

用荧光定量 RT-PCR 检测鼻咽癌病人外周血 CK-19 mRNA 的表达

白守民¹, 梁碧玲¹, 崔念基², 刘宜敏¹, 尹爱华³, 薛卫平¹, 孙颖¹

(中山大学 1. 附属第二医院放射科, 广东 广州 510120; 2. 肿瘤防治中心放疗科, 广东 广州 510060;
3. 达安基因诊断中心, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨鼻咽癌病人外周血中 CK-19 mRNA 表达与鼻咽癌临床的关系。【方法】用荧光定量 RT-PCR 方法检测 97 例鼻咽癌病人及 26 例正常人外周血中 CK-19 mRNA 的表达量。【结果】鼻咽癌病人外周血中 CK-19 mRNA 阳性表达 94% (91/97), 健康对照组阳性表达 8% (2/26); T4 期病人及远处转移病人外周血中 CK-19 mRNA 拷贝数显著升高, CK-19 mRNA 拷贝数与鼻咽癌临床分期呈正相关。【结论】荧光定量 RT-PCR 方法检测鼻咽癌病人外周血 CK-19 mRNA 表达, 方法简单、准确, 在预测鼻咽癌远处转移及准确临床分期方面有一定可行性。

关键词:鼻咽肿瘤; 荧光定量检测; 聚合酶链反应

中图分类号: R73.6 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2003)03-0249-04

Quantitation of CK-19 mRNA Gene Expression with RT-PCR Assay in Peripheral Blood of Patients with Nasopharyngeal Carcinoma

BAI Shou-min¹, LIANG Bi-ling¹, CUI Nian-ji², LIU Yi-min¹, YIN Ai-hua³,
XUE Wei-ping¹, SUN Ying¹

(1. Department of Radiology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China;
2. Department of Radiotherapy, Cancer Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China;
3. DA-AN Gene Diagnostic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To investigate the relationship between the expression of CK-19 mRNA and the clinical stage of nasopharyngeal carcinoma (NPC).【Methods】Real-time transcription-PCR assay was used to detect the expression of CK-19 mRNA in peripheral blood of 97 patients with NPC and 26 healthy individuals.【Results】The positive rate of CK-19 mRNA expression in peripheral blood of NPC and healthy individuals was 94% (91/97) and 8% (2/26) respectively. The copy number of CK-19 mRNA expression was significantly enhanced in T4 stage patients and patients with metastasis. There was a good correlation between the clinical stage and the level of CK-19 mRNA.【Conclusion】The real-time transcription-PCR is a simple and accurate assay for detecting the expression of CK-19 mRNA in patients with NPC. It may be used to predict the early metastasis of NPC and to make an accurate classification of clinical stage.

Key words: nasopharyngeal neoplasms; fluorogenic quantitative detection; polymerase chain reaction

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(3): 249 ~ 252]

鼻咽癌诊治中早期发现和准确判断疾病分期是提高鼻咽癌病人 5 年生存率的关键。用 EB 病毒

检测筛查早期鼻咽癌敏感性较低, 近年来许多学者开展了对外周血癌细胞的研究。外周血癌细胞检测

收稿日期: 2002-12-10

基金项目: 广州市科委基金资助项目(2000J01203)

作者简介: 白守民(1971-), 男, 河南三门峡人, 硕士, 主治医师。

是通过检测特异的分子生物学标记物,从而间接反映癌细胞存在的一种方法,已大量应用于乳腺癌和前列腺癌等研究。我们用荧光定量 RT-PCR 方法,用角蛋白片段 CK-19 为标记物,探讨 CK-19 mRNA 在鼻咽癌病人外周血中的表达及其与临床分期的关系。

1 材料与方 法

1.1 临床资料及标本的采集

中山大学附属第二医院(下称中山二院)和肿瘤医院符合下列条件的鼻咽癌病人 97 例:①已取得病理诊断;②有完整的影像学资料;③年龄 < 70 岁, Karnofsky 评分 ≥ 70 ;④半年内未做过化疗。其中,男性 77 例,女性 20 例;年龄 22 ~ 70 岁,中位年龄 42.5 岁;低分化鳞癌 90 例,泡状核细胞癌 7 例;非转移病人 79 人,转移病人 18 例,包括骨转移 10 例,肝转移 6 例,肺转移 2 例;根据鼻咽癌 1997 国际抗癌联盟(UICC)TNM 分期法, I 期病人 5 例, II 期病人 18 例, III 期病人 24 例, IV 期病人 50 例。中山二院放疗科工作人员及中山一院内科门诊非肿瘤病人共 26 例做对照组。取病人和对照者静脉血,低温冰壶保存, 2 h 内送到中山大学达安基因诊断中心实验室提取 RNA。

