

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.08.015

非小细胞肺癌患者外周血 CEA mRNA 表达及临床意义

冯 旭¹,丁 凯²,周华富¹,何 巍¹,郭建极¹

Expression and Clinical Significance of CEA mRNA in Peripheral Blood of Non-small Cell Lung Cancer Patients

FENG Xu¹,DING Kai²,ZHOU Hua-fu¹,HE Wei¹,GUO Jian-ji¹

1. Department of Cardiothoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Department of Cardiothoracic Surgery, Wanbei Coal-electricity Group General Hospital

Corresponding Author: DING Kai, E-mail: kay826@163.com

Abstract: Objective To detect CEA expression in peripheral blood of non-small lung cancer(NSCLC) patients and discuss the possibility of indicating NSCLC micrometastases by it. **Methods** The expression of CEA mRNA was analyzed by RT-PCR in 48 NSCLC in peripheral blood, compared with 15 patients with benign lung disease(BLD) and 10 healthy volunteers. **Results** The positive expression rate of CEA mRNA was significantly higher in NSCLC than in those of BLD and healthy volunteers($P<0.01$). The expression rate of CEA mRNA was 27.8%, 83.3%, 61.5%, 100% in peripheral blood with non-small cell lung cancer of TNM stage I ~IV respectively. The positive expression of CEA was closely related with the clinical staging and lymph node metastasis($P<0.05$), but not related to pathological type and tumor cell differentiation($P>0.05$). **Conclusion** Expressions of CEA mRNA in peripheral blood can be used as a valuable biomarker for diagnosis of micrometastasis in patients with NSCLC.

Key words: Non-small cell lung cancer; Peripheral blood; Micrometastases; Carcinoembryonic antigen mRNA

摘要:目的 检测非小细胞肺癌(NSCLC)患者外周血 CEA 表达情况,探讨其作为分子标志物检测 NSCLC 微转移的可行性。**方法** 应用 RT-PCR 技术检测 48 例 NSCLC 患者,15 例肺良性疾病(BLD)患者和 10 例健康人外周血 CEA mRNA 的表达。**结果** NSCLC 患者 CEA mRNA 的阳性表达率明显高于 BLD 患者和健康对照组($P<0.01$)。I ~IV 期 NSCLC 患者外周血中 CEA mRNA 阳性表达率分别为 27.8%、83.3%、61.5%和 100%。NSCLC 患者外周血 CEA 阳性表达与临床分期及淋巴结转移密切相关($P<0.05$),而与病理类型及分化程度无关($P>0.05$)。**结论** 检测外周血 CEA mRNA 表达可作为诊断 NSCLC 患者微转移的一个有价值的参考指标。

关键词: 非小细胞肺癌;外周血;微转移;癌胚抗原信使核糖核酸

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2010)08-0914-04

0 引言

肺癌发病率逐年升高,全球每年大约有 1 100 000 人死于肺癌^[1]。我国陈万青等^[2]报告的部分县市统计资料显示,肺癌发病率和死亡率在大多数地

区占第一位,也是死亡率较高的肿瘤之一。肺癌中 80%为非小细胞肺癌(NSCLC),手术是首选治疗方法。随着肿瘤诊疗水平的不断提高,肺癌多学科综合治疗达到了一个新的水平,但到目前为止,肺癌患者预后差的现状仍没有明显改善。各期肺癌总的 5 年生存率仅 15%左右^[3]。多数患者仍死于肿瘤复发与转移。如能早期发现肿瘤微转移,并加以干预治疗,对避免肿瘤复发与转移及改善患者预后都有重要意义。但在 NSCLC 微转移的检测中,仍缺乏理想的分子标志物。本试验选用癌胚抗原(CEA)作为分子标志物,以探讨其在 NSCLC 微转移诊断中的意义。

收稿日期:2009-03-11;修回日期:2009-10-15
基金项目:广西壮族自治区科技厅自然科学基金资助项目(桂科自 0542078);广西壮族自治区科技厅青年基金资助项目(桂科青 0728067)
作者单位:1. 530021 南宁,广西医科大学第一附属医院心胸外科;2. 安徽省宿州市皖北煤电集团总医院心胸外科
通信作者:丁凯,Email: kay826@163.com
作者简介:冯旭(1971-),男,博士,副主任医师,主要从事胸部肿瘤的基础与临床研究

