

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2001.02.06

RT-PCR 法检测淋巴结肺癌微转移的临床可行性探讨

葛明建 李良彬 张玉洪 王梅

【摘要】 目的 探讨 RT-PCR 法检测淋巴结肺癌微转移的临床可行性。方法 以 CK₁₉mRNA 作为标志物,建立 RT-PCR 法。运用该法测定 20 例肺癌患者区域性淋巴结混合物中 CK₁₉mRNA 的表达,将其与单个淋巴结检测结果和病理结果分别进行比较。结果 CK₁₉RT-PCR 法的检测灵敏度为 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ 肺癌组织 RNA/1 μg 正常淋巴结 RNA。20 例患者中 8 例被本法和病检法同时证实存在淋巴结转移,在余下的 12 例病检阴性的患者中,有 3 例被本法证实存在肺癌微转移。RT-PCR 法检测单个淋巴结和混合淋巴结微转移结果无明显差异 ($P > 0.05$)。结论 与检测单个淋巴结相比,RT-PCR 检测混合淋巴结同样可以提高传统病检法淋巴结转移检出率,而且大大减少了工作量,降低了检测费用,具有临床应用价值。

【关键词】 肺肿瘤 淋巴结 转移 角蛋白 聚合酶链反应

【中图分类号】 R734.2 ;R655.3

Clinical possibility of detection of lung cancer micrometastasis in regional lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction GE Mingjian, LI Liangbin, ZHANG Yuhong, WANG Mei. Department of Thoracic Surgery, The First Hospital, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, P. R. China

【Abstract】 Objective To study the clinical possibility of detection of lung cancer micrometastasis in regional lymph nodes (LNs) by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Methods** The CK₁₉ mRNA was used as marker. Serial dilution for lung cancer tissues was performed to demonstrate the sensitivity of the method. Each LN was bisected. One half was subjected to routine histological examination (HE), and the other half of all LNs which were pooled was subjected to CK₁₉ RT-PCR. **Results** The sensitivity of CK₁₉RT-PCR method ranged from 1×10^{-6} to $1 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ RNA of lung cancer tissue per 1 μg RNA of normal LNs. Among 20 patients analyzed in this study, HE was done on each LN, which revealed LN metastasis in eight patients and these results were confirmed by CK₁₉ RT-PCR. Of the other 12 patients who were diagnosed to be devoid of metastasis by HE, three patients were found to have micrometastasis in the regional LNs by RT-PCR. There was no significant difference between the detecting result of single LN and that of mixed LNs ($P > 0.05$).

Conclusion Comparing with detecting single LN by RT-PCR, the sensitivity of RT-PCR for detection of micrometastasis in mixed LNs is remarkably higher than that of routine HE method. It can dramatically reduce the time and the cost of detection and can be applied clinically.

【Key words】 Lung neoplasms Lymph node Metastasis Keratin Polymerase chain reaction

This work was supported by a grant from the Scientific Found of Chongqing Health Bureau (to GE Mingjian) (00-2004).

我们以前应用 CK₁₉RT-PCR 法检测了单个淋巴结中肺癌微小转移灶,发现该法可提高淋巴结癌转移的检出率,从而准确地评价转移状况^[1]。本研究应用 RT-PCR 法检测混合淋巴结中的肺癌微转移灶,就其临床可行性进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料 原发性肺癌组织 ($n = 20$) 及区域性 (肺门、气管旁和隆凸下等处) 淋巴结 ($n = 102$) 取自在本院接受手术的 20 例肺癌患者。在采集淋巴结时注意防止来自癌细胞和正常上皮细胞的污染。为防止核糖核酸酶的污染,整个采集标本过程在无菌条件下进行。将所有淋巴结均切分为两等份,其中一半固定于 10% 甲醛中留作病检用,而将每例患者所有淋巴结的另一半

