

PCR 技术在肺癌微转移中的应用现状

欧阳伟炜 李卓玲 苏胜发 卢 冰

摘 要 肺癌微转移是引起肿瘤复发和转移的重要原因,PCR 技术作为目前检测肺癌微转移的一种方法,能及早发现肺癌微转移,因此 PCR 技术对提高诊断肺癌的准确性、指导肺癌治疗、判断肺癌预后有着重要的作用。本文对近年来 PCR 技术在肺癌微转移的应用情况进行综述。

关键词 PCR 肺癌 微转移

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.07.054

肺癌是发生率和病死率增长最快,对人类健康和生命威胁最大的恶性肿瘤。随着手术方式、放疗技术的改进,化疗方案的日趋成熟,基因、生物治疗的开展,使肺癌的综合治疗达到了一个新的水平。但是肺癌患者在原发肿瘤切除后仍出现肿瘤复发和远处转移,其总的 5 年生存率没有明显提高^[1]。近年来,许多研究者认为肺癌微转移是引起肿瘤复发和转移的主要原因。早期发现微转移对非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)更精确的分子分期、制定综合的治疗方案、预后判断提供依据^[2]。肺癌微转移是指恶性肿瘤发展过程中,播散并存在于血液循环、淋巴道、骨髓及各组织器官中的肿瘤细胞,尚未形成转移性结节,且无任何临床表现,常规病理学、普通影像学等方法难以发现和检测到的转移。目前检测微转移的方法有很多,包括 HE 连续切片法、免疫组织化学法(immunohistochemistry, IHC)、聚合酶链式反应(polymerase chain reactions, PCR)技术、流式细胞术、PET-CT 检查等方法。本文主要对近年 PCR 技术在肺癌微转移中的应用情况进行综述。

一、PCR 技术概念

PCR 技术是一种分子生物学技术,PCR 种类包括 PCR、反转录 PCR、荧光定量 PCR、反向 PCR、不对称 PCR、多重 PCR、巢式 PCR、递减 PCR。PCR 技术的影响因素很多,包括模板、引物、循环温度、循环次数、反转录酶、镁离子浓度、RNA 酶被污染等,在实验

中要特别注意这些因素对实验结果的影响。目前肺癌微转移主要应用 3 种技术,以下对这 3 种技术进行说明。

1. PCR:PCR 是选择性的体外快速扩增 DNA 或 RNA 片段的方法,以母链 DNA 为模板,在 DNA 聚合酶的催化下,以特定引物为延伸点,通过变性、退火、延伸等步骤复制出与母链 DNA 互补的子链 DNA 的过程。PCR 是一项 DNA 体外合成放大技术,它能在数小时内将目的基因片段扩增 $10^6 \sim 10^8$ 倍。PCR 技术常用于检测肿瘤细胞中的基因突变、染色体重排等 DNA 异常。Kishimoto 等^[3]用 PCR-SSCP 法检测了 115 例 NSCLC 手术切除后常规病理检查无转移淋巴结的 p53 突变,结果显示 52% p53 基因突变阳性,提示有 NSCLC 微转移的存在。

2. 反转录聚合酶链式反应技术(reverse transcriptase polymerase chain reactions, RT-PCR):RT-PCR 是以 RNA 为模板,反转录为 cDNA 后,再进行 PCR 扩增。通过检测待检组织中的肿瘤标志物 mRNA 来证实肿瘤细胞的存在,敏感度可以大大提高,目前是公认诊断 NSCLC 微转移最常用、最敏感的方法。Jiang 等^[4]对有胸腔积液的肺癌患者通过 RT-PCR 技术,检测甲状腺转录因子 1(thyroid transcription factor 1, TTF-1) mRNA,发现 TTF-1 mRNA 可以作为肺癌胸膜微转移的分子标志物,能诊断合并胸腔积液的肺癌,特别是原发性肺腺癌。

