

检测CK19 mRNA、CEA mRNA 诊断非小细胞肺癌外周血微转移

朱广迎 刘德林 王绪 陈杰

【摘要】 目的 探讨检测细胞角蛋白(cytokeratin 19, CK19) mRNA、癌胚抗原(cancer embryonic antigen, CEA) mRNA 诊断非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC) 患者外周血微转移的临床意义。方法 应用 RT-PCR 法检测 35 例 NSCLC 患者外周血中的 CK19 mRNA、CEA mRNA, 并以 20 例良性病变、20 例健康人作对照。结果 35 例 NSCLC 患者外周血 CK19 mRNA、CEA mRNA 阳性表达率分别为 40% 和 57%, 两者均阳性者 40%, 两者均阴性者 43%; 肺良性疾病患者 20 例, CK19 mRNA 阳性 2 例(10%), 无 CEA mRNA 阳性者; 20 例健康对照 2 个指标检测结果均为阴性。随访发现 CK-19 mRNA 阳性、CEA mRNA 阳性和二者均阴性患者的远处转移率分别为 50%、56% 和 27%。结论 CEA mRNA 和 CK19 mRNA 是检测肺癌患者外周血微转移的良好标志物, 检测外周血微转移有助于预测肺癌患者预后。

【关键词】 RT-PCR 肺肿瘤 微转移 CEA mRNA CK19 mRNA

【中图分类号】 R734.2

Detection of CK19 and CEA mRNA expression for the diagnosis of peripheral blood micrometastases in patients with non-small cell lung cancer ZH U Guangying, LI U Delin, WANG Xu, CHEN Jie. Department of Radiation Oncology, Cancer Institute, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, P. R. China

Corresponding author: ZHU Guangying, E-mail: zgypu@263.net, zhyzgy@21cn.net

【Abstract】 Objective To explore the sensitivity and clinical significance of detection of CK19 mRNA and CEA mRNA expression for the diagnosis of micrometastases in the peripheral blood of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Nested reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect CK19 mRNA and CEA mRNA in the peripheral blood of 35 patients with NSCLC. Twenty patients with pulmonary benign lesions and 20 normal healthy volunteers were served as controls. **Results** The positive rates of CK19 mRNA and CEA mRNA for NSCLC patients were 40% (14/35) and 57% (20/35) respectively, 14 cases (40%) were positive for both mRNA, and 15 cases (43%) were both negative for both mRNA. No blood samples from patients with pulmonary benign lesions was positive for CEA mRNA, but 2 samples (10%) were positive for CK19 mRNA. Of these 20 samples from normal volunteers, none was positive for both CK19 mRNA and CEA mRNA. The distant metastasis rate of patients with positive CK-19 mRNA, positive CEA mRNA and both negative in the peripheral blood were 50%, 56% and 27% respectively. **Conclusion** Both CK-19 mRNA and CEA mRNA are good markers to detect micrometastasis in the peripheral blood of patients with NSCLC. Detection of CK19 and CEA mRNA expression might be helpful to predict the prognosis of patients with lung cancer.

【Key words】 RT-PCR Lung neoplasms Micrometastasis CEA mRNA CK19 mRNA

This work was supported by Science Foundation of Health Bureau of Jiangsu Province (to ZHU Guangying) (No. Z9709).

恶性肿瘤治疗的关键在于防治转移, 在临床实践中常发现部分接受根治性放射治疗或手术的肺癌患者

在治疗过程中或治疗后短期内出现了远处转移^[1~3], 这提示患者在接受手术或放疗前可能已经有亚临床转移或微转移的存在。近年来, 癌胚抗原(cancer embryonic antigen, CEA) mRNA 和细胞角蛋白(cytokeratin 19, CK19) mRNA 逆转录多聚酶链反应(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) 方法被用

本研究受江苏省卫生厅科研(Z9709)资助

作者单位: 221002 徐州医学院肿瘤研究所放疗科(通讯作者: 朱广迎)
现在北京大学临床肿瘤学院北京肿瘤医院放疗科, 邮编 100036, E-mail: zgypu@263.net, zhyzgy@21cn.net

