

检测细胞角蛋白在食管癌外周血和骨髓微转移中的意义

姚成才¹, 张 义¹, 柯胜奎², 章云鹏³, 姜 杰⁴

Significance of cytokeratine detection for micrometastatic tumor cells in peripheral blood and bone marrow in patients with esophageal cancer

YAO Chengcai¹, ZHANG Yi¹, KE Shengkui², ZHANG Yunpeng³, JIANG Jie⁴

¹Department of Chest - surgery, Fujian Traditional Chinese Medical University Affiliated Xiamen T. C. M Hospital, the Overseas Chinese Hospital of Xiamen, Fujian Xiamen 361009, China; ²Department of Chest - surgery, Xiamen University Affiliated Zhongshan Hospital, Fujian Xiamen 361005, China; ³The Medicine College of Xiamen University, Fujian Xiamen 361002, China; ⁴Health Bureau of Xiamen City, Fujian Xiamen 361001, China.

【Abstract】 Objective: To explore the clinical significance of cytokeratine (CK) 18mRNA gene expression in peripheral blood and bone marrow of patients with esophageal cancer. **Methods:** Nested reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expressions of CK18mRNA gene in peripheral blood and rib marrow of 50 esophageal carcinoma patients without distal metastasis, 10 esophageal carcinoma patients with distal metastasis, 10 benign esophageal disease patients. **Results:** In peripheral blood and rib marrow of 50 esophageal carcinoma patients without distal metastasis group, the positive expression rates of CK18mRNA were 38.0% (19/50) and 42.0% (21/50). In 10 esophageal carcinoma patients with distal metastasis group, the positive expression rates of CK18mRNA were 90.0% (9/10) and 100% (10/10), CK18mRNA was not detected in benign esophageal disease group. There were very significant differences among three groups ($P < 0.01$). The CK18mRNA positive expression rate were significantly different in stage IV than less than stage III esophageal cancer ($P < 0.05$). CK18mRNA positive expression rate was not significantly different in peripheral blood and rib marrow of esophageal cancer ($P > 0.05$), but both was closely positive correlated ($r = 0.704, P < 0.01$). **Conclusion:** It is helpful to detect the expression of CK18mRNA gene in peripheral blood and rib marrow in early diagnosis of esophageal cancer micrometastasis.

【Key words】 esophageal cancer; cytokeratine; micrometastasis; peripheral blood; bone marrow

Modern Oncology 2012, 20(09): 1863 - 1866

【摘要】 目的: 探讨食管癌患者外周血和骨髓中 CK18mRNA 基因表达及临床意义。**方法:** 采用巢式 RT-PCR 方法检测 50 例 M₀、10 例 M₁ 的食管癌患者及 10 例食管良性病变患者外周血及肋骨骨髓中细胞角蛋白 CK18mRNA 基因的表达。**结果:** 50 例 M₀ 食管癌患者外周血、骨髓中 CK18mRNA 阳性表达率分别为 38.0% (19/50) 和 42.0% (21/50); 10 例 M₁ 的食管癌患者外周血、骨髓中 CK18mRNA 阳性表达率分别为 90.0% (9/10)、100% (10/10); 食管良性病变患者的外周血和骨髓中 CK18mRNA 阳性表达率均为 0% (0/10), CK18mRNA 阳性表达在三组间差异有显著性 ($P < 0.01$)。CK18mRNA 在 IV 期食管癌患者外周血和骨髓中阳性表达率与 III 期以前患者相比, 有显著性差异 ($P < 0.05$)。CK18mRNA 在外周血和骨髓中表达无差异 ($P > 0.05$), 但呈正相关性 ($r = 0.704, P < 0.01$)。**结论:** 应用 RT-PCR 法检测食管癌患者外周血或骨髓中 CK18mRNA 微转移有助于食管癌的分期和预后的判断。