1.2 荧光定量 RT-PCR 方法的建立

参照 Su 等^[1]的方法,培养 SUNE-1 细胞,设计并合成 CK-19 引物。引物序列:上游引物 5'-GCG GGA CAA GAT TCT TCG TC -3', 下游引物 5'-CTT CAG GCC TTC GAT GCG CAT -3', 扩增片段为 152 bp。上游引物位于第 6 外显子,下游引物位于第 7 外显子,中间跨越一个长达 3 535 bp 的内含子。提取 SUNE-1 细胞总 RNA,制备 cDNA,进行常规 PCR 反应,并进行纯化。采用 A-T 克隆的原理,将纯化的 PCR 产物合成质粒并克隆,得到了定量阳性标准模板。检测时,将克隆的定量阳性标准按每 μl 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 拷贝数梯度稀释,加于不同反应管中,反应体系中包括 CK-19 上下游引物、Cybergree 荧光染料、Taq 酶等,在 PE5700 荧光定量 PCR 扩增仪上扩增,反应结束后在计算机上得到标准曲线,并自动计算出样品的定量结果。

1.3 标本的检测

取 5 mL EDTA 抗凝血,用 QiaAmp 全血 RNA 抽提试剂盒提取血液中的总 RNA,测定 A 值并计

算出含量。具体操作按试剂盒说明进行。取 2 μg RNA 按上述方法制备 cDNA,将制备的 cDNA 取 5 μL 加入荧光定量 PCR 反应体系,同时设置阴性对照和阳性定量梯度对照,在 PE5700 荧光定量 PCR 仪上进行扩增。反应结束后计算出每微克总 RNA 中 CK-19 mRNA 基因的拷贝数。整个实验过程在达安基因诊断中心由专业人员完成。

1.4 结果统计

结果资料输入 SPSS 10.0 版本分析,率的差异采用 χ^2 检验,两组样本比较采用 Wilcoxon 秩和检验,多组样本比较采用 Kruskal-Wallis 检验;病变分期与 CK-19 mRNA 表达量关系采用 Spearman 等级相关分析。

2 结 果

2.1 荧光定量 RT-PCR 结果

PE5700 型扩增仪在 PCR 反应进行的同时,每 8.5 s 检测 1 次 PCR 产物量(荧光变化强度)。将不同的标准起始模板数(C_0)按 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 加入 PCR 反应体系,当荧光强度增加到某一阈值,PCR 产物进入指数增期,此时的循环次数(C_t 值)被记录下来。将不同梯度定量模板数与 C_t 值做对数拟合后,就得到定量标准曲线(图 1),样品与标准曲线比较就能准确反映待检样品的起始模板量。

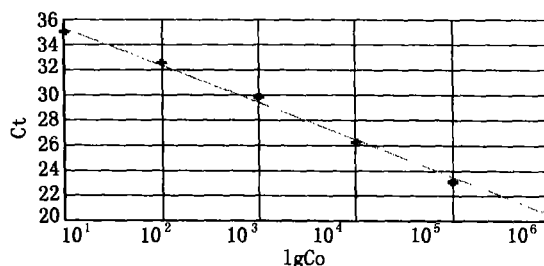


图 1 CK-19 mRNA 荧光定量 RT-PCR 的定量标准曲线
Fig. 1 The standard curves of CK-19 mRNA by RT-PCR

Co: starting copy number; Ct: the cycle number at which the PCR product copy number increase significantly

2.2 CK-19 mRNA 的表达

放疗前共 97 例病人中,阳性表达病人 91 (94%) 人,26 例非肿瘤对照组中,阳性表达 2 (8%) 人,对照组与病人 CK-19 mRNA 阳性表达率经四格表 χ^2 检验 $\chi^2 = 82.5$, $P < 0.001$,两组差异

有显著性。对照组与病人 CK-19 mRNA 拷贝数经秩和检验显示差异也有显著性(表 1)。

表 1 鼻咽癌病人与对照组 CK-19 mRNA 表达拷贝数
Table 1 The absolute copy number of CK-19 mRNA in patients and control

