

大肠癌患者外周血 CK19 和 MUC-1 mRNA 水平及其临床意义

071000 河北保定 解放军第 252 医院普外一科 王 前, 刘 洁¹, 安泽武²

【摘要】目的 探讨大肠癌(CRC)患者外周血中角蛋白(CK)19、黏蛋白(MUC)-1 mRNA 水平并分析两者与临床病理特征的关系。**方法** 采用巢式逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 20 例健康体检者(健康组)、20 例大肠良性腺瘤患者(良性疾病组)及 90 例 CRC 患者(CRC 组)的外周血 CK19 和 MUC-1 mRNA 水平,并分析两者与 CRC 临床病理参数(Dukes 分期、分化程度、远处转移及组织学类型)的关系。**结果** CRC 组 CK19 mRNA 阳性率为 58.9%(53/90),均高于健康组的 0 和良性疾病组的 5.0%(1/20),差异有统计学意义($P < 0.05$);CRC 组 MUC-1 mRNA 阳性率为 52.2%(47/90),与健康组的 60.0%(12/20)和良性疾病组的 50.0%(10/20)比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);健康组和良性疾病组 CK19 mRNA、MUC-1 mRNA 阳性率的差异无统计学意义($P > 0.05$)。CRC 中 CK19 mRNA 和 MUC-1 mRNA 阳性率均与 Dukes 分期、分化程度及远处转移有关($P < 0.05$),但与组织学类型无关($P > 0.05$)。**结论** CRC 患者外周血中 CK19 mRNA 阳性率明显升高,且外周血中 CK19 mRNA、MUC-1 mRNA 与 Dukes 分期、分化程度及远处转移有关,提示两者可能在 CRC 发生发展中均有重要意义。

【关键词】 大肠癌; 外周血; 细胞角蛋白 19; 黏蛋白-1

中图分类号:R735.3 文献标识码:A 文章编号:1009-0460(2014)03-0204-04

Expression of CK19 and MUC-1 mRNA in the peripheral blood of patients with colorectal cancer and their clinical significances

WANG Qian, LIU Jie, AN Zewu. Department of General Surgery, the No.252 Hospital of PLA, Baoding 071000, China

Corresponding author: AN Zewu, E-mail:anzewu99m126.com

【Abstract】Objective To explore the expression of cytokeratin (CK) 19 and mucin (MUC)-1 mRNA in the peripheral blood of patients with colorectal cancer (CRC) and their relationship with clinicopathological parameters. **Methods** The levels of CK19 and MUC-1 were measured by nested reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in the peripheral blood of 20 healthy human volunteers (Healthy group), 20 patients with benign colorectal adenomas (Benign disease group) and 90 patients with CRC (CRC group). The correlations between levels of CK19 and MUC-1 mRNA and clinicopathological parameters of CRC (Dukes stage, differentiation, distant metastasis and histological type) were analyzed. **Results** The positive rate of CK19 mRNA was 58.9% (53/90) of CRC group, higher than 0 of Healthy group and 5.0% (1/20) of Benign disease group with significant difference ($P < 0.05$). The positive rates of MUC-1 mRNA were 52.2% (47/90), 60.0% (12/20) and 50.0% (10/20) for CRC group, Healthy group and Benign disease group with no significant difference ($P > 0.05$). No significant differences were observed between Healthy group and Benign disease group on positive rates of CK19 mRNA and MUC-1 mRNA. The positive rates of CK19 mRNA and MUC-1 mRNA were related with Dukes stage, differentiation and distant metastasis, and non-related with histological type ($P < 0.05$). **Conclusion** The positive rate of CK19 mRNA in CRC increased, and CK19 and MUC-1 mRNA related with the Dukes stage, differentiation and distant metastasis, which may play an important role in the development of CRC.

