

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2000.01.08

# CK19 RT-PCR 法检测淋巴结中肺癌微小转移灶

葛明建 王梅 李良彬 张玉洪 黄天禄

**【摘要】** 目的 探索检测淋巴结中肺癌微小转移灶的新途径。方法 区域性淋巴结共 159 枚,取自 20 例可手术的原发性肺癌患者,将每枚淋巴结均分为两等份,分别进行癌转移的病理学检测和细胞骨架角蛋白 19(CK19)基因的表达分析。结果 本实验建立的 CK19 RT-PCR 法可检测到  $1 \times 10^7$  个正常淋巴细胞中存在的 10 个肺癌细胞。在被测的 159 枚淋巴结中,42 枚被病理切片和分子学方法同时证实存在转移,在余下的 117 枚病检阴性淋巴结中,CK19 RT-PCR 还发现 25 枚存在微小转移。结论 与传统病理学检查相比,CK19 RT-PCR 法可提高淋巴结癌转移检出率,从而准确地评价其转移状况。

**【关键词】** 肺肿瘤 淋巴结 转移 角蛋白 聚合酶链反应

**Detection of lung cancer micrometastasis in regional lymph nodes by assays of CK19 reverse transcription-polymerase chain reaction** GE Mingjian, WANG Mei, LI Liangbin, ZHANG Yuhong, HUANG Tianlu. Department of Thoracic Surgery, The First University Hospital, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, P. R. China

**【Abstract】 Objective** To set up a molecular method(RT-PCR) which can be used to detect micrometastasis of regional lymph nodes(LNs) in patients with lung cancer. **Methods** Primary lung cancer tissues ( $n = 20$ ) and regional LNs ( $n = 159$ ) were obtained from 20 patients with lung cancer who underwent lobectomy. Each LN was halved. One half of a LN was subjected to histological examination (HE) and the other half was subjected to RT-PCR amplification of CK19 mRNA. Serial dilution study using LC-5 cells was performed to detect sensitivity of the CK19 RT-PCR method. **Results** Serial dilution study for LC-5 cells demonstrated that CK19 mRNA was detectable at a concentration as low as 10 LC-5 cells in  $1 \times 10^7$  LN cells. CK19 mRNA was found in 42 LNs that were proved to have metastasis by HE. Of the other 117 LNs which were diagnosed as no metastasis by HE, however, twenty five LNs were found to express CK19 mRNA by RT-PCR. **Conclusion** Comparing with HE method, the RT-PCR method can make more accurate assessment of metastatic status in LNs.

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

准确评价肿瘤患者的淋巴结转移状况具有重要的临床意义,而传统病理学方法常低估淋巴结转移的存在,使其可靠性受到影响<sup>[1]</sup>。本实验旨在建立和评价能准确检测肺癌患者区域性淋巴结中隐匿性微小转移灶(micrometastases)的逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 组织标本** 原发性肺癌组织( $n = 20$ )及相应区域淋巴结( $n = 159$ )取自本院 1996 年 10 月至 1997 年 3

月手术的 20 例肺癌患者,术中将每例患者肺门( $N_1$ )和纵隔( $N_2$ )等处的各组区域性淋巴结全部清除,然后在严格防止污染的前提下将每枚淋巴结切分为两等份,一份作病理检查(HE),另一份淋巴结及肺癌组织保存于液氮中直至提取 RNA。表 1 示 20 例患者的主要临床病理参数。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。

**1.1.2 细胞株** 人肺鳞癌细胞 LC-5 由本校病理生理教研室提供,人肺腺癌细胞 PAa 由北京医科大学病理学教研室提供。

**1.1.3 主要试剂** 异硫氰酸胍、二甲基焦碳酸(DEPC)和 2-巯基乙醇等购于 Sigma 公司;逆转录酶 MMLV-RT 由 GIBCO BRL 公司提供;脱氧核糖核酸酶

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(王梅、张玉洪、黄天禄)

