

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2002.03.10

RT-PCR 法检测 MUC1 mRNA 诊断肺癌 纵隔淋巴结隐匿转移

王洲 殷洪年

【摘要】 目的 探讨对常规病理检查漏诊的肺癌纵隔淋巴结转移病灶的诊断方法。方法 应用逆转录聚合酶链反应法 (RT-PCR) 检测 pN₀₋₁ 期非小细胞肺癌患者 (NSCLC) 纵隔淋巴结中 MUC1 基因 mRNA 的表达。结果 5 枚肺良性疾病的局部淋巴结无 MUC1 基因 mRNA 表达, 5 枚经病理检查证实有淋巴结转移癌的 NSCLC 纵隔淋巴结中均检测到 MUC1 mRNA 表达。实验组 19 例患者的 78 枚纵隔淋巴结中有 6 枚检测到 MUC1 mRNA 表达, 从而诊断为纵隔淋巴结隐匿转移。结论 应用 RT-PCR 法检测纵隔淋巴结中 MUC1 基因 mRNA 的表达可以提高临床对肺癌纵隔淋巴结转移诊断的准确性。

【关键词】 隐匿转移 纵隔淋巴结 肺肿瘤 MUC1 基因 逆转录聚合酶链反应

【中图分类号】 R73-37; R734.2

Diagnosis of occult metastasis to mediastinal lymph nodes in patients with NSCLC: detection of MUC1 mRNA by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) WANG Zhou, YIN Hongnian. Department of Thoracic Surgery, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, P. R. China

【Abstract】 Objective To evaluate the diagnostic method of occult metastasis to mediastinal lymph nodes (MLNs) in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** The mRNA expression of mucin 1 (MUC1) gene, an epithelial-tissue-specific gene, was detected in dissected mediastinal lymph nodes by RT-PCR assay. Seventy-eight MLNs which had no malignant evidence on routine histopathologic examination were assessed in 19 patients with stage pN₀₋₁ disease. Five regional lymph nodes from 5 patients with benign pulmonary diseases and 5 MLNs proved malignant by histopathology from 5 patients with NSCLC were also studied as negative and positive control respectively. **Results** The mRNA of MUC1 was not detected in any specimen of negative control group, whereas the mRNA was detected in all MLNs of positive control group. The mRNA in 6 out of 78 MLNs from 19 patients with pN₀₋₁ disease was also detected, and occult metastasis was diagnosed. **Conclusion** Detection of MUC1 mRNA expression might be helpful to diagnose occult metastasis in MLN in patients with lung cancer, and RT-PCR is superior to routine histopathologic examination in staging NSCLC.

【Key words】 Occult metastasis Mediastinal lymph node Lung neoplasms MUC1 gene RT-PCR

纵隔淋巴结转移是非小细胞肺癌 (NSCLC) 重要的预后不利因素之一。但是, 在术后常规病理检查无纵隔淋巴结转移的患者中预后也存在着很大的差别, 常规病理检查漏诊的淋巴结转移病灶——即纵隔淋巴结隐匿转移, 与预后的差别有关^[1]。MUC1 (mucin 1) 基因是上皮组织特异性标志物, 在正常的肺、支气管组织中均有表达, 在起源于上皮组织的 NSCLC 也保留有该基因的表达, 而正常淋巴结中则无 MUC1 基因的表达。如果在 NSCLC 患者的纵隔淋巴结中检测到 MUC1 基因的表达, 就可以诊断为纵隔淋巴结转移^[2, 3]。本研究应用 RT-PCR 法检测 MUC1 基因 mRNA 的表达, 诊断常

规病理检查漏诊的纵隔淋巴结转移, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 标本来源于我科 1999 年 10 月至 2000 年 10 月间经手术治疗的 pN₀₋₁ NSCLC 患者, 男性 13 例, 女性 6 例, 年龄 34 ~ 73, 平均 58 岁。手术依照 Naruke 肺癌淋巴结分布图作为廓清标志^[4], 系统性纵隔淋巴结廓清 7 例, 选择性纵隔淋巴结廓清 12 例, 共摘除纵隔淋巴结 78 枚。分期依照 UICC 1997 年修订标准, 病理分型依据 WHO 标准。患者临床资料见表 1。对照组为同期手术治疗的病例, 其中阴性对照 5 例 (肺良性病变的局部淋巴结 5 枚), 阳性对照 5 例 (病理