【Key Words】 Colorectal cancer; Peripheral blood; Cytokeratin 19; Mucin-1

大肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的恶性肿瘤,其发病率居世界恶性肿瘤第3位,且呈逐年上升趋势,严重影响患者生活质量。早期 CRC 的预后

和生存质量较好,但常因无症状或症状不典型而被忽视。巢式逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)可检测外周血中微量癌细胞,其灵敏度达 $10^{-6} \sim 10^{-7}$ 级。

1 071000 河北省保定市第一中心医院

2 通讯作者, E-mail:anzewu99m126.com

目前缺少检测 CRC 微转移公认的特异分子标记物^[1]。细胞角蛋白(Cytokeratin, CK)家族来源于上皮组织,是真核细胞细胞骨架中间丝蛋白,而黏蛋白(Mucin, MUC)家族是一类主要存在黏液中的细胞表面糖蛋白,其中两家族的重要成员 CK19、MUC-1均在肿瘤的发生和转移中发挥了重要作用^[2-3]。但 CRC 中两者 mRNA 水平尚未见报道,故本研究采用巢式 RT-PCR 检测 CRC 患者外周血中 CK19 mRNA、MUC-1 mRNA 水平,同时分析两者 mRNA 水平与 CRC 临床病理特征的关系,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取解放军第 252 医院 2006 年 4 月至 2007 年 2 月收治的 90 例 CRC 患者(CRC 组),其中男性 47 例,女性 43 例;年龄范围 35~65 岁,中位年龄 53 岁;Dukes 分期:A 期 18 例,B 期 20 例,C 期 40 例,D 期 12 例;组织学类型:管状腺癌 50 例,乳头状腺癌 40 例;分化程度:高分化 13 例,中分化 57 例,低分化 20 例;40 例伴有远处转移。纳入标准:(1)未接受手术及化疗;(2)经病理学确诊。同时选取 20 例健康体检者(健康组)和 20 例大肠良性腺瘤患者(良性疾病组)作对照。健康组:男性 10 例,女性 10 例,年龄范围 28~60 岁,中位年龄 48 岁;良性疾病组:男性 10 例,女性 10 例,年龄范围 30~65 岁,中位年龄 50 岁。

1.2 主要试剂 TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司, DNA 聚合酶、逆转录试剂盒及引物均购自大连宝生物工程有限公司, RNase-free DNase I、cDNA 合成试剂盒均购自美国 Fermentas 公司, Taq PCR Master-Mix 购自天根公司, CRC 细胞株 A544 由中南大学湘雅医学院提供。

1.3 引物设计 参照 GenBank, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 CK19、MUC-1 的引物。CK19 外侧引物:上游 5'-AAGCTAACCATGCAGAACCTCAACGACCGC-3', 下游 5'-TTATTGGCAGGTCAGGAGAAGAGCC-3', 预期扩增产物长度 1069bp; 内侧引物:上游 5'-TTATTGGCAGGTCAGGAGAAGAGGCC-3', 下游 5'-CGCGACTTGATGTCCATGAGCCGCTGGTAC-3', 预期扩增产物长度 745bp。MUC-1 外侧引物:上游 5'-ATGCCAGTAGCACTCACCATA-G-3', 下游 5'-CAGCCAAGGCAATGAGATAGAC-3', 预期扩增产物长度 510bp; 内侧引物:上游 5'-C-

GTCGTGGACATTGATGGTACC-3', 下游 5'-GGTACCCTCTCTCACCTCCTCCAA-3', 预期扩增产物长度 287bp。内参 β -actin:上游 5'-TCATCACCATTGGCAATGAG-3', 下游 5'-CACTGTGTTGGCGTACAGGT-3', 预期扩增产物长度 154bp。

1.4 标本收集及总 RNA 提取鉴定 患者接受治疗前于空腹状态下抽取静脉血约 4ml, 置于 EDTA 抗凝管中, 红细胞裂解液裂解红细胞, 分离有核细胞, 异硫氰酸胍/苯酚法抽提总 RNA; 样本中加入 1ml TRIzol 试剂反复吹打使细胞充分裂解, 加入 200 μ l 三氯甲烷剧烈震荡, 冰上静置 2~5min, 120 000r/min 离心 15min, 抽取上清置于 EP 管中, 加入等体积预冷异丙醇, 120 000r/min 离心 10min, 弃上清, 采用无核酸酶的 75% 乙醇洗涤沉淀, DEPC 水溶解 RNA, 所得 RNA 溶液用 RNase-free DNase I 处理, -80 $^{\circ}$ C 保存。采用紫外分光光度计鉴定 RNA 纯度, 确保 260nm 与 280nm 吸光值的比值 ($A_{260/280}$) 的范围值在 1.78~1.99, 2% 琼脂糖凝胶电泳的条带清晰可见。