RQ1 (DNase RQ1)、Taq DNA 聚合酶、dNTP 和 PCR Marker 购于华美生物工程公司;水饱和酚、氯仿和异戊醇等均均为国产分析纯。实验试剂用无菌双蒸水配制,用于 RNA 提取的试剂或器皿均用 0.1% DEPC 处理。

1.1.4 引物 下列引物由北京赛百盛(美国)生物工程公司合成。

根据  $\beta$ -actin 的基因序列<sup>[2]</sup>设计以下引物:上游引物(467-491) 5'-CCAAAGCCCAACCGCGAGAAATGAC-3';下游引物(1589-1565) 5'-AGGGTACATGGTGGTCCCGC-CAGAC-3'。以上引物分别位于第 2 和第 4 外显子,可扩增 589 bp 的 cDNA 片段。本片段用作内对照标准。

根据 CK19 基因序列<sup>[3]</sup>设计以下引物:上游引物(757-786) 5'-TCCGCGACTACAGCCACTACTACACGACC-3';下游引物(1502-1473) 5'-CGCGACTTGATGTCATG-AGCCGCTGGTAC-3'。上、下游引物分别位于第 1 和第 6 外显子,可扩增 745 bp 的 CK19 cDNA 片段。

1.1.5 主要仪器 PCR 扩增仪 9600 型(美国 PE 公司)和 UV-240 紫外分光光度仪(日本岛津株式会社)。

1.2 方法

1.2.1 提取组织总 RNA 采用 AGPC 一步法<sup>[4]</sup>。

1.2.2 DNase 消化 RNA 标本 参照我们以前介绍的方法<sup>[5]</sup>。

1.2.3 RT-PCR 将 100 ng RNA 加入以下逆转录体系中:0.1 $\mu$ g(dT)<sub>18</sub> 25 pmol/L,dNTP 各 500  $\mu$ mol/L,Tris-HCl 50 mmol/L,KCl 50 mmol/L,MgCl<sub>2</sub> 10 mmol/L,MMLV-RT 200 U,总体积 25  $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 h。取 2  $\mu$ l 逆转录产物加入以下混和物中:CK19 或  $\beta$ -actin 引物 20 pmol/L,dNTP 各 200  $\mu$ mol/L,Taq DNA 酶 1 U,Tris-HCl 10 mmol/L,KCl 50 mmol/L,MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L,总体积 25  $\mu$ l。CK19 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 150 s; $\beta$ -actin 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 45 s,60 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 60 s。循环 40 次,最后 72 $^{\circ}$ C 下充分延伸 5 min 结束反应。取 5  $\mu$ l 产物在 2% 琼脂糖凝胶板上电泳,溴化乙锭染色。在紫外透射反射仪上观察结果并拍照。

1.2.4 灵敏度实验 将正常淋巴结组织 100 ng 与 3 ml DEPC 处理水混和后匀浆,用 Ficoll-Hypaque 分离液密度梯度离心,取淋巴细胞于镜下计数,将其调整为 10<sup>7</sup> 数量级的细胞悬液 共 10 份。将肺鳞癌细胞 LC-5 连续稀释为以下各数量级的细胞悬液 :10<sup>5</sup>,10<sup>4</sup>,10<sup>3</sup>,10<sup>2</sup>,10<sup>1</sup>,1,1,1,1,1。将以上两种细胞悬液分别混和制成代表不同浓度的混和液,提取 RNA,分别进行 CK19 和  $\beta$ -actin mRNA 表达分析。

