维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2003)06 - 0735 - 03

膀胱移行细胞癌患者外周血 CK20 表达的研究

韩永华 , 吴小候

(重庆医科大学临床学院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 CK20 在膀胱移行细胞癌(TCCB)患者外周血的表达及其意义。方法:采用逆转录聚合酶链反应(RT - PCR)检测 63 例 TCCB 患者和 19 例健康志愿者以及 19 例非肿瘤患者外周血 CK20 表达。以 GAPDH 作为内参照。结果:19 例健康志愿者和 19 例非肿瘤患者外周血 CK20 的表达均为阴性;63 例 TCCB 患者外周血 CK20 阳性表达率为 25.4%(16/63),其中 T_1 期为 0(0/31),T_2 期为 12.5%(2/16),T_3 期为 77.8%(7/9),T_4 期为 100%(7/7),CK20 阳性表达率随分期增加而增加,T_{3-4} 期明显高于 T_1 期和 T_2 期。对 T_{1-3} 期 33 例患者随访 6 个月,其中外周血 CK20 阴性表达 26 例未发现远处转移;外周血 CK20 阳性表达 7 例中 2 例发生远处转移。结论:检测外周血 CK20 表达,可以提示癌细胞的血行播散,对判断预后以及指导治疗具有一定临床价值。

【关键词】膀胱肿瘤;CK20;逆转录聚合酶链反应;血

【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2002 - 06 - 14

Detection of CK20 in peripheral blood of patients with transitional cell carcinoma of the bladder

HAN Yonghua , et al

(*Department of Urology , College of Clinical Medicine , Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To study the expression of cytokeratin (CK) 20 in the peripheral blood of patients with transitional cell carcinoma of the bladder and to evaluate its clinical significance. *Methods*: CK20 mRNA in 63 patients with TCCB, 19 non - cancerous patients and 19 healthy volunteers was detected respectively. GAPDH was used as a general marker for normal blood cells. CK20 and GAPDH were amplified by using RT - PCR. *Results*: Nineteen healthy volunteers and 19 non - cancerous patients showed no CK20 signals in peripheral blood. Sixteen of 63(25.4%) patients with TCCB showed positive CK20 signals in peripheral blood, including 0/31 of stage T_1, 2/16 of stage T_2, 7/9 of stage T_3, 7/7 of stage T_4. The CK20 expression difference between T_1/T_2 group and T_{3-4} groups was significant. Two patients with positive CK20 signals in peripheral blood had distant metastases during a 6 - month follow - up period. *Conclusion*: CK20 is applicable to detect cancer cells in the peripheral blood of transitional cell carcinoma of the bladder and may play an important role in the evaluation of the prognosis and postoperative management of TCCB.

【Key words】 Bladder tumor; Peripheral blood; RT - PCR; CK20

癌细胞具有浸润和转移的生物学特性,其机制尚不完全清楚。癌细胞进入血循环是肿瘤形成远处转移的重要环节,从血液中直接观察癌细胞极其困难,通常采用癌细胞标志物检测其存在。研究发现,细胞角质蛋白 20(cytokeratin 20, CK20)表达于人类某些上皮细胞和上皮细胞来源的肿瘤,如尿路移行细胞癌,而且原发灶和转移灶表达特征相似[1]。本研究运用逆转录聚合酶链反应(RT - PCR)检测 TCCB 患者外周血 CK20 的表达,评价其临床意义,报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验对象

经临床和病理证实的膀胱移行细胞癌患者63例,其中男46例,女17例,年龄19~82岁,平均60.3岁;T_1、T_2、T_3 和 T_4 期分别为 31、16、9 和 7 例。对照组 19 例健康志愿者和 19 例泌尿外科非肿瘤患者,男 28 例,女 10 例,年龄 23~83 岁,平均 59.8 岁。对每个研究对象无菌采取肘静脉血 5.0 ml,加入 3.8% 的柠檬酸钠 0.8ml 混匀抗凝,用 Ficoll 100 液提取

作者介绍:韩永华(1970 -),男,硕士研究生,主要研究方向:膀胱肿瘤

维普资讯 http://www.cqvip.com

有核细胞。

1.2 主要试剂与仪器

总 RNA 提取试剂(B. M.), M - Mu1V 逆转录酶(Promega), Taq 酶(上海生工), 引物序列[2,3](由上海博亚合成) CK20 sense: 5′ - CAGACACACGGTGAACTATGG - 3′ antisense: 5′ - GATCAGCTTCCACTGTTAGACG - 3′ GAPDH sense: 5′ - CCATGGAGAAGGCTGGGG - 3′ antisense: 5′ - CAAAGTTGTCATGGATGACC - 3′ PCR 扩增仪(BIO - RAD Gene Cycler™), 图象分析仪(BIO - RAD)。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 提取 使用总 RNA 提取试剂, 按说明书对外周血有核细胞提取总 RNA, 经 OD260/OD280 测定值及用琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。