1 资料与方法

1.1 临床资料

48 例 NSCLC 患者均为我院胸心外科经手术病理确诊者,男 31 例,女 17 例,年龄 37~77(56.6±8.7)岁。UICC 分期:Ⅰ期 18 例,Ⅱ期 12 例,Ⅲ期 13 例,Ⅳ5 例;腺癌 24 例,鳞癌 16 例,腺鳞癌 4 例,大细胞癌 2 例,细支气管肺泡细胞癌 1 例,癌肉瘤 1 例,并取同期住院的肺良性疾病(BLD)患者 15 例(包括结核球、炎性假瘤、错构瘤等)和健康体检者 10 例作对照。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂和仪器

红细胞裂解液购自北京索来宝公司,Trizol 购自 Invitrogen 公司,反转录试剂盒购自 Fermentas 公司,Taq 酶购自 TaKaRa 公司,用多通道 PCR 仪(美国 MJ 公司)对样本进行检测。凝胶成像分析系统 Gel Doc 2000(美国 Bio-Rad 公司)对图像进行采集。

1.2.2 引物设计

采用 Primer Premier 5 引物设计软件自行设计引物,取 β -actin 作内参照。所有引物均由北京三博远志生物技术有限公司合成。引物序列及扩增产物长度见表 1。

表 1 CEA 及 β -actin 引物序列		
Table 1 The Primer Sequences of CEA and β -actin		
Primer	Sequences	Product length
CEA	F:5'-TGC TCA CAG CCT CAC TTC-3'	169 bp
	R:5'-CCA TCC ACT CTT TCA CCT T-3'	
β -actin	F:5'-TCC TGT CCG ATC CAC GAA ACT-3'	315 bp
	R:5'-TAA TCA TTT GCG GTG GAC GAT-3'	

1.2.3 总 RNA 抽提及反转录

分别取 NSCLC 患者和 BLD 患者术前及健康体检者空腹抽取第 2 管静脉血 4ml 放入 EDTA 抗凝管中,立即加红细胞裂解液离心去上清液,沉淀白细胞,Trizol 1 000 μ l 消化,氯仿抽提,异丙醇沉淀总 RNA,用 DEPC 水配成的 75%乙醇洗涤 2 次,气干后加入无菌 DEPC 水 30 μ l 溶解 RNA,取总 RNA 约 3 μ g 加入 20 μ l 反应体系中,严格按反转录试剂盒说明书进行反转录。

1.2.4 RT-PCR 反应

每份外周血样本均扩增 CEA 及 β -actin,反应体系为 25 μ l:cDNA 1 μ l,10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ l,Taq DNA (5u/ μ l)聚合酶 0.125 μ l,dNTP Mix (各 2.5mmol/L)2 μ l,MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μ l,上、下游引物(20 μ mol/L)各 0.5 μ l,加适量超纯水使总体积达 25 μ l。反应条件:94 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 45 s,54 $^{\circ}$ C (CEA)/57 $^{\circ}$ C (β -actin) 45 s,72 $^{\circ}$ C 40 s,共 30 个循

环,最后 72 $^{\circ}$ C 5min。
1.2.5 琼脂糖电泳检测
取 PCR 反应产物加 loading buffer(5:1)混匀上样于 2%琼脂糖凝胶电泳,经 EB 染色,0.5 $\times$ TBE 缓冲液里 120V 恒压 30 min,用 β -actin 检测反转录的效率,Gel Doc 2000 凝胶成像系统来判断检测物的有无。
1.3 统计学方法
应用 SPSS 13.0 统计软件,采用 χ^2 检验或 Fisher's 确切概率法, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

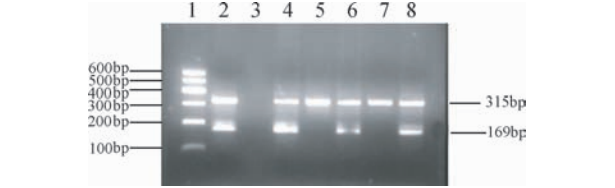
2 结果

2.1 总 RNA 的鉴定

1.5%琼脂糖凝胶电泳可见清晰 28S 和 18S 条带,紫外分光光度仪测定总 RNA OD_{260}/OD_{280} 在 1.60~1.92(1.69±0.08)之间。

2.2 三组人群外周血 CEA 检测结果

48 例 NSCLC 外周血中 28 例阳性表达,BLD 组仅 1 例表达,健康人中无表达,差异有统计学意义($P=0.000$),见表 2。CEA mRNA 和 β -actin 电泳结果见图 1。