本研究受重庆市卫生局科研基金 (00-2004) 资助

作者单位 400016 重庆医科大学附属第一医院胸外科 (葛明建、李良彬) 检验科 (张玉洪、王梅)

混合在一起,保存于液氮中直至提取 RNA。正常淋巴结($n = 10$)取自经病理证实的可手术的肺部非恶性肿瘤患者。每例患者均有病理学诊断依据,按 TNM 分期采用 1997 肺癌国际 TNM 分期标准^[2]。主要实验试剂及仪器同前^[1]。

1.2 方法 肺癌及淋巴结组织中总 RNA 的提取、脱氧核糖核酸酶消化 RNA 标本和 RT-PCR 过程同前^[1]。

灵敏度试验 对从原发性肺癌组织提取的 RNA 进行连续稀释后与正常对照淋巴结 RNA 混合,使各混合

物浓度分别为 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 和 $1 \times 10^{-7} \mu\text{g}$ 肺癌组织 RNA/ $1 \mu\text{g}$ 正常淋巴结 RNA 不同梯度。对这些 RNA 混合物中的 CK19 mRNA 进行 RT-PCR 扩增,扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶中电泳。

1.3 统计学处理 本组资料为计数资料,运用 χ^2 检验或四格表确切概率计算法进行统计学处理,以 $P < 0.05$ 为差异显著性标准。

2 结果

本组患者的临床病理资料及检测结果见表 1。

表 1 本组病例的临床病理资料及混合淋巴结中 CK19 mRNA 检测结果

Tab 1 Clinical and pathological data of the patients and the expression of CK19 mRNA in pooled lymph nodes

Case	Age/Sex	Tumor size (cm)	Type	Grade	Stage	No. of metastatic lymph nodes	
						Histology	RT-PCR
1	49/F	2.5	ASC	Well	I A	0/2	-
2	68/M	6.0	ADC	Mod	II B	1/7	+
3	64/F	3.0	ADC	Poor	III A	3/4	+
4	57/M	5.0	SCC	Poor	III B	1/9	+
5	66/F	4.0	ADC	Well	I B	0/3	-
6	42/M	4.0	SCC	Well	I B	0/2	-
7	62/M	6.0	ASC	Poor	IV	0/4	+
8	51/M	8.0	SCC	Well	III B	0/10	-
9	42/M	8.0	SCC	Poor	II B	1/5	+
10	50/M	2.0	SCC	Poor	I B	0/5	-
11	59/F	5.0	ACC	Mod	I B	0/7	-
12	44/F	8.0	SCLC	Poor	III B	0/5	+
13	53/M	6.0	SCC	Mod	I B	0/5	-
14	46/F	3.0	ADC	Mod	I A	2/7	+
15	48/M	6.0	ASC	Mod	III B	4/5	+
16	48/M	5.0	ADC	Mod	IV	0/4	+
17	48/F	3.0	ADC	Mod	II B	0/3	-
18	52/M	5.0	SCC	Well	II B	2/4	+
19	56/M	5.0	SCC	Mod	I B	0/6	-
20	61/M	5.0	ADC	Mod	II B	1/5	+

M : Male ; F : Female ; ASC : Adenosquamous carcinoma ; ADC : Adenocarcinoma ; SCC : Squamous cell carcinoma ; ACC : Alveolar cell carcinoma

2.1 CK19 RT-PCR 法的检测灵敏度 对 10 例原发性肺癌组织进行连续稀释,结果发现其中 6 例的最低检测浓度为 $1 \times 10^{-5} \mu\text{g}$ 肺癌组织 RNA/ $1 \mu\text{g}$ 正常淋巴结 RNA,余下的 4 例各有 2 例分别为 $1 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ 和 $1 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ 肺癌组织 RNA/ $1 \mu\text{g}$ 正常淋巴结 RNA。图 1 示 3 例有代表性的检测结果。

