

生损伤的基因,使细胞向恶性转化。本研究发  
hMSH2 与 p53 异常表达无相关性,提示 p53 的突变  
可能与 hMSH2 无关,但是否与其他 MMR 基因有关  
值得进一步探讨。

本研究显示,p53 与 PCNA 表达呈正相关。这与  
Gonda 等<sup>[6]</sup>研究结果一致。此外,在对食管癌和子宫  
内膜癌的研究中也得到相似的结果<sup>[7,8]</sup>。这提示 p53  
突变与细胞增殖活性增强有关。原因可能是野生型  
p53 可以诱导 p21<sup>WAF1</sup> 表达,p21<sup>WAF1</sup> 是细胞周期依赖  
性激酶的抑制因子,抑制 PCNA 及 PCNA-DNA 聚  
合酶 δ 的活性而导致 G<sub>1</sub> 期停滞。p53 突变后失去这  
种抑制能力,导致细胞过度增殖<sup>[9]</sup>。

参考文献

- 1 Zhang QX, Ding Y, Le XP, et al. Studies on microsatellite instability in p16 gene and expression of hMSH2 mRNA in human gastric cancer tissues [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9 (3):437~441
- 2 Leach FS, Hsieh JT, Molberg K, et al. Expression of the human mismatch repair gene hMSH2: a potential marker for urothelial malignancy[J]. Cancer, 2000, 88(10):2333~2341
- 3 Castrilli G, Fabiano A, La Torre G, et al. Expression of hMSH2 and hMLH1 proteins of the human mismatch repair system in

- salivary gland tumors[J]. J Oral Pathol Med, 2002, 31(4):234~238
- 4 高歌, 周长玉, 林种玉, 等. Hp 感染与胃癌及癌前病变中 p53、bcl-2、c-myc 基因表达关系的研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2002, 29(5):325~328
- 5 曲宏岩, 庞 达, 张岂凡, 等. 胃癌原发灶与淋巴结转移灶 p53 基因点突变研究[J].中国肿瘤临床, 2001, 28(11):855~856
- 6 Gonda G, Bajtai A, Nagy P, et al. Quantitative analysis of p53 expression and cell proliferation in gastric carcinomas. An immunohistochemical study [J]. Hepatogastroenterology, 2004, 51(55):273~276
- 7 Chen H, Wang LD, Guo M, et al. Alterations of p53 and PCNA in cancer and adjacent tissues from concurrent carcinomas of the esophagus and gastric cardia in the same patient in Linzhou, a high incidence area for esophageal cancer in northern China [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9 (1):16~21
- 8 Elhafey AS, Papadimitriou JC, El-Hakim MS, et al. Computerized image analysis of p53 and proliferating cell nuclear antigen expression in benign, hyperplastic, and malignant endometrium[J]. Arch Pathol Lab Med, 2001, 125(7):872~879
- 9 Zolota V, Batistatou A, Tsamandas AC, et al. Immunohistochemical expression of TGF-beta1, p21WAF1, p53, Ki67, and angiogenesis in gastric carcinomas: a clinicopathologic study [J]. Int J Gastrointest Cancer, 2002, 32(2-3):83~89

(2004-09-23 收稿)(2004-12-01 修回)  
(王展宏校对)

· 短篇论著 ·

## 荧光定量 RT-PCR 检测胃癌患者外周血癌细胞及意义

吴 晴 薛月华 陈栋晖 朱莉菲 丁红华 弥兆远  
上海交通大学附属第一人民医院 (上海市 200080)

关键词 胃肿瘤 荧光定量检测 聚合酶链反应

中图分类号:R735.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8179(2005)11-0656-02

胃癌的转移和复发是影响预后的重要因素,而  
存在于患者淋巴结,外周血,骨髓和腹腔中的微转移  
是导致转移和复发的基础<sup>[1-3]</sup>。由于进入血中的肿瘤  
细胞极其微量,采用传统的病理学、免疫细胞化学等  
方法难以检测<sup>[4]</sup>。我们采用逆转录-实时荧光定量  
PCR 技术(以下简称荧光定量 PCR),用角蛋白片段  
CK19 为标记物,探讨其在胃癌患者外周血中表达的  
临床意义及与病理临床的关系,以期为临床治疗  
方案的选择与评价预后提供依据。

### 1 材料与与方法

#### 1.1 临床资料及标本的采集

胃癌患者 92 例,分别于手术或化疗前后抽取静

脉血检测,内科门诊非肿瘤患者 22 例。

#### 1.2 荧光定量 RT-PCR 方法的建立

提取 SGC7901 细胞总 RNA,制备 cDNA 行常规  
PCR 反应。将纯化的 PCR 产物合成质粒并克隆,得  
到定量阳性标准模块。检测时,将克隆的定量阳性标  
准按每 μl 10<sup>7</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup>、10 拷贝数梯度  
稀释,加于不同反应管中,反应体系中包括 CK19  
上、下游引物(上海久盛医疗用品有限公司设计并提  
供),Cybergreen 荧光染料、Taq 酶(美国 GIBCO 公  
司)等,在 PE5700 荧光定量 PCR 扩增仪上扩增,反  
应结束后在计算机上得到标准曲线,自动计算出样  
品的定量结果。

### 1.3 标本与检测

取 5 $\mu$ l EDTA 抗凝血,采用 TRIZOL 试剂,RNA 抽提试剂盒(上海生工公司)提取血液中的总 RNA,测定 A 值,并计算出含量。具体操作按试剂盒说明进行。取 2 $\mu$ g RNA 按上述方法制备 cDNA,将制备的 cDNA 取 5 $\mu$ l 加入荧光定量 PCR 反应体系,同时设置阴性对照和阳性定量梯度对照,在 PE5700 荧光定量 PCR 仪上扩增。反应结束后计算出每  $\mu$ g 总 RNA 中 CK19 mRNA 基因的拷贝数。

