论著

文章编号:1000-5404(2006)24-2472-03

非小细胞肺癌患者纵隔淋巴结和外周血中MUC1基因的检测及意义

郑顺利[1],杨庆生[1],马小红[2] (暨南大学附属第一医院:[1]胸心外科,[2]外科动物实验室,广州 510630)

提 要:目的 探讨非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者纵隔淋巴结和外周血中黏蛋白-1基因(MUC1 mRNA)作为肺癌微转移标志的可行性。**方法** 应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术,首先检测30例肺良性病变患者的外周血及其67枚纵隔淋巴结,以及30枚病理报告为NSCLC的纵隔淋巴结的MUC1 mRNA,以证实RT-PCR技术的敏感度和特异度;然后检测158例NSCLC患者的外周血和97例手术患者的病理报告阴性的296枚纵隔淋巴结的MUC1 mRNA的表达,以了解和比较NSCLC患者的外周血和纵隔淋巴结肺癌微转移情况。**结果** 在30例肺良性病变患者外周血中未检测到MUC1 mRNA,158例NSCLC患者有49例在外周血中检测到MUC1 mRNA,阳性率为31.0%,两者差异显著($P<0.01$);经χ^2检验,Ⅰ、Ⅱ期NSCLC患者的外周血中MUC1 mRNA阳性率无明显差异($P>0.05$),Ⅰ期或Ⅱ期与Ⅲ期间差异显著($P<0.05$),与Ⅳ期间差异明显($P<0.01$),Ⅲ、Ⅳ期间差异显著($P<0.05$)。对$Ⅲ_a$期以下的97例手术患者,术中所取的296枚病理报告为阴性的淋巴结进行MUC1 mRNA检测,结果显示112枚为MUC1 mRNA阳性,阳性率37.8%;30例肺良性病变的67枚淋巴结中有1枚MUC1 mRNA阳性,假阳性率为1.5%,与前者比较阳性率的差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 用RT-PCR法对患者淋巴结和外周血中MUC1 mRNA的检测具有较高的敏感度和特异度,可作为肺癌微转移的一个诊断标准,同时与预后相关。

关键词:非小细胞肺癌;微转移;黏蛋白-1基因;淋巴结;外周血

中图法分类号:R446.9;R730.43;R734.2 **文献标识码**:A

Detection and significance of MUC1 mRNA in mediastinal lymphnodes and peripheral blood affected by non-small cell lung cancer

ZHENG Shun-li[1], YANG Qing-sheng[1], MA Xiao-hong[2] ([1]Department of Cardiothoracic Surgery, [2]Surgical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: **Objective** To discuss the possibility of mucin-1 gene (MUC1 mRNA) in mediastinal lymphnodes (MLNs) and peripheral blood as a symbol of occult metastasis in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** By reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), MUC1 mRNA in peripheral blood and in 67 MLNs from 30 patients with benign pulmonary diseases (negative control group) and in 30 MLNs which had metastasis determined by routine pathologic examination (positive control group) was detected; MUC1 mRNA in peripheral blood in 158 patients with NSCLC and in 296 MLNs proven to be tumor-free by routine histopathologic examination from 97 NSCLC patients was detected (experimental group). **Results** MUC1 mRNA was not identified in peripheral blood in 30 patients with benign pulmonary diseases, but 49 specimens from 158 NSCLC patients were positive (positive rate 31.0%), there was significant difference between these two groups ($P<0.01$). No significant difference between stage Ⅰ and stage Ⅱ NSCLC ($P>0.05$), but the positive rate of MUC1 mRNA in stage Ⅲ and Ⅳ NSCLC was significantly higher than that in stage Ⅰ and Ⅱ ($P<0.05$ or $P<0.01$). One of 67 benign MLNs was identified to be MUC1 mRNA positive (false positive 1.5%), MUC1 mRNA in 112 MLNs from 296 MLNs in experimental group was positive (37.8%), ($P<0.05$). **Conclusion** RT-PCR is a specific and sensitive method to detect MUC1 mRNA in MLNs and peripheral blood in NSCLC patients. MUC1 mRNA might be a valuable marker to determine micrometastases in NSCLC patients. It can provide important clinical information for prognosis and selection of appropriate treatment strategies.