于检测存在于血液、骨髓和淋巴结中的微转移^[4,5], 本研究旨在比较 CEA mRNA 和 CK19 mRNA RT-PCR 的敏感性和特异性, 以筛选出非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 血行微转移的基因标志。

1 材料与方法

1.1 病例 NSCLC 患者 35 例, 肺部良性疾病患者 20 例, 均为外科手术病例, 术后病理确定诊断。所有肺癌病例均来源于 2000 年 9 月 1 日至 2001 年 12 月 30 日间徐州医学院附属医院住院患者。另收集 20 例健康人外周血标本作为对照。

1.2 试剂和引物设计 逆转录试剂盒购自 Gibco 公司, DEPC (焦炭酸二乙酯) 购自 Amresco 公司, Trizol 为 MBI 公司产品, 淋巴细胞分离液为上海恒信化学试剂有限公司产品, Taq 酶、DNA Marker 购自 Sangon 公司, 6-mer primers、dNTPs、EB、琼脂糖为华美公司产品。

参考文献 6、7 设计 CK19 及 CEA 特异性引物序列, 由 sangon 公司合成。CK19 上下游引物分别为: 5'-AGGTGGATTCCGCTCCGGCA-3', 5'-ATCTTCCTGTCCCTCGAGCA-3', 扩增片段长度为 460 bp。CEA 引物序列: CEA-A 5'-TCTGGAACCTTCTCCTGGTCTCTCAGCTGG-3', CEA-B 5'-TGTAGCTGTTGCAAATGCTTTAAGAAGAAG-3', CEA-C 5'-GGGCCACTGTGCGATCATGATTGG-3'。采用 A、B 引物对可以扩增 160 bp 片段, 采用 B、C 引物对可以扩增 131 bp 片段。另设计看家基因 3 磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 基因作为内参照, 其上下游引物序列分别为: 5'-CGGAGTCAACGGATTGGTCGTAT-3', 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAG-3', 扩增 306 bp 片段^[8]。

1.3 标本的收集与总 RNA 的抽提 对所有患者于治疗前抽取新鲜肝素抗凝血 3~5 ml, 用淋巴细胞分离液进行有核细胞的分离, Trizol 试剂溶解细胞, 硫氰酸胍-酚-氯仿一步法抽提总 RNA^[9]。对所抽提的总 RNA 用紫外分光光度计定量, 并行 1% 琼脂糖凝胶电泳观察。

1.4 cDNA 第一链合成 取样品总 RNA 约 2 μg 加入 20 μl 反应体系中按照试剂盒提供的条件进行逆转录。

1.5 CK19 mRNA 和 CEA mRNA RT-PCR 条件的优化 取预先扩增证实为 CK19 阳性样本的逆转录产物进行相同体系不同循环数 (21 24 27 30 33 36) 扩

增, 各取 5 μl 产物于 1.7% 琼脂糖凝胶上电泳, 以 CK19/GAPDH 荧光比值对循环数作图, 选择最适循环数。取同一阳性样本逆转录产物 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 μl 分别作模板进行 PCR 扩增, 产物进行 1.7% 琼脂糖凝胶电泳, 以 CK19/GAPDH 荧光比值对模板量作图, 选择最适模板量。

采用类似的方法确定 CEA mRNA 模板量、循环数对 RT-PCR 产物数量的影响。

1.6 PCR 反应 按照文献 6、7 报道方法, 结合实验选择条件进行, 具体反应条件分列如下: CK19 一步 PCR 反应体系 25 μl, 其中 10× buffer 3 μl, Taq 酶 1 U, 四种 dNTPs 各 200 μmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, CK19 上下游引物各 1.2 mmol/L, GAPDH 上下游引物各 0.8 mmol/L。反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 接以 30 循环 95℃, 30 s; 63℃, 1 min; 72℃, 1 min; 最后 72℃ 补延伸 5 min, 冰上冷却。

