论著

文章编号:1000-5404(2010)23-2556-04

实时荧光定量PCR检测食管癌患者组织和外周血中TACSTD1和CK19表达的临床意义

张 浩,陈家军,聂荣华,洪 波,刘日辉,张拥军,詹波涛 (441021 湖北 襄樊,襄樊市中心医院心胸外科)

【摘要】 目的 研究食管癌患者外周血中TACSTD1和CK19的表达,探讨其作为食管癌微转移标志物的可行性和其对食管癌患者预后的影响。方法 用实时荧光定量RT-PCR联合检测30例食管癌患者手术切除的肿瘤标本和食管残端TACSTD1和CK19的表达并比较二者的区别,检测30例健康献血员外周血标本TACSTD1和CK19的表达得出正常人群的表达范围,以此为标准检测30例食管癌患者术前外周血标本是否存在TACSTD1和/或CK19的高表达。结果 TACSTD1和CK19在食管癌组织中的表达量均明显高于食管残端组织($P<0.01$)。22例患者的外周血标本检测出TACSTD1和/或CK19的高表达。CK19和TACSTD1在外周血中的表达量与患者的肿瘤分化程度高低($P<0.05$)和T分期($P<0.05$)、N($P<0.01$)分期有密切联系。结论 CK19和TACSTD1在食管癌组织均有特异性的高表达,在食管癌的发生、发展中可能起着重要的作用。CK19和TACSTD1是有价值的食管癌微转移标志物。

【关键词】 食管癌;微转移;TACSTD1;CK19;QRT-PCR
【中图法分类号】 R730.43;R735.1 【文献标志码】 A

Clinical significance of CK19 and TACSTD1 expression in tissue and peripheral blood of patients with esophageal cancer detected by real-time quantitative PCR

Zhang Hao, Chen Jiajun, Nie Ronghua, Hong Bo, Liu Rihui, Zhang Yongjun, Zhan Botao (Department of Cardiothoracic Surgery, Xiangfan Central Hospital, Xiangfan, Hubei Province, 441021, China)

【Abstract】 **Objective** To study the expression of CK19 and TACSTD1 in peripheral blood of patients with esophageal cancer, and explore the possibility to use it as a marker for micro-metastasis of esophageal cancer and its influence on prognosis of esophageal cancer patients. **Methods** Expression of CK19 and TACSTD1 was detected in 30 tissue samples from esophageal cancer patients and in 30 peripheral blood samples from healthy volunteers by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (QRT-PCR). **Results** The expression level of CK19 and/or TACSTD1 was significantly higher in esophageal cancer tissue samples than in its stump tissue samples ($P<0.01$). The TACSTD1 and /or CK19 were highly expressed in peripheral blood samples from 22 patients. The expression level of TACSTD1 and CK19 was closely related with the severity of tumor differentiation ($P<0.05$), T ($P<0.05$) and N stages ($P<0.01$). **Conclusion** CK19 and TACSTD1 are highly expressed in esophageal cancer tissue and play an important role in occurrence and development of esophageal cancer. CK19 and TACSTD1 are good markers for micro-metastasis of esophageal cancer.

【Key words】 esophageal cancer; micrometastasis; TACSTD1; CK19; QRT-PCR

Corresponding author: Zhang Hao, Tel: 86-710-3524503, E-mail: zh. jack@yahoo.com.cn

有相当一部分食管癌患者,肿瘤分期低,无明显转移证据,但在行癌根治术后却早期死于癌转移[1]。这说明患者术前已存在用常规组织病理学方法不能检出的癌细胞播散或隐性淋巴结转移。这些微转移灶和循环癌细胞往往是肿瘤出现显性转移和复发的主要原因。目前的观点认为,微转移是一项独立的预后指标[2]。精确肿瘤分期、判断预后、准确地评估癌局部区域的播散程度在预后和治疗上都非常重要,对肿瘤患者的放疗、化疗等综合治疗方案科学合理的选择以及疗效、预后的评估、判断将产生巨大的影响,对降低