3. 荧光定量 PCR(fluorescence quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR):FQ-PCR 是在 RT-PCR 反应体系中加入荧光标记的探针,该探针能与扩增基因的某一区域的序列发生特异性结合,实现对 PCR 扩增产物的动态监测和自动定量,因而 FQ-PCR 又称实时定量 PCR(real time quantitative, PCR)

作者单位:550001 贵阳医学院附属医院胸部肿瘤科、贵州省肿瘤医院胸部肿瘤科

通讯作者:卢冰,主任医师,电子信箱:lbgymaaaa@sohu.com

或反转录实时 PCR (real-time RT-PCR 或 quantitative real-time RT-PCR), 亦有人称为 QPCR (quantitative PCR) 或 RT-QPCR (reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reactions)。Saintigny 等^[5]应用 real-time RT-PCR 技术, 以细胞角蛋白 7 (cytokeratin 7, CK7)、CK19、黏蛋白 1 (mucin type 1, MUC1) mRNA 检测 19 例 NSCLC 患者, 29 例健康人, 17 例肺部良性疾病患者。19 例 NSCLC 中 4 例明确有 NSCLC 微转移, 6 例明确有 NSCLC 转移及 19 例 NSCLC 中有 84 枚常规病理阴性淋巴结。健康人及肺良性疾病 CK19、CK7、MUC1 均为阴性, 4 例 NSCLC 微转移及 6 例 NSCLC 明确转移至少能检测出上述标志物中的一个阳性, 84 枚常规病理阴性淋巴结 7% 至少能检测出上述标志物中的一个阳性, 预后评估待进一步随访研究。Saintigny 等还指出 CK19 及 CK7 mRNA 有很高的敏感度, 认为是检测肺癌淋巴结及骨髓微转移的金标准, 但是 CK19 特异性较低。Song 等^[6]认为检测出 CK19 mRNA 与肺癌的转移和复发相关。

二、PCR 技术在肺癌微转移检测中应用的意义

1. 提高诊断的准确性: 肺癌患者微转移病灶的检测, 可以补充病理的 TNM 分期, 精确到分子生物学分期, 能提高诊断的准确性。Yarbro^[7]提到 NSCLC 患者外科手术后病理 TNM 分期是分期的金标准, 可以作为一个重要的预后因素。Perng 等^[8]提到虽然多数研究者认为手术的病理分期是诊断的标准, 但是该研究者却认为病理学的 TNM 分期不能令人完全满意, 不能准确的评估生存率。Qiu 等^[9]对早期 NSCLC 根治术后病理学阴性淋巴结应用 FQ-PCR 技术检测癌胚抗原 (carcino-embryonic antigen, CEA) mRNA, IHC 检测 p53、AE1/AE3。发现 FQ-PCR 检测 193 枚病理学阴性淋巴结有 32 枚 (16.6%) CEA mRNA 阳性表达。应用 FQ-PCR 技术检测 CEA mRNA 的表达能检测 I N₀ 期病理学阴性淋巴结的 NSCLC 患者的微转移。CEA mRNA、p53、AE1/AE3 阳性者无病生存期明显低于阴性者。该研究表明早期 NSCLC CEA mRNA、p53、AE1/AE3 的联合检测可以提高准确的 N 分期, 提高诊断的准确性, 能提供重要的预后信息。I 期 NSCLC 微转移通过 FQ-PCR 的检测比 IHC 敏感。前哨淋巴结 (sentinel lymph node, SLN) 是原发肿瘤引流区域淋巴结中的特殊淋巴结, 是原发肿瘤发生淋巴结转移所必经的第 1 站淋巴结, 及早检测 SLN 能明确患者分期、指导治疗、评估复发风险。