1.5 cDNA 合成及巢式 RT-PCR 扩增 以 RNA 为模板, 依次进行两轮 PCR 扩增, 具体条件如下。CK19(第 1 轮): 94 $^{\circ}$ C 1min, 65 $^{\circ}$ C 50s, 72 $^{\circ}$ C 2min, 2 $^{\circ}$ C 40s, 扩增 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 50s, 67 $^{\circ}$ C 50s, 72 $^{\circ}$ C 2min, 72 $^{\circ}$ C 40s, 扩增 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10min。CK19(第 2 轮): 94 $^{\circ}$ C 50s, 72 $^{\circ}$ C 2min, 扩增 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。MUC-1(第 1 轮): 94 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 45s, 55 $^{\circ}$ C 45s, 68 $^{\circ}$ C 1min, 扩增 35 个循环; 68 $^{\circ}$ C 终延伸 7min。MUC-1(第 2 轮): 94 $^{\circ}$ C 2min, 94 $^{\circ}$ C 45s, 55 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 7min。同时以标准 cDNA 为阳性对照, 无菌水为阴性对照。

1.6 PCR 产物鉴定 采用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 溴乙锭染色, 紫外光下观察, 在 745bp、287bp 处出现扩增条带分别提示 CK19-mRNA、MUC-1 mRNA 阳性结果。

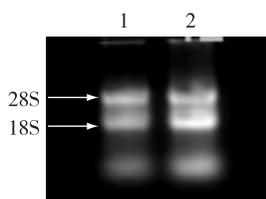
1.7 灵敏度检测 将生长良好的 A544 大肠癌细胞株, 用胰蛋白酶消化, 加入 0.9% 生理盐水 10ml 混匀, 显微镜下细胞计数, 得到每毫升悬液所含细胞数。调整液体体积至每毫升悬液含 1×10^7 个细胞, 依次稀释悬液浓度至 1×10^6 /ml、 1×10^5 /ml、 1×10^4 /ml、 1×10^3 /ml、 1×10^2 /ml、 1×10^1 /ml 和 1/ml 等 7 个数量级细胞浓度。提取细胞 RNA 做 CK 19 mRNA 和 MUC-1 mRNA 的 RT-PCR 分析。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 11.5 版软件分析。

数据比较用 χ^2 检验和 Fisher 确切概率法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 总 RNA 鉴定 抽取 RNA 的 $A_{260/280}$ 值在 1.78 ~ 1.99 之间,用 2% 琼脂糖凝胶电泳、凝胶成像系统成像可见 28S、18S 的清晰条带,表明 RNA 完整性和纯度均符合标准,可用于后续检测。见图 1。



1,2: CRC 患者标本

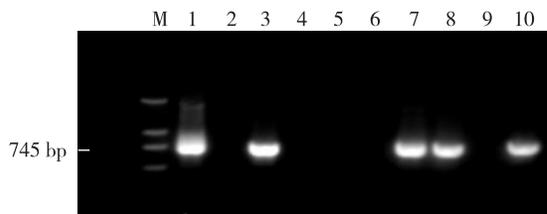
图 1 部分总 RNA 样本电泳图

2.2 各组 CK19 mRNA 和 MUC-1 mRNA 阳性率情况 CRC 组的 CK19 mRNA 阳性率均高于其他两组 ($P < 0.05$),健康组与良性疾病组的 CK19 mRNA 阳性率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。3 组 MUC-1 mRNA 的阳性率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1、图 2、图 3。

