临床研究 文章编号:0253-3626(2010)07-1063-04

放射治疗前后肺癌患者外周循环癌细胞的变化

王 梅[1],葛明建[2]

(重庆医科大学附属第一医院 1. 检验科;2. 胸外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:通过实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应法检测放射治疗前后肺癌患者外周循环癌细胞(Circulating tumour cells,CTCs)的改变,评估其作为新的疗效评定标准的可行性。方法:分别于放疗前后采集肺癌患者(n=30)外周血标本,同时摄胸片或CT扫描,并且计算肿瘤最大直径及垂直径的乘积。所有患者均接受原发灶及纵隔区域的常规分割放疗。运用fqRT-PCR法检测放射治疗前后患者外周血中CK19mRNA拷贝数的改变。结果:与放疗前相比,放疗后患者外周血CK19mRNA水平显著降低(5.093 2±1.062 8与4.249 3±0.832 3,t=3.192,P=0.007)。放疗前后CK19mRNA水平变化与肺癌的组织类型(鳞/腺癌与小细胞癌)有密切关系(0.538 9±1.062 8与1.682 6±0.946 7,t=2.145,P=0.051),同时与癌肿分化等级(高/中分化与低分化)间也存在一定关系(0.502 4与1.527 1,t=2.017,P=0.065)。放疗前后CK19mRNA水平变化与瘤负荷改变间存在相关性(r=0.575,P=0.025)。放疗前阳性率为80%(24/30),放疗后为53%(16/30),有8例病人经放疗后外周血CK19mRNA表达转为阴性。结论:对于播散性癌细胞,仅行放疗是不够的,还需施以其它一些全身性辅助治疗措施,才可能取得较好疗效。可将治疗前后外周血中CTCs变化来作为实体瘤新的疗效评判标准。对外周血等处的播散癌细胞进行检测对肿瘤分期及预后评估具有参考价值。

【关键词】肺肿瘤;血液;聚合酶链反应;细胞角蛋白;信使RNA;放射疗法

【中国图书分类法分类号】R734.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-03-09

Fluctuation of circulating tumor cells in patients with lung cancer detected by real-time fluorescent quantitative-PCR approach before and after radiotherapy

WANG Mei, et al

(*Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the real-time fluorescent quantitative-polymerase chain reaction approach (fqRT-PCR) of cytokeratin 19 (CK19) targets for its feasibility to estimate the number of circulating tumor cells (CTCs) in the patients with lung carcinoma during radiotherapy and to correlate our observation to clinical findings. *Methods*: Samples of 5ml peripheral blood were taken from each lung cancer patients (n=30) both before and after the radiotherapy course. Meanwhile tumour size was determined by chest X-ray or computed tomography. The blood samples were subjected to real time RT-PCR assay. All patients with lung cancer were treated with primary definitive and mediastinal radiotherapy. *Results*: Compared to with that before the-treatment, the value of CK19 mRNA in PB after therapy decreased dramatically(5.093 2 ± 1.062 8 vs 4.249 3 ± 0.832 3,t=3.192,P=0.007). The change of CK19 mRNA level

作者介绍:王 梅(1970-),女,主管技师,研究方向:临床检验和分子生物学。

通讯作者:葛明建,男,教授,E-mail:mingjian_ge@hotmail.com。

基金项目:重庆市卫生局科研基金资助(编号:00-2004)。

J Thorac Imaging,2004,19(1):16-23.

[5] Hart D,Wall B F.UK population dose from medical X-ray examinations[J]. Eur J Radiol,2004, 50(3):285-291.

[6] Zhu X H,Yu J Q,Huang Z. Low-dose chest CT:Optimizing radiation protection for patients[J]. AJR,2004,183(3):809-816.

[7] Yoshiharu O,Hisanobu K,Astushi K,et al. Influence of detector collimation and beam pitch for identification and image quality of ground-glass attenuation and nodules on 16-and 64-detector row CT systems:Experimental study using chest phantom[J].Eur J Radiology,2007,64(3):406-413.

[8] John D,Kostas P,Panos P,et al.Conceptus radiation dose and risk from chest screen-film radiography[J]. Eur Radiol,2003,13(3):406-412.

[9] 曾勇明.数字X线成像技术操作规范与剂量优化[M].重庆:重庆出版社,2009.117-118.

[10] 张春红,林大全.中国成人仿真人体模型的参数研究[J].机械,2009,36(7):1-3.

[11] 张春红,林大全.探析我国仿真人体模型中的仿生技术[J].机械,2009,36(1):1-2.