2.2 RT-PCR 法和病检法检测混合淋巴结肺癌转移结果比较 两法同时检测 20 例患者区域性淋巴结中肺癌转移结果见表 1。病理检查时,对每枚淋巴结($n = 102$)都进行标准 HE 染色,若所有被检测的淋巴结中至少有一枚被证实存在转移,则认为该患者为淋巴结转移“阳性”。在被检测的 20 例患者中,病检发现 8 例存在淋巴结转移,RT-PCR 法除证实了以上病检结果以外,另外还发现 3 例患者的区域淋巴结中存在微转

移。图 2 示 4 例病检阳性和 3 例阴性的患者区域性淋巴结中 CK19 mRNA 表达情况。

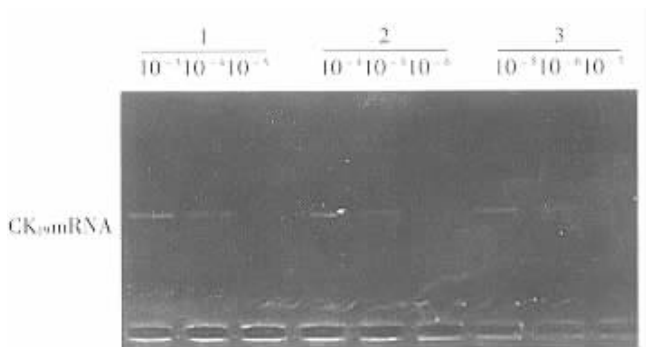


图 1 CK19 RT-PCR 法的灵敏度

Fig 1 Sensitivity of CK19 RT-PCR method for detection of lymph node micrometastasis of lung cancer

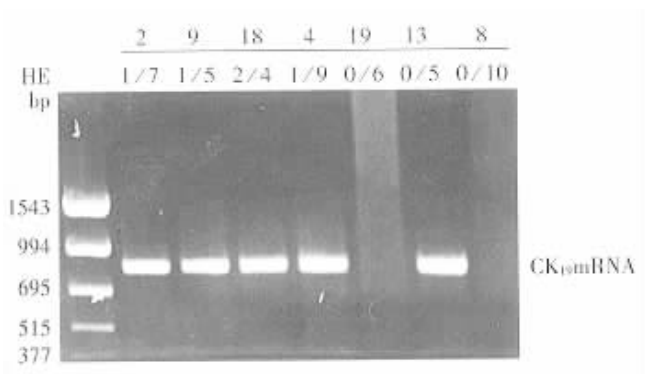


图 2 CK₁₉RT-PCR 法检测淋巴结中肺癌微转移

Fig 2 Detection of the lung cancer micrometastasis in LNs by CK₁₉ RT-PCR method. Case 2, 4, 9 and 18th were histologically node-positive patients and case 8, 13 and 19th were histologically node-negative patients.

2.3 RT-PCR 法检测单个或混合淋巴结肺癌微转移结果比较 原有研究表明,以病例为观察单位,单个淋巴结组 10 例病检阴性病例中有 4 例被 CK₁₉RT-PCR 法证实存在淋巴结微转移灶^[1]。本研究发现,混合淋巴结组 12 例病检阴性病例中的 3 例存在 CK₁₉mRNA 阳性表达。两组结果比较无显著差异 ($P = 0.27$)。

3 讨论

研究结果表明 CK₁₉mRNA 在原发性肺癌组织中都有表达,在正常淋巴结中无表达,提示其符合“上皮组织特异性标志物”的条件。若在肺癌患者区域性淋巴结中检测到 CK₁₉基因的表达,则提示存在癌转移^[1,3]。我们可以及时发现和有效克服 CK₁₉假基因的干扰,同时通过设立严格对照以及遵守实验操作规则等措施来克服假阳性结果的产生^[4]。CK₁₉RT-PCR 法可灵敏而特异地检测出淋巴结中的肺癌微小转移灶,从而准确地评价肺癌转移状况,为术后的辅助治疗等提供重要依据^[1,3]。

