

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2004.03.07

• 临床研究 •

检测CK19 mRNA和MUC1 mRNA 诊断非小细胞肺癌淋巴结微转移

牛中喜 周清华 孙芝琳 孙泽芳 朱文 王艳萍 车国卫 秦建军 陈晓禾

【摘要】 目的 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)淋巴结微转移的基因诊断方法,并分析CK19 mRNA、MUC1 mRNA作为肺癌微转移检测分子标志物的可行性。方法 应用巢式逆转录聚合酶链反应(nested RT-PCR),对31例NSCLC的119枚淋巴结中的粘蛋白1(MUC1) mRNA、角蛋白19(CK19) mRNA表达情况进行检测;对照组为10例肺良性病变患者的35枚淋巴结。结果 31例NSCLC患者的119枚淋巴结中,66枚(55.5%)淋巴结存在CK19 mRNA阳性表达,65枚(54.5%)存在MUC1 mRNA阳性表达;肺良性病变患者35枚淋巴结中CK19 mRNA和MUC1 mRNA表达均为阴性,与肺癌组比较均有显著性差异。结论 MUC1、CK19基因均可作为RT-PCR法检测NSCLC患者淋巴结微转移的分子标志物,两者联合检测可能有助于早期诊断肺癌转移。

【关键词】 非小细胞肺癌 淋巴结微转移 分子诊断 MUC1基因 CK19基因

【中图分类号】 R734.2

Detection of mRNA expression of CK19 and MUC1 gene for diagnosis of lymph node micrometastasis in NSCLC patients by reverse transcriptase polymerase chain reaction NIU Zhongxi, ZHOU Qinghua, SUN Zhilin, SUN Zhefang, ZHU Wen, WANG Yanping, CHE Guowei, QIN Jianjun, CHEN Xiaohu. Key Laboratory of Lung Cancer Molecular Biology of Sichuan Province, Department of Thoracic Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, P. R. China

Corresponding author: ZHOU Qinghua, E-mail: zhouqh@mail.sc.cninfo.net

【Abstract】 Objective To investigate gene diagnosis of micrometastasis in lymph nodes in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and the feasibility of mucin 1 (MUC1) mRNA and cytokeratin 19 (CK19) mRNA as molecular marker to detect micrometastasis of lung cancer. **Methods** Expression of MUC1 mRNA and CK19 mRNA was detected in 119 lymph nodes taken from 31 patients with NSCLC, 35 lymph nodes from 10 patients with pulmonary benign diseases as controls by nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** In the 119 lymph nodes from lung cancer patients, CK19 mRNA expression was detected in 66 lymph nodes (55.5%) and MUC1 mRNA expression was detected in 65 lymph nodes (54.5%) by RT-PCR. Neither CK19 mRNA nor MUC1 mRNA expression was observed in all the 35 lymph nodes in the benign pulmonary lesion group. **Conclusion** The results suggest that the detection of both MUC1 and CK19 mRNA might be helpful to diagnose NSCLC micrometastasis in lymph nodes. The establishment of this method may lead to an earlier diagnosis of metastasis for lung cancer.

【Key words】 Non-small cell lung cancer Lymph node micrometastasis Molecular diagnosis MUC1 gene CK19 gene

This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China (to ZHOU Qinghua) (No. 30070333).

非小细胞肺癌患者肺门和纵隔淋巴结的转移与否,是其预后最重要的指标之一。伴有淋巴结转移的

患者极易复发和远处转移,术后一般需要辅助化疗;无淋巴结转移的患者预后较好。HE(hematoxylin and eosin)染色是诊断淋巴结转移的常用方法,但其漏诊率高达10%~30%^[1]。近几年来,RT-PCR方法被应用于肺癌淋巴结微转移的诊断^[2,3],检测在癌组织中表达而在淋巴结中表达的基因。组织特异性标志物及

本研究受国家自然科学基金(30070333)资助

作者单位:610041 成都,四川大学华西医院四川省肺癌分子重点实验室、胸外科(通讯作者:周清华, E-mail: zhouqh@mail.sc.cninfo.net)(牛中喜现在武警总医院胸外科)