[12] 曾勇明,张志伟,梁开运,等.双能量减影胸部成像模拟肺部病变检出的实验研究[J].重庆医科大学学报,2007,32(7):686-688.

[13] 曾勇明,吴富荣,张志伟,等.数字X线摄影辐射剂量与图像质量相关性的实验研究[J].重庆医科大学学报,2009,34(11):1517-1520.

(责任编辑:关蕴良)

before and after radiotherapy was closely related to the type(squamous cell cancer/adenocarcinoma vs. small cell cancer, 0.538 9 ± 0.903 0 vs 1.682 6 ± 0.946 7, t=2.146 5, P=0.051). Meanwhile, there was a close link between the grade (Well/Mod vs Poor) and the change of CK19 mRNA (0.502 4 vs 1.527 1, t=2.017, P=0.065). The change of CK19 mRNA level in peripheral blood (PB) was related to variation of tumour burden during radiotherapy (r=0.057 5, P=0.025).Of the 30 cases studied, 24 cases were positive before radiotherapy (24/30, 80%).The positive rate was 53 %(16/30) after radiotherapy, meaning that 8 cases were converted into negative after radiotherapy. *Conclusion*: The disseminated cancer cells cannot be completely eradicated by radiotherapy, suggesting further more systemic adjuvant treatment should be conducted. Early assessment of the therapeutic response might be possible by serial quantitative of CTCs. Detection of tumour cells disseminated in peripheral blood can provide clinically important data that are of value for tumour staging and possibly for prognostication.

【Key words】Lung neoplasm; Blood; Polymerase chain reaction; Cytokeratin; Messenger RNA; Radiotherapy

本实验以 CK19mRNA 作为检测标志物，运用实时荧光定量逆转录－聚合酶(The real-time fluorescent quantitative-polymerase chain reaction approach, fqRT-PCR)法检测放射治疗前后肺癌患者外周循环癌细胞(Circulating tumour cells, CTCs)的改变，评估其作为新的疗效评定标准的可行性及临床相关性。

1 材料与方法

1.1 临床资料

本组共 30 例病人，分别于放疗前后各采集 5 ml 外周血。放疗前标本至少在放疗开始前 1 d 获得，在此之前患者未接受手术或化疗等其它治疗。同时摄胸片或 CT 扫描，并且计算肿瘤最大直径及垂直径的乘积(cm^2)。在放疗结束时再次采集标本，并以相同方法测量和计算肿瘤的大小。所有患者均接受原发灶及纵隔区域的常规分割放疗，中位放疗剂量为 60 Gy(30~72 Gy)，中位放疗时间为 48 d(10~56 d)。放疗期间患者亦暂不接受手术或化疗等。本组 30 例患者均经病理检查获得确诊。临床分期方法包括胸片、纤支镜、胸部 CT、腹部超声及全身骨骼同位素扫描等。本组男 20 例，女 10 例。其中鳞癌 18 例，腺癌 4 例，小细胞癌 8 例。高/中分化 16 例，低分化 14 例。Ⅱ期 8 例，Ⅲ期 20 例，Ⅳ期 2 例。阴性对照组(n=20)为健康体检者。

1.2 实验过程

1.2.1 提取 RNA 首先运用人淋巴细胞分离液(上海化学试剂二厂)分离外周血单个核细胞(PBMNs)。按 Trizol Reagent (Invitrogen, Cat# 15596-026) 的说明提取 PBMNs 中的总 RNA。通过测定 A_{260} 计算 RNA 的浓度，A_{260}/A_{280} 的比值判定 RNA 纯度，1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

1.2.2 合成 CDNA 总 RNA 在 70℃中孵育 5 min。逆转录反应在 18 μl 1×RT 缓冲液[50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3), 75 mmol/L KCl 及 3 mmol/L $MgCl_2$]中完成，同时加入 0.5 mmol/L dNTP, 1 μl R Nasin 及 200 U MMLV 逆转录酶 (Promega)，合成条件为 37℃ 30 min。