1:DNA molecular marker; 2,4,6,8:The peripheral blood of NSCLC patients; 3:Blank control; 5: The peripheral blood of BLD patients; 7: The peripheral blood of healthy volunteers. The position of the bands were as expected for CEA (169bp) and β -actin (315bp)

图 1 不同样本外周血 CEA mRNA 及 β -actin 的检测结果
Figure 1 CEA mRNA and β -actin expression in peripheral blood of different samples

表 2 NSCLC 与 BLD 及健康对照组外周血 CEA mRNA 检测结果
Table 2 Detective results of CEA mRNA in Peripheral Blood of NSCLC and BLD and Healthy Volunteers

Groups	n	Positive cases	Positive rate(%)
NSCLC	48	28	58.33
BLD	15	1	6.67
Healthy control	10	0	0

Note:Comparison between NSCLC group and BLD group and Healthy control group, $P=0.000$; $\chi^2=20.378$
2.3 外周血 CEA 表达与临床特征的关系
NSCLC 患者外周血 CEA 阳性表达与患者性别、年龄、吸烟史、血型、病理类型及分化程度无关($P>0.05$),而与肿瘤分期及有无淋巴结转移密切相关($P<0.05$),见表 3。

表 3 NSCLC 患者外周血 CEA mRNA 表达与临床特征的关系

Table 3 Correlation between CEA mRNA expression in the peripheral blood and clinical characteristics in NSCLC patients

Characteristic	<i>n</i>	Positive cases	Positive rate(%)	χ^2		<i>P</i>
Gender				3.563	0.059	>0.05
Male	31	15	48.4			
Female	17	13	76.5			
Age(years)				1.088	0.297	>0.05
≤50	13	6	46.2			
>50	35	22	62.9			
Smoking				2.634	0.105	>0.05
With smoking	27	13	48.1			
Without smoking	21	15	71.4			
Blood type				2.038	0.565	>0.05
A	15	11	73.3			
B	10	5	50			
O	21	11	52.4			
AB	2	1	50			
Differentiation degree				1.560	0.458	>0.05
High	6	4	66.7			
Middle	19	9	47.4			
Low	23	15	65.2			
pTNM stage				13.626	0.003	<0.05
I	18	5	27.8			
II	12	10	83.3 [*]		0.004 [△]	
III	13	8	61.5 ^{**}		0.065 [△]	
IV	5	5	100 [*]		0.007 [△]	
Histology				4.029	0.545	>0.05
Adenocarcinoma	24	12	50			
SCC [☆]	16	9	56.3			
Others [#]	8	7	87.5			
Lymph node metastasis				4.410	0.036	<0.05
with	23	17	73.9			
without	25	11	44			

Note:Compared with I stage; ^{*}:*P*<0.05; ^{**}:*P*>0.05; [△]:Fisher’s exact test; [☆]:Squamous cell carcinoma; [#]: Include of adenosquamous carcinoma(*n* = 4),large cell carcinoma(*n* = 2); bronchioloalveolar carcinoma(*n* = 1);carcinosarcoma(*n* = 1)

3 讨论

CEA 是组织分泌的一种糖蛋白,正常人不表达,而在胚胎性肿瘤、胃肠、肺、乳腺癌组织中表达。已有报道证实肿瘤组织 CEA 基因的表达与血清 CEA 蛋白含量是无关联的^[4],CEA 曾被认为是敏感度和特异性较差的肿瘤标志物,但检测手段从蛋白水平提升到基因水平后,其敏感度和特异性也得到一定程度的提高。RNA 在细胞外环境中极不稳定,如在患者外周血中检测出 CEA mRNA 的表达,则从理论上可认为外周血中有肿瘤细胞的异位存在。

RT-PCR 法已被用于检测实体瘤微转移细胞中特殊 mRNA 的表达^[5],也是目前检测肿瘤微转移最常用最敏感的检测方法^[6]。本研究表明 NSCLC 患者外周血 CEA mRNA 阳性检出率明显高于 BLD 组和健康对照组,而与一般临床特征(年龄、性别、吸烟史、血型等)无关。提示可作为检测外周血 NSCLC 微转移的指标,但阳性率低于白雪慧等^[7]报告的 77.6%。而 BLD 组中也发现有 CEA mRNA 表达,假阳性率为 6.67%,说明用其作为标志物来检测 NSCLC 微转移特异性并不高。造成这种假阳性的原因可能与采血和 RNA 抽提时上皮细胞的污染、假基因的干扰或外周血中 CEA 的低表达有关。