诊断有转移癌存在的 NSCLC 患者纵隔淋巴结 5 枚)。

表 1 实验组病例临床资料一览表

Tab 1 The clinical characteristics of patients with NSCLC

Characteristics	n	Lymph node dissection style		pTNM				
		Selective	Systematic	I A	I B	II A	II B	III A
Tumor location								
Right upper lobe (RUL)	3	1	2	1	1			1
Right lower lobe (RLL)	9	6	3	1	6		2	
Left upper lobe (LUL)	5	4	1		3	1	1	
Left lower lobe (LLL)	2	1	1	2				
Histology								
Adenocarcinoma (ADC)	10	6	4	3	4	1	2	
Squamous cell carcinoma (SCC)	8	5	3	1	6			1
Adenosquamous carcinoma (ASC)	1	1					1	

1.1.2 主要仪器 超速低温离心机(Sorvall Super T21 杜邦公司),PCR 扩增仪(PTC-200TM 美国),电泳仪(Power/PAC300 BIORAD),ULTROSPEC II 紫外分光光度计(LKB Biochrom 公司),GIS-700D 数码凝胶图像分析系统(上海天能公司)。

1.1.3 主要试剂 TRIzol 总 RNA 提取试剂(GIBCO-BRL 公司),RNA-PCR 试剂盒(Takara Shuzo 公司)。

1.1.4 引物 购自大连宝生物公司,引物设计参照 Noguchi 的报道^[5],MUC1 引物:上游引物 CGTCGTGGACATTGATGGTACC;下游引物 GGTACCTCCTCACCTCCTCCAA,可扩增 287bp 的 cDNA 片段。内标 β-actin 引物:上游引物 CACTGTGTTGGCGTACAGGT;下游引物 TCATCACCATTGGCAATGAG,可扩增 154bp 的 cDNA 片段。

1.2 方法

1.2.1 取材方法 将摘除之淋巴结沿长轴于中间切开,标本标号后一半送常规病理检查,另一半用锡箔纸包裹标号后浸入液氮中 1 min 速冻,然后置于 -70℃ 冰箱内保存。

1.2.2 提取总 RNA 按 TRIzol 试剂说明书提取每例标本的总 RNA,紫外分光光度仪测量、判定所提取 RNA 的纯度,要求光密度值 OD260/OD280 > 1.7。

1.2.3 RT-PCR 按 RNA-PCR 试剂盒说明书将每例标本的总 RNA 反转录成 cDNA。在下列反应体系中 PCR 3 μL 标本 cDNA,10 × Buffer 4 μL,MUC1 上、下游引物各 1.5 μL β-actin 上、下游引物各 0.5 μL,TaqDNA 聚合酶 0.25 μL,灭菌蒸馏水 34.75 μL。PCR 条件:94℃ 2 min,94℃ 1 min,50℃ 1 min,72℃ 1.5 min,共 30 次循环。

1.2.4 电泳 PCR 产物 5 μL 在 2% 琼脂糖凝胶板上

电泳,EB 染色,应用 GIS 数码凝胶图象分析系统记录结果。在 287bp 处显带者为 MUC1 mRNA 阳性。

1.2.5 PCR 产物测序 由宝生物工程(大连)有限公司完成。

2 结果

阴性对照组的 5 枚淋巴结均无 MUC1 基因 mRNA 的表达;阳性对照组的 5 枚纵隔淋巴结均检测到了 MUC1 基因 mRNA 的表达。实验组 5 例患者中的 6 枚纵隔淋巴结检测到 MUC1 基因 mRNA 的表达,占受检标本的 7.7%,图 1 是病例 1 纵隔淋巴结 MUC1 mRNA RT-PCR 产物凝胶电泳结果,PCR 产物测序结果显示,287bp 的 cDNA 片段为目的基因。此 5 例患者淋巴结中 MUC1 基因 mRNA 的表达情况见表 2。

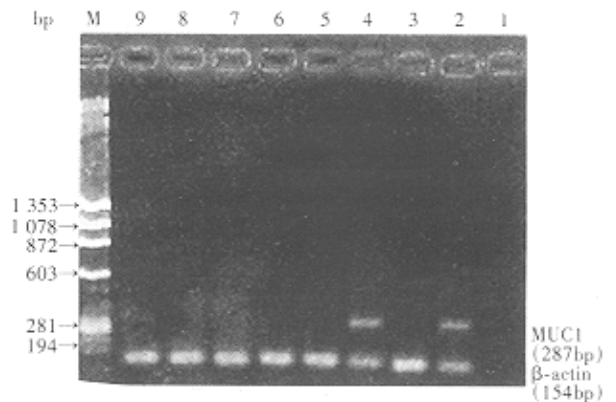


图 1 病例 1 纵隔淋巴结 MUC1 mRNA 表达情况

1 空白 2 阳性对照 3 阴性对照 4~9 纵隔淋巴结 M 分子量标准

Fig 1 The expression of MUC1 mRNA in No. 1 case

Lane 1: empty; lane 2: positive control; lane 3: negative control; lanes 4 to 9: mediastinal lymph nodes; M: molecular marker