其基因只在特定的组织中表达,如角蛋白 19(cytokerin 19, CK19) 和粘蛋白 1(mucin 1, MUC1) 仅在上皮组织中表达,如果在间质组织中扩增出 CK19 和 MUC1 基因的表达,则表明有上皮源性肿瘤细胞播散到间质组织中。本研究选择上皮组织特异性基因 CK19 和 MUC1 作为分子标志物检测了 31 例非小细胞肺癌(NSCLC) 患者的淋巴结微转移,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 研究对象 本研究对象为 NSCLC 患者淋巴结标本,取自四川大学华西医院胸心外科 2002 年 5 月至 2002 年 12 月接受手术治疗的部分患者,共 31 例,其

中男性 21 例,女性 10 例; I + II 期 22 例, III+ IV 期 9 例。同期采取 10 例肺良性病变患者 35 枚淋巴结。两组患者术后经病理组织学检查确诊。

1.2 主要试剂 异硫氰酸胍、焦碳酸二乙酯、乙醇、十二烷基胍酸钠(Sarcosyl)、醋酸钠、柠檬酸三钠、氯仿、异戊醇、β- 巯基乙醇、异丙醇均购自华美生物公司; 逆转录 PCR 试剂盒购自美国 Promega 公司; DNA Marker(DL2000) 购自成都天泰生命科技公司。

1.3 引物的设计与合成 引物由北京赛百盛生物工程公司合成。参照 CK19 基因序列设计引物^[4,5], MUC1 基因序列设计引物(A、C 为外引物, B、D 为内引物)^[6], β-actin 基因序列^[7]设计引物(E)(表 1)。

表 1 CK19、MUC1 及 β-actin 基因引物序列

Tab 1 Primers for RT-PCR amplification of CK19 mRNA, MUC1 mRNA and β-actin mRNA

mRNA		Product size(bp)	Primer
CK19	A	1069	5'-AAGCTAACCATGCAGAACCTCAACGACCGG-3' 5'-TTATTGGCAGGTCAGGAGAAGAGCG-3'
	B	745	5'-TCCC CGACTACAGCCACTACTACAGCAGC-3' 5'-CGCGACTTGATGTCCATGAGCCGCTGGTAG-3'
MUC1	C	510	5'-ATGCCAGTAGCACTCACCATAG-3' 5'-CAGCCAAGGCAATGAGATAGAC-3'
	D	287	5'-CGTCGTGGACATTGATGTAGC-3' 5'-GGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAA-3'
β-actin	E	154	5'-TCATCACCATTGGCAATGAG-3' 5'-CACTGTGTTGGCGTACAGGT-3'

1.4 标本收集及总 RNA 提取 取研究对象的癌组织和淋巴结各 100 mg 左右,置于液氮罐中- 190℃速冻,- 80℃保存。总 RNA 的提取采用异硫氰酸胍-酚氯仿一步法^[8]。

1.5 RNA 的鉴定 总 RNA 经紫外光分光测定,并行 1% 琼脂糖凝胶电泳观察。

1.6 RT-PCR 逆转录试剂盒一步法 PCR 按照 Promega 试剂盒说明进行;巢式逆转录聚合酶链反应(nested RT-PCR) 参照周清华等^[9]方法。

1.7 PCR 扩增产物鉴定 配制 1% 琼脂糖凝胶,产物电泳,经溴化乙啶(EB) 显色得到特异性条带者为阳性检出。CK19 cDNA 特异性条带为 745 bp, MUC1 cDNA 为 287 bp, β-actin 为 154 bp。

1.8 灵敏度实验 取 A549 肺癌细胞依次稀释浓度至 1 × 10⁹/L, 1 × 10⁸/L, 1 × 10⁷/L, 1 × 10⁶/L, 1 × 10⁵/L, 1 × 10⁴/L 和 1 × 10³/L, 分别加入到 1 × 10⁶ 个正常淋巴结细胞中。提取细胞 RNA(参照改良一步法^[10])