Group	n	n(copy)/ μ g	
		Median	Interquartile range
Patient	97	779.5	4 247.3
Control	26	7.12 ¹⁾	... ²⁾

1) Wilcoxon rank sum test, $P < 0.01$; 2) can not figure out because of there are too many 0 value

2.3 T、N、M 分期与 CK-19 mRNA 表达的关系

除 5 例局部复发病外,按鼻咽癌 1997 国际抗癌联盟(UICC)TNM 分期法,不同 TNM 分期病人外周血 CK-19 mRNA 表达拷贝数见表 2。经秩和检验后显示:T4 期与 T1 期、T2 期、T3 期 CK-19 mRNA 表达拷贝数差异有显著性,但 T1、T2、T3 期之间无统计学差异。N 分期各组间秩和检验显示无统计学意义差异。18 例远处转移病人与 79 例非远处转移病人之间经秩和检验显示 CK-19 mRNA 表达拷贝数差异有显著性。

表 2 T、N、M 分期与 CK-19 mRNA 表达拷贝数
Table 2 The absolute copy number of CK-19 mRNA in different T, N and M stage

Group	n	n(copy)/ μ g	
		Median	Interquartile range
T1	10	367.5	3 194.3
T2	24	416.5	807.2
T3	20	490.0	1 403.0
T4	25	3 190.0 ¹⁾	6 044.0
N0	31	768.0	3 623.0
N1	26	571.0	2 897.0
N2	12	726.0	3 772.3
N3	10	593.0 ²⁾	4 143.7
M0	79	619.0	3 130.0
M1	18	11 800.0 ³⁾	56 690.0

1) every group compare with each other in T stage by K-W test, $P < 0.01$; 2) every group compare with each other in N stage by K-W test, $P > 0.05$; 3) Wilcoxon rank sum test in M stage, $P < 0.01$

2.4 临床分期与 CK-19 mRNA 表达

根据鼻咽癌 UICC 1997 TNM 分期法将病人分为 I、II、III、IV 期,各期病人 CK-19 mRNA 表达拷贝

数见表 3,秩和检验结果显示 IV 期与各分期之间 CK-19 mRNA 的拷贝数均有显著差异($P < 0.05$)但 I、II、III 期之间差异无显著性。将病变分期与 CK-19 mRNA 拷贝数作相关分析显示两者之间呈正相关,有统计学意义($r = 0.53, P < 0.01$)。

表 3 各临床分期 CK-19 mRNA 的表达拷贝数
Table 3 The absolute copy number of CK-19 mRNA in different clinical stage

Group	n	n(copy)/ μ g	
		Median	Interquartile Range
I	5	317.0	4 814.5
II	18	366.5	589.8
III	24	494.0	915.5
IV	50	4 225.0	10 861.5

Every group compare with each other by K-W test, $P < 0.01$

3 讨论

寻找敏感性高、特异性强的生物学标记物是分子生物学研究的主要内容之一。CK-19 是细胞角蛋白的一种,存在于细胞骨架中的中间微丝,主要分布于表皮、黏膜等上皮组织内,血液及造血系统没有该蛋白存在。用 CK-19 为标记物已广泛用于各种上皮性肿瘤的检测如:肺癌、乳腺癌、泌尿系肿瘤等^[2,3]。鼻咽癌也属于上皮来源肿瘤,我们用荧光定量 PCR 方法检测鼻咽癌病人外周血中 CK-19 mRNA 的表达,发现大多数病人(91/97)外周血中 CK-19 mRNA 阳性表达,而正常人群中(2/26)表达很少,提示 CK-19 作为一种肿瘤标记物,在鼻咽癌诊断方面有一定应用价值,但其检测的敏感性及其特异性尚有待更多病例进行研究。

肿瘤标记物的表达与临床的关系,已有的报道结果差异较大,大多认为阳性表达率与临床分期相关^[4,5],但也有相反意见^[6]。可能由于采用不同的方法和标记物,各研究的可重复性及可对比性较差。如在上皮性肿瘤研究中, Burchill 和 Slade 分别采用 RT-PCR 方法和定量 RT-PCR 检测对照组中 CK-19 的表达,阳性表达率分别为 40% 和 0,因而得到不同的结论^[7,2]。荧光定量 PCR 方法采用终点定量,实时检测反应物的变化,具有重复性好可信度高等特点^[8]。本研究采用这种方法结果显示,CK-19 mRNA 拷贝数在 T4 期病人及远处转移病人外周血中明显升高,CK-19 mRNA 的拷贝数与病变分期呈正相关,这说明随病变进展 CK-19 mRNA 表

