

纵隔(N₂)淋巴结 CEA mRNA 表达与 I 期非小细胞肺癌微转移及预后的关系

邵丰 杨如松 邹卫 赵一昕 马国栋 曹琿 潘宴青 王尊乔 刘政呈 杨溯

【摘要】 目的 检测癌胚抗原(CEA) mRNA 在 I 期非小细胞肺癌 N₂ 淋巴结中的表达, 对其与微转移及预后等相关性进行初步分析。方法 2005 年至 2010 年我院 160 例术后经病理证实为 I 期 NSCLC 患者, 分别选取其肿瘤组织及隆突下(N₂)淋巴结, 另取 10 例术后证实肺良性疾病患者淋巴结作为对照组, 采用实时荧光定量 RT-PCR 的方法检测其 CEA mRNA 的表达, 并分析其表达与肿瘤大小、病理类型及预后等相关性。结果 CEA mRNA 在 160 例肺癌组织中有 142 例表达(142/160), 160 枚 N₂ 淋巴结中 19 枚有表达(19/160); 在腺癌患者 N₂ 淋巴结中的表达率明显高于鳞癌; I B 期患者 N₂ 淋巴结中的表达率高于 I A 期; 在 10 例肺良性疾病患者淋巴结中均未见 CEA mRNA 表达。生存分析显示, N₂ 淋巴结 CEA mRNA 表达患者 5 年生存率明显低于不表达患者。结论 I 期 NSCLC 患者 N₂ 淋巴结中 CEA mRNA 表达提示可能存在微转移, 且预后较差。腺癌 N₂ 淋巴结微转移率可能高于鳞癌。I B 期患者预后较 IA 期差, 可能与其 N₂ 淋巴结微转移率较高有关。

【关键词】 癌, 非小细胞肺; 癌胚抗原; 逆转录聚合酶链反应; 预后; 微转移; N₂ 淋巴结

Correlation between carcinoembryonic antigen mRNA in N₂ lymph nodes as a micrometastasis marker and the prognosis of patients with stage I non-small-cell lung cancer SHAO Feng, YANG Ru-song, ZOU Wei, ZHAO Yi-xin, MA Guo-dong, CAO Hui, PAN Yan-qing, WANG Zun-qiao, LIU Zheng-cheng, YANG Su. Department of Thoracic Surgery, Nanjing Chest Hospital, Nanjing 210029, China
Corresponding author: YANG Ru-song, Email: njyrs_md@188.com

【Abstract】 Objective To analyze the correlation between lung carcinoembryonic antigen (CEA) mRNA in N₂ lymph nodes as a micrometastasis marker and the prognosis of patients with stage I non-small-cell lung cancer (NSCLC). **Methods** CEA mRNA were detected in the tumor and N₂ lymph nodes using real-time quantitative PCR in 160 patients with pathologically stage I NSCLC after surgery from 2005 to 2010. Another 10 lymph nodes of benign lung disease were designed as control group. The correlation between prognosis and the expression of CEA mRNA in N₂ lymph nodes was analyzed. **Results** CEA mRNA were found in 142 cases of the tumor, but not found in the 10 lymph nodes of benign lung disease. 19 N₂ lymph nodes were detected with the expression of CEA mRNA. Adenocarcinoma was more often associated with the expression of CEA mRNA compared with squamous-celled carcinoma. Patients with IB stage were higher expression of CEA mRNA in N₂ lymph nodes than whom with IA stage. Patients without the expression of CEA mRNA in N₂ lymph nodes had better survival. **Conclusions** Patients with the expression of CEA mRNA in N₂ lymph nodes probably indicates the exist of micrometastasis, and had worse survival. Adenocarcinoma was more often associated with high ratio of micrometastasis compared with squamous-celled carcinoma. Higher expression of CEA mRNA in N₂ lymph nodes in the patients with IB stage induced worse survival compared with the patients in IA stage.

【Key words】 Carcinoma, non-small-cell lung; Carcinoembryonic antigen; Reverse transcriptase polymerase chain reaction; Prognosis; Micrometastasis; N₂ lymph nodes

肺癌是人类常见的恶性肿瘤, 其中 I 期非小细胞

肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)预后最佳, 但其复发率仍然达 25%~50%, 可能的原因就是淋巴结等存在肿瘤微转移^[1], 而纵隔淋巴结(N₂)转移更是患者预后不良的重要标志^[2]。本研究采用荧光定量 RT-PCR 法检测癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA) mRNA 在 I 期 NSCLC 肿瘤组织、N₂ 淋巴结中的

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.17.028

基金项目: 南京市医学科技发展项目(QYK10170); 南京市卫生青年人才项目(宁卫科 2011-42)