1.3 统计学处理 采用  $\chi^2$  检验,以 P < 0.05 为差异显著性。

2 结果

2.1 CK19 mRNA 在原发性肺癌组织、正常淋巴结及 LC-5、PAa 细胞中的表达(图 1) CK19 mRNA 在所有原发性肺癌组织中都有表达,在肺癌细胞 LC-5 及 PAa 中也有表达,而在正常淋巴结中均无表达。

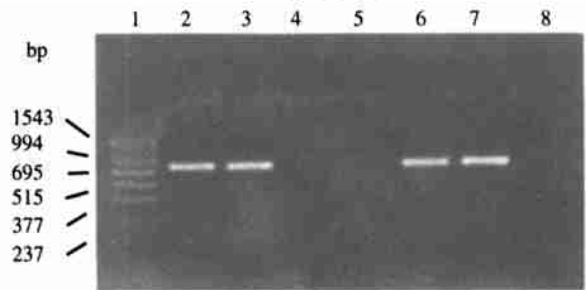


图 1 CK19 mRNA 在原发性肺癌组织、正常淋巴结、LC-5 和 PAa 细胞中的表达

1:分子量标准;2,3:原发性肺癌组织;4,5:正常淋巴结;6:肺鳞癌细胞 LC-5;7:肺腺癌细胞 PAa;8:空白对照

Fig 1 CK19 mRNA expression in primary lung cancer tissue, normal control LNs and LC-5, PAa cells. Lane 1: molecular marker; Lane 2,3: lung cancer tissues; Lane 4,5: normal lymph nodes; Lane 6,7:LC-5 and PAa cells; Lane 8: control.

2.2 CK19 RT-PCR 法的检测灵敏度 灵敏度实验发现,在 10 个 LC-5 细胞/10<sup>7</sup> 个正常淋巴细胞浓度时,CK19 mRNA 仍可被检测到。为了考查 1 个 LC-5 细胞/10<sup>7</sup> 个正常淋巴细胞浓度时的检测灵敏度,本实验准备了 4 份此浓度的混和物,结果这 4 份混和物中的 CK19 mRNA 均未被扩增出(图 2)。

LC-5 cells	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	1	1	1	1
LN cells	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>

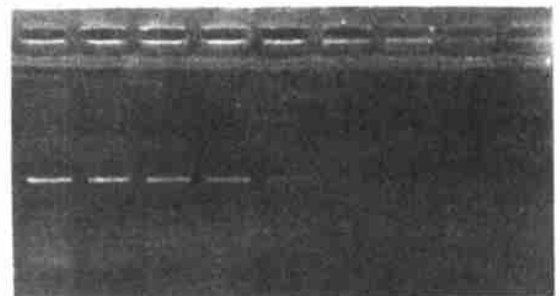


图 2 CK19 RT-PCR 法的灵敏度

Fig 2 Sensitivity of the CK19 RT-PCR method

Detection of sensitivity was determined by performing serial dilution of LC-5 cells and preparing mixture with normal LN cells. Total RNA was extracted from these mixtures. CK19 mRNA expression were studied on these RNA sample by RT-PCR. Result of agarose gel electrophoreses are shown.

2.3 RT-PCR 法和常规病理方法检测淋巴结肺癌转移结果比较 RT-PCR 法和病检法同时检测 159 枚区域性淋巴结肺癌转移的结果见表 1。两法同时检测淋巴

结中肺癌转移的结果比较见表 2 ( $\chi^2 = 25.00, P < 0.005$ )。图 3 示 RT-PCR 法检测第 20 例患者淋巴结中肺癌微转移结果。

表 1 20 例肺癌患者的临床病理资料及区域性淋巴结中肺癌转移情况

Tab 1 Patient characteristics and the results of lung cancer metastasis in single lymph node

Case	Age/ Sex	Tumor size (cm)	Histology (Type, Grade)	P-TNM Stage	No. of metastatic LN	
					HE	CK19 RT-PCR
1	68/ M	10.0	SCC, Mbd	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> ( B)	0/5	1/5
2	50/ M	5.0	SCC, Mbd	T <sub>2</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub> ( A)	1/9	3/9
3	60/ F	4.5	CS, Poor	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub> ( A)	4/22	7/22
4	72/ M	5.5	SCLC, Poor	T <sub>4</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub> ( B)	11/21	14/21
5	63/ M	5.0	SCC, Mbd	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> ( B)	0/10	0/10
6	71/ M	5.0	SCC, Mbd	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub> ( B)	5/9	7/9
7	60/ M	10.0	SCC, Mbd	T <sub>4</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub> ( B)	5/5	5/5
8	39/ M	3.0	ADC, Mbd	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> ( A)	0/7	0/7
9	62/ M	4.5	SCC, Mbd	T <sub>4</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> ( B)	0/6	5/6
10	64/ M	5.3	SCC, Poor	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub> ( B)	1/18	5/18
11	63/ M	3.0	ASC, Mbd	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub> ( B)	3/3	3/3
12	65/ M	2.0	SCC, Well	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> ( A)	0/7	0/7
13	78/ M	5.8	ADC, Mbd	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> ( B)	0/3	3/3
14	49/ F	7.2	ADC, Poor	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub> ( A)	4/4	4/4
15	43/ M	8.0	SCC, Poor	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> ( B)	0/3	1/3
16	62/ M	4.4	ADC, Mbd	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> ( B)	0/6	0/6
17	43/ M	2.0	ADC, Well	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> ( B)	0/5	0/5
18	44/ M	3.0	SCC, Well	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> ( B)	0/4	0/4
19	63/ M	6.2	ADC, Poor	T <sub>2</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub> ( A)	6/6	6/6
20	59/ F	4.7	ADC, Mbd	T <sub>4</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub> ( B)	2/6	3/6