1.2.3 引物与探针 运用 Primer Express 软件 (PE Applied Biosystems)来设计合适的 Taqman 引物和探针。CK19 引物的序列为：上游引物(5'→3')GCA GAA CCG GAA GGA TGC T；下游引物(5'→3')TCC GTT TCT GCC AGT GTG TC。产物长度为 202 bp。Taqman 探针的 5'端被报告基团 FAM(发光波长为 518 nm)标记，而 3'端被磷酸化以防止 PCR 过程其自身序列的延伸。探针的序列为 TGG TTC ACC AGC CGG ACT GAA。选择引物探针对时注意引物跨越内含子－外显子交界处，以避免扩增序列高度同源的 CK19 假基因。引物和探针均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.4 Taqman PCR 反应 PCR 反应在以下反应体系中完成：43 μl PCR 反应缓冲液[10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.4), 50 mmol/L KCl 及 1.5 mmol/L $MgCl_2$], 0.2 mmol/L dNTP, 5 μlCDNA, 2U Taq DNA 聚合酶(Promega)，上、下游引物各 0.4 μmol/L，首先在 95℃水平预变性 5 min，然后按以下反应条件完成 35 个循环：95℃ 30 s, 62℃ 20 s, 72℃ 20 s。最后在 72℃下延伸 10 min 结束反应。在每一批 PCR 反应中设立阳性对照(提自 LC-5 细胞的 RNA)及阴性对照(水)。所有反应均在 ABI Prism 7000 序列检测系统上完成。

根据所获得的标准曲线，得到各检测标本的起始浓度(基因拷贝数/ml)。实验数据均以每毫升血清中 CK19mRNA 拷贝数的常用对数表示。所有反应均在 ABI Prism 7000 序列检测系统(Perkin-Elmer Applied Biosystem)中完成。它主要原理是根据 PCR 过程中荧光标记探针所发出的荧光信号来计算 CK19mRNA 的起始拷贝数。7000 系统包含 1 个内置的热循环仪以通过纤维光缆与 96 个标本孔均相连的激光检测头。CCD(Charge- Coupled Device)摄像头可收集发自每个标本的荧光信号并且进行自动分析。检测系统自带的软件可以计算 Ct 值并确定每个标本的起始拷贝数。检测值以每毫升血清中 CK19mRNA 拷贝数的常用对数值表示。

1.2.5 LC-5 细胞连续稀释试验 用 Trypsin-EDTA(Sigma)收集单层培养的 LC-5 细胞，用冷 PBS 洗涤并混悬。用计数池测定细胞的密度，以台盼蓝(Sigma)染色评价细胞的活力。调整细胞的密度至 2 ml DEPC 处理水中含 10^6 个细胞。为了

模仿肺癌病人外周循环中癌细胞存在的情况，分别从健康志愿者外周血 10^7 个 PBMNs 和 10^6 个 LC-5 细胞中提取 RNA，将提取自正常人 10^6 个 PBMNs 中的 RNA 分别与提取自 1、10、10^2、10^3、10^4 和 10^5 个 LC-5 细胞的 RNA 相混合。对阴性对照，则只以提自 10^6 个 PBMNs 的 RNA 为检测对象。运用 fqRT-PCR 法分别检测以上 RNA 混合物的起始基因拷贝数，并以此建立标准曲线和 ROC 曲线。每个浓度的标本均重复测定 3 次。

1.3 统计学分析

运用 SPSS10.0 for Windows 统计软件包处理实验数据。配对样本 t 检验比较放疗前后外周血 CK19mRNA 水平变化。运用两变量相关性或独立样本 t 检验评价临床病理相关性。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CK19 诊断实验的评估

为了准确评定本方法检测 CTCs 的价值，我们运用 SPSS 10.0 for windows 统计软件建立了受试者工作特征（receiver operator charicteristic，ROC）曲线。它是以方法的灵敏度（Sensitivity）为横坐标，1－特异性（1－Specificity）为纵坐标建立的曲线。通过测定曲线下的面积（Area under curve，AUC）来确定诊断方法的准确性（Accuracy）。本实验方法的曲线下面积为0.965（95%CI：0.916~1.014）（图 1）。将健康对照组均值的 95%可信区间的上界（$\bar{x}$ ± 1.96s）作为本诊断实验的分界值（Cut-off Value），其值为 4.120。在此分界值条件下，本诊断实验的灵敏度为 90%，特异度为 84%。通过比较批间和批内不同浓度标准品的 Ct 值来评估检测方法的重复性，批间和批内 Ct 值的变异系数（CV）分别为 6.5%和 2.2%。图 2 及图 3 分别显示标准曲线及扩增曲线。

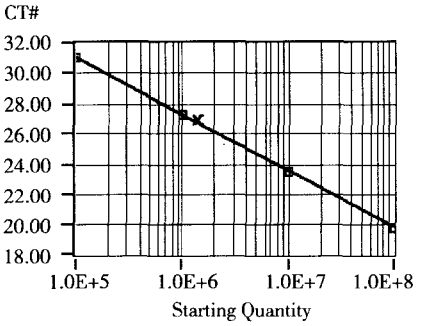


图 2 标准曲线

2.2 放疗前后 CK19mRNA 水平的变化

与放疗前相比，放疗后患者外周血 CK19mRNA 表达水平显著降低（5.093 2 ± 1.062 8 vs 4.249 3 ± 0.832 3，t=3.192，P=0.007，配对样本 t 检验）。

