

[文章编号] 1000-2200(2009)02-0100-03

· 基础医学 ·

非小细胞肺癌外周血癌胚抗原 mRNA 表达与 肿瘤微血管密度的相关性

王祖义, 汪国文, 刘学刚, 唐震, 史向前, 李小军, 刘以尧, 段贵新, 周晓, 贡会源

[摘要] 目的: 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)外周血癌胚抗原(CEA)mRNA 的表达与肿瘤微血管密度(MVD)之间的相关性。方法: 采用逆转录巢式聚合酶链反应(nested RT-PCR)和微流控芯片(micro-fluid chip)技术检测 57 例 NSCLC 患者术前外周血 CEA mRNA; 选择单克隆抗体 CD31 和 CD34, 采用免疫组化对肿瘤组织进行 MVD 计数。结果: 57 例 NSCLC 患者外周血 CEA mRNA 阳性表达率为 61.4%; CD31 和 CD34 显示的 MVD 结果分别为 (29.7 ± 12.1) 条和 (38.2 ± 12.7) 条, 范围分别是 10~61 条和 19~76 条。CEA mRNA 阳性表达率和 MVD 计数呈正相关关系($P < 0.05$)。结论: 在 NSCLC 患者, 其肿瘤 MVD 较高的则更容易发生外周血微转移。

[关键词] 癌, 非小细胞肺; 癌胚抗原; 微血管密度; 微转移; 微流控芯片

[中国图书资料分类法分类号] R 734.2 **[文献标识码]** A

Relationship between expression of carcinoembryonic antigen mRNA in peripheral blood and microvessel density of tumor in non-small cell lung cancer

WANG Zu-yi, WANG Guo-wen, LIU Xue-gang, TANG Zhen, SHI Xiang-qian, LI Xiao-jun,

LIU Yi-yao, DUAN Gui-xin, ZHOU Xiao, GONG Hui-yuan

(Department of Cardiothoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the relationship between microvessel density (MVD) of the tumor and carcinoembryonic antigen (CEA)mRNA expression of peripheral blood (PB) in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods:** Nested reverse transcription polymerase chain reaction (nested RT-PCR) and micro-fluid chip were used to detect CEA mRNA from PB; Elivision™ plus immunohistochemical technique was used to investigate the expression of CD31 and CD34. **Results:** In the 57 cases of NSCLC, the positive rate of CEA mRNA was 61.4% and the MVDs shown by CD31 and CD34 were 29.7 ± 12.1 and 38.2 ± 12.7 , respectively, within a range of 10–61 and 19–76. The expression of CEA mRNA was positively related to MVD ($P < 0.05$). **Conclusions:** For patients with NSCLC, high MVD may increase the chances of micrometastasis.

[Key words] cancer, non-small cell lung; carcinoembryonic antigen; microvessel density; micrometastasis; micro-fluid chip

在恶性肿瘤的发生、发展和转移过程中,血管的生成起到十分重要的作用。当瘤体直径 > 2 mm 时,其进一步生长依赖于新生血管提供血供,同时因为新生血管的管壁通透性大,也成为瘤细胞通过血循环进行转移的重要途径^[1]。本文以癌胚抗原(CEA)mRNA 为肿瘤标记物,对非小细胞肺癌(NSCLC)患者外周血的微转移灶进行检测,同时采用免疫组化法,对相应瘤体组织的微血管密度(MVD)进行计数,并将两者结果作相关性分析,判断两者之间的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2006 年 1~10 月我科 NSCLC 患者 57 例术前外周血及其相对应的病理科存档的

石蜡组织标本。其中,男 47 例,女 10 例;年龄 38~77 岁。腺癌 17 例,鳞癌 34 例,其它 6 例。I 期 24 例,II 期 10 例,III 期 21 例,IV 期 2 例。57 例术前均未行放疗和化疗。对照组选用已明确有远处转移的 NSCLC 患者 8 例及肺癌细胞系 A549 梯度稀释后作为微转移检测的阳性对照和灵敏度检测。以 18 例肺部良性疾病患者术前外周血为微转移检测的阴性对照。每次用已知 CD31 和 CD34 阳性标本切片作为 MVD 计数阳性对照,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2 主要试剂和设备 Trizol(加拿大 BBI 公司);人淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限责任公司);MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒和即用 PCR 扩增试剂盒(上海生工生物工程有限公司);Cliper 1000 微流芯片检测试剂盒(上海浩源生物科技有限公司);鼠抗人 CD31 单克隆抗体(MAB0031,克隆系 JC/70A)、鼠抗人 CD34 单克隆抗体(MAB0034,克隆系 QBEnd/10)和 Elivision™ plus

[收稿日期] 2007-09-07

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金项目资助(2002kj220)

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 胸心外科,安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 王祖义(1964-),男,硕士,主任医师,副教授。

Polyer HRP (Mouse/Rabbit) IHC Kit(福州迈新生物技术开发有限公司);OPTICON 荧光定量 PCR 仪(东盛创新科技有限公司);Caliper 1000 微流控芯片分析仪和 Caliper 1000 DNA 芯片(上海浩源生物科技有限公司)。