Melfi 等^[10]通过 RT-PCR 技术检测 16 例患者前哨淋巴结 CK19 和 CK7 检测出 6 例出现肺癌微转移。有 1 例病理检测肺癌微转移阴性的患者用 RT-PCR 检测出肺癌微转移, 该例患者在手术后 3 个月出现复发。SLN 用 RT-PCR 能提高 N₀ 期的肺癌微转移检出率, 能提高诊断的准确性。

有研究认为 DVL-3 和 δ -catenin 在肺癌中能异常表达, 影响转移^[11,12]。Li 等^[13]应用 RT-PCR 技术, 检测 75 例有胸腔积液的肺癌患者和 51 例有胸腔积液的肺部良性疾病患者的 DVL-3 mRNA 和 δ -catenin mRNA, 结果显示对比良性疾病 DVL-3 mRNA 和 δ -catenin mRNA 在恶性病变有显著增高, 特别是在肺腺癌中呈高表达。DVL-3 mRNA 在肺癌中有很高的特异性 (94.1%), 阳性预测值 (positive predictive value, PPV) 高达 95.7%, δ -catenin mRNA 有很高的敏感度 (92.0%), 阴性预测值 (negative predictive value, NPV) 达到 88.5%。当两者联合评价时敏感度 100.0%, NPV 为 100.0%, 准确度为 96.0%。DVL-3 mRNA 和 δ -catenin mRNA 能作为胸膜微转移的分子标志物, 能诊断有胸腔积液肺癌患者的微转移。Li 等^[14]收集 44 例 I 期 NSCLC 患者的原发肿瘤及病理学阴性淋巴结, 应用 RT-PCR 技术检测 surviving mRNA 和 livin mRNA, 发现 surviving mRNA 在 44 例原发肿瘤中均表达, livin mRNA 在 44 例原发肿瘤中有 39 例表达, livin mRNA 和 (或) surviving mRNA 阳性表达的 I 期 NSCLC 患者 15 例 (34.1%) 存在 NSCLC 淋巴结微转移。RT-PCR 技术检测 surviving mRNA 和 livin mRNA 阳性表达者较阴性表达者有很高的风险导致肿瘤复发和肿瘤相关死亡, 无病生存率和总生存率明显下降。surviving mRNA 和 livin mRNA 能作为分子诊断标志物用于检测 I 期 NSCLC 淋巴结微转移, 提高诊断 NSCLC 微转移的准确性。

Oddmund 等^[15]应用实时 RT-PCR 技术, 发现表面活性蛋白 C (surfactant protein C, SFTPC) 在正常淋巴结不表达, 在 NSCLC 肿瘤细胞的淋巴结高表达。CK19 mRNA 在 NSCLC 肿瘤细胞的淋巴结对比正常淋巴结呈高表达, SFTPC 和 CK19 mRNA 是检测 NSCLC 局部淋巴结微转移的标志。Mohajeri 等^[16]应用 PCR 技术和 IHC 对 41 例 NSCLC 患者进行骨髓微转移检测。PCR 技术检测出 14 例 (34%) 阳性, IHC 检测出 2 例 (4.8%) 阳性, 表明 PCR 能作为肺癌骨髓微转移检测的方法, PCR 技术比 IHC 更能提高诊断

的准确性。EGFR (the epidermal growth factor receptor) 是上皮生长因子细胞增殖和信号转导的受体,在 NSCLC 患者中过度表达。Zhang 等^[17]应用 RT-PCR 技术检测 42 例 NSCLC 患者和对照组 40 例健康人的外周血的 EGFR 的 mRNA 表达水平,EGFR mRNA 的阳性率患者占 69%,健康人占 12.5%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明外周血的 EGFR mRNA 表达水平能诊断 NSCLC 微转移,有重要的临床价值,能了解肺癌的预后。外科操作可以促进血液转移,Song 等^[6]应用 FQ-RT-PCR 技术检测 30 例 NSCLC 肺切除术的患者 CD44v6 mRNA, CD44v6 基因在 NSCLC 患者静脉血的表达明显高于健康者。CD44v6 基因表达在肺切除术的晚期明显高于早期。VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-3 是促进实体肿瘤淋巴管生成的重要信号,通过这些淋巴结发生肿瘤转移。Nwogu 等^[18]应用 RT-PCR 对 NSCLC 患者检测,发现 VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D、VEGF 受体-3 在高表达的淋巴结中存在微转移。NSCLC 微转移与淋巴结的 VEGF-A/C/D 或 VEGF-受体-3 表达水平有相关性。