1.9 统计学处理 采用 x² 检验,所有数据经 SPSS10.0 软件包统计处理。

2 结果

2.1 总 RNA 鉴定 采用异硫氰酸胍-酚氯仿一步法提取组织及淋巴结 RNA, OD260/OD280 > 1.75, 经过 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 18S 和 28S 条带清晰可见(图 1)。

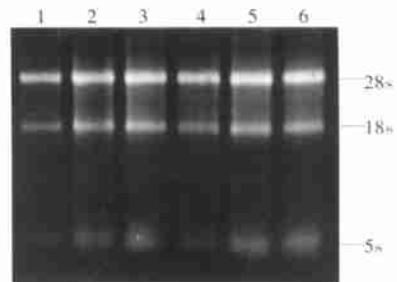


图 1 总 RNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig 1 Agarose electrophoresis of total RNA
1-3: Lung cancer tissue; 4-6: Lymph node sample

作 MUC1 mRNA 和 CK19 mRNA 的 RT-PCR 分析

2.2 灵敏度检测 实验发现 CK19 mRNA 和 MUC1 mRNA RT-PCR 分析的灵敏度均可达到 10 000 个癌细胞/L, 而 1 000 个癌细胞/L 的细胞悬液未检测出 MUC1 的阳性表达(图 2、3)。

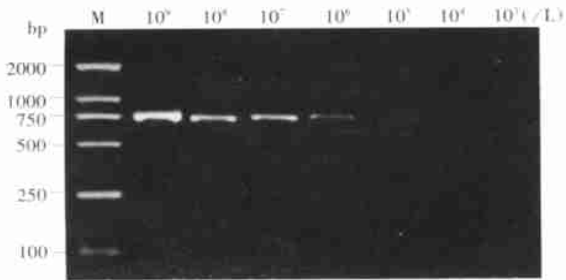


图 2 CK19 mRNA 灵敏度实验结果

Fig 2 Sensitivity test of the RT-PCR method for detection of micrometastasis of lung cancer by CK19 mRNA

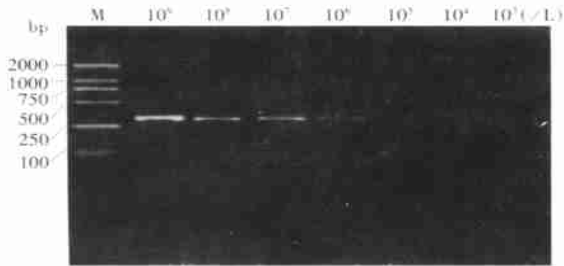


图 3 MUC1 mRNA 灵敏度实验结果

Fig 3 Sensitivity test of the RT-PCR method for detection of micrometastasis of lung cancer by MUC1 mRNA

2.3 NSCLC 组织和淋巴结中 CK19、MUC1 mRNA 的表达 CK19、MUC1 mRNA 在 31 例 NSCLC 组织中均为阳性表达; 31 例 NSCLC 患者的 119 枚淋巴结中有 66 枚(55.5%) 表达 CK19, 65 枚(54.6%) 表达 MUC1, CK19 和 MUC1 均为阳性者有 58 枚(图 4、5)。10 例肺良性病变患者的 35 枚淋巴结均无 CK19、MUC1 表达。

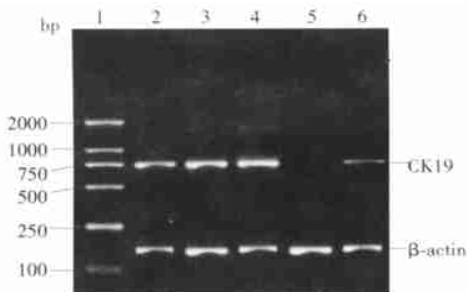


图 4 肺癌患者肺癌组织和淋巴结中 CK19 mRNA 的 RT-PCR 结果

Fig 4 RT-PCR analysis of CK19 mRNA in cancer tissue and lymph nodes from patient with lung cancer