【通信作者】 张 浩,电话:(0710)3524503,E-mail:zh. jack@yahoo.com.cn

肿瘤患者的病死率有积极的意义[3]。

肿瘤相关钙信号转导因子1(tumour associated calcium signal transducer,TACSTD1)又称EpCam(epithelial cellular adhesion molecule)即上皮细胞粘附分子,是一种位于4q染色体的GA733-2基因编码的位于上皮细胞表面的跨膜糖蛋白(由265个氨基酸组成的大的胞外区、一个简单的跨膜区和由26个氨基酸组成的短的细胞质区共同构成),它介导上皮细胞特有的钙离子依赖的细胞间黏附。细胞角蛋白是主要表达于上皮细胞的一组蛋白(CK1~CK20),其中CK19在正常上皮细胞、上皮性肿瘤细胞的表达最为特异。本研究初步探讨了TACSTD1和CK19作为食管癌微转移标志物的可行性。

1 资料与方法

1.1 实验对象

选择30例于2006年10月至2007年2月在襄樊市中心医院胸外科住院接受手术治疗食管癌患者入组,其中男性20例,女性10例,年龄43~71(53.5±14.8)岁。该组患者术前术后均未行放化疗,患者均接受标准后外侧切口食管癌根治术,留取切除的癌肿组织和食管残端组织标本,术前1 d的外周血标本。30例患者的残端组织均经病理检查未见癌残余,可视为正常食管组织。选择2007年2月在我院体检中心参加常规体检的30例健康献血员入组,其中男性20例,女性10例,年龄44~72(54.5±13.8)岁。留取该组的外周血标本。

1.2 仪器与试剂

水平电泳槽(北京君意东方仪器公司,JY-SPC),电泳仪(北京鼎国生物技术发展中心),DG-Ⅲ双稳数显电泳仪,低温高速离心机(SIGMA公司,1-13),成像系统(柯达紫外显相系统400W像素),普通PCR仪(Biometra公司,UNOⅡ),荧光定量PCR(Bio-Rad,IQ icycler)。Trizol购自Invitrogen公司,普通PCR用cDNA第1链合成试剂盒,DNA Marker(DL 2000)购自TaKaRa公司,*Taq* DNA聚合酶和dNTP Mix购自Fermentas公司,荧光定量PCR所用cDNA第1链合成试剂盒,DNase酶Ⅰ、RNase酶抑制剂购自Fermentas公司,SYBR Green PCR预混液购自ABI公司,基因引物设计根据标准荧光定量PCR引物设计基本原则设计。为避免基因组DNA的污染,上下游引物设计为跨内含子,引物由上海Invitrogen公司合成。TACSTD1上游引物5′-TGTTTGGTGATGAAGGCAGA-3′,下游引物5′-AAAGCCCATCATTGTTCTGG-3′。CK19上游引物5′-ATGCGAAGCCAATATGAGGT-3′,下游引物5′-AGTAACCTCGGACCTGCTCA-3′。以18S作为内参,上游引物5′-CCGAGAAGTTTCAGCACATC-3′,下游引物5′-TGGCAGTGATAGCGAAGGCT-3′。

1.3 实验方法

1.3.1 RNA提取 每份样品取约30 mg,用匀浆器充分研磨组织/细胞样品后,加入1 ml Trizol匀浆样品,在室温静置5~10 min。加入0.2倍体积的氯仿,在2~8 ℃下12 000×*g*离心15 min。将水样层转移至干净的试管,加入0.5倍体积的异丙醇,混匀后室温下静置15 min,在2~8 ℃下12 000×*g*离心10 min。将RNA沉淀用1 ml 75%乙醇洗涤,在震荡器上混匀后2~8 ℃下7 500×*g*离心5 min。空气中干燥RNA沉淀后,加入适量无RNase的水,使RNA完全溶解。

1.3.2 基因组DNA的去除 按顺序依次加入下列试剂total RNA 1 μg、10×reaction buffer 1 μl、RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor(40 U/μl)核糖核酸酶抑制剂0.25 μl、DNase Ⅰ(1 U/μl)胰脱氧核糖核酸酶1 μl、加DEPC-treated Water至9 μl。37 ℃孵育30 min,加入1 μl 25 mmol/L的EDTA,65 ℃温育10 min使酶失活。

1.3.3 逆转录反应(20 μl体系) 在0.5 ml离心管中加入总RNA 2 μg,Oligo(dT)$_{18}$(0.5 μmol/μl)1 μl,DEPC水溶液补至反应总体积为11 μl,70 ℃温浴5 min,冰浴1 min。然后在每个样品中加入8 μl反应缓冲液[5×RT缓冲液4 μl,10 mmol/L dNTP混合物2 μl,Ribonuclease Inhibitor(40 U/μl)0.5 μl,DEPC水溶液1.5 μl];37 ℃温浴5 min,最后加入逆转录酶RevertAid™ M-MulV Reverse Transcriptase(200 U/μl)1 μl,42 ℃温浴60 min;70 ℃ 10 min终止反应,冰浴备用。