【关键词】 食管癌; 细胞角蛋白; 微转移; 外周血; 骨髓

【中图分类号】 R735.1

【文献标识码】 A

DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2012.09.31

【文章编号】 1672-4992-(2012)09-1863-04

【收稿日期】 2011-09-01

【修回日期】 2011-09-12

【作者单位】 ¹福建中医药大学附属厦门中医院暨厦门华侨医院胸外科, 福建 厦门 361009

²厦门大学附属中山医院, 福建 厦门 361005

³厦门大学医学院, 福建 厦门 361002

⁴厦门市卫生局, 福建 厦门 361001

【作者简介】 姚成才 (1973-), 男, 安徽安庆人, 博士, 副主任医师, 主要从事手汗症、胸部、乳腺、消化道肿瘤的早期诊断治疗和微创治疗工作。E-mail: yao-130@yahoo.com.cn

食管癌是常见的消化道恶性肿瘤,其疗效不尽人意,究其原因主要是远处转移和局部复发,而血液和骨髓中微转移是复发和转移的基础。细胞角蛋白 18 (Cytokeratin 18, CK18) 是上皮细胞骨架的组成成分,是具有严格的上皮特异性的癌细胞标志物,在正常骨髓、血液、淋巴结中无表达^[1],在转移、扩散到其他组织器官时,其特性始终保持稳定^[2]。本研究利用 CK18 这一特性,采用巢式逆转录聚合酶链反应 (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 方法检测 50 例 M₀、10 例 M₁ 的食管癌患者及 10 例食管良性病变患者外周血和骨髓中 CK18mRNA 基因的表达情况及临床意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料

研究组:选择 2003 年 9 月至 2004 年 5 月病理确诊为食管癌而 B 超、CT 或术中探查未发现远处转移的 M₀ 患者 50 例。对照组:①阳性对照组:同期 B 超、CT、术中探查明确发现远处转移 M₁ 患者 10 例。②食管良性病变对照组:食管平滑肌脂肪瘤 5 例,贲门失弛症 3 例,食管烧伤 2 例。

1.2 标本采集和处理

所有患者均未行任何针对肿瘤的治疗,术前采取外周静脉血(肝素抗凝),先抽 1ml 弃去,更换针筒再留取 5ml。开胸术中自腋后线第 5 或 6 肋弓处用骨穿针抽取 3-5ml 骨髓(注射器和标本均肝素抗凝),所采集新鲜血液和骨髓标本立即在超净台内进行淋巴细胞分离提取单个核细胞,加入 Trizol 试剂-20℃ 保存用于后续实验。

1.3 实验仪器与试剂

TGL-16G 台式高速冷冻离心机(上海安亭公司),凝胶图像分析系统(英国 Syngene 公司),DNA 扩增仪(德国 Whatman/Biometra 公司),紫外分光光度计 UV-2550(日本岛津公司),Trizol 抽提试剂盒(美国 Invitrogen 公司),AMV 二步法 RT-PCR 试剂盒(上海申工生物工程有限公司)。

1.4 实验方法

总 RNA 提取:采用 Trizol 抽提试剂盒,按其说明书步骤提取细胞中总 RNA,电泳结果显示 RNA 提取质量良好。RT-PCR:以提取的总 RNA 为模板,按 AMV 二步法 RT-PCR 试剂盒说明书中步骤进行。CK18mRNA 引物(上海申工生物工程有限公司)合成设计序列如下: A 5'-CGTCTGTTTCAAGGAGTGGACCCGGT-3'; B 5'-CCAGTGCCGACGGAG-GTTGTTGA-3'; C 5'-CACGAGTGGACCCGGT-3'; D 5'-CCAGTGCCGACGGAG-3'; 扩增产物片段长度为 388 bp。内参照 β-actin 引物: 5'-CCAAGCCAACCGCGAGAAGAT-GAC-3'; 5'-AGGGTACATGCTGCTGCCGCCAGAC-3'; 扩增产物片段长度为 589bp。PCR 反应条件:预变性,94℃ 2min; 变性,94℃ 15s; 退火,56℃ 40s; 延伸,68℃ 45s; 40 个循环; 最后 70℃ 延伸 5min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳观测(图 1-3)。