RT-PCR 法是灵敏度较高的方法,运用它可以检测出 1×10^7 个正常淋巴细胞中仅存的 10 个肺癌细胞^[1]。本实验结果显示在 $1 \mu\text{g}$ 正常淋巴结 RNA 中即使仅混入 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ 肺癌组织 RNA 也可被检测到。与普通病检法相比,RT-PCR 法可提高淋巴结转移检出率,成为早期诊断肺癌淋巴结亚临床转移的重要实验手段。

对每个淋巴结进行癌转移的分子学评价,不仅工作量大,并且费用也不菲,而临床医生常需获得的信息是每一组(如肺门、隆凸下和气管旁等处)由多个淋巴

结组成的淋巴结群,而不一定是每一个淋巴结的癌转移状况,以便为术后肿瘤分期、预后判断以及辅助性治疗措施的选择寻找依据。如何在降低检测结果的临床参考价值的前提下减少工作量、降低检测费用是本实验的重要目的。我们以病例为单位,将每个患者的所有待测淋巴结相混合,测定了淋巴结混合物中 CK₁₉mRNA 的表达情况,结果显示:与病检法相比,本法可提高淋巴结肺癌转移检出率;与同法检测单个淋巴结转移结果相比,两者结果无显著性差异。因此我们认为运用本法从评价单个淋巴结演变到评价混合淋巴结的转移状况,这一方法上的改进不仅没有影响检测灵敏度,而且降低了工作量和检测费用,使本法运用于临床作为常规检测手段的可能性提高。值得指出的是,这种通过一次检测同时了解多个完整淋巴结的准确转移状况是常规病检法无法达到的。

将 RT-PCR 法运用于恶性肿瘤淋巴结、外周血和骨髓等处微小转移灶的测定在国外是近几年来才开展起来的^[5,6]。近年来国内同行也进行了这方面的探索,将此法运用于肝癌、乳腺癌等实体瘤微转移的研究中,结果初步显示了其应用价值和临床意义^[7,8]。至今尚未见到有关肺癌淋巴结微转移测定的报道,本研究在这方面进行了尝试,得出了与相关文献较一致的初步结论^[1]。本实验在以前的基础上,对 RT-PCR 法检测肿瘤淋巴结微转移的临床可行性进行了探索,为本法成为临床常规检查手段积累了资料。今后还需对本法的临床可行性进行反复验证,以便使之尽早地运用于临床,从而为肺癌患者的治疗提供依据。

参 考 文 献

- 葛明建,李良彬,张玉洪,等. CK₁₉RT-PCR 法检测淋巴结中肺癌微小转移灶. 中国肺癌杂志, 2000, 3(1): 23-26.
- 任少华,胡华成. 1997 肺癌国际分期修正系统介绍. 肺癌杂志, 1998, 1(2): 127-128.
- 葛明建,李良彬. 恶性肿瘤淋巴结微转移灶的检测及其临床意义. 重庆医学, 1998, 27(3): 61-163.
- 葛明建,李良彬,张玉洪,等. RT-PCR 中加工过的假基因的干扰及解决办法. 中华医学遗传学杂志, 1998, 15(3): 170-172.
- Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, et al. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Clin Oncol, 1994, 12(3): 475-482.
- Mori M, Mimari K, Inoue H, et al. Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Cancer Res, 1995, 55(15): 3417-3420.
- 张琴,张一楚,顾学范,等. 逆转录-聚合酶链反应检测乳腺癌腋淋巴结微转移的研究. 中华外科杂志, 1998, 36(7): 430-432.
- 罗元辉,房殿春,鲁荣,等. 应用逆转录聚合酶链反应检测原发性肝癌患者外周血肿瘤细胞. 中华内科杂志, 1998, 37(3): 168-170.

(收稿 2000-05-07 修回 2000-09-20)

(本文编辑 李蓓兰)