2. 指导治疗:肺癌患者通过 PCR 技术能检测早期患者微转移,早期诊断,早期治疗,防止肿瘤的复发和转移。Sienel 等^[19]认为黑色素瘤抗原基因-A (melanoma antigen gene, MAGE-A) 在肿瘤组织表达,但在正常组织不表达,是一种微转移标志物。该研究应用 RT-PCR 技术对 50 例可手术没有远处转移的 NSCLC 患者骨髓穿刺进行 MAGE-A 检测,有 52% 患者在原发肿瘤切除后仍有 MAGE-A 表达,包括 MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3/6、MAGE-A4、MAGE-A12。表明 MAGE-A 转录与 NSCLC 微转移相关,影响预后。该研究认为,标志物代表了潜在的治疗靶点,不仅需要用标志物检测微转移,而且需要根除标志物,以防止肿瘤转移复发。因此将辅助性抗 MAGE-A 免疫治疗用于双盲、随机 II 期临床研究,182 例 MAGE-A3 阳性表达完整手术切除的 I B/II 期 NSCLC 患者用重组 MAGE-A3 蛋白和一种免疫佐剂治疗,随访 21 个月,发现免疫治疗组 (30%) 复发,安慰剂组 (41%) 复发,降低了复发率。

3. 判断预后:微转移会引起复发,使患者预后更差。肺癌的复发可能是在疾病早期没有系统的监测微转移引起的。肺癌微转移患者不仅有很高的复发率和肿瘤相关的病死率,而且无病生存期和总生存期显著降低。Xi 等^[20]通过微阵列检查肿瘤基因表达谱

可以显示淋巴结转移状态,认为肺癌淋巴结微转移导致预后差。Benlloch 等^[21]对 I 期 NSCLC 病理学阴性淋巴结进行检测,通过 real-time RT-PCR 技术,检测癌胚抗原相关细胞黏附分子 5 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5, CEACAM5) 和腭肺鼻上皮癌相关蛋白 (palate lung and nasal epithelium carcinoma associated protein, PLUNC)。发现 CEACAM5 和 PLUNC 在肿瘤组织中能够表达,在良性组织中不表达,或者低表达。检测 344 枚淋巴结中 13% CEACAM5 阳性,16% PLUNC 阳性。因此检测 CEACAM5、PLUNC 能评估 NSCLC 病理学阴性的淋巴结是否存在 NSCLC 微转移,比现在常用的 TNM 分期方法能更精确的评估复发的风险,对判断预后有重要的意义。Dai 等^[22]对 I ~ II b 期 NSCLC 根治切除术后患者,应用 RT-PCR 技术检测,发现 NSCLC 淋巴结微转移应用 RT-PCR 技术能检测出脆性组氨酸三联体基因 (fragile histidine triad, FHIT) 和细胞周期依赖性激酶抑制基因 (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, CDKN2A) mRNA 缺失, FHIT 或 CDKN2A mRNA 缺失者较未缺失者更易复发,5 年的无病生存率和总生存率降低,能预测肿瘤的复发和判断预后,该研究表明 NSCLC 淋巴结微转移患者降低了无病生存率和总生存率, NSCLC 淋巴结微转移是一个独立预测指标,表示预后差。