表 1 3 组 CK19 mRNA 和 MUC-1 mRNA 的阳性率比较 [例 (%)]

| 组别 | n | CK19 mRNA | | MUC-1 mRNA | |
|-------|----|------------------------|------------------------|------------|----------|
| | | + | - | + | - |
| 健康组 | 20 | 0(0) | 20(100.0) | 12(60.0) | 8(40.0) |
| 良性疾病组 | 20 | 1(5.0) | 19(95.0) | 10(50.0) | 10(50.0) |
| CRC 组 | 90 | 53(58.9) ^{**} | 37(41.1) ^{**} | 47(52.2) | 43(47.8) |

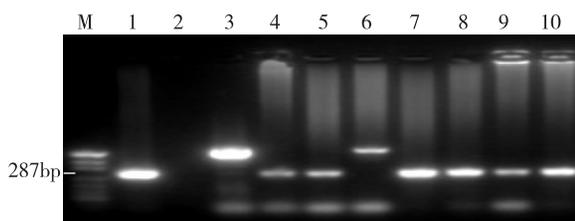
注:与健康组比较: * $P < 0.05$;与良性疾病组比较: # $P < 0.05$



M: 相对分子质量参照物 (DNA marker); 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3~10: CRC (3、7~8 及 10 为阳性表达)

图 2 CRC 外周血巢式 RT-PCR 产物中 CK19 mRNA 的表达

2.3 CK19 mRNA 和 MUC-1 mRNA 阳性率与临床



M: 相对分子质量参照物 (DNA marker); 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3~10: CRC (4~5、7~10 为阳性表达)

图 3 CRC 外周血巢式 RT-PCR 产物中 MUC-1 mRNA 的表达

病理参数的关系 CRC 中 CK19 mRNA 和 MUC-1 mRNA 阳性率均与 Dukes 分期、分化程度及远处转移有关 ($P < 0.05$),但与组织学类型无关 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 CK19 mRNA 和 MUC-1 mRNA 阳性率与 CRC 临床病理特征的关系 [例 (%)]

| 临床病理参数 | n | CK19 mRNA + | MUC-1 mRNA + |
|----------|----|-----------------------|-----------------------|
| Dukes 分期 | | | |
| A+B | 38 | 12(31.6) [*] | 11(28.9) [*] |
| C+D | 52 | 41(78.8) | 36(69.2) |
| 分化程度 | | | |
| 高+中 | 70 | 37(52.9) [*] | 30(42.9) [*] |
| 低 | 20 | 16(80.0) | 17(85.0) |
| 远处转移 | | | |
| 无 | 50 | 21(42.0) [*] | 17(34.0) [*] |
| 有 | 40 | 32(80.0) | 30(75.0) |
| 组织学类型 | | | |
| 管状腺癌 | 50 | 29(58.0) | 23(46.0) |
| 乳头状腺癌 | 40 | 24(60.0) | 24(60.0) |

注:与对应项比较, * $P < 0.05$

2.4 灵敏度检测 RT-PCR 检测 CK19 mRNA 和 MUC-1 mRNA 的灵敏度为 10^{-6} ($1 \times 10^1 / \text{ml}$),而 10^{-7} 级 ($1 / \text{ml}$) 的细胞悬液未检测出两者 mRNA 的阳性表达。

3 讨论

CK19、MUC-1 均在肿瘤发生及转移中发挥了重要作用,目前已成为研究热点。CK 家族来源于上皮组织,是真核细胞细胞骨架中间丝蛋白,广泛表达于上皮组织细胞中,而在间叶组织中缺乏表达^[2]。CK19 是 CK 家族的重要成员之一。MUC 家族是一类主要存在于黏液中的细胞表面糖蛋白,位于人染色体 1q21 ~ q24 区域,共有 MUC-1、MUC-2、

MUC-3、MUC-4、MUC-5a 和 MUC-5b 共 6 个成员^[3-4]。国外一些报道指出 MUC-1 与实体瘤关系密切,同时健康人外周血中也发现 MUC-1,故认为将外周血 MUC-1 mRNA 作为诊断实体瘤微转移的指标尚不成熟^[5-6],同时与 CRC 临床病理特征的关系还需要进一步探讨。