1.5 统计学方法

用 SPSS11.5 统计分析软件包行 χ² 检验或四格表确切概率法和 Logistic 回归检验,规定双侧 P < 0.05 或 0.01 为差异有显著性。

2 结果

2.1 CK18mRNA 在三组之间表达的比较

研究组:CK18mRNA 阳性检出率在外周血和骨髓中分别

为 38.0% (19/50) 和 42.0% (21/50)。阳性对照组:CK18mRNA 阳性检出率在外周血和骨髓中分别为 90.0% (9/10) 和 42.0% (21/50)。10 例良性病变对照组外周血和骨髓中 CK18mRNA 阳性表达率为 0% (0/10)。统计学分析发现外周血和骨髓中 CK18mRNA 阳性检出率在三组间差异显著,有统计学意义(χ² 外 = 17.167, P = 0.000 和 χ² 髓 = 20.635, P = 0.000)。表 1。

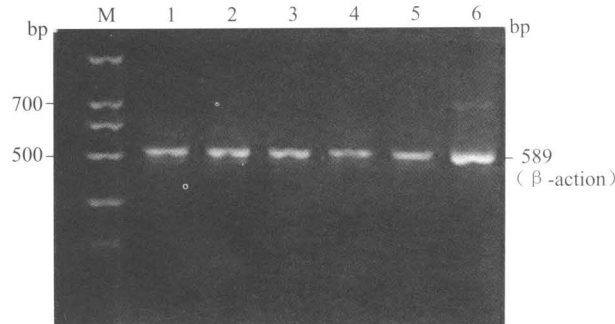


图 1 组织标本中内参 β-action 琼脂糖凝胶电泳测定结果 M:Marker;1,3:有远处转移组;2:良性病变组;4,5,6:无远处转移组

Fig. 1 The result of tissue sample β-action in 1% agarose gel electrophoresis

M:Marker;1,3:Esophageal carcinoma tissues with distal metastasis; 2:Benign esophageal disease tissues;4,5,6:Esophageal carcinoma tissues without distal metastasis

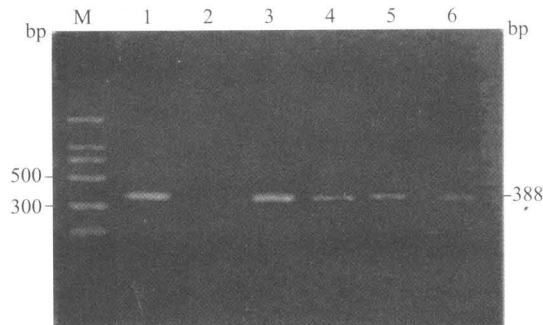


图 2 肋骨骨髓中 CK18mRNA 琼脂糖凝胶电泳测定结果, 1,3,4,5,6 为阳性结果,2 为阴性结果

M:Marker;1,3:有远处转移组;2:良性病变组;4,5,6:无远处转移组

Fig. 2 The result of the rib marrow CK18mRNA in 1% agarose gel electrophoresis. 1,3,4,5,6 were positive results, 2 was negative result

M:Marker;1,3:Esophageal carcinoma tissues with distal metastasis; 2:Benign esophageal disease tissues;4,5,6:Esophageal carcinoma tissues without distal metastasis

表 1 各组患者术前外周血、骨髓中 CK18mRNA 的检测结果 n(%)

Tab. 1 The detective results of the preoperation expressions of CK18mRNA gene in the peripheral blood and rib marrow among 3 groups n(%)

Groups	n	Peripheral blood		Rib marrow	
		Negative	Positive	Negative	Positive
Study	50	31	19(38.0)	29	21(42.0)
Positive contrast	10	1	9(90.0)	0	10(100.0)
Benign contrast	10	10	0(0)	10	0(0)