1.3.2 逆转录体系 总 RNA 提取物 2μg, oligo dT_{18} 0.5μg, DEPC 水 9μl, 70℃ 反应 5min, 迅速冰浴后, 加入 5μl 5x buffer, 20u RNasin, 1μl 10 mmol/l dNTP, 200U M - Mulv 逆转录酶, 用 DEPC 水补足 25μl 反应体积, 混匀, 经 37℃ 60min 逆转成 cDNA, 经 94℃ 5min 灭活逆转录酶。

1.3.3 PCR 扩增 取 cDNA 产物 5μl, 各引物分别取 40pmol, 5μl 10x buffer, 4μl 25mmol/l $MgCl_2$, 1μl 10mmol/l dNTP, Taq 酶 2.5u, 双蒸水补足反应体积 50μl。94℃ 60s, 60℃ 30s, 72℃ 60s 循环 30 次, 72℃ 延伸 7 min。

1.3.4 电泳 取扩增产物 7.5ul, 加 1.5ul 上样 buffer, 点于 2% 琼脂糖凝胶(含 EB0.5μg/ml)上, 经 80 伏、30 min 电泳, 扫描制片, 记录结果。

1.3.5 结果判断 出现 370bp 和 208bp 电泳带为 CK20 阳性, 仅出现 208bp 电泳带为 CK20 阴性。

1.4 统计学处理

采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

19 例健康人和 19 例非肿瘤患者外周血 CK20 表达均为阴性。

63例 TCCB 患者外周血 CK20阳性表达率为 25.4%(16/63), 其中 T_1期为0(0/31), T_2 期 12.5%(2/16), T_3 期 77.8%(7/9), T_4 期 100%(7/7)。浅表性肿瘤患者外周血无 CK20 表达, 浸润性肿瘤患者外周血 CK20 阳性表达率随分期增加而增加, $T_{3\sim4}$期明显高于 T_2 期。

$T_{1\sim3}$期 33 例 TCCB 患者随访 6 个月, 其中外周血 CK20 阴性表达 26 例(T_1 期 18 例, T_2 期 8 例)术后 1 周, 1 个月, 3 个月、6 个月复查外周血 CK20 表达均为阴性, 随访期间未见远处转移; 7 例(T_2 期 2 例, T_3 期 5 例)外周血 CK20 阳性表达患者术后 1 周, 1 个月, 3 个月, 6 个月复查外周血 CK20, 分别有 6、3、2、2 例患者外周血 CK20 阳性, 该 2 例外周血 CK20 持续阳性患者分别于术后 5～6 个月发生远处转移, 其中骨转移 1 例, 腹膜后淋巴结转移 1 例, 而膀胱内未见复发肿瘤, 其余 5 例随访期间未见肿瘤复发或远处转移。

4 例 T_4 期 TCCB 患者随访 6 个, 放化疗后 1 个月, 3 个月, 5 个月复查外周血 CK20 表达均为阳性, 临床上仍存在肿瘤。

3 讨 论

CK20 为Ⅰ型角质蛋白, 是 Moll 等在 1990 年分离鉴定出来的, 分子量为 46000, 含有 424 个氨基酸残基。CK20 DNA 长 18kb, mRNA 长 1.75 kb, 其 mRNA 表达不受相应编码蛋白表达高低的影响[4]。研究发现, 绝大多数尿路移行细胞癌、结直肠腺癌和胃腺癌 CK20 表达阳性[1]。一旦表达 CK20 的癌细胞进入外周血, 可以通过检测外周血 CK20 表达发现该癌细胞在外周血中的存在。我们采用 RT - PCR 法检测外周血 CK20 表达发现, 19 例健康人和 19 例非肿瘤患者外周血 CK20 表达均为阴性, 与文献报道一致[5,6], 63例 TCCB 患者16例外周血 CK20 阳性, 阳性率为25.4%(16/63)。T_1 期患者外周血 CK20 均为阴性, CK20 阳性率 T_2 期为 12.5%(2/16), T_3 期 77.8%(7/9), T_4 期 100(7/7)。外周血 CK20 阳性表达率随分期增加而增加, $T_{3\sim4}$期明显高于 T_1 期和 T_2 期, T_4 期 TCCB 患者外周血 CK20 表达均为阳性。Fujii 等[7]检测 TCCB 患者外周血 CK20 的表达, 也发现浅表性肿瘤患者外周血无 CK20 表达, 而 6 例已有转移的患者中 5 例 CK20 阳性。

