临床研究。

DOI: 10.3779/i.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

殷洪年 王洲

【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 pNo. 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 MUCL 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 MUCL 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 RT-PCR Lung neoplasms MUC1 gene

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(mucin1)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[23]。本研究

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 pNo.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 应用 RT-PCR 法检测 MUC1 基因 mRNA 的表达 诊断常力 漏油 病理分型依据 WHO 标准。患者临床资料见表

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-	- 监表
	ラライツ 30 70 17 11 11 17 17 17 17 17 17 17 17 17 17	

Tab 1	The clinical	characteristics	of	natients	with NSCLC
I an I	The chinean	characteristics	OI	panents	WILL INSCLIC

Cl		Lymph node		pTNM						
Characteristics	n	Selective	Systematic		ΙA	ΙB	∏ A	∐ B	∭ 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) JULTROSPEC | 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 CGTCGTGGA-CATTGATGGTACC:下游引物 GGTACCTCCTCTCACCTC-CTCCAA,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

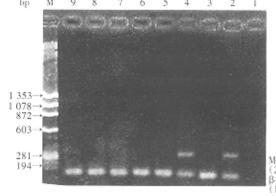
- 1.2.1 取材方法 将摘除之淋巴结沿长轴干中间切 开 标本标号后一半送常规病理检查 另一半用锡箔纸 包裹标号后浸入液氮中 1 min 速冻 然后置于 - 70℃冰 箱内保存。
- 1.2.2 提取总 RNA 按 TRIzol 试剂说明书提取每例 标本的总 RNA 、紫外分光光度仪测量、判定所提取 RNA 的纯度 要求光密度值 OD260/OD280 > 1.7。
- 1.2.3 RT-PCR 按 RNA-PCR 试剂盒说明书将每例标 本的总 RNA 反转录成 cDNA。在下列反应体系中 PCR 3 μ L 标本 cDNA $,10 \times$ Buffer 4 μ L ,MUC1 上、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℃

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。



287bp) β-actin (154bp)

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

2 min 94℃ 1 min 50℃ 1 min ,72℃ 1.5 min ,共30次循 Tane 1: empty; lane 2: positive control; lane 3: negative control; lanes 4 to 9: L Fig 1 The expression of MUC1 mRNA in No. 1 case 环。

PCR 产物 5 μL 在 2% 琼脂糖凝胶版上U nucdiastinal dymphenodes ; M: molecular marker

-		-		44
表 2	纵隔淋巴结中	MUC1 基达	∟mRNA	的表达情况

Tab 2 The mRNA expression of MUC1 gene in mediastinal lymph node

No. Location Hi	II' . 1	TNM	Dissected stations and pathological diagnosis								N	MUC1 mRNA						
	Histology	pTNM	12	11	10	2	3	4	5	6	7	8	9	2	3	4	7	
1	LUL	ADC	∏ A	+	-(2)		•	-		-		_	-	-		+		
2	RUL	SCC	IΒ	-(2)	-	-	-	-	-						+		+	
3	RLL	SCC	ΙA	-	-	-	-	-	-			-	_	_				+
4	RLL	ADC	ΙB	-	-	-	-		-			-	-	-(2)				+
5	RLL	ADC	ΙB	-	-	-	-(2)	-	-			-	-					+

Note: numbers in the parentheses indicate the numbers of lymph nodes.

3 讨论

肺癌的淋巴结分期主要依据 HE 染色常规病理检查的结果 临床上通常仅对每枚淋巴结标本的最大切片进行病理检查 这种做法可导致对淋巴结微小转移病灶的漏诊⁶¹。淋巴结标本连续切片病理检查可降低淋巴结转移癌的漏诊率 ,提高肺癌 TNM 分期的准确性。但是 ,即使对淋巴结标本连续切片 30 次时 ,常规病理检查仍有漏诊存在^[7]。而且连续切片检查工作烦琐 ,在日常工作中不能常规应用 ,临床上仍需要简便、诊断准确性高的检查手段对肺癌淋巴结进行病理分期。

应用肿瘤特异性标志物诊断隐匿性淋巴结转移是 最理想的方法,可以杜绝假阳性发生,提高诊断的特异 性 但目前尚未发现某个特定的肿瘤特异性标志物能 在 NSCLC 中全部表达,应用肿瘤特异性标志物诊断隐 匿性淋巴结转移只能用在有该标志物表达的肺癌患者 中 对其广泛应用有赖于新的肿瘤特异性标志物的发 现。上皮组织特异性标志物是指对上皮组织具有识别 性的物质 起源于上皮组织的 NSCLC 多保留着某些上 皮组织特异性标志物的表达,但在正常的淋巴结组织 却无上皮组织特异性标志物的表达。如果在 NSCLC 患者的区域淋巴结内检测到上皮组织特异性标志物的 表达即可诊断为淋巴结转移。MUC1 基因编码上皮组 织细胞膜上的粘蛋白的核心蛋白 ,是一种上皮组织特 异性标志物。在 Salerno 等 3 应用 RT-PCR 方法检测 MUC1 基因 mRNA 表达诊断 NSCLC 隐匿性淋巴结转移 的研究中,该方法显示出较高的敏感性和特异性。

淋巴结检测到了隐匿性转移(检出率为 7.7%),病理分期分别由 I 期和 II A 期上调为 III A 期。提示 RT-PCR 法检测 MUC1 mRNA 诊断肺癌纵隔淋巴结转移优于常规病理检查。PCR 法诊断肺癌纵隔淋巴结转移不需要对淋巴结标本连续切片检查 ,而且 PCR 法的敏感性高于常规病理检查 ,从理论上讲 ,RT-PCR 法可以检测到有基因表达的单个瘤细胞 ,这是常规病理检查无法比拟的。

综上所述,我们认为,现行的 HE 染色常规病理检查对于肺癌纵隔淋巴结的病理分期有一定的局限性, RT-PCR 法检测 MUC1 mRNA 的表达可以诊断肺癌隐匿性纵隔淋巴结转移,提高临床对肺癌纵隔淋巴结转移移;断的准确性。

参 考 文 献

- 1 Chen ZL, Perez S, Holmes EC, et al. Frequency and distribution of occult micrometastasis in lymph nodes of patients with non-small-cell lung carcinoma. J Natl Cancer Inst ,1993, 85(6):493-498.
- 2 Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C, et al. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. Cancer Res, 1993, 53(3):641-651.
- 3 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.
- 4 Naruke T, Suemasu K, Ishikawa S. Lymph node mapping and curability at various levels of metastasis in resected lung cancer. J Thorac Cardiovasc Surg ,1978 ,76(6):832-839.
- 5 Noguchi S , Aihara T , Motomura K , et al. Detection of breast cancer micrometastasis in axillary lymph node 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.
- 6 Gusterson B. Are micrometastases clinically relevant ?Br J Hosp Med ,1992 , 47(4):247-248.
- 7 Nicholson AG, Graham AN, Pezzella F, et al. Does the use of immunohisto-chemistry to identify micrometastasis provide useful information in the staging of node-negative non-small cell lung carcinomas? Lung Cancer, 1997, 18(3):

(收稿 2001-03-06 修回 2001-04-18)

物测序结果显示出检测的 cDNA 片段系目的基本 vungca.org 排除了假基因的可能。本组中有 5 例患者的 6 枚纵隔

(本文编辑 张世雯)