1.3 引物设计和 PCR 反应条件 CEA 及甘油醛三磷酸脱氢酶(GAPDH)引物按照参考文献^[2,3]设计,由上海生工生物工程有限公司合成;一步法提取总 RNA,参考 MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒说明书,逆转录合成 cDNA;按照即用 PCR 扩增试剂盒说明书进行加样,按照参考文献^[2]进行反应参数设置。

1.4 染色方法 参照 Elivision™ plus Polyer HRP (Mouse/Rabbit) IHC Kit 所提供的方法,采用高温抗原修复 Elivision™ plus 免疫组化染色方法进行 CD31 和 CD34 标记。

1.5 鉴定分析

1.5.1 总 RNA 鉴定分析 取 5 μl 溶解后 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳,18 s 和 28 s 条带清晰则所提 RNA 良好(见图 1),或核酸蛋白测定仪显示 OD_{260/280} 在 1.8~2.0,提示 RNA 纯度良好。



18 s 28 s
图 1 总 RNA 检测

1.5.2 PCR 产物鉴定分析 将终产物稀释 50 倍后,取 0.5 μl 目的基因和 0.5 μl 内参加样,按照 Caliper 1000 微流控芯片检测试剂盒操作说明书进行微流控芯片电泳,分析结果:目的基因峰高 ≥ 0.5 且内参基因峰高 ≥ 0.5 为阳性;目的基因峰高 < 0.5 且内参基因峰高 ≥ 0.5 为阴性;内参基因峰高 < 0.5 则放弃标本,波峰及电泳曲线见图 2。

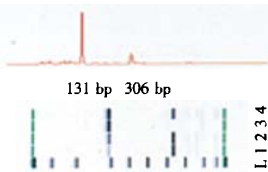


图 2 反应终产物检测

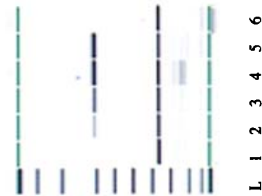
1.6 MVD 计数方法与结果判定 CD31 和 CD34 阳性反应物为浅棕色至深棕色颗粒,分布在血管内皮细胞。微血管计数方法参考 Weidner 标准^[4]:首先在低倍镜(×10)下扫描,寻找肿瘤内清楚的血管染色,且微血管密度最多的区域(热点),然后在 400 倍镜下计数肿瘤内、肿瘤与正常组织交界处的毛细血管和小静脉的数目(管腔内径小于 8 个红细胞直

径),邻近正常的肺组织不做计数对象,只做内对照评价免疫组化染色。任何呈棕黄色的内皮细胞和内皮细胞簇且与邻近血管、肿瘤细胞和其它结缔组织成分清楚分开即为一个能够计数的微血管。每位医生每张切片选取 4 个热点,平均计数作为最终结果。

1.7 统计学方法 采用直线相关分析。

2 结果

2.1 各组外周血 CEA mRNA 表达 18 例肺部良性疾病患者外周血 CEA mRNA 不表达;8 例确诊有远处转移的 NSCLC 患者化疗前外周血及肺癌细胞系 A549 细胞 ≥ 10/ml 梯度 CEA mRNA 检测全部为阳性,说明检测方法可靠(见图 3)。



L:Marker;1-5 分别为 10⁰-10⁷/ml 梯度;6:对照
图 3 微流控芯片灵敏度检测

2.2 免疫组化染色 CD31 和 CD34 单克隆抗体免疫组化染色能清晰地显示血管内皮细胞(见图 4,5)。

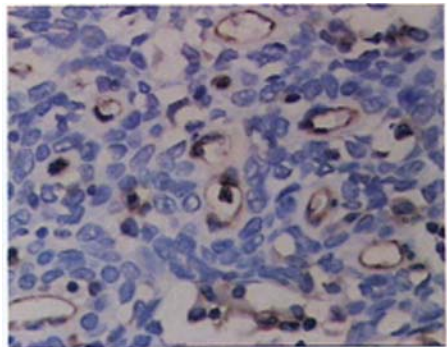


图 4 肺鳞癌 CD31(免疫组化法 ×400)

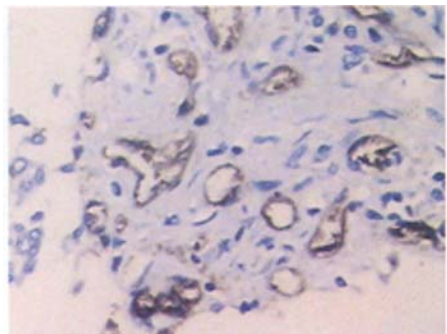


图 5 肺鳞癌 CD34(免疫组化法 ×400)