Key words: non-small cell lung cancer; micrometastases; MUC1 mRNA; lymph node; peripheral blood

作者简介:郑顺利(1966-),男,广东省潮州市人,博士,主治医师,主要从事胸部肿瘤及肺气肿外科治疗方面的研究。电话:(020)38688615

收稿日期:2006-01-06;修回日期:2006-03-22

肺癌转移和复发是患者病死率高的主要原因，而隐性微转移（occult micrometastasis，OMs）用常规病理学方法不能检测到。黏蛋白 1（mucin1，MUC1）基因是上皮组织特异性标志物，在正常的肺、支气管组织中和 NSCLC 的癌组织中均有表达，但在正常的淋巴结中则无该基因表达[1]，如果在 NSCLC 患者的纵隔淋巴结中检测到 MUC1 基因的表达，就可考虑为癌转移。为了探讨非小细胞肺癌（NSCLC）患者淋巴结和外周血中黏蛋白 1 基因作为肺癌微转移标志的可行性，我们应用 MUC1 mRNA 作为分子标志物，检测 158 例 NSCLC 患者和 30 例肺良性病变患者的淋巴结和外周血 MUC1 mRNA，并分析其临床意义。

1　材料与方法

1.1　患者基本资料及分组

158 例 NSCLC 患者的年龄为（51.3 ± 9.8）岁，其性别、肿瘤部位、病理类型和分化程度等一般情况见表 1；按照 1997 年美国癌症联合会提出的新的 TNM 分期法[2]，在 158 例肺癌中 I_a 期 6 例、I_b 期 9 例、II_a 期 20 例、II_b 期 21 例、III_a 期 41 例，III_b 期 51 例，Ⅳ期 10 例。另取 30 例肺良性病变患者外周血和淋巴结进行 MUC1 mRNA 检测，作为阴性对照。

1.2　检测方法

1.2.1　MUC1 引物的设计　　参照 Noguchi 等[3]的报道：上游引物：5′-CGTCGTGGACATTGATGGTACC-3′，下游引物：5′-GGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAA-3′，其产物为 287 bp 的反向转录脱氧核糖核酸（cDNA）片段。内标 β-actin 引物，上游引物：5′-CACTGTGTTGGCGTACAGGT-3′，下游引物：5′-TCATCACCATTGGCAATGAG-3′，其产物为 154 bp 的 cDNA 片段。

1.2.2　取材方法　　①血标本：术前抽取患者外周血 4 ml，EDTA 抗凝后经液氮 -190 ℃速冻，-80 ℃保存备用；②淋巴结：将摘除的淋巴结编号，然后平分为两半，随机取一半送常规病理检查，另一半包裹后浸入液氮中速冻，然后置于 -80 ℃冰箱内保存，用于 RT-PCR 检测。

1.2.3　提取总 RNA　　按 Trizol 试剂说明书提取每例标本的总 RNA，紫外分光光度仪测量、判定所提取 RNA 的纯度［$D(260)/D(280) > 1.7$］。

1.2.4　RT-PCR　　将每例标本的总 RNA 反转录成 cDNA。PCR 反应体系：3 μl 标本 cDNA，10 × Buffer 4 μl，MUC1 上、下游引物各 1.5 μl，β-actin 上、下游引物各 0.5 μl，*Taq* DNA 聚合酶 0.25 μl，灭菌蒸馏水 34.75 μl。PCR 条件：94 ℃预变性 2 min，94 ℃变性 1 min，50 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 90 s，共 30 次循环。

1.2.5　凝胶电泳　　PCR 产物 5 μl 在 2% 琼脂糖凝胶板上电泳，在 287 bp 处显带者为 MUC1 mRNA 阳性。

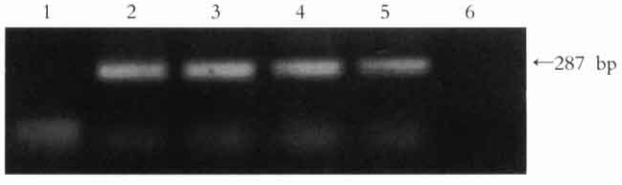
1.3　统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件进行 χ^2 检验。