1 DNA marker; 2 Lung tissue; 3-6 Lymph nodes

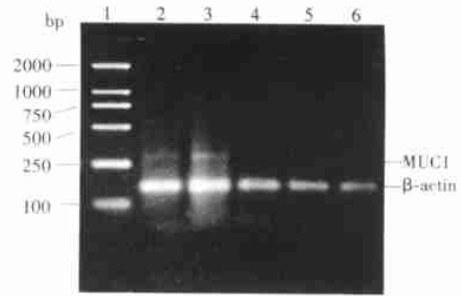


图 5 肺癌患者肺癌组织和淋巴结中 MUC1 mRNA 的 RT-PCR 结果

Fig 5 RT-PCR analysis of MUC1 mRNA in pulmonary tissue and lymph nodes from patient with lung cancer

1, DNA marker; 2, Lung tissue; 3-6, Lymph nodes

2.4 常规病理方法和 RT-PCR 法检测肺癌淋巴结转移的比较 RT-PCR 法和常规病理方法同时检测 119 枚手术切除的淋巴结标本, RT-PCR 检测出 66 枚淋巴结存在 CK19 mRNA 阳性表达(55.5%), 65 枚淋巴结存在 MUC1 mRNA 阳性表达(54.6%), HE 检测出 41 枚淋巴结存在转移, RT-PCR 法与常规病理方法比较有显著性差异($P < 0.01$) (表 2)。CK19 mRNA 和 MUC1 mRNA 在淋巴结中的阳性率比较无统计学差异($P > 0.05$)。HE 染色阴性的 78 枚淋巴结中, 经 RT-PCR 法证实 25 枚存在 CK19 mRNA 阳性表达(32.1%, 25/78), 24 枚淋巴结存在 MUC1 mRNA 阳性表达(30.8%, 24/78), RT-PCR 法优于常规病理学方法。

表 2 常规病理方法和 RT-PCR 法检测肺癌淋巴结转移的比较

Tab 2 Comparison of positive rate of lymph node metastasis

Groups	N	Micrometastasis		Positive rate(%)
		+	-	
RT-PCR				
CK19	119	66	53	55.5
MUC1	119	65	54	54.6
HE staining				
	119	41	78	34.5

CK19 vs HE, $P < 0.01$; MUC1 vs HE, $P < 0.01$

2.5 淋巴结微转移与肺癌临床病理生理特征的关系

淋巴结微转移与患者年龄、性别、是否吸烟、原发肿瘤大小肿瘤部位等均无明显关系($P > 0.05$), 而与肺癌组织学类型、细胞分化程度、P-TNM 分期有密切关系($P < 0.05$) (表 3)。

3 讨论

国内外大量研究表明 肺癌患者总的生存率较低

表 3 淋巴结微转移与肺癌临床病理生理特征的关系

Tab 3 The relationship between the CK19 mRNA expression in lymph node and clinicopathologic characteristics of patients with lung cancer

Characteristic	N	Lymph node OMs		P
		+	-	
Age				> 0.05
< 55	8	3	5	
≥55	23	19	4	
Sex				> 0.05
Male	21	14	7	
Female	10	8	2	
Smoking history				> 0.05
Yes	16	12	4	
No	15	10	5	
Primary tumor				> 0.05
T1+ T2	21	14	7	
T3+ T4	10	8	2	
Location				> 0.05
Center	10	6	4	
Periphery	21	16	5	
Histologic classification				< 0.05
Other NSCLC	19	12	7	
Adenocarcinoma	12	10	2	
Differentiation				< 0.05
Poor	15	10	5	
Moderate+ Well	16	12	4	
Stage				< 0.05
I + II	22	13	9	
III+ IV	9	9	0	

的主要原因是肿瘤的复发和转移,特别是肺癌微转移。在常规组织学检查阴性的淋巴结中,肺癌的微转移检测率达到 61.1% (11/18)^[11]。

在肺癌微转移的检测中,目前尚缺乏公认的分子标志物。本研究应用了巢式 RT-PCR 方法,发现 NSCLC 组织均有 MUC1 mRNA 和 CK19 mRNA 的表达。这一结果与先前的报道相符合^[9,12]。另一方面,阴性对照组中均未发现 MUC1 mRNA、CK19 mRNA 的表达。综合上述结果,我们认为 MUC1 mRNA、CK19 mRNA 符合分子标志物的标准。