作者单位: 210029 南京市胸科医院胸外科

通讯作者: 杨如松, Email: njyrs_md@188.com

表达, 对其与微转移及预后等相关性进行初步分析。

材料与方 法

1. 一般资料: 选取 2005~2010 年我院 160 例经术后病理确诊为 I 期非小细胞肺癌患者, 术前均未行放、化疗, 术中均行系统性纵隔淋巴结清除术, 清除淋巴结大于 6 组, 包括隆突下及肺门淋巴结。患者年龄 28~80 岁, 中位年龄 57.3 岁; 男 94 例, 女 66 例; 术后病理分期按照第 7 版国际抗癌联盟 (International Union Against Cancer, UICC) 标准进行分期, 其中 IA 期 (T1aN0M0, T1bN0M0) 82 例, IB 期 (T2aN0M0) 78 例, 腺癌 101 例, 鳞癌 59 例。分别取部分肺癌组织及隆突下 (N2) 淋巴结各一枚; 同时取 10 例术后证实肺良性疾病患者淋巴结 10 枚, 所有标本均取自病理科石蜡切片, 置于 -80 °C 妥善保存。本组患者随访从手术之日开始, 采用门诊定期复查、电话随访及电子邮件随访等方式, 自手术日起随访至患者死亡或者末次随访日为 2012 年 05 月 01 日, 平均随访时间 38.6 个月, 术后随访过程中若出现复发或转移则给予放疗或者化疗, 术后中位随访期 3 年。

2. RNA 的抽提和逆转录: (1) 石蜡切片 RNA 抽提: 石蜡组织切片样品刮入 1.5 ml 离心管。加入 1 ml 二甲苯及无水乙醇, 振荡离心, 无水乙醇重复洗涤离心, 37 °C 干燥 10~15 min。加入 1 ml RNAiso, 研磨粉碎, 转入 1.5 ml 离心管, 静置 5 min。按 RNAiso 1/5 体积加入氯仿, 震荡离心, 加入异丙醇, 混匀静置离心, 弃上清, 75% 乙醇洗涤沉淀离心, 弃上清, 室温干燥 5 min。用 50 μ l DEPC 水溶解沉淀, 紫外分光光度计测量 RNA 浓度。(2) 逆转录: 加 6-随机引物 2 μ l, 70 °C 变性 5 min。加入 5 \times Buffer 4 μ l、dNTP 1 μ l、RNase 0.5 μ l、反转录酶 0.3 μ l 的混合液。反应条件: 37 °C 60 min, 70 °C 15 min, 4 °C 保存。

3. 实时荧光定量 PCR: CEA 引物序列为: 上游: 5'-CGCAAGAGCCTATGTATGTGG-3', 下游: 5'-TTCGCTCCCGAAAGGTAAG-3'。内参 GRAPH 引物序列: 上游: 5'-GCCACATCGCTCAGACACC-3', 下游: 5'-GATGGCAACAATATCCACTTTACC-3'。定量 PCR 反应体系: SYBR Green 10 μ l、ROX 0.4 μ l、primer (F, R) 1 μ l, cDNA 2 μ l。反应条件: 95 °C 5 min 预变性, 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 共 37 个循环, 72 °C 退火 10 min。采用实时荧光定量 PCR 仪 ABI stepone plus 检测, 计算所有样本及内参照的 Ct 值, 通过比较 Ct 法 ($2^{-\Delta Ct}$ 法) 取得相对定量的结果。

4. 统计学分析: 应用 SPSS 19.0 统计软件, 组间率的比较采用 χ^2 检验, 用 Log-rank 进行差异检验, 采

用 Kaplan-Meier 法 (K-M 法) 估计生存率及平均生存时间, 绘制生存曲线。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

CEA mRNA 在 160 例肺癌组织中有 142 例表达 (142/160), 在 10 例肺良性疾病患者淋巴结中均未见表达 (0/10), N₂ 淋巴结 160 枚中有 19 枚表达 (19/160), 其中鳞癌有 1 枚表达 (1/59), 腺癌有 18 枚表达 (18/101), 腺癌患者中 N₂ 淋巴结中 CEA mRNA 表达高于鳞癌 ($P = 0.005$); IA 期患者有 3 枚表达 (3/82), IB 期患者有 16 枚表达 (16/78), IB 期患者 N₂ 淋巴结 CEA mRNA 表达高于 IA 期 ($P = 0.002$); 生存分析显示 N₂ 淋巴结表达患者 5 年生存率较不表达患者明显降低 ($P = 0.002$) (表 1, 图 1)。