2　结果

2.1　外周血中 MUC1 mRNA 的检测结果

在 158 例 NSCLC 患者中有 49 例在外周血中检测到 MUC1 mRNA（图 1），Ⅰ～Ⅳ期 NSCLC 患者的外周血中 MUC1 mRNA 阳性率分别为：6.7%（1/15），14.6%（6/41），37.0%（34/92）和 80.0%（8/10），Ⅰ、Ⅱ期间无显著差异（$P > 0.05$），Ⅰ期、Ⅱ期与Ⅲ期间差异有显著性意义（$P < 0.05$），与Ⅳ期间差异明显（$P < 0.01$），Ⅲ、Ⅳ期间差异有统计学意义（$P < 0.05$）。而性别、肿瘤部位（中央型或周围型）、病理类型之间以及分化程度等的不同对患者外周血 MUC1 mRNA 的阳性率无显著性影响（$P > 0.05$）。见表 1。在 30 例肺良性病变患者外周血中未检测到 MUC1 mRNA。



1：阴性对照；2，3：NSCLC 患者外周血中 MUC1 mRNA 阳性；4，5：淋巴结中 MUC1 mRNA 阳性；6：淋巴结中 MUC1 mRNA 阴性

图 1　MUC1 mRNA 阳性表达的 RT-PCR 产物电泳图

表 1　158 例 NSCLC 患者的一般情况和相应的外周血 MUC1 mRNA 阳性情况

类别		总数	阳性	阴性	阳性率
性别					
	男性	91	30	61	33.0%
	女性	67	19	48	28.4%
肿瘤部位					
	中央型	85	29	56	34.1%
	周围型	73	20	53	27.4%
病理类型					
	鳞癌	74	21	53	28.4%
	腺癌	47	19	28	40.4%
	其他	37	9	28	24.3%
分化程度					
	低	56	22	34	39.3%
	中	56	16	40	28.6%
	高	46	11	35	23.9%

2.2　淋巴结的 MUC1 mRNA 的检测结果

对 III_a 期以下的 97 例手术患者术中所取的 296 枚病理报告为阴性的淋巴结进行 MUC1 mRNA 检测，结果显示 112 枚有肺癌微转移（图 1），如果以此为标准，则有 16 个病例由于 N2 淋巴结阳性而被提高肿瘤分期。30 例肺良性病变的 67 枚淋巴结中有 1 枚 MUC1 mRNA 阳性（假阳性率为 1.5%），与前者比较阳性率的差异有显著性意义（$P < 0.01$）。对 30 枚病理报告为 NSCLC 的淋巴结的检测均为 MUC1 mRNA 阳性。

3　讨论

在临床工作中发现，一些患者的年龄、肿瘤分期、

病理类型及分化程度等相似，但生存时间却有明显差异，这是否与淋巴结和外周血的隐匿性转移有关？病理检查对几个恶性细胞或直径小于 2 mm 的微转移灶常漏诊[4]，更无法检测到外周血中的个别癌细胞。应用肿瘤特异性标志物诊断外周血和淋巴结中微转移应是最理想的方法，但目前未发现某个特定的肿瘤特异性基因能在 NSCLC 中全部表达，为此国内外学者应用逆转录 PCR 技术，对肺癌患者淋巴结、外周血或骨髓中 MUC1 mRNA 进行检测，并发现 MUC1 mRNA 的存在与 NSCLC 患者的预后存在密切关系[5,6]。

MUC1 基因在正常支气管、肺组织和原发肺癌均有表达，但在正常情况下淋巴结中无表达[1,7]。Salerno 等[1]在应用 RT-PCR 方法检测 MUC1 mRNA 表达诊断 NSCLC 隐匿性淋巴结转移的研究中，发现该方法对肺癌隐匿性淋巴结转移的诊断具有较高的敏感性和特异性。但有报道认为，通过检测外周血 MUC1 的表达作为微转移的检测指标尚不成熟，需要更多的病例以获取足够证据[8]。

因此确认 RT-PCR 法检测 MUC1 mRNA 的敏感度和特异度成为本实验的首要任务，本实验首先对 30 枚病理报告为 NSCLC 患者的淋巴结、30 例肺良性病变患者的 67 枚淋巴结以及 30 例肺良性病变患者外周血进行 MUC1 mRNA 检测，结果证明，应用 RT-PCR 法检测淋巴结和外周血中 MUC1 mRNA 具有极高的敏感度和特异度。在此基础上对 158 例 NSCLC 患者外周血中的 MUC1 mRNA 进行检测，结果在其中 49 例的外周血中检测到 MUC1 mRNA，因此我们可以认为，在 49 个病例的外周血中检测到 NSCLC 的癌细胞。