从本研究结果看,运用 RT-PCR 技术检测肺癌患者淋巴结的微转移,较常规病理组织检查技术敏感性显著增高。作为分子标志物,CK19 mRNA 和 MUC1 mRNA 的比较无统计学意义,联合检测 CK19 mRNA 和 MUC1 mRNA 比单独检测优越,如果考虑时间或经济等问题,单独检测 CK19 mRNA 或 MUC1 mRNA 也是可行的。

对肺癌淋巴结转移与患者临床病理生理特征的相关性目前尚无定论 日本学者 Sakao 等^[13]报道肺

癌淋巴结转移与患者年龄、性别、吸烟史、原发肿瘤大小、肿瘤病理类型、细胞分化程度等临床特征无明显相关性,但是与患者肿瘤位置呈一定的相关关系,中央型肺癌出现淋巴结转移的可能性明显高于周围型肺癌,两者之间差异具有显著性($P < 0.05$)。Passlick 等^[14]亦认为肺癌淋巴结转移与肿瘤位置明显相关,在观察的病例中 89.4% (101/113) 的中央型肺癌患者存在淋巴结转移,而周围型肺癌患者中仅有 62.9% (102/162) 存在淋巴结转移,二者比较具有显著性差异 ($P < 0.05$)。同时发现淋巴结转移与细胞分化程度也存在密切关系,低分化肺癌中淋巴结转移率为 87.2% (82/94),而中分化肺癌和高分化肺癌的转移率分别为 61.7% (66/107) 和 54.1% (40/74),三者之间差异具有显著性 ($P < 0.05$)。本研究对肺癌患者淋巴结微转移与患者年龄、性别、吸烟史、原发肿瘤大小、肿瘤位置、细胞分化程度、肿瘤类型及 P-TNM 分期等特征进行了统计分析,结果显示:肺癌患者淋巴结微转移与肺癌组织学类型,细胞分化程度和 P-TNM 分期有密切关系 ($P < 0.05$),而与原发肿瘤大小、部位、患者性别、年龄、吸烟史等均无明显关系 ($P > 0.05$)。

综上所述,运用 RT-PCR 技术检测 CK19 mRNA 或 MUC1 mRNA,可以发现肺癌患者淋巴结的微转移,该技术敏感性、灵敏度均显著高于常规病理组织技术,不仅能提高淋巴结转移的检出率,并可为指导患者术后多学科综合治疗提供理论基础和实验依据。

参 考 文 献

- Gusterson B. Are micrometastases clinically relevant? Br J Hosp Med, 1992, 47(4): 247-248.
- Pantel K, Izbicki J, Passlick B, et al. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small cell lung cancer without overt metastases. Lancet, 1996, 347 (9002): 649-653.
- Passlick B, Izbicki JR, Kubuschok B, et al. Detection of disseminated lung cancer cells in lymph nodes: impact on staging and prognosis. Ann Thorac Surg, 1996, 61(1): 177-182; discussion 183.
- Quinlan RA, John L, Frank WW, et al. Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. In: Edd W, Fischman D, Liem K (eds). Intermediate Filaments. New York: The New York Acad Sci 1985, 285-306.
- Bader BL, Jahn L, Franke WW. Low level expression of cytokeratins 8, 18 and 19 in vascular smooth muscle cells of human umbilical cord and in cultured cells derived therefrom, with an analysis of the chromosomal locus containing the cytokeratin 19 gene. Eur J Cell Biol, 1988, 47(2): 300-319.
- Lancaster CA, Peat N, Duhig T, et al. Structure and expression of the human polymorphic epithelial mucin gene: an expressed VN-