表 1 CEA mRNA 在良性疾病、肺癌及 N₂ 淋巴结中表达情况

组织	例数	CEA mRNA 表达(例)		阳性率 (%)	P 值
		+	-		
肺癌组织	160	142	0	88.8	
良性疾病淋巴结	10	0	10	0	
N ₂ 淋巴结	160				
鳞癌	59	1	58	1.7	0.005
腺癌	101	18	83	17.8	
IA 期	82	3	79	3.7	0.002
IB 期	78	16	62	20.5	

讨 论

肺癌是人类常见的恶性肿瘤, 近十多年来我们对于肺癌的发生发展规律有了进一步的认识, 对其治疗也取得了很大的进展, 但 NSCLC 的生存率并未得到明显的提高。即使对于完全切除的 I 期 NSCLC 复发率仍然达 25%~50%, 可能的原因就是手术前的常规检查不能发现已经存在的隐匿性微转移灶^[1]。因此, 对非小细胞肺癌微转移的研究日益受到重视^[3-6]。

现今在肺癌淋巴结微转移的研究中尚无公认的专一性标记物。CEA 曾被认是一个广谱性肿瘤标志物, 不能作为肿瘤的筛选指标, 但自 RT-PCR 检测手段应用后, CEA mRNA 作为检测 NSCLC 尤其是腺癌患者淋巴结和外周血微转移的重要标志物已被广泛采用^[7-9]。本研究中, CEA mRNA 在 160 例肺癌组织中有 142 例表达 (142/160), 在 10 例肺良性疾病患者淋巴结中均未见表达 (0/10), N₂ 淋巴结 160 枚中有 19 枚表达 (19/160), 其中鳞癌有 1 枚表达 (1/59), 腺癌有 18 枚表达 (18/101), 可以发现 CEA mRNA 在腺癌患者的 N₂ 淋巴结中的表达明显高于鳞癌, 说明 I 期腺癌患者更容易发生纵隔淋巴结微转移, 因此预后可能较同

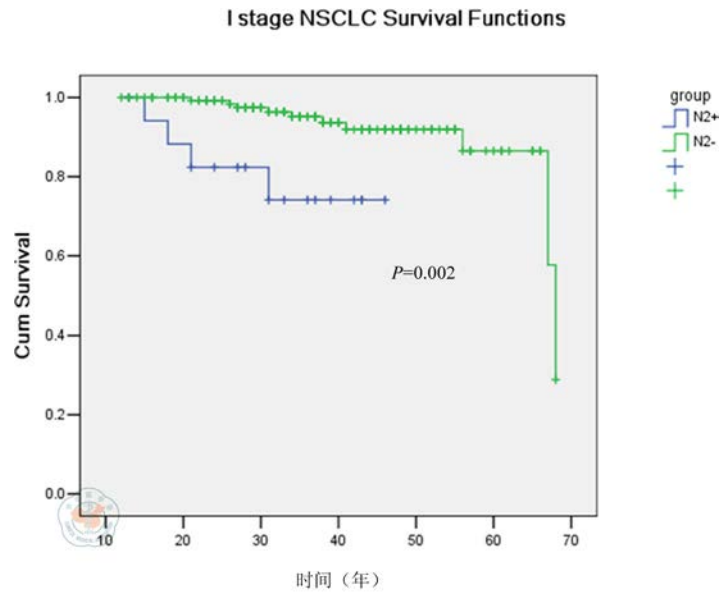


图1 I期NSCLC患者生存曲线

期的鳞癌差。Ohta 等^[10]对取自 181 例外周型 I 期 NSCLC 患者的 3081 枚淋巴结做微转移检测,发现直径不大于 2 cm 且未侵犯胸膜的鳞癌不存在淋巴结微转移,并提出手术只需对其行局部切除,但对于腺癌则无论肿瘤大小都存在淋巴结微转移的可能,因此需行肺叶切除+系统性纵隔淋巴结清除术。但是也有研究证明肿瘤组织类型与淋巴结微转移无明显相关性^[11]。早在 2002 年,Osaki 等^[12]发现,无论何种病理类型,从 I A 期上升到 I B 期则淋巴结微转移的发生率明显增加。本研究中病理分期为 I A 期患者有 3 枚表达 (3/82), I B 期患者有 12 枚表达 (12/78), I B 期患者 N₂ 淋巴结 CEA mRNA 表达高于 I A 期,说明 I B 期淋巴结较 I A 期发生 N₂ 淋巴结微转移可能性更大,因此其预后较差。