### 1.4 统计学分析

结果资料输入 SPSS10.019 版本分析,多组样本比较采用 KRUSKAL-WALLIS 检验;TNM 分期与 CK19 mRNA 表达量关系采用 SPEARMAN 等级相关分析。

## 2 结果

### 2.1 荧光定量 RT-PCR 结果

PE5700 型扩增仪在 PCR 反应进行的同时,每 8.5sec 检测 1 次 PCR 产物量(荧光变化强度)。将不同的标准起始模板数( $C_0$ )按  $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10$  加入 PCR 反应体系,当荧光强度增加到某一阈值,PCR 产物进入指数期,此时的循环次数(CT 值)被记录下来。将不同梯度定量模板数与 CT 值做对数拟合后,得到定量标准曲线,样品与标准曲线比较即能准确反映待检样品的起始模板量。

### 2.2 CK19 mRNA 表达

92 例胃癌患者治疗前外周血 CK19 mRNA 阳性表达者 37 例(41.3%),22 例非肿瘤对照组无 1 例阳性表达。

### 2.3 临床病理因素与 CK19 mRNA 表达关系

CK19 mRNA 的拷贝数在 IV 期患者明显增高,与 I、II、III 期相比,有显著性差异, $P < 0.01$ ,但 I、II、III 期之间差异无显著性, $P > 0.05$ ;T<sub>4</sub> 期与 T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub> 期 CK19mRNA 表达的拷贝数差异有显著性, $P < 0.01$ ,而 T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub> 期之间无显著性差异, $P > 0.05$ ;低、中、高分化组间比较无显著性差异, $P > 0.05$ ;N 分期(淋巴结转移)组间比较无显著性差异, $P > 0.05$ ;远处 28 例转移与 64 例非远处转移两组患者间比较差异有显著性, $P < 0.01$ 。

## 3 讨论

微转移播散并存活于血循环中是肿瘤发生显性转移的前提<sup>[2]</sup>,早期发现微转移有助于我们对恶性肿瘤进行全面的认识,为治疗提供依据。

CK19 是细胞角蛋白的一种,主要分布于腺上皮和腺上皮起源的恶性肿瘤。由于周围静脉血中不表达 CK19,因此 CK19 mRNA 常作为检测周围静脉

血中癌细胞的标记物<sup>[4-5]</sup>。荧光定量 PCR,实施终点定量,实时检测反应物变化,重复性好,可信度高<sup>[5]</sup>。本研究采用此方法检测 92 例胃癌患者外周血中 CK19 mRNA 基因,其阳性表达 37 例(41.3%),较国内外学者报告稍高,可能是本组患者大部分为晚期患者所致。而 22 例非肿瘤患者无 1 例阳性表达,显示较高的特异性。T<sub>4</sub> 期及远处转移患者外周血中 CK19 mRNA 拷贝数显著升高,甚至 I、II 期患者中外周血亦有 CK19 mRNA 拷贝,提示胃癌早期即可发生血源性播散,随着临床分期的增加,血液中癌细胞的检出率逐渐增高。因而采用此方法有助于判断胃癌分期及发现早期转移灶。

2 例 IV 期患者,CK19 mRNA 阴性,经过重复抽血随访,1 例患者 CK19 mRNA 检测阳性。可能与肿瘤细胞间歇性地脱落或侵袭进入血流,且多数被免疫系统清除有关<sup>[6]</sup>。因脱落的癌细胞大多数聚集成团,在血流中分布不均,导致外周血癌细胞检出率降低,故本法不能在所有患者外周血中检测到 CK19 mRNA,多次采血检查可减少漏诊率。

25 例胃癌患者行根治术后,外周血中 CK19 mRNA 阳性拷贝数无明显下降。推测其原因为:1)术前已有癌细胞播散;2)手术操作促使癌细胞进入血循环;3)免疫功能低下。手术增加了循环癌细胞逃避免疫监视而形成微转移灶的机会<sup>[7]</sup>,因此应重视手术时癌细胞的播散,术后尽早化疗,避免血道播散。

### 参考文献

- 1 Yasuda K, Adachi Y, Shiraishi, N, et al. Prognostic effect of lymph node micrometastasis in patients with histologically node-negative gastric cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2002, 9(8):771~774
- 2 Mori M, Mimori K, Ueo H, et al. Molecular detection of circulating solid carcinoma cells in the peripheral blood: the concept of early systemic disease [J]. *Int J Cancer*, 1996, 68(6):739~743
- 3 Nakanish H, Kodera Y, Torii A, et al. Detection of carcinoembryonic antigen expressing free tumor cells in peritoneal washes from patients with gastric carcinoma by polymerase chain reaction [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1997, 88(1):687~692
- 4 Slade MJ, Smith B M, Sinnett H D, et al. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases on patients with breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17(3):870~879
- 5 Peck K, Sher Yp, Shih JY, et al. Detection and quantitation of circulating cancer cells in the peripheral blood of lung cancer patients [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(13):2761~2765
- 6 章希炜,范萍,杨宏宇,等.胃肠恶性肿瘤外周血微转移的检测及其临床意义 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2003, 25(1):66~68
- 7 Seeliger H, Spatz H, Janch KW. Minimal residual disease in gastric cancer [J]. *Recent Results Cancer Res*, 2003, 162:79~87

(2004-10-28 收稿)

(2005-03-07 修回)

(王展宏校对)