- TR unit. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 173(3): 1019-1029.
- 7 Nakajima Iijima S, Hamada H, Reddy P, et al. Molecular structure of the human cytoplasmic beta-actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985, 82(18): 6133-6137.
 - 8 Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162(1): 156-159.
 - 9 Zhou QH, Gong YL, Qin Y, et al. Clinical significance of molecular diagnosis of micrometastasis in lymph nodes, peripheral blood and bone marrow in the treatment of patients with non-small cell lung cancer. *Chin J Lung Cancer*, 2001, 4(6): 435-439. [周清华, 宫友陵, 覃杨, 等. 非小细胞肺癌患者淋巴结、外周血、骨髓微转移分子诊断在肺癌外科治疗中的作用. *中国肺癌杂志*, 2001, 4(6): 435-439.]
 - 10 Izraeli S, Pfleiderer C, Lion T. Detection of gene expression by PCR amplification of RNA derived from frozen heparinized whole blood. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(21): 6051.
 - 11 Krismann M, Todt B, Schroder J, et al. Low specificity of cytokerin 19 reverse transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of hematogenous lung cancer dissemination. *J Clin Oncol*, 1995, 13(11): 2769-2775.
 - 12 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.
 - 13 Sakao Y, Hata E, Miyamoto H, et al. Prognosis and prognostic factor after extended lymphadenectomy in lung cancer. *Nippon Kyoku Geka Gakkai Zasshi*, 1997, 45(5): 711-717.

(收稿: 2003-06-18 修回: 2003-08-20)

(本文编辑 张世雯)

• 作者 • 编者 • 读者 •

我刊为何采用中英文对照形式著录参考文献?

从今年起, 我刊刊登的论著类稿件开始采用中英文对照形式著录参考文献, 许多作者认为这是无聊的事, 不仅浪费时间, 而且也增加了工作量, 但从长远来看, 以中英文对照形式著录参考文献是大势所趋。随着全球一体化, 我国的科技期刊需要走出国门, 进入国际市场, 倘若只采用母语出版科技期刊, 是无法让其走出国门的, 因为语言的障碍, 不懂汉语的读者不可能阅读这些科技期刊中刊登的稿件, 更不用说引用这些稿件, 与国外科技界进行学术交流只能是一纸空谈, 国际检索系统自然也不可能收录这样的科技期刊。目前英语已成为一种国际语言, 越来越多的非英语国家开设了英文课程, 人们的英语水平较以前有了大幅度提高, 特别是科技工作者的英语读写能力均显著增强。为了达到国际交流的目的, 我国多数的科技期刊采用了中英文对照形式, 具体表现为应用中英文目录、中英文摘要、中英文图表及中英文参考文献, 个别有实力的科技期刊甚至出版了英文版, 如中华医学杂志(英文版) *Chinese Medical Journal*, 生物医学与环境科学(英文版) *Biomedical and Environmental Sciences*, 中国癌症研究(英文版) *Chinese Journal of Cancer Research*, 中国药理学报(英文版) *Acta Pharmacologica Sinica*, 世界胃肠病学杂志(英文版) *World Journal of Gastroenterology* 等, 这些科技期刊已逐渐成为我国科技界与国际科技界学术交流的桥梁, 而且也提高了我国科学技术和科技期刊在国际上的影响力。近年来我国的科技期刊被国际著名检索系统收录的数目在不断增加, 而这与科技期刊刊登英文目录和英文摘要等有着密不可分的关系。中英文对照的应用对促进我国科技期刊进入国际科技信息交流网起到了积极的作用, 同时也促进了我国科技期刊更多地进入国际市场和国际检索系统, 扩大了国际影响。

自创刊以来, 我刊便采用了中英文目录、中英文摘要和中英文图表, 国内外的读者和作者对此都比较认同, 用中英文对照形式著录论著类稿件的参考文献可以进一步提高论著类稿件的可读性和科学性, 同时也为读者特别是国外读者的查验、检索等提供方便。目前我刊只是对论著类稿件的参考文献采用中英文对照形式著录, 今后我刊还将扩大其应用范围, 将述评、临床经验、综述等稿件的参考文献也采用中英文对照形式著录, 以提高稿件的可读性, 方便读者对参考文献的查验和检索。

(张世雯)