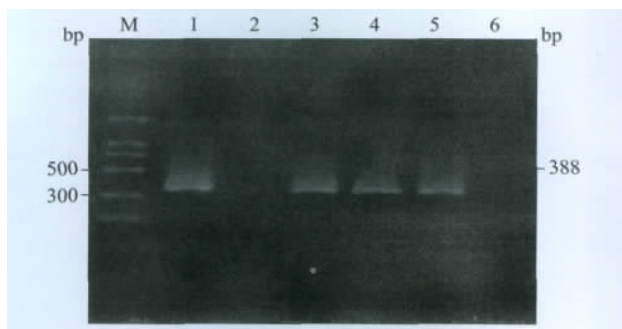


图3 外周血中 CK18mRNA 琼脂糖凝胶电泳测定结果,1、3、4、5 为阳性结果,2、6 为阴性结果

M: Marker; 1,3: 有远处转移组; 2: 良性病变组; 4,5,6: 无远处转移组

Fig. 3 The result of the peripheral blood CK18mRNA in 1% agarose gel electrophoresis. 1, 3, 4, 5 were positive results. 2, 6 was negative result

M: Marker; 1,3: Esophageal carcinoma tissues with distal metastasis; 2: Benign esophageal disease tissues; 4,5,6: Esophageal carcinoma tissues without distal metastasis

2.2 食管癌患者外周血、骨髓中 CK18mRNA 阳性表达与 TNM 分期的关系

IV期食管癌患者外周血中 CK18mRNA 阳性表达与 0 + I + II_a + II_b + III期(III期以前)相比有显著性差异($\chi^2 = 9.054, P = 0.003$)。IV期食管癌患者骨髓中 CK18mRNA 阳性表达与 0 + I + II_a + II_b + III期(III期以前)相比有显著性差异($\chi^2 = 11.226, P = 0.001$)。见表2。

2.3 CK18mRNA 在外周血和骨髓中表达的关系

食管癌患者骨髓中 CK18mRNA 阳性检出率为 51.7% (31/60),外周血中 CK18mRNA 阳性检出率为 46.7% (28/60),二者之间比较无统计学意义($\chi^2 = 0.300, P = 0.584$)。CK18mRNA 在外周血、骨髓中同为阳性表达 25 例,同为阴性表达 26 例,骨髓中阳性表达而外周血中阴性表达 6 例,骨髓中阴性表达而外周血中阳性表达 3 例。在 60 例食管癌患者中,CK18mRNA 表达一致共有 51 例,一致率为 85.0% (51/60)。统计学分析显示 CK18mRNA 外周血中表达与骨髓中表达呈正相关($r = 0.704, P = 0.000$)。

表2 外周血、骨髓中 CK18mRNA 检测阳性分布与 TNM 分期的关系 n(%)

Tab. 2 The relation of the positive detective results of the expressions of CK18mRNA gene with TNM stages in the peripheral blood and bone marrow n(%)

TNM stages	n	Peripheral blood		Bone marrow	
		Negative	Positive	Negative	Positive
0	2	2	0(0)	2	0(0)
I	2	1	1(50.0)	1	1(50.0)
II _a	10	6	4(40.0)	6	4(40.0)
II _b	12	8	4(33.3)	7	5(41.7)
III	24	14	10(41.7)	13	11(45.8)
IV	10	1	9(90.0)	0	10(100.0)

3 讨论

肿瘤细胞的微转移是肿瘤复发和远处转移的基础,也是肿瘤治疗失败的基本原因之一。近年来国内外许多学者用

多种方法对肿瘤微转移进行了广泛的研究^[3-4]。结果表明,认为无转移的肿瘤往往存在广泛的微转移,并且是影响远期生存的独立因素,从而对肿瘤的合理治疗方案的制定提供了理论依据。由于食管癌显著的地域性分布差异,受各种条件的制约,在其微转移方面的研究的广度和深度均滞后于肺癌、乳腺癌、结肠癌等疾病。

