

外周血 CK-20 mRNA 的表达与大肠癌诊断、分期及预后的研究

叶欣,李毅,刘丽霞,王庆才,侯刚,杨宪勇

关键词:大肠癌;角蛋白;逆转录-聚合酶链式反应

中图分类号:R735.3⁺4 文献标识码:B 文章编号:1000-8578(2006)04-0281-02

0 引言

我们利用 RT-PCR 技术检测了 126 例大肠癌患者外周血单个核细胞 CK-20 mRNA 的表达情况,研究 CK-20 mRNA 的表达在大肠癌中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 大肠癌组 经手术后病理证实的大肠癌患者 126 例,男 75 例,女 51 例,年龄 38~73 岁,平均 57.4 岁;按 Duke's 分期:A 期 23 例、B 期 34 例、C 期 44 例、D 期 25 例。术前采集外周血。

1.1.2 正常对照组 健康志愿者 25 例,男 17 例,女 8 例,年龄 29~58 岁,平均 46.5 岁。

1.1.3 细胞株组 HT29 细胞株(结肠癌细胞株); H740 细胞株(肝癌细胞株); 2HTB-133(乳腺癌细胞株); TPG5(肺癌细胞株); K562 细胞株(红白细胞病细胞株); SGC7901(胃癌细胞株),常规细胞培养。

1.1.4 其他癌症组 胃癌、肺癌、肝癌、乳腺癌、食管癌各 10 例。

1.2 方法

1.2.1 样品的采集和保存

(1)血标本的采集 采取大肠癌患者及正常献血员外周静脉血 10ml,放入 20u/ml 肝素处理的防凝试管内,分离出单个核细胞,放入-80℃ 冰箱保存备测。

(2)实体瘤标本的来源 大肠癌组织及其他癌症取自大肠癌和其他癌症病人手术后癌组织。标本 30min 内送实验室,新鲜提取总 RNA;不能保证 30min 内制备的样品,在留取后放-80℃ 冰箱保存备测。

1.2.2 CK-20 mRNA 的测定 用 RT-PCR 法。总 RNA 的提取:以酸性硫氰酸肌-苯酚-氯仿一步法提出总 RNA,-80℃ 保存待测。逆转录(RT)反应:于 DEPC 处理的 Eppendorf 管中,加入总 RNA,MLLV,随机引物,逆转录反应体系,快速离心混匀。37℃ 1h,95℃ 10min 灭活 MMLV。快速离心使蒸气沉于管底。PCR 反应:于 0.5ml Eppendorf 管中,加入 RT 反应产物,PCR 反应体系,CK-20 上游引物(5' CAGACACACGGTGAACCTATGG3')1μl,CK-20 下游引物(5' CAGACACACGGTGAACCTATGG3')1μl,扩增片段长度为 370bp;-actin 上游引物(5' GTGGGGCGC-CCCAAGCACCA3')1μl,-actin 下游引物(5' CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC3')1μl,扩增片段长度为 500bp。95℃ 5min,离心使蒸气沉于管底。加入 TaqDNA 聚合酶,快速离心混匀。循环条件:94℃ 1min,58℃ 1min,72℃ 1min。循环 35 次,末次延长 7min。电泳鉴定,观察目的基因,实验中仅出现一条 500bp -actin 带,为 CK-20 mRNA 阴性;同时出现 370bp 带,为 CK-20 mRNA 阳性。

1.3 随访 对 18 例 Duke's A 患者、23 例 Duke's B 患者、28 例 Duke's C 患者进行了随访,内容主要观察远处转移情况。

1.4 统计学处理 用 POMS 2.00 版医学统计软件包进行数据处理,用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 CK-20 mRNA 的表达情况

细胞株:仅 HT29、SGC7901 细胞株阳性,其余细胞株均阴性;25 例健康志愿者:外周血 CK-20 mRNA 均为阴性;126 例大肠癌中 69 例阳性,阳性率 54.8%;其他癌症组:仅胃癌组织阳性,其余癌组织均阴性。

2.2 Duke's 分期 126 例大肠癌患者外周血 CK-20 的表达情况

各分期 CK-20 mRNA 表达的阳性率分别为: Duke's A 期 21.7%,B 期 32.4%,C 期 63.6%,D 期:88%。各分期比较:A 期与 B 期比较 $\chi^2 =$

收稿日期:2005-08-30;修回日期:2005-10-25

基金项目:山东省医药卫生科研基金资助项目(1999.第 A6 号)

作者单位:271000 山东省泰安市中心医院肿瘤科

作者简介:叶欣(1963-),男,本科,主任医师,主要从事肿瘤化疗和生物治疗研究

1.948, $P < 0.05$; 与 C 期比较 $\chi^2 = 2.346$, $P < 0.01$; 与 D 期比较 $\chi^2 = 10.605$, $P < 0.01$ 。B 期与 C 期比较 $\chi^2 = 2.806$, $P < 0.01$; 与 D 期比较 $\chi^2 = 7.421$, $P < 0.01$; C 期与 D 期比较 $\chi^2 = 4.343$, $P < 0.01$ 。