CEA mRNA RT-PCR 与上述条件类似。

1.7 PCR 产物分析 CK19 扩增产物 5 μl 加上样缓冲液 1 μl 或 CEA 两轮扩增产物各 5 μl 混匀加上样缓冲液 1 μl, 于 1.7% 琼脂糖凝胶上电泳, 80 V 恒压, 60 min, EB 染色, 在 UVP 凝胶成像系统 (英国 UVP 公司生产) 下摄片, 测量荧光强度。

1.8 随访统计 手术后开始随访各组患者的远处转移率, 转移的判定以计算机断层扫描 (computed tomography, CT)、磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 为准, 临床症状、单光子发射计算机断层扫描 (single photon emission computed tomography, SPECT) 结果为参考依据。

1.9 统计学处理 χ^2 检验比较组间差异。

2 结果

2.1 总 RNA 鉴定 实验中所抽提总 RNA OD260/OD280 值在 1.65~1.88 之间, 外周血提取总 RNA 量约 50~100 μg, 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色可见 28 s、18 s 亮带。

2.2 CK19 mRNA、CEA mRNA RT-PCR 检测 各组患者外周血微转移癌细胞的比较 35 例 NSCLC 患者、20 例肺部良性疾病患者、20 例健康对照外周血检测结果如表 1, NSCLC 患者的 CK19 mRNA 和 CEA mRNA 阳性率显著高于肺部良性疾病患者和健康对照组 ($P < 0.05$)。图 1 为 7 例 NSCLC 患者外周血中 CK19 mRNA 和 CEA mRNA 检测结果。CK19 mRNA 和 CEA mRNA 均阳性的 NSCLC 患者为 14 例 (40%), 15 例 (43%) 为均阴性者 6 例为单纯 CEA mRNA 阳性。

NSCLC 患者的 CEA mRNA 阳性率为 57% (20/35), 高于 CK19 mRNA 阳性率(40%, 14/35), 但差异无显著性。外周血检测时临床诊断远处转移的 8 例患者外

周血的 CK19 mRNA RT-PCR 和 CEA mRNA RT-PCR 检测结果均为阳性。

表 1 各组患者外周血 CK19 mRNA、CEA mRNA 表达阳性率比较

Tab 1 Comparison of CK19 mRNA and CEA mRNA expression of peripheral blood of patients among different groups

Group	No. of patients	No. of patients with CK19 mRNA expression	No of patients with CEA mRNA expression	No of patients with CEA mRNA or CK19 mRNA expression
NSCLC	35	14(40%)	20(57%)	20(57%)
Pulmonary benign diseases	20	2(10%)*	0(0)**	2(10%)***
Health control	20	0(0)	0(0)	0(0)

Compared to NSCLC group: * $\chi^2=4.19, P<0.05$; ** $\chi^2=15.57, P<0.005$, *** $\chi^2=9.90, P<0.005$