国外^[5]对食管癌的微转移研究多集中在淋巴结方面,Kutup A 等^[6]发现食管癌的复发可能与淋巴结和骨髓中肿瘤细胞的微转移有关,并指出通过检测不同实体瘤的淋巴结和骨髓中抗肿瘤靶点可能是治疗该类肿瘤的一种新的方法。O'Sullivan 等^[7]利用流式细胞技术和免疫组化技术发现 50 例食管癌患者肋骨骨髓 CK18 微转移达 88% - 89%,并且成功接种肋骨骨髓中癌细胞于裸鼠皮下,充分表明食管癌患者骨髓中存在微转移。本研究发现食管癌患者骨髓中 CK18mRNA 阳性检出率为 51.7% (31/60),较 O'Sullivan 等^[7]检出率低,可能与实验方法和实验操作技巧的娴熟程度不同有关。Nakamura 等^[8]报道 3 例 I 期食管癌患者外周血中 CK18mRNA 阳性 2 例;并且在 I 期有 6% 远处转移,50% 淋巴结有微转移。本实验结果也显示, I 期 2 例患者有 1 例 CK18mRNA 阳性阳性率为 50% (1/2), I_a 期 10 例 CK18mRNA 阳性表达 4 例(40%),提示食管癌患者早期就可发生外周血和骨髓微转移。本研究还发现 CK18mRNA 阳性表达在 IV 期与 III 期以前相比,差异有显著性($P < 0.05$), III 期前各期之间比较差异无显著性($P > 0.05$),说明当患者临床发现转移时,CK18mRNA 阳性表达率 100%,而没有显性转移者其 CK18mRNA 阳性表达率差异不大,但其阳性表达率逐渐增高,说明微转移随肿瘤的进展而逐渐增加。

本研究发现 CK18mRNA 在骨髓中阳性检出率为 51.7% (31/60),在外周血中阳性检出率为 46.7% (28/60),骨髓较外周血中阳性检出率高,但无统计学意义,这与多数学者报道在骨髓较外周血中阳性检出率高且有统计学意义不同,考虑可能与样本量太小有关。CK18mRNA 在外周血和骨髓中表达一致共有 51 例,一致率为 85.0% (51/60),Logistic 回归分析发现 CK18mRNA 在二者表达呈正相关($r = 0.704, P < 0.01$),这也说明血液和骨髓中微转移的发生是关联的,二者似乎是同时进行的,当然,具体细节还有待进一步深入研究。

【参考文献】

[1] pelkey TJ, Frison HF, Bruns G, et al. Molecular and immunological detection of circulating tumor cells and micrometastasis from solid tumor [J]. Clin Chem, 1996, 2(9): 1369 - 1381.

[2] Oki E, Maehara Y, Tokunaga E, et al. Detection of disseminated cancer cells in bone marrow of gastric cancer using real time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction [J]. Cancer Lett, 2002, 188(1-2): 191 - 198.

[3] Xia WM, Liu DY, Zhou WL, et al. Study on micrometastases in pelvic lymph nodes detected by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction with clinically localized prostate cancer before radical prostatectomy [J]. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2010, 48(20): 1565 - 1568.

[4] Tarakawa T, Miyake H, Kurahashi T, et al. Improved sensitivity for detecting micrometastases in pelvic lymph nodes by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) compared with conventional RT-PCR in patients with clinically local-

- ized prostate cancer undergoing radical prostatectomy [J]. *BJU Int*, 2009, 103(8): 1074 - 1078.
- [5] Kayani B, Zacharakis E, Ahmed K, et al. Lymph node metastases and prognosis in oesophageal carcinoma - A systematic review [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2011, 37(9): 747 - 753.
- [6] Kutup A, Yekebas EF, Izbicki JR. Current diagnosis and future impact of micrometastases for therapeutic strategies in adenocarcinoma of the esophagus, gastric cardia, and upper gastric cancer [J]. *Recent Results Cancer Res*, 2010, 182: 115 - 125.
- [7] O'Sullivan GC, Sheehan D, Clarke A, et al. Micrometastasis in esophagogastric: High detection rate in resected rib segments [J]. *Gastroenterology*, 1999, 116(3): 543 - 548.
- [8] Nakamura T, Yasumura T, Hayashi K, et al. Immuno - cytochemical detection of circulating esophageal carcinoma cells by immunomagnetic separation [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(6C): 4739 - 4744. (编校: 张西敏)

多西他赛单药二线治疗 33 例晚期非小细胞肺癌疗效观察

曾建昌, 戈 伟

Efficacy of docetaxel single - agent as second - line treatment for 33 patients with advanced non - small cell lung cancer

ZENG Jianchang, GE Wei

Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei Wuhan 430060, China.