Nosotti 等^[23]应用 real-time RT-PCR 技术对 55 例已行外科手术的 I 期 NSCLC 患者进行检测,利用 CEA mRNA 标记,发现 CEA mRNA 在 20 例 (36.3%) 患者存在肿瘤细胞,提示存在 NSCLC 淋巴结微转移。CEA mRNA 阳性患者对比 CEA mRNA 阴性者在生存率和无病生存率上有显著性的差异。多因素分析证实了 NSCLC 微转移是一个独立预测指标,患者有更短的无病生存率。谭思创等^[24]收集 43 例 NSCLC 患者作为实验组,15 例良性肺部病变患者作为对照组进行实验,通过 RT-PCR 检测肺组织特异性蛋白 X (lung-specific X protein, LUNX) mRNA 的表达,实验组 43 例患者的 87 枚淋巴结中有 33 枚 (37.93%) LUNX mRNA 表达,对照组 15 例患者的 26 枚淋巴结中有 2 枚 (7.69%) 表达,两组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$), RT-PCR 检测 LUNX mRNA 对比常规病理切片检查 LUNX mRNA 检测有较高的敏感度。LUNX mRNA 是检测肺癌微转移的一个有价值的指标,可为今后制定治疗方案、评估预后提供重要参考依据。

三、展 望

肺癌微转移是引起复发和转移的重要因素,即使微转移灶再小,甚至只有一个肿瘤细胞,只要它具有转移肿瘤细胞的生物学特性就可以作为疾病处于进展期的标志物,和含有较多肿瘤细胞的大的转移灶一样能说明预后较差。临床上常规病理学和影像学检查只能发现较为明显的转移灶,而不能用于检测微转移。微转移的检测对判断患者的复发、转移及预后有着重要的意义。随着科学技术的发展,PCR 技术被广泛的应用于肺癌微转移的检测,能够提高诊断肺癌的准确性,判断预后,指导治疗。目前 PCR 技术在肺癌微转移的应用存在的主要问题是:检测肺癌微转移的标志物尚无统一的标准;尚无微转移分期的金标准;尚无统一治疗微转移的标准治疗方案,因此未来研究方向仍然主要是寻找最敏感、最特异的分子标志物,确定微转移的分期及治疗手段。