M:Male; F:Female; SCC:Squamous cell carcinoma; CS:Carcinosarcoma;SCLC:Small cell lung cancer; ADC:Adenocarcinoma; ASC:Aderosquamous carcinoma

表 2 CK19 RT-PCR 和常规病检法检测淋巴结肺癌转移结果比较

Tab 2 Comparison between HE and CK19 RT-PCR detection of lung cancer metastases in regional lymph nodes

	Histological examination	
	Positive	Negative
CK19 RT-PCR		
Positive	42	25
Negative	0	92

$\chi^2 = 25.00, P < 0.005$

### 3 讨论

选择合适的“组织特异性标志物”(tissue specific marker)是成功运用 RT-PCR 法检测肿瘤微转移的首要条件。研究表明,上皮细胞骨架成分之一——角蛋白 CK19 的表达主要局限于上皮组织及相应来源的肿瘤组织,在正常外周血和淋巴结等组织中均无表达。若在上皮源性肿瘤患者的淋巴结等组织中检测到 CK19 基因表达则表明存在癌细胞转移<sup>[6]</sup>。本研究将 CK19 作为检测标志物,结果发现 CK19 基因具有上皮组织表达特异性,符合“上皮组织特异性标志物”的条件。目前,分析 CK19 基因表达已经广泛用于乳腺癌等实

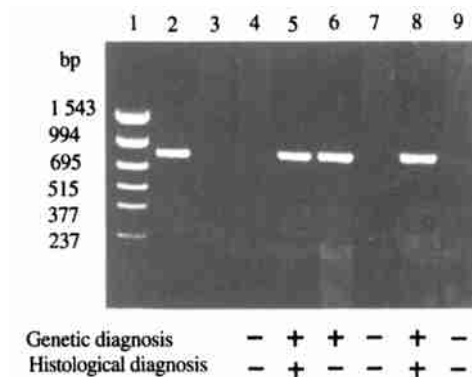


图 3 CK19 RT-PCR 法检测淋巴结中肺癌微小转移(第 20 例患者) 1:分子量标准;2:原发性肺癌组织;3:正常淋巴结;4~9:被测淋巴结。病检结果显示第 5 和第 8 淋巴结转移,CK19 RT-PCR 法检测结果示除第 5、8 淋巴结外,第 6 淋巴结还存在肺癌微转移。

Fig 3 Detection of lung cancer micrometastases in LNs by CK19 RT-PCR methods (Case 20). The number of involved lymph nodes was two by the histological diagnosis (Lane 5 and Lane 8) and three by the genetic diagnosis (Lane 5, 6 and 8). RT-PCR amplification of CK19 mRNA for primary lung cancer tissue (Lane 2) and normal control LN (Lane 3) were used as positive and negative control respectively.