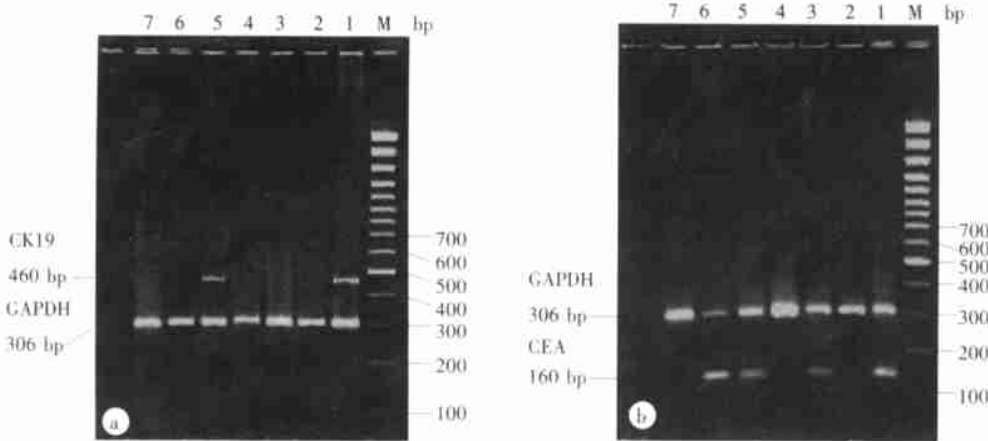


图 1 7 例 NSCLC 患者外周血 CK19 mRNA(a) 与 CEA mRNA(b) 检测结果

M 为 DNA 分子量标记, 病例 1、5 两个指标检测均为阳性, 病例 2、4、7 检测均为阴性, 病例 3、6 CK19 检测阴性, 而 CEA 检测阳性

Fig 1 Results of CK19, CEA expression in peripheral blood of patients with NSCLC

M: molecular marker. Case 1 and case 5 expressed both CK19 mRNA and CEA mRNA. Case 2, case 4 and case 7 did not express either CK19 mRNA or CEA mRNA. Case 3 and case 6 expressed CEA mRNA, but did not express CK-19mRNA

2.2 随访结果 35 例中失访 2 例, 随访率为 94%。随访时间为 1~2 年。CK19 mRNA、CEA mRNA 阳性患者远处转移发生率分别为 50% (7/14)、56% (10/18), 经统计学处理后其差异无显著性($P>0.05$), 但阳性患者的远处转移发生率均高于两指标皆阴性患者的发生率(27%, 4/15) ($P<0.05$)。

3 讨论

在肿瘤的治疗中, 目前困扰临床医生的主要问题仍是肿瘤的复发与转移^[10]。近年来, 随着分子生物学技术的进展, RT-PCR 技术已被用于检测实体瘤微转移细胞中特殊 mRNA 的表达。该方法具有很高的敏感性, 每 $10^5 \sim 10^7$ 个正常有核细胞中含 1~10 个癌细胞即可检测出来^[11], 但对该方法的特异性仍有争论。

根据本实验室建立的 RT-PCR 方法和优化条件, 在检测 CK19 mRNA 和 CEA mRNA 表达时, 本实验

发现 20 例健康对照外周血的两个标记物检测均为阴性, 20 例良性肺部疾病 CK19 mRNA 阳性率为 10% (2/20), 而无一例 CEA mRNA 阳性, 说明 CEA mRNA RT-PCR 的特异性高于 CK19 mRNA RT-PCR, 提示临床检测合并肺部良性病变的肺癌患者有远处转移时宜选择 CEA mRNA RT-PCR, 避免少数假阳性结果。35 例 NSCLC 患者外周血 CK19 mRNA、CEA mRNA RT-PCR 阳性率分别为 40% (14/35) 和 57% (20/35), 说明 CEA mRNA、CK19 mRNA 检测的敏感性优于临床检查, 前者的敏感性高于后者。同时术后随访证明, CEA mRNA、CK19 mRNA 阳性患者出现远处转移的发生率明显高于阴性患者。

总之, 本研究结果证明 CEA mRNA、CK19 mRNA 是 NSCLC 患者远处转移的良好预后标志, 而且 CEA mRNA 的敏感性、特异性优于 CK19 mRNA, 为今后应用于临床提供了依据。