【Abstract】 Objective: To evaluate the single - agent docetaxel as second - line treatment of advanced non - small cell lung cancer (NSCLC) treatment and adverse reactions. **Methods:** Thirty three patients with advanced non - small cell lung cancer were treated by platinum - containing chemotherapy, if relapse or progress after treatment to receive docetaxel 75mg / m² intravenous infusion of 1 hour, the first day repeat every 3 weeks. **Results:** All 33 cases could be evaluated, no complete remission (CR), partial remission (PR) was 12. 1% (4 / 33), stable (SD) 51. 5% (17 / 33), progress (PD) 36. 4% (12 / 33), effective rate was 12. 1% (4 / 33), the median survival time 8. 5 months, one year survival rate 33. 3% (11 / 33). Adverse reactions were mainly hematological toxicity, but patients can be tolerated. **Conclusion:** The single - agent docetaxel for second - line chemotherapy for advanced non - small cell lung cancer is effective and with a better tolerability.

【Key words】 docetaxel; second - line treatment; advanced; non - small cell lung cancer

Modern Oncology 2012, 20(09): 1866 - 1868

【摘要】 目的: 评价单药多西他赛作为二线治疗对晚期非小细胞肺癌(NSCLC) 的疗效和不良反应。 **方法:** 33 例经病理和(或) 细胞学检查诊断为晚期非小细胞肺癌, 曾用含有铂类方案化疗, 治疗后复发或进展接受多西他赛 75mg / m² 静滴 1 小时, 第一天, 每 3 周重复。 **结果:** 可评价疗效 33 例中, 无完全缓解(CR), 部分缓解(PR) 12. 1% (4 / 33), 稳定(SD) 51. 5% (17 / 33), 进展(PD) 36. 4% (12 / 33), 有效率 12. 1% (4 / 33), 中位生存期 8. 5 个月, 1 年生存率 33. 3% (11 / 33)。 不良反应主要是血液学毒性, 可以耐受。 **结论:** 多西他赛单药用于二线化疗治疗晚期非小细胞肺癌疗效肯定, 耐受性较好。

【关键词】 多西他赛; 二线治疗; 晚期; 非小细胞肺癌

【中图分类号】 R734. 2

【文献标识码】 A

DOI: 10. 3969 / j. issn. 1672 - 4992. 2012. 09. 32

【文章编号】 1672 - 4992 - (2012) 09 - 1866 - 03

【收稿日期】 2011 - 12 - 26

【修回日期】 2012 - 02 - 09

【作者单位】 武汉大学人民医院肿瘤中心, 湖北 武汉 430060

【作者简介】 曾建昌(1975 -), 男, 湖北武汉人, 在职硕士研究生, 副主任医师, 主要从事肿瘤内科专业工作。 E - mail: zengjianchang@ sina. com

【通讯作者】 戈伟(1960 -), 男, 湖北武汉人, 副主任医师, 副教授, 主要从事肺癌综合治疗肿瘤靶向治疗工作。 E - mail: gewei514@ 126. com

肺癌是危害人类健康常见的恶性肿瘤之一。 80% - 85% 的肺癌是非小细胞肺癌, 其中大多数患者诊断时已是 III / IV 期患者, 其 5 年生存率不到 5%^[1]。 目前以铂类为基础的两药联合化疗能改善晚期非小细胞肺癌患者的生存时间及生活质量, 作为标准化疗方案广泛应用于一线治疗^[2]。 出现疾病进展后行二线化疗仍是当前的重要手段, 近年来, 已有多个随机临床研究证实两药联合二线化疗与单药相比并不具有生存优势, 且毒副反应更大^[3]。 单药化疗成为治疗选择而广泛应用于临床。 我院采用多西他赛单药每三周给药