1.3.4 Real-time PCR(25 μl体系) PCR反应总体积为25 μl,其中Template(反转录产物)1 μl,引物各900 nmol/L,2×SYBR Green PCR Master mix 12.5 μl补DEPC无菌水溶液至25 μl。在Bio-Rad公司的IQ icycler荧光定量PCR仪上按下列条件扩增:95 ℃ 2 min预变性,然后94 ℃ 20 s、60 ℃ 20 s、72 ℃ 20 s共55个循环,然后72 ℃ 5 min,55 ℃ 10 s,最后每10 s 1个循环,每循环提高0.5 ℃,共80个循环。

1.4 统计学方法

根据仪器给出的△Ct值计算相对浓度。用SPSS 13.0统计软件对结果进行配对*t*检验、成组样本的*t*检验以及多个样本均数比较的方差分析。

2 结果

2.1 食管癌组织与食管残端组织中TACSTD1和CK19表达的差别

30例患者的残端组织与癌肿组织作配对*t*检验,结果表明CK19表达残端组织与癌肿组织间比较差异有统计学意义(CK19浓度2种组织差值为1.64±0.54,$t=3.03$,$P=0.005$),TACSTD1表达残端组织与癌肿组织间比较差异有统计学意义(TACSTD1浓度2种组织差值为6.47±1.74,$t=3.72$,$P=0.001$)。

2.2 食管癌患者外周血CK19和TACSTD1的表达

选择30例健康献血员的外周血标本,检测其中CK19和TACSTD1的表达量,分别计算其在正常人中表达量的95%置信区间为1.22~21.76和1.31~33.59。30例食管癌患者外周

血中，以CK19为指标则共计17例患者血液存在高表达，以TACSTD1为指标则共计20例患者血液存在高表达，二者联合检测，以任意指标升高为标准共计22例患者血液存在高表达。

2.3 CK19和TACSTD1表达量与患者的肿瘤分化程度高低和T、N分期的关系

30例患者中，肿瘤分化程度高者8例，分化程度低者22例，二者外周血CK19表达（分别为209.24±357.88，514.61±588.78）比较差异有统计学意义（$P<0.05$）；二者外周血TACSTD1表达（分别为217.65±354.49，1 601.40±1 601.25）比较差异有统计学意义（$P<0.01$）。30例患者中，N0（区域淋巴结无转移）者22例，N1（区域淋巴结有转移）者8例，二者外周血CK19表达（分别为271.93±424.01，876.62±610.19）比较差异有统计学意义（$P<0.01$）；二者外周血TACSTD1表达（分别为666.05±1 134.45，3 281.2±573.65）比较差异有统计学意义（$P<0.01$）。30例患者中，T1（肿瘤浸润食管黏膜层或黏膜下层）者6例，T2（肿瘤浸润食管肌层）者16例，T3（肿瘤浸润食管外膜）者8例，三者外周血CK19表达（分别为16.13±25.85，389.31±422.95，833.72±705.34）比较差异有统计学意义（$P<0.05$），三者外周血TACSTD1表达（分别为30.62±47.81，1 384.50±1 560.46，2 320.90±1 459.84）比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。

3 讨论

近20年来肿瘤微转移已成为研究热点。肿瘤细胞在外周血中的微转移是肿瘤复发和转移的重要起始步骤，肿瘤细胞弥散入淋巴结、骨髓及外周血预示着患者生存时间的缩短。播散到外周血中的实体肿瘤细胞数目非常少，需要高度敏感、特异的技术对其进行检测。PCR方法是检测微转移最普遍的方法，该方法可检测出10^6～10^7正常细胞中的一个肿瘤细胞。光学显微镜法只能检测出10^2～10^3正常细胞中的一个肿瘤细胞，免疫组织化学方法可检测出10^4～10^5正常细胞中的一个肿瘤细胞，因而PCR方法具有更高的敏感性[4]。