本研究比较 NSCLC 患者的外周血中 MUC1 mRNA 阳性率结果显示，晚期患者的 MUC1 mRNA 阳性率明显高于早期患者，这与其他报道相符[9]。本研究还显示病理类型、分化程度、肿瘤部位（中央型或周围型）和性别对患者外周血 MUC1 mRNA 的阳性率无明显影响（$P>0.05$）。

在肿瘤转移的早期，难以用常规的影像学或病理学的方法发现少量肿瘤细胞的病灶。本实验对 Ⅲ_a 期以下的 97 例手术患者，手术中所取的 296 枚病理报告为阴性的淋巴结进行 MUC1 mRNA 检测，显示 112 枚有肺癌微转移。如果以此为标准，则有 16 个原来 N2 淋巴结阴性的病例现在由于 N2 淋巴结阳性而被提高肿瘤分期。我们曾经以病理报告为标准，比较胸部 CT 与纵隔镜对术前肿瘤分期的影响[10]，结果显示纵隔镜在对术前肺癌肿瘤分期中的作用明显优于胸部 CT，因为胸部 CT 的淋巴结阳性判断标准依赖于肿大的淋巴结，可是只有几个恶性细胞或微小转移灶的淋巴结不可能明显增大。王洲等[11]发现纵隔淋巴结隐匿性微转移组（在纵隔淋巴结中检测到 MUC1 mRNA）的 3 年生存率明显低于阴性组。所以，除了现存的术前临床分期和术后的病理分期，以后是不是应该有一种新的分期方法——基因分期？

肺癌微转移分子诊断的优势在于其检测的敏感性[9]。应用敏感性极高的巢式 RT-PCR 法检测微转移时，应特别注意防止假阳性的出现，抽取外周血必须应用套管针以免上皮细胞污染；而淋巴结取材前应彻底冲洗并剔除周围组织[11]，本实验中有 1 例淋巴结假阳性，可能与淋巴结受其他组织污染有关。

综上所述，我们认为，RT-PCR 法检测淋巴结和外周血 MUC1 mRNA 具有较高的敏感度和特异度，可以作为诊断肺癌隐匿性转移的指标之一。

参考文献：

[1] SALERNO C T, FRIZELLE S, NIEHANS G A, *et al*. Detection of occult micrometastases in non-small cell lung carcinoma by reverse transcriptase-polymerase chain reaction [J]. Chest, 1998, 113(6): 1526 - 1532.

[2] MOUNTAIN C F. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer [J]. Chest, 1997, 111(6): 1710 - 1717.

[3] NOGUCHI S, AIHARA T, MOTOMURA K, *et al*. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Comparison between MUC1 mRNA and keratin 19 mRNA amplification [J]. Am J Pathol, 1996, 148(2): 649 - 656.

[4] WU J, OHTA Y, MINATO H, *et al*. Nodal occult metastasis in patients with peripheral lung adenocarcinoma of 2.0 cm or less in diameter [J]. Ann Thorac Surg, 2001, 71(6): 1772 - 1778.

[5] MATSUNAGA H, HANGAI N, ASO Y, *et al*. Application of differential display to identify genes for lung cancer detection in peripheral blood [J]. Int J Cancer, 2002, 100(5): 592 - 599.

[6] OSAKI T, OYAMA T, GU C D, *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]. J Clin Oncol, 2002, 20(13): 2930 - 2936.

[7] HO S B, NIEHANS G A, LYFTOGT C, *et al*. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues [J]. Cancer Res, 1993, 53(3): 641 - 651.

[8] 徐崇锐，宋 勇，施 毅，等. 非小细胞肺癌微转移的检测及临床意义[J]. 中华结核和呼吸杂志，2004，27(5)：349 - 350.

[9] 牛中喜，周清华，朱金如. 非小细胞肺癌患者外周血中微转移的诊断研究[J]. 中华肿瘤杂志，2004，26(9)：571.

[10] 郑顺利，马小红，杨庆生，等. CT 和纵隔镜在肺癌术前分期中的优势与局限性分析（附 163 例报告）[J]. 中国综合临床，2005，21(3)：260 - 262.

[11] 王 洲，刘凡英，刘相燕，等. 淋巴结隐匿性微转移对肺癌预后影响的临床研究[J]. 中国肿瘤临床，2004，31(4)：210 - 213.

（编辑 陈聪连）