本研究发现不同病理类型 CEA 的检出率差异无统计学意义,但在鳞癌中表达略高于腺癌,不同于以往报道^[8-10]。CEA 的表达与肿瘤的分化程度无

关,而与肿瘤的分期及淋巴结转移密切相关。各分期间比较显示Ⅰ期与Ⅱ、Ⅳ期差异有统计学意义,而其他各期间比较差异均无统计学意义,推测可能与Ⅲ、Ⅳ期所占病例数较少有关,或者与肿瘤细胞是间断释放入血的,单点时间采血产生的偏倚有关。另外分期很早的Ⅰ、Ⅱ期也有阳性表达,提示即使是早期肺癌也可能已有血源性微转移的存在,这也许是早期肺癌术后预后不佳的原因所在。而Ⅳ期中表达明显高于其他各期,说明随病情发展肿瘤细胞发生血行转移的可能性更大。但Ⅲ期表达率低于Ⅱ期,可能与我们上面谈到的原因有关。有淋巴结转移者 CEA 表达率高于无淋巴结转移者,说明有淋巴结转移的 NSCLC 患者外周血中存在肿瘤细胞的概率更高,另一方面也说明淋巴转移和血行转移密切相关。但在无淋巴结转移的患者外周血中仍有高达 44% 阳性率,可能是由于二者并不是同步转移的,肿瘤细胞仅暂时出现在外周血中,而淋巴结还未形成转移灶。

血行微转移的意义目前仍存在争议,而肿瘤的转移也是一个复杂的生物学过程。Park 等^[11]认为微转移发展为临床转移至少经过 4 步:(1)微量肿瘤细胞自原发灶脱离;(2)适应新代谢环境,逃避机体免疫;(3)侵袭远处组织;(4)在新组织中新生血管形成,肿瘤生长。癌细胞进入血液循环仅是肿瘤转移多阶段、多步骤中的一步,转移灶最终是否形成,受到多种因素的影响。血液中微转移的出现也不一定形成显性转移灶,但本研究结果显示外周血中 CEA mRNA 高表达提示有较高的转移风险,下一

步我们将对参与实验的患者进行长期随访,继续扩大样本量,并多个时间点采血,以进一步明确其与肿瘤复发、转移及预后的关系。

参考文献:

[1] Shibuya K, Hiraoka M. Radiation therapy for lung cancer[J]. Gan to Kagaku Ryoho, 2007, 34(4): 544-549.

[2] 陈万青, 张思维, 李连弟, 等. 中国部分市县 1998-2002 年肺癌的发病与死亡[J]. 中国肿瘤, 2006, 15(9): 570-574.

[3] Toll BA, Salovey P, O'Malley SS, et al. Message framing for smoking cessation: the interaction of risk perceptions and gender[J]. Nicotine Tob Res, 2008, 10(1): 195-200.

[4] Zieglschmid V, Hollmann C, Böcher O. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2005, 42(2): 155-196.

[5] Zach O, Lutz D. Tumor cell detection in peripheral blood and bone marrow [J]. Curr Opin Oncol, 2006, 18(1): 48-56.

[6] Park Jw, Kwon TK, Kim IH, et al. A new strategy for the diagnosis of MAGE expressing cancers[J]. Immunol Methods, 2002, 266(1-2): 79-86.

[7] 公雪慧, 邬蒙, 罗辉, 等. 非小细胞肺癌患者外周血 CEA mRNA 表达与临床及病理的相关性研究[J]. 实用癌症杂志, 2006, 21(4): 354-357.

[8] 郑晓莉, 黄震英, 董万军. 血清 CEA、CYFRA21-1、CA153 三种肿瘤标志物联合检测在肺癌诊断中的临床价值[J]. 肿瘤防治研究, 2006, 33(6): 471-472.

[9] 郭成业, 姚舒洋, 李德爱, 等. RT-PCR 检测外周血 CK19 mRNA 及 CEA mRNA 诊断非小细胞肺癌微转移的研究[J]. 中国医刊, 2008, 43(7): 47-48.

[10] 李招云, 李素珍, 毛卫华, 等. 肺癌患者外周血微转移检测的意义[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(6): 512-514.

[11] Park BJ, Altorki NK. Diagnosis and management of early lung cancer[J]. Surg Clin North Am, 2002, 82 (3): 457-476.

[编辑: 安 风; 校对: 刘红武]