外周血中出现癌细胞并不意味着以后一定形成转移灶, 能否形成转移灶取决于癌细胞与机体的多方面的相互作用, 血循环中的癌细胞大多数被机体破坏, 只有少数癌细胞可以形成转移实体灶。本组有 33 例 $T_{1\sim3}$期 TCCB 患者获得随访 6 个月, 其中外周血 CK20 阴性表达 26 例术后多次复查外周血 CK20 表达均为阴性, 随访期间未见远处转移; 7 例外周血 CK20 阳性表达患者术后 1 周, 1 个月, 3 个月, 6 个月复查外周血 CK20, 分别有 6、3、2、2 例患者外周血 CK20 阳性, 2 例外周血 CK20 持续阳性患

维普资讯 http://www.cqvip.com

者分别于术后 5～6 个月发生远处转移，其余 5 例随访期间未见远处转移。结果表明，外周血 CK20 阳性表达患者发生转移的机会明显增加，而且外周血 CK20 阳性表达先于临床上肿瘤转移灶的发现。Funaki 等[6]对结直肠癌患者外周血 CK20 的研究发现，9 例 C 期患者外周血 CK20 表达阳性 5 例，而这 5 例患者术后随访 11 个月复发 3 例，其余 2 例外周血 CK20 表达阳性患者和 4 例外周血 CK20 表达阴性患者术后随访 1～20 个月未见复发。我们认为对浸润性 TCCB 患者检测外周血 CK20 表达对预测预后有参考价值。对外周血 CK20 阳性 TCCB 患者术后尽早行全身化疗或许能减少远处转移的发生。骆成玉等[8]报道大肠癌患者早期化疗可使 45.7% (16/35)的患者外周血 CK20 表达阳性转为阴性。

TCCB 患者外周血 CK20 表达受以下因素的影响：不了解肿瘤细胞释放入血的规律和在循环中的运行和成活情况，不能获取肿瘤细胞；肿瘤细胞异质性导致循环中存在的肿瘤细胞不表达 CK20 mRNA。因此，不能认为所有的外周血 CK20 阴性表达 TCCB 患者外周血中没有癌细胞或以后不发生转移。

参 考 文 献

[1] Moll R, Lowe A, Laufer J, et al. Cytokeratin 20 in human carcinomas: a new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies[J]. Am J Pathol, 1992; 140: 427－447.

[2] Burchill SA, Bradburg MF, Pittman K, et al. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase－polymerase chain reaction[J]. Br J Cancer, 1995; 71: 278－281.

[3] Tohru Suzuki, Yasushi Suzuki, Tomoaki Fujioka. Expression of the catalytic subunit associated with telomerase gene in human urinary bladder cancer[J]. J Urol, 1999; 162: 2217－2220.

[4] Moll R, Zimbelmann R, Goldschmid MD, et al. The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas[J]. J Differentiation, 1993; 53(2): 75－79.

[5] Datta YH, Adams RT, Drobyki WR, et al. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse transcriptase－polymerase chain reaction[J]. J clin Oncol, 1994; 12: 475－483.

[6] Funaki NO, Tanaka J, Ohshio G, et al. Cytokeratin 20 mRNA in peripheral venous blood of colorectal carcinoma patients[J]. Br J Cancer, 1998; 77(8): 1327－1332.

[7] Fujii Y, Kageyama Y, Kawakami S, et al. Detection of disseminated urothelial cancer cells in peripheral venous blood by a cytokeratin 20 specific nested reverse transcriptase ploymerase chain reaction[J]. Jpn Cancer Res, 1999; 90(7): 753－757.

[8] 骆成玉，李世拥. 大肠癌患者外周血中癌细胞检测的临床意义[J]. 中华实验外科杂志，1999; 16: 199－200.

(上接第 731 页)

[4] Ferraz de carvalho CA, Liberti EA, Fujimura I, et al. Functional anatomy of the retro－and suprahepatic portions of the human inferior vena cava and their main affluents[J]. Surg Radiol Anat, 1994; 16(3): 267－275.

[5] Dell Isola C, Tucci GF. Anatomicosurgical research on isolating the retrohepatic segment of the vena cava inferior[J]. G chir, 1993; 14(1): 7－11.

[6] 龚 斌，费 军，石 尧，等. 下腔静脉的应用解剖观察[J]. 解剖学杂志，1990; 13(1): 43－46.

[7] 窦寰宇，鞠学红，杨金堂. 下腔静脉属支插管的应用解剖[J]. 中国临床解剖学杂志，1991; 9(3): 161－162.

[8] Willianis PL, Warwick R, Dyson M, et al. Angiology. In: Grays Anatomy 37 th ed[M]. Edinburgh: Churchill Livingtone, 1989: 813－818.

[9] Hollinshead WH. Textbook of Anatomy 3 rd ed[M]. New York: Harper to row, 1974: 649－665.

[10] Baniel J, Foster RS, Donohue JP. Surgical anatomy of the lumbar vessels: implications for retroperitoneal surgery[J]. J Urol, 1995; 153(5): 1422－1425.