由于传统的RT-PCR法最多只能达到半定量的程度，因此它很难区分正常组织中靶基因的基础表达水平与癌相关组织中增高的表达水平，加之目前缺少特异性肿瘤标志物，从而导致假阳性的产生[5]。与传统定量RT-PCR相比，实时定量RT-PCR具有自己独特的优点，实时荧光定量PCR克服了传统PCR假阳性率过高的缺点，近来受到各国学者的欢迎，被大量应用在各种肿瘤微转移的研究领域[6,7]。目前最常用的实时定量PCR实验数据分析方法包括绝对定量和相对定量2种。绝对定量的方法是通过标准曲线将荧光信号与基因原始拷贝数相对应，从而比较基因表达拷贝数差异。绝对定量的方法对标准样品的制备要求非常严格，微小的实验操作失误都会影响标准曲线的制作，最终影响实验结果。而相对定量的方法关注的是样本之间的表达差异，并不需要知道确切的拷贝数目的多少。相对定量方法是一种通过实时定量PCR实验分析基因表达相对差异的简便方法，本研究用相对定量方法来比较不同组织标本的表达差异。为了区分阳性结果是由于癌细胞存在还是正常细胞的低水平表达所致，我们将健康对照组实验结果均值的95%可信区间的上限值作为真阳性标准。这样可对待测标本的标志物进行定量分析，克服传统RT-PCR的技术缺点及一定程度上解决标志物的非特异性问题。通过我们的研究发现，分别计算CK19和TACSTD1在正常人中表达范围分别小于21.76和33.59。结果以CK19为指标则共计17例患者血液存在高表达，以TACSTD1为指标则共计20例患者血液存在高表达，二者联合检测，以任意指标升高为标准共计22例患者血液存在高表达，充分说明联合检测的敏感性要高于CK19和TACSTD1单独检测。

食管癌是发源于上皮细胞的恶性肿瘤，上皮组织的某些特异性标志物可作为食管癌微转移细胞检测的标志物。Cregan等[8]在非上皮组织中分别检测了CK8、CK18、CK19的mRNA，结果显示在广泛的不同种类非上皮组织中均有CK8、CK18不同程度的表达，而CK19表达均阴性，故CK19的阳性表达已成为上皮细胞及其肿瘤标志较为敏感的标志物。CK19常作为靶基因用于上皮性恶性肿瘤（包括食管癌）微转移的检测，其原理即肿瘤细胞起源于上皮组织，会表达上皮组织特异性标志物CK19，而正常的外周血、骨髓均来源于间叶组织，缺乏CK19的表达，因此对上皮性恶性肿瘤（包括食管癌）患者外周血和骨髓分离单个核细胞后通过检测CK19的表达，可以间接确定肿瘤细胞的存在。然而，由于CK19的特异性较差，导致在临床应用中产生很多假阳性。Xi等[9]的研究表明TACSTD1作为微转移标志物较CK19有两大优势：①TACSTD1在良性和恶性淋巴结中表达的变异性较小。②TACSTD1在良性和恶性淋巴结中表达的差异性较大。因而，我们选择联合检测TACSTD1和CK19，以提高检测的敏感性和特异性。

Went等[10]的研究表明TACSTD1在多种肿瘤组织中有很高的表达，包括结肠癌、直肠癌、食管癌、肺癌、肝癌、前列腺癌。Xi等[11]利用QRT-PCR检测了食管癌和正常淋巴结中的43种基因表达，筛选出6种基

因,进一步检测 34 例食管癌患者的淋巴结,结果表明 TACSTD1 检测食管癌微转移有较高的灵敏度和特异性。国外已有关于抗 EpCam 疗法用于临床实验的报道。同样的道理正常的外周血、骨髓均来源于间叶组织,缺乏 TACSTD1 的表达,因此对上皮性恶性肿瘤(包括食管癌)患者外周血和骨髓分离单个核细胞后通过检测 TACSTD1 的表达,也可以间接确定肿瘤细胞的存在。Munz 等[12]的研究表明,尽管 TACSTD1 对致癌作用的直接影响尚不明确,但其对于细胞周期和增殖有直接作用,并且可以迅速上调原癌基因 c-myc 和细胞周期调节蛋白 A/E 的表达,而且 TACSTD1 表达的减弱会强烈抑制人类癌细胞的增殖和代谢。

我们通过研究发现 CK19 和 TACSTD1 在食管癌组织均有特异性的高表达,这意味着 CK19 和 TACSTD1 在食管癌的发生、发展中可能起着重要的作用,而且其在外周血中的表达量与患者的肿瘤分化程度高低和 T、N 分期等已知的预后因素有密切联系,说明 CK19 和 TACSTD1 是有价值的食管癌微转移标志物。