参考文献

- Li Q, Qi H, Zhou HX, *et al.* Detection of micrometastases in peripheral blood of non - small cell lung cancer with a refined immunomagnetic nanoparticle enrichment assay [J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6:2175 - 2181
- 梁翠微, 龚五星, 杜均祥, 等. 非小细胞肺癌外周血分子微转移研究 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2011, 36(7): 709 - 711
- Kishimoto Y, Murakami Y, Shiraishi M, *et al.* Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in human non - small cell carcinomas of the lung [J]. *Cancer Res*, 1992, 52(17): 4799 - 4804
- Jiang B, Wu GP, Zhao YJ, *et al.* Transcription expression and clinical significance of TTF - 1 mRNA in pleural effusion of patients with lung cancer [J]. *Diagn Cytopathol*, 2008, 36(12): 849 - 854
- Saintigny P, Coulon S, Kambouchner M, *et al.* Real - time RT - PCR detection of CK19, CK7 and MUC1 mRNA for diagnosis of lymph node micrometastases in non small cell lung carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2005, 115(5): 777 - 782
- Song PP, Zhang W, Zhang B, *et al.* Effects of different sequences of pulmonary artery and vein ligations during pulmonary lobectomy on blood micrometastasis of non - small cell lung cancer [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(2): 463 - 468
- Yarbro JW. Introductory remarks to the Conference on Prognostic Factors and Staging in Cancer Management: contributions of artificial neural networks and other statistical methods [J]. *Cancer*, 2001, 91 (Suppl 8): 1593 - 1594
- Perng RP, Chen CY, Chang GC, *et al.* Revisit of 1997 TNM staging system - survival analysis of 1112 lung cancer patients in Taiwan [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2007, 37(1): 9 - 15
- Qiu Y, Yang H, Chen H, *et al.* Detection of CEA mRNA, p53 and AE1/AE3 in haematoxylin - eosin - negative lymph nodes of early - stage non - small cell lung cancer may improve veracity of N staging and indicate prognosis [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2010, 40(2): 146 - 152
- Melfi FM, Lucchi M, Davini F, *et al.* Intraoperative sentinel lymph node mapping in stage I non - small cell lung cancer: detection of micrometastases by polymerase chain reaction [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2008, 34(1): 181 - 186
- Wei Q, Zhao Y, Yang ZQ, *et al.* Dishevelled family proteins are expressed in non - small cell lung cancer and function differentially on tumor progression [J]. *Lung Cancer*, 2008, 62(2): 181 - 192
- Zhang JY, Wang Y, Zhang D, *et al.* Delta - catenin promotes malignant phenotype of non - small cell lung cancer by non - competitive binding to E - cadherin with p120^{ctn} in cytoplasm [J]. *J Pathol*, 2010, 222(1): 76 - 88
- Li XY, Liu SL, Cha N, *et al.* Transcription expression and clinical significance of dishevelled - 3 mRNA and δ - catenin mRNA in pleural effusions from patients with lung cancer [J]. *Clin Dev Immunol*, 2012: 904 - 946
- Li J, Li ZN, Yu LC, *et al.* Gene diagnosis of micrometastases in regional lymph nodes of patients with stage I non - small cell lung cancer: impact on staging and prognosis [J]. *Clin Transl Oncol*, 2013, 15(11): 882 - 888
- Oddmund N, Mona U, Gurpartap S, *et al.* Abstract 343: Molecular markers for detection of micrometastases in regional lymph nodes from patients undergoing surgery for non - small cell lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(Suppl 8): 343
- Mohajeri G, Sanei MH, Tabatabaee SA, *et al.* Micrometastasis in non - small - cell lung cancer: detection and staging [J]. *Ann Thorac Med*, 2012, 7(3): 149 - 152
- Zhang X, Xie J, Yu C, *et al.* mRNA expression of CK19, EGFR and LUNX in patients with lung cancer micrometastasis [J]. *EXP Ther Med*, 2014, 7(2): 360 - 364
- Nwogu CE, Yendamuri S, Tan W, *et al.* Lung cancer lymph node micrometastasis detection using real - time polymerase chain reaction: correlation with vascular endothelial growth factor expression [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2013, 145(3): 702 - 708
- Sienel W, Mecklenburg I, Dango S, *et al.* Detection of MAGE - A transcripts in bone marrow is an independent prognostic factor in operable non - small - cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(13): 3840 - 3847
- Xi L, Lyons - Weiler J, Coello MC, *et al.* Prediction of lymph node metastasis by analysis of gene expression profiles in primary lung adenocarcinomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(11): 4128 - 4135
- Benlloch S, Galbis - Caravajal JM, Alenda C, *et al.* Expression of molecular markers in mediastinal node from resected stage I non - small - cell lung cancer (NSCLC): prognostic impact and potential role as markers of occult micrometastases [J]. *Ann Oncol*, 2009, 20(1): 91 - 97
- Dai CH, Li J, Yu LC, *et al.* Molecular diagnosis and prognostic significance of lymph node micrometastasis in patients with histologically node - negative non - small cell lung cancer [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(2): 1245 - 1253
- Nosotti M, Palleschi A, Rosso L, *et al.* Lymph node micrometastases detected by carcinoembryonic antigen mRNA affect long - term survival and disease - free interval in early - stage lung cancer patients [J]. *Oncol Lett*, 2012, 4(5): 1140 - 1144
- 谭思创, 程章波, 马宇超, 等. 非小细胞肺癌患者区域淋巴结 LUNX 基因表达及其临床意义 [J]. *中南大学学报: 医学版*, 2010, 35(12): 1236 - 1241

(收稿日期: 2014 - 04 - 02)

(修回日期: 2014 - 10 - 22)