志谢 本研究过程中得到徐州医学院附属医院胸外科大力支持,特此致谢

参 考 文 献

- 1 Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest*, 1997, 111(6): 1710-1717.
- 2 Park BJ, Altorki NK. Diagnosis and management of early lung cancer. *Surg Clin North Am*, 2002, 82(3): 457-476.
- 3 Davies A, Gandam DR, Lara P, et al. Current and future therapeutic approaches in locally advanced (stage III) non-small cell lung cancer. *Semin Oncol*, 2002, 29(3 Suppl 12): 10-16.
- 4 Salerno CT, Frizelle S, Niehans GA, et al. Detection of occult micrometastases in non-small cell lung carcinoma by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Chest*, 1998, 113(6): 1526-1532.
- 5 Jiao X, Krasna MJ. Clinical significance of micrometastasis in lung and esophageal cancer: a new paradigm in thoracic oncology. *Ann Thorac Surg*, 2002, 74(1): 278-284.
- 6 Noguchi S, Aihara T, Motomura K, et al. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase polymerase chain reaction. Comparison between MUC1 mRNA and keratin 19 mRNA amplification. *Am J Pathol*, 1996, 148(2): 649-656.
- 7 Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, et al. Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol*, 1994, 12(4): 725-729.
- 8 Toyota M, Ho C, Ahuja N, et al. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res*, 1999, 59(10): 2307-2312.
- 9 Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162(1): 156-159.
- 10 Hashimoto T, Kobayashi Y, Ishikawa Y, et al. Prognostic value of genetically diagnosed lymph node micrometastasis in non-small cell lung carcinoma cases. *Cancer Res*, 2000, 60(22): 6472-6478.
- 11 Braun S, Pantel K. Micrometastatic bone marrow involvement: detection and prognostic significance. *Med Oncol*, 1999, 16(3): 154-165.

(收稿: 2002-10-14 修回: 2003-01-18)

(本文编辑 张世雯)

• 会议消息 •

2004 亚太地区国际肿瘤生物学和医学 暨第 21 届国际肿瘤标志物学术会议第二轮征文通知

为了促进世界各地肿瘤生物学研究相关领域的交流与合作,由中国抗癌协会肿瘤标志物专业委员会、中华医学会微生物与免疫学分会、国际肿瘤标志物委员会、国际抗癌联盟主办,第四军医大学·国家 863 计划西安细胞工程基地、陕西省肿瘤医院承办的“2004 亚太地区国际肿瘤生物学和医学(2004 Asian Pacific Conference of Tumor Biology and Medicine)暨第 21 届国际肿瘤标志物学术会议(21st International Academy of Tumor Marker Oncology Conference)”将于 2004 年 8 月 21 日至 25 日在西安召开。这是我国肿瘤生物学领域的一次重大盛会,会议将邀请诺贝尔医学奖获得者美国弗雷德·哈钦森癌症研究中心 Leland H·Hartwell 教授,欧美两院院士美国爱因斯丹医科大学病理学院 Janis V·Klavins 教授,美国匹兹堡大学医学院 Olivera J·Finn 教授,奥地利格拉茨大学 George D·Birkmayer 教授,美国荷克生命科学研究院 C·Channa Reddy 教授,澳大利亚奥斯特丁研究中心 Ian·F·C Mckenzie 教授,中国两院院士孙燕、汤钊猷、吴、吴孟超、吴祖泽、杨胜利、饶子和、姚开泰、郝希山、徐光炜、顾健人、黄翠芬、程书钧、曾毅、甄永苏、樊代明、魏于全等国内外著名专家教授报告当今肿瘤基础与临床研究的最新成果与发展趋势。此外,我们还将邀请工作在肿瘤预防、诊断与治疗第一线中青年专家参加会议并介绍实际工作经验。会议将授予与会者国家 I 类医学继续教育项目(编号 2004-02-08-001)学分 10 分。大会组委会热烈欢迎您莅临西安出席本届学术盛会并提交学术论文,所有征文(全文或摘要)均须为未经正式公开发表的文稿。征文一律以英文书写(全文 3000~5000 字,摘要 500 字左右)并附中文对照稿。中文作为审稿的参考,英文稿作为大会正式征文。所有文稿请采用 Word 文件格式, A4 纸排版。字体全部用 Times New Roman, 字号为 5 号。所有投稿均须填写论文摘要表。

通讯联系: 710032 陕西省西安市长乐西路 17 号第四军医大学细胞工程研究中心会议筹备组 赵岩、张思珂、邢金良

电话: 029-83374573 传真: 029-83293906

E-mail: chcerc3@fmmu.edu.cn

Web: <http://www.xjccrc.com>

中国肺癌杂志
www.lungca.org