临床可根据食管癌患者外周血中 TACSTD1 和 CK19 的检出结果进行针对性化疗,既可避免部分患者因不必要的化疗带来的毒副作用,又可使一些真正高危患者得益于化疗,从而有的放矢,对减少肿瘤的转移和复发将起到重要作用,从而为食管癌的诊断和治疗带来根本的变化。

当前有学者提出多个部位和多个时间段的动态检测可能会改变检测结果[13,14]。Wharton 等[15]发现多次采血微转移检测阳性率高于单次检测。因而本研究的临床意义仍有待进一步扩大样本量的检测和详尽的食管癌患者复发与生存期相关随访资料的证实和验证。

美国国家癌症研究所(National Cancer Institute)建立了早期检测研究网(Early Detection Research Network,EDRN),其目的在于加速新发现的肿瘤标志物的临床应用同时评估其危险因素。该网络建立了生物标志物发展评价的五阶段标准:①临床前探索期确定可靠方向;②临床分析和验证期分析评价标志物对疾病的检测能力;③回顾性纵向分析设定的指标对临床前疾病的检测能力制定阳性筛选标准;④前瞻性观察标志物对疾病的检出率及假阳性率;⑤设计前瞻性临床随机试验对普遍人群进行筛查[16]。根据上述原则目前 TACSTD1 和 CK19 作为食管癌微转移的标志物还处于第 2 阶段,离最后应用于临床还有相当长的距离。

参考文献:

[1] Eloubeidi M A, Desmond R, Arguedas M R, *et al*. Prognostic factors for the survival of patients with esophageal carcinoma in the U. S.: the importance of tumor length and lymph node status[J]. Cancer, 2002, 95(7): 1434-1443.

[2] Wu Z Y, Li J H, Zhan W H, *et al*. Lymph node micrometastasis and its correlation with MMP-2 expression in gastric carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(18): 2941-2944.

[3] 程朋, 张涛, 曾维政. 恶性肿瘤微转移临床研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2005, 13(1): 113-115.

[4] Schuler F, Dolken G. Detection and monitoring of minimal residual disease by quantitative real-time PCR[J]. Clin Chim Acta, 2006, 363(1/2): 147-156.

[5] Kong S L, Salto-Tellez M, Leong A P, *et al*. Discordant quantitative detection of putative biomarkers in nodal micrometastases of colorectal cancer: biological and clinical implications[J]. J Clin Pathol, 2005, 58(8): 839-844.

[6] Masuda T A, Kataoka A, Ohno S, *et al*. Detection of occult cancer cells in peripheral blood and bone marrow by quantitative RT-PCR assay for cytokeratin-7 in breast cancer patients[J]. Int J Oncol, 2005, 26(3): 721-730.

[7] 程勇, 熊兵红, 王子卫. FQ-PCR 法检测腹腔镜结直肠癌根治术患者外周血 CK20 mRNA 变化[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(23): 2238-2239.

[8] Cregan M D, Fan Y, Appelbee A, *et al*. Identification of nestin-positive putative mammary stem cells in human breastmilk[J]. Cell Tissue Res, 2007, 329(1): 129-136.

[9] Xi L, Coello M C, Litle V R, *et al*. A combination of molecular markers accurately detects lymph node metastasis in non-small cell lung cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(8): 2484-2491.

[10] Went P T, Lugli A, Meier S, *et al*. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas[J]. Human Pathol, 2004, 35(1): 122-128.

[11] Xi L, Luketich J D, Raja S, *et al*. Molecular staging of lymph nodes from patients with esophageal adenocarcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(3): 1099-1109.

[12] Munz M, Kieu C, Mack B, *et al*. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation[J]. Oncogene, 2004, 23(34): 5748-5758.

[13] Liefers G J, Cleton-Jansen A M, van-de-Velde C J, *et al*. Micrometastases and survival in stage Ⅱ colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 1998, 339(4): 223-228.

[14] Pantel K, Cote R J, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease[J]. J Natl Cancer Inst, 1999, 91(13): 1113-1124.

[15] Wharton R Q, Jonas S K, Glover C, *et al*. Increased detection of circulating tumor cells in the blood of colorectal carcinoma patients using two reverse transcription-PCR assays and multiple blood samples[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(12): 4158-4163.

[16] Pepe M S, Etzioni R, Feng Z, *et al*. Phases of biomarker development for early detection of cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93(14): 1054-1061.

(收稿 2010-07-09 修回 2010-09-15)

(编辑 栾 嘉)