2.3 放疗前后 CK19mRNA 水平变化与临床病理参数的关系

放疗前后 CK19mRNA 水平变化与肺癌的组织类型（鳞/腺癌与小细胞癌）有密切关系（0.538 9 ± 1.062 8 与 1.682 6 ± 0.946 7，t=2.145，P=0.051，独立样本 t 检验），同时与癌肿分化等级（高/中分化与低分化）间也存在一定关系（0.502 4 与 1.527 1，t=2.017，P=0.065，独立样本 t 检验），而与分期、性别及年龄等无关。

2.4 放疗前后 CK19mRNA 水平变化与瘤负荷改变间的相关分析

放疗前后 CK19mRNA 水平变化与瘤负荷改变间存在相关性（r=0.575，P=0.025，两变量相关性分析）。

2.5 放疗前后 CK19mRNA 表达阳性率

若以健康对照组（n=20）外周血 CK19mRNA 均值的 95%可信区间的上限值（4.120）为分界值，若测值>4.120 为阳性，则放疗前本组病人阳性率为 80%（24/30），放疗后阳性率为 53%（16/30），有 8 例病人经放疗后外周血 CK19mRNA 表达转为阴性。

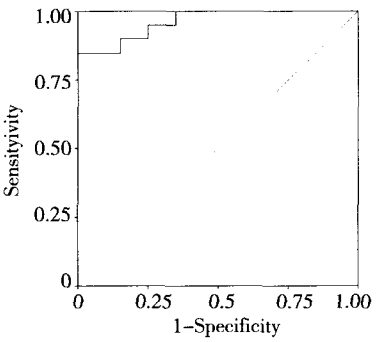


图 1 CK19 诊断实验的 ROC 曲线

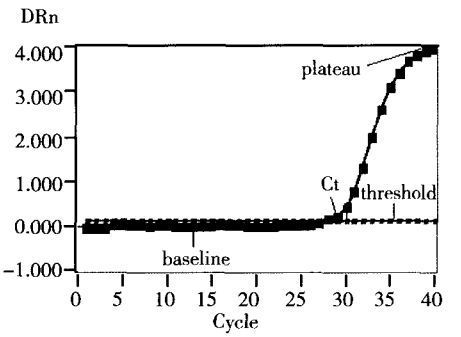


图 3 扩增曲线

3 讨 论

微小转移（Micrometastasis）一般是指恶性肿瘤在发展过程中，播散并存活于血循环、淋巴道、骨髓及各组织器官中的肿瘤细胞，此时它们尚未形成转移结节，无任何临床表现，常规检查方法如影像、常规病理检查等难以发现。血循环、骨髓以及淋巴结中存在癌细胞，提示肿瘤已经不再局限于原发灶，有发展为远处转移瘤的可能，预后不良。研究表明，不少患者在首次治疗前就已经存在微转移，这些微小病灶的结局如何，取决于癌细胞的生物学特性、机体的免疫状况及宿主器官的微环境。相当一部分肿瘤细胞处于休眠状态，即细胞增殖周期停滞或增殖与死亡处于平衡状态。当机体遭受种种打击或免疫力下降，静止的肿瘤细胞就将摆脱受抑制状态而

持续增殖,并发展为肿瘤[1,2]。因此,检测是否存在肿瘤微小转移对肿瘤患者预后及指导治疗方案的选择都具有重要意义[3~7]。

测定血液等易获得的体液标本,可以对肿瘤患者进行长期的动态监测[8]。在检测 CTCs 和微转移方面,PCR 法较传统方法优越,它甚至可以检测到不同来源标本(如血液、骨髓、淋巴结、尿液及粪便等)中 10^7 个正常细胞中存在的一个癌细胞!如今,PCR 检测微转移的标志物主要包括:发生遗传学变异的原癌基因和抑癌基因、组织特异性及肿瘤特异性标志物的转录本。近年来,由于癌细胞纯化技术的运用使得检测方法的特异性和灵敏度进一步提高。对肺癌、乳腺癌、结直肠癌或前列腺癌微转移检测的结果进行分析发现具有微转移的病人术后早期即出现复发。