非小细胞肺癌的治疗及预后主要由肿瘤的 TNM 分期决定,包括肿瘤大小,区域淋巴结转移情况及远处转移情况。其中纵隔淋巴结 (N₂) 有无转移更是区别局限性肺癌 (I/II 期) 和局部晚期肺癌 (III A/IIIB 期) 的重要决定因素,也是患者预后不良的重要标志,对于一些直径较小 (直径小于 2 cm) 的肺癌亦可能存在纵隔淋巴结转移。Fukui 等^[2]研究显示,大约 5.8% 患者存在 N₂ 淋巴结转移,且病理类型均为侵袭性低分化腺癌。而对于淋巴结微转移与预后的关系,研究认为淋巴结微转移可导致患者不良预后^[13]。本研究显示,在 I 期 NSCLC 的 N₂ 淋巴结中检测到 CEA mRNA 的表达 (19/160),提示即使早期肺癌亦有可能发生 N₂ 淋巴结微转移,且生存分析显示 N₂ 淋巴结中 CEA mRNA 表达患者五年生存率较不表达患者明显降低,成为影响预后的重要独立因素之一。

本研究表明, I 期 NSCLC 患者 N₂ 淋巴结中 CEA mRNA 表达提示可能存在微转移,且预后较差,可以作为患者预后独立影响因子并可以作为 NSCLC 患者术后综合治疗 (放、化疗)、判断治疗效果等较好的参考指标。而腺癌 N₂ 淋巴结微转移率可能高于鳞癌,提示其预后较鳞癌差。而 I B 期患者预后较 I A 期差可能与其 N₂ 淋巴结微转移率较高有关。

参 考 文 献

- [1] Rena O, Carsana L, Cristina S, et al. Lymph node isolated tumor cells and micrometastases in pathological stage I non-small cell lung cancer: prognostic significance. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, 2007, 32: 863-867.
- [2] Fukui T, Katayama T, Ito S, et al. Clinicopathological features of small-sized non-small cell lung cancer with mediastinal lymph node metastasis. *Lung Cancer*, 2009, 66: 309-313.
- [3] Verhagen AF, Bulten J, Shirango H, et al. The clinical value of lymphatic micrometastases in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2010, 5: 1201-1204.
- [4] 姚成才, 姜杰, 赵德平, 等. 肺癌术中肺血管结扎顺序对肺癌微转移影响的研究. *中华肿瘤防治杂志*, 2010, 17: 1641-1645.
- [5] 李建英, 刘安, 鱼军, 等. CK19 mRNA, MUC1 mRNA, LUNX mRNA 在非小细胞肺癌微转移中的表达及临床意义. *现代肿瘤医学*, 2011, 19: 1551-1553.
- [6] 李晓玲, 张景国, 陈立群, 等. 期非小细胞肺癌多基因蛋白表达与淋巴结微转移及预后关系分析. *中国医科大学学报*, 2011, 40: 1026-1031.
- [7] 鲁立军, 谢云亭, 许凝. 术中胸膜腔冲洗液细胞学及 CEA 检测对 NSCLC 胸膜腔微转移预测价值分析. *中华肿瘤防治杂志*, 2012, 19: 1643-1646.
- [8] 丁凯, 周华富, 周晓艳, 等. CEA mRNA 及 CK19mRNA 在非小细胞肺癌外周血中的表达及其与临床病理参数的关系. *安徽医科大学学报*, 2012, 47: 171-174.
- [9] Sheu CC, Chang MY, Chang HC, et al. Combined detection of CEA, CK-19 and c-met mRNAs in peripheral blood: a highly sensitive panel for potential molecular diagnosis of non-small cell lung cancer. *Oncology*,

- 2006, 70: 203-211.
- [10] Ohta Y, Oda M, Wu J, et al. Can tumor size be a guide for limited surgical intervention in patients with peripheral non-small cell lung cancer? Assessment from the point of view of nodal micrometastasis. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2001, 122: 900-906.
- [11] Marchevsky AM, Qiao JH, Krajisnik S, et al. The prognostic significance of intranodal isolated tumor cells and micrometastases in patients with non-small cell carcinoma of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 126: 551-557.
- [12] Osaki T, Oyama T, Gu CD, et al. Prognostic impact of micrometastatic tumor cells in the lymph nodes and bone marrow of patients with completely resected stage I non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 2002, 20: 2930-2936.
- [13] Ono T, Minamiya Y, Ito M, et al. Sentinel node mapping and micrometastasis in patients with clinical stage IA non-small cell lung cancer. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2009, 9: 659-661.

(收稿日期: 2013-06-24)

(本文编辑: 张岚)

邵丰, 杨如松, 邹卫, 等. 纵隔(N₂)淋巴结 CEA mRNA 表达与 I 期非小细胞肺癌微转移及预后的关系 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(17): 7784-7787.