2.3 随访情况

Duke's C 期的患者在术前和术后的治疗差异极大,完成随访(12~52月)并且可以评价的患者 20 例,11 例 CK-20 mRNA 阳性的患者中有 6 例(54.5%)发生了远处转移,而 9 例 CK-20 mRNA 阴性的患者中有 3 例(33.3%)发生了远处转移,两者比较 $\chi^2 = 1.421$, $P > 0.05$,出现这种结果的原因可能是由于 Duke's C 期术后的治疗差异极大;Duke's B 期患者术后常规给予 4 个周期的“DF 方案”化疗,完成随访(12~57月)并且可以评价的患者 23 例,8 例 CK-20 mRNA 阳性的患者中有 5 例(62.5%)发生了远处转移,而 15 例 CK-20 mRNA 阴性的患者中有 3 例(20%)发生了远处转移,两者比较 $\chi^2 = 7.803$, $P < 0.05$;23 例 Duke's A 患者中,随访短于 12 月的 3 例,失访 2 例,完成随访(12~56月)的 18 例,这 18 例患者术后在未发生转移前,不进行化疗、放疗、生物治疗和其他治疗),5 例 CK-20 mRNA 阳性的患者中有 2 例(40%)发生了远处转移,而 13 例 CK-20 mRNA 阴性的患者中未发生远处转移,两者比较 $\chi^2 = 10.341$, $P < 0.01$ 。

3 讨论

CK-20 是 Moll 等于 1990 年首先发现的,CK-20 不同于其他角蛋白成分,它有更严格的特异性上皮分布,主要分布于胃肠道粘膜上皮细胞、泌尿道伞状细胞、表皮 Merkel 细胞、舌味蕾细胞上。大肠癌是上皮组织来源的肿瘤之一,在其发生发展过程中癌细胞有可能随时进入血液循环,造成远处转移,而非上皮来源的细胞如正常血细胞上无 CK-20 分布,如果在大肠癌患者外周血中检测到 CK-20 mRNA 的表达,则可说明上皮源性肿瘤细胞已经转移入血^[1],有可能形成转移灶。

从我们的研究结果看,HT29 细胞株、SGC7901 细胞株 CK-20 mRNA 表达阳性,而其它细胞株和献血员外周血细胞 CK-20 mRNA 表达均阴性。在切除的肿瘤组织中除大肠癌和胃癌 CK-20 mRNA 表达阳性,其余肺癌、肝癌、乳腺癌、食管癌组织 CK-

20 mRNA 表达均阴性,这说明 CK-20 mRNA 表达对于诊断大肠癌和胃癌有较高的特异性,这一点在我们以前的相关研究中也得到了证实^[2,3]。

我们观察的 126 例大肠癌患者中,随着 Duke's 分期的加重 CK-20 mRNA 阳性率逐渐升高,且各期之间比较均有显著差异,这说明大肠癌患者外周血 CK-20 mRNA 阳性表达与 Duke's 分期有确切的关系,即随着大肠癌病情的发展和病期的加重外周血微转移率逐渐增加。

关于 Duke's A 期大肠癌是否存在微转移、是否能形成转移灶和是否是一个独立的预后指标一直有争议^[4]。我们的研究结果是:Duke's A 期患者 CK-20 mRNA 阳性率为 21.7%,即有 21.7% Duke's A 期患者存在血行微转移,这个表明早期大肠癌就可能存在癌细胞的血行转移。从我们对 5 例 CK-20 mRNA 阳性 Duke's A 期患者随访的结果看有 2 例最终形成了转移灶,而 13 例 CK-20 mRNA 阴性 Duke's A 期患者无 1 例出现转移灶(两组比较有显著性差异),这可以说明如果早期大肠癌患者外周血 CK-20 mRNA 阳性就有可能最终形成转移灶。根据这个结果如果 Duke's A 期大肠癌患者外周血 CK-20 mRNA 阳性就应该进行相关的治疗。在 Duke's B 期外周血 CK-20 mRNA 阳性组的远处转移率为 62.5%,而外周血 CK-20 mRNA 阴性组的远处转移率为 33.3%,两组比较有显著性差异,这也进一步证实了大肠癌患者外周血 CK-20 mRNA 表达情况是一个判断预后的指标。

参考文献:

- [1] Staritz P, Kienle P, Koch M, et al. Detection of disseminated tumour cells as a potential surrogate marker for monitoring palliative chemotherapy in colorectal cancer patients[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2004, 23(4): 633-639.
- [2] 叶欣,李毅,刘忠民,等. 大肠癌患者淋巴结合角蛋白-20mRNA 基因表达的临床意义[J]. 中华肿瘤杂志, 2002, 24(3): 261-264.
- [3] 王庆才,赵幼安,李毅,等. 胃癌病人外周血细胞角蛋白-20mRNA 表达与透明质酸浓度变化的研究[J]. 中华消化杂志, 2001, 21(9): 565-566.
- [4] Laso CA, Gonzalez JJ, Fresno F, et al. Prognostic value of micrometastases in esophageal and colorectal carcinoma[J]. Hepatogastroenterology, 2004, 51(58): 964-967.

[编辑:刘红武]