Saintigny 等^[7]发现 CRC 组外周血 CK19 mRNA 阳性表达率高于健康组,认为 CK19 mRNA 与 CRC 的发生有关。本研究表明 CRC 组外周血的 CK19 mRNA 阳性率均高于健康组和良性疾病组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。但 CRC 组外周血 MUC-1 mRNA 阳性率与健康组和良性疾病组的差异均无统计学意义($P > 0.05$),提示 MUC-1 能否作为 CRC 微转移的特异性标志物还需进一步探讨。本研究还发现 CK19 mRNA 和 MUC-1 mRNA 阳性率均与 Dukes 分期及分化程度有关($P < 0.05$),Dukes 分期中“C+D 期”及低分化患者中 CK19 mRNA 和 MUC-1 mRNA 阳性率均高于对应项($P < 0.05$),提示两者可能在 CRC 发生发展中具有重要作用。

理论上起源于上皮组织的 CRC 保留着某些上皮组织特异性标记物的表达,而间叶组织中一般无上皮组织标记物,在 CRC 外周血中检测到上皮组织特异性标记物,即可诊断为转移^[8]。Oosterkamp 等^[9]应用 RT-PCR、Northern blotting 及放射免疫沉淀法研究了人类上皮细胞及非上皮细胞来源细胞系中 CK19 mRNA 情况,证实有不同数量 CK19 mRNA 及蛋白被检测出,但在非上皮来源的肿瘤细胞中的检出量低于上皮来源的肿瘤。本研究发现 CK19 mRNA 和 MUC-1 mRNA 在伴有远处转移的 CRC 外周血中的阳性率高于无远处转移者,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 CK19、MUC-1 可能在 CRC 转移中具有重要作用。

综上所述,CRC 中 CK19 mRNA 阳性率升高,且

CK19 mRNA、MUC-1 mRNA 与 Dukes 分期、分化程度及远处转移有关,可能在 CRC 发生发展中有重要意义。

参考文献

- [1] Osaki T, Oyama T, Gu CD, et al. Prognostic impact of micro-metastatic tumor cells in the lymph nodes and bone marrow of patients with completely resected stage I non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(13): 2930-2936.
- [2] Lee CW, Kuo WL, Yu MC, et al. The expression of cytokeratin 19 in lymph nodes was a poor prognostic factor for hepatocellular carcinoma after hepatic resection [J]. *World J Surg Oncol*, 2013, 11(1): 136.
- [3] Pichon MF, Brun GL, Hacene K, et al. Comparison of fifteen immunoassays for the measurement of serum MUC-1/CA 15-3 in breast cancer patients [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2009, 47(8): 985-992.
- [4] 王为东,李玉军.CD147 和 CK19 在肝细胞癌中的表达及临床意义 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2012, 17(4): 334-338.
- [5] Lacunza E, Abba MC, Segal-Eiras A, et al. Identification and expression of the epithelial Muc1 mucin in normal feline tissues [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, 130(1-2): 17-24.
- [6] Pelkey TJ, Frison HF, Bruns DE. Molecular and immunological detection of circulating tumor cells and micrometastasis from solid tumor [J]. *Clin Chem*, 2008, 2(9): 1369-1381.
- [7] Saintigny P, Coulon S, Kambouchner M, et al. Real-time RT-PCR detection of CK19, CK7 and MUC-1 mRNA for diagnosis of lymph node micrometastases in non small cell lung carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2005, 115(5): 777-782.
- [8] Alvi AR, Siddiqui NA, Zafar H. Risk factors of gallbladder cancer in Karachi-a case-control study [J]. *World J Surg Oncol*, 2011, 9: 164.
- [9] Oosterkamp HM, Scheiner L, Stefanova MC, et al. Comparison of MUC-1 expression in epithelial and non-epithelial cancer cell lines and demonstration of a new short variant form (MUC-1/Z) [J]. *Int J Cancer*, 1997, 72(1): 87-94.

收稿日期:2013-09-10; 修回日期:2013-10-12