体瘤淋巴结中微小转移的检测<sup>[7]</sup>。

防止假阳性出现是 RT-PCR 法检测肿瘤微转移成功的关键。假基因 (pseudogene) 的干扰是造成 RT-PCR 法诊断癌转移时出现假阳性结果的主要原因之一。我们发现设立 RT 阴性对照 (- RT) 可及时发现假基因的干扰,而在 cDNA 合成以前用 DNase 预处理 RNA 标本可有效地消除假基因的干扰<sup>[5]</sup>。造成假阳性的另一个重要原因是标本受到污染,这其中包括来自正常上皮细胞和癌细胞的污染,以及淋巴结之间的交叉污染。此外,前次 PCR 产物的污染也可造成假阳性结果。我们通过设立空白对照、阳性和阴性对照,以及严格遵守实验操作规则来克服污染产生的假阳性结果<sup>[8,9]</sup>。

目前,病理检查结果仍然是临床医师判断肿瘤淋巴结转移情况和制定各项术后辅助性治疗措施的主要依据。然而,传统的病理学方法只是通过对单张淋巴结病理切片(约相当于整个淋巴结体积的 1%)的转移情况的分析来评判整个淋巴结的癌转移情况,难免具有片面性,常低估淋巴结转移的存在<sup>[1]</sup>。连续切片法(SMS)虽可提高淋巴结转移检出率,但因费时费力而使其运用于临床的可能性不大<sup>[7]</sup>。我们运用 CK19 RT-PCR 法对 159 枚区域性淋巴结中肺癌转移状况进行了检测,并且与病理检查进行比较,结果表明本法可提高淋巴结转移检出率,这对于提高肿瘤分期准确率、早期预测肿瘤术后复发和准确判断患者预后等均有指导意义,对筛选存在亚临床转移的患者以及加强对这部分人的术后辅助性全身治疗,以降低术后复发率、提高生存率均有重要意义。

将 RT-PCR 方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近几年才在国外开展起来,近年来国内同行也进行了这方面的探索,将此分子学方法运用于肝癌、乳腺癌等实体瘤微转移的研究中,初步显示了其实用价值和临床意义<sup>[10,11]</sup>。本研究以

CK19 基因作为检测标志物,扩增了它在肺癌患者区域性淋巴结中的表达,得出了与以上研究相一致的初步结论。在采集标本时我们尽量清扫肉眼可见到的各组淋巴结,以便进行长期而大量的随访以积累足够的资料,从而准确评估本法检测肿瘤微转移的临床意义。

### 参 考 文 献

- 1 Pelkey TJ, Frierson HF, Bruns DE. Molecular and immunological detection of circulating tumor cells and micrometastases from solid tumor. *Clinical Chemistry*, 1996, 42(9) 1369-1381.
- 2 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 USA*, 1985, 82(18) 6133-6137.
- 3 Bader BL, Jahn L, Franke WW. Low level expression of cytokeratin 8, 18 and 19 in vascular smooth muscle cells of human umbilical cord and in cultured cell derived therefrom, with an analysis of the chromosomal locus containing the cytokeratin 19 gene. *Eur J Cell Bio*, 1988, 47(3) 300-319.
- 4 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162(2) 156-159.
- 5 葛明建,张玉洪,李良彬,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.
- 6 Traweck ST, Liu J, Battifora H, et al. Keratin gene expression in non-epithelial tissue. *Am J Pathol*, 1993, 142(4) 1111-1118.
- 7 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. *重庆医科大学学报*, 1998, 27(3) 161-163.
- 8 葛明建,李良彬,张玉洪,等. 克服 RT-PCR 法检测肿瘤微转移的假阳性. *重庆医科大学学报*, 1998, 23(2) 153-156.
- 9 Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 1989, 333(6221) 237.
- 10 张琴,张一楚,顾学范,等. 逆转录-聚合酶链反应检测乳腺癌淋巴结微转移的研究. *中华外科杂志*, 1998, 36(7) 430-432.
- 11 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:1999-05-21 修回:1999-12-28)

(本文编辑 李蓓兰)

## · 启 事 ·

### 作者须知

投寄论文如属国家科学基金项目或省、部级以上重点攻关课题,请在文稿首页脚注中注明“本文为 × × × 基金资助项目(课题)”,及基金编号和课题负责人,并在英文关键词后写出基金或课题的英文对照。不必在文题上加角注符号。

本刊编辑部