Traweek 等[9]建立了高度灵敏的 RT-PCR 方法,并且运用它来检测了 MCF-7 乳腺癌细胞角蛋白 19(Cytokeratin 19)基因的表达,他们发现可检测出 10^6 个 HL-60 细胞中存在的 1 个肿瘤细胞。之后,陆续有人以角蛋白基因转录本作为标志物,运用相同的方法检测了存在于骨髓抽吸物中的乳腺癌细胞。虽然,大多数研究都提议将 CK19 作为临床应用的标志物,但缺乏大规模临床试验的证实。这主要应归咎于目前仍存在的相当数量的假阳性结果。这就要求进一步研究以界定 CK19 的正常表达水平,或者是建立定量检测方法来将肿瘤特异性的 CK19 基因表达水平与正常背景转录水平区分开。

能定量检测 CTCs 的数量或标志物基因表达水平的精细变化代表了一个里程碑。与现有的其它定量 PCR 方法相比,实时 PCR 法有一些明显的优点。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,从而导致假阳性的产生。本实验运用 fqRT-PCR 法来检测外周血中 CTCs,以便为动态监测疾病、观察疗效及早期诊断等创造条件。

本研究结果显示,放疗前后肺癌患者外周血中CK19mRNA 水平改变与肺癌的组织类型(P=0.051)及分化等级(P=0.065)间均存在密切关系。我们认为可能为治疗过程中,不同病理类型/分化的癌肿对放疗的敏感性不同,此间释放入血的癌细胞的数目亦不相同的缘故。但值得一提的是,放疗为一局部治疗手段,对于已有全身播散的肺癌病人,仅施以放疗显然是不够的,还需施以其它一些全身性辅助治疗措施(如化疗及生物治疗等),才可能取得较好疗效。本实验发现放疗后仍有相当一部分病人外周血 CK19mRNA 表达呈阳性就是很好的佐证。

传统的评价放疗疗效的标准是比较治疗前后肿瘤巨体体积变化大小来实现的。本实验发现放疗前后外周血 CK19 mRNA 水平变化与瘤负荷改变间存在很好的相关性(r=0.575, P=0.025),提示可将治疗前后外周血中 CTCs 变化来作为实体瘤新的疗效评判标准。在疾病的整个病程中均可获得血液标本并且采集标本的过程创伤很小,患者容易接受。对外周血的 CTCs 进行长期观察对了解患者的预后具有重要价值。同时对观察疗效及药物的作用靶点等均有提示意义[10,11]。尤其是近年来定量检测方法的问世,使得定量测定疾病病程中或治疗过程中外周血癌细胞数量变化成为可能,这为肿瘤疗效的观察提供了一项重要手段。在以后的临床实践中,还需进行长期大量的观察,以明确个体治疗相关的 CTCs 数量的减少是否与预后改善有关系。同时需开展前瞻性的临床研究来明确是否该方法在评估疾病预后、制定"个体化"的治疗措施以及建立新的治疗方案方面有价值。

参 考 文 献

[1] Wikman H, Vessella R, Pantel K. Cancer micrometastasis and tumour dormancy[J]. APMIS, 2008, 116(7-8): 754-770.

[2] Aguirre-Ghiso J A. The problem of cancer dormancy: understanding the basic mechanisms and identifying therapeutic opportunities [J]. Cell Cycle, 2006, 5(16): 1740-1743.

[3] Ge M J, Wu Q C, Wang M, et al. Detection of disseminated lung cancer cells in regional lymph nodes by assay of CK(19) reverse trancriptase polymerase chain reaction and its clinical significance[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2005, 131(10): 662-668.

[4] Ge M J, Shi D, Wu Q C, et al. Observation of circulating tumour cells in patients with non-small cell lung cancer by real-time fluorescent quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction in peroperative period[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2006, 132(4): 248-256.

[5] 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.

[6] Gu C D, Osaki T, Oyama T, et al. Detection of micrometastatic tumor in PNo lymph nodes of patients with completely resected nonsmall cell lung cancer: impact on recurrence and survival[J]. Ann Surg, 2002, 235(1): 133-139.

[7] Yoshioka S, Fujiwara Y, Sugita Y, et al. Real -time rapid reverse transcriptase-polymerase chain reaction for intraoperation diagnosis of lymph node micrometastasis: clinical appilication for cervical lymph node dissection in esophageal cancer[J]. Surgery, 2002, 132(1): 34-40.

[8] Scher H I, Jia X, de Bono J S, et al. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(3): 233-239.

[9] Traweek S T, Liu J, Battifora H. Keratin gene expression in non-epithelial tissues. Detection with polymerase chain reaction[J]. Am J Pathol, 1993, 142(4): 1111-1118.

[10] Alix-Panabières C, Riethdorf S, Pantel K. Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(16): 5013-5021.

[11] Riethdorf S, Pantel K. Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization[J]. Pathobiology 2008, 75(2): 140-148.

(责任编辑:冉明会)