2.3 CEA mRNA 阳性表达与 MVD 计数 CEA mRNA 阳性表达率为 61.4% (35/57); CD31 和 CD34 显示的 MVD 结果分别为 (29.7 ± 12.1) 条和 (38.2 ± 12.7) 条, 范围分别是 10 ~ 61 条和 19 ~ 76 条。Spearman 相关性分析显示: CEA mRNA 阳性率与 CD31 染色 MVD 计数呈正相关关系 ($r = 0.836, P < 0.05$); CEA mRNA 阳性率与 CD34 染色 MVD 计数呈正相关关系 ($r = 0.827, P < 0.05$)。

3 讨论

1971 年, Flokman^[5] 提出了肿瘤依赖于血管生成的假说。肿瘤的血管生成是指从宿主现存血管内皮建立新生血管的过程, 血管的生成不但为肿瘤细胞生长提供条件, 也使癌细胞通过不成熟的血管进入血流而导致远处转移。因此, 血管生成在肿瘤的发生、发展和转移过程中起到了十分重要的作用。

本实验采用 nested-RT-PCR 和微流控芯片技术对 NSCLC 患者外周血 CEA mRNA 进行检测, 以此判断外周血的微转移, 同时对同一组患者术后的肿瘤组织 MVD 进行计数。本实验所采用的微流控芯片技术, 与传统的琼脂糖凝胶电泳相比, 具有更高的灵敏度, 使得微转移的检测结果更加精确。而对于 MVD 染色试剂的选择上, 不同学者的研究结果存在着较大的差异; Giatromanolaki 等^[6] 对 CD31 和 FⅧ进行了对比研究, 认为 CD31 染色效果比 FⅧ好, 比其更敏感。熊正文等^[7] 研究认为, CD34 比 CD31 更敏感, 能突出显示较小的、不成熟的微血管或单一的内皮细胞, 但两者之间差异无统计学意义。本实验选用两者单克隆抗体对肿瘤组织的 MVD 进行计数, 以减少因试剂可能造成的误差。

本研究结果显示, NSCLC 患者外周血 CEA mRNA 的表达与瘤体 MVD 计数呈正相关关系, 即瘤体组织微血管越多则越容易发生血行微转移。这是因为新生的微血管为肿瘤的进一步生长提供了充足的供血供氧, 同时由于这些微血管管壁通透性较大, 使得肿瘤细胞易于进入管腔并进而循血液循环发生转移。本研究结果是对传统血管生成与微转移之间相关性理论的证实, 也提示肿瘤, 抑制血管生成治疗的重要性。目前抑制血管生成的治疗药物主要包

括: 血管内皮生长因子抑制剂 (VEGF)、阻断内皮细胞增殖的药物及基质金属蛋白酶抑制剂 (MMPI) 等。其中, 重组单克隆抗体 bevacizumab (rhuMAB-VEGF, Avastin) 在最近一项大样本多中心 III 期临床试验结果显示, 其比对照组具有更高的缓解率和更长的中位生存时间^[8]。而另一项结果显示, 酪氨酸激酶抑制剂 KDR (VEGFR-2) 能够减缓肿瘤进展时间^[9]。虽然针对血管生成的药物还未普遍应用于临床, 但在肿瘤的综合治疗中将会起到越来越重要的作用。

[参 考 文 献]

- [1] 陈剑锋, 涂远荣. 非小细胞肺癌微转移的研究进展[J]. 福建医药杂志, 2004, 26(5): 150 - 152.
- [2] D'Cunha J, Corfitts AL, Herndon JE 2nd, et al. Molecular staging of lung cancer: real-time polymerase chain reaction estimation of lymph node micro-metastatic tumor cell burden in stage I non-small cell lung cancer-preliminary results of cancer and leukemia group B Trial 9761[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2002, 123(3): 484 - 491.
- [3] Toyota M, Ho C, Ahuja N, et al. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification[J]. Cancer Res, 1999, 59(10): 2307 - 2312.
- [4] Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma[J]. N Engl J Med, 1991, 324(1): 1 - 8.
- [5] Folkman J. Tumor angiogenesis; therapeutic implications[J]. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182 - 1186.
- [6] Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Theodossiou D, et al. Comparative evaluation of angiogenesis assessment with anti-factor-Ⅷ and anti-CD31 immunostaining in non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 1997, 3(12 Pt 1): 2485 - 2492.
- [7] 熊正文, 徐昌富, 李宏伟, 等. 非小细胞肺癌中血管内皮标记物显示微血管密度的对比研究[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2003, 19(4): 223 - 225.
- [8] Sandler AB, Gray R, Brahmer J, et al. A randomized phase III trial comparing bevacizumab/ carboplatin/ paclitaxel versus carboplatin/ paclitaxel in chemotherapy-naive patients with advanced or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC): [J]. Proc Am Soc Clin Oncol, 2005, 23: 621s.
- [9] Heymach JV, Dong RP, Dimery I, et al. ZD6474, a novel antiangiogenic agent, in combination with docetaxel in patients with NSCLC: results of the run-in phase of a two-part randomized phase II study[J]. Proc Am Soc Clin Oncol, 2004, 22: 3051.

欢迎 订 阅

欢迎 投 稿