达量逐渐升高,提示用这种方法检测外周血 CK-19 mRNA 表达对准确判断鼻咽癌病变分期,发现早期转移病灶方面有一定应用前景。

本研究显示 CK-19 mRNA 表达拷贝数仅与局部侵犯范围有关,而与淋巴结转移状况无关,是否能够进一步说明鼻咽癌病人外周血中癌细胞的数量仅与局部侵犯范围有关,而与淋巴结转移无关,还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Su S, Vivier R G, Dickson M C, *et al.* High-throughput RT-PCR analysis of multiple transcripts using a microplate RNA isolation procedure[J]. *Biotechniques*, 1997, 22(6): 1107.
- [2] Slade M J, Smith B M, Sinnott H D, *et al.* Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases on patients with breast cancer[J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17(3): 870.
- [3] Yeh K H, Chen Y C, Yeh S H, *et al.* Detection of circulating cancer cells by nested reverse transcription-polymerase chain reaction of cytokeratin-19 (K19)—

possible clinical significance in advanced gastric cancer [J]. *Anticancer Res*, 1998, 18(2B): 1283.

- [4] Hioki T, Sugimura Y. Detection of circulating cancer cells by nested reverse transcription-polymerase chain reaction of cytokeratin-19 in patients with renal cell carcinoma[J]. *Hinyokika Kyo*, 1999, 45(8): 577.
- [5] 云径平,李锦添,刘克拉. 鼻咽癌中 P21^{ras} 的表达及其与淋巴结转移的关系 [J]. *中山医科大学学报*, 1999, 20(1): 59.
- [6] Kawamata H, Uchida D, Nakashiro K, *et al.* Haematogenous cytokeratin 20 mRNA as a predictive marker for recurrence in oral cancer patients[J]. *Br J Cancer*, 1999, 80(3-4): 448.
- [7] Burchill S A, Bradbury M F, Pittman K, *et al.* Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase polymerase chain reaction[J]. *Br J Cancer*, 1995, 71(2): 278.
- [8] Martell M, Gomez J, Esteban J I, *et al.* High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA[J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 37(2): 327.

(编辑 黄小廷)

(上接第 245 页 from page 245)

参考文献:

- [1] Kawakami K, Qureshi M H, Zhang T T, *et al.* IL-18 protects mice against pulmonary and disseminated with *Cryptococcus neoformans* by inducing IFN- γ production [J]. *J Immunol*, 1997, 159(11): 5528.
- [2] Kobayashi K, T Kasama, J Yamazaki, *et al.* Protection of mice from *Mycobacterium avium* infection by recombinant interleukin-12[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(6): 1369.
- [3] Tare N S, Bowen S, Warrier R R, *et al.* Administration of recombinant interleukin-12 to mice suppresses hematopoiesis in the bone marrow but enhances hematopoiesis in the spleen[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 1995, 15(4): 377.
- [4] Kaplan M H, Sun Y L, Hoey T, *et al.* Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice[J]. *Nature*, 1996, 382(6587): 174.
- [5] Kanakaraj P, Ngo K, Wu Y, *et al.* Defective interleukin (IL)-18-mediated natural killer and T helper cell type 1 responses in IL-1 receptor-associated kinase (IRAK)

-deficient mice [J]. *J Exp Med*, 1999, 189(7): 1129.

- [6] Zhang T T, Kawakami K, Qureshi M H, *et al.* Interleukin(IL)-12 and IL-18 synergistically induce the fungicidal activity of murine peritoneal exudate cells against *Cryptococcus neoformans* through production of interferon- γ by natural killer cells[J]. *Infect Immun*, 1997, 65(9): 3596.
- [7] Yoshimoto T, Okamura H, Tagawa Y, *et al.* Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon- γ production from activated B cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(8): 3948.
- [8] Munder M, Mallo M, Eichmann K, *et al.* Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL) 12 and IL-18: a novel pathway of autocrine macrophage activation[J]. *J Exp Med*, 1998, 187(12): 2103.
- [9] Micallef M J, Ohtsuki T, Kohno K, *et al.* Interferon- γ -inducing factor enhanced T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon- γ production[J]. *Eur J Immunol*, 1996, 26(7): 1647.

(编辑 黄小廷)