

晚期肺腺癌外周血 *CK19*、*CK20*、*MMP-9* mRNA 的表达及其相关性

龚磊, 黄志煜, 杨海燕, 雷涛, 余海峰, 缪璐璐, 胡小云, 范云

(浙江省肿瘤医院, 浙江省胸部肿瘤(肺、食管)诊治技术研究重点实验室, 浙江杭州 310022)

摘要: [目的] 探讨晚期肺腺癌患者外周血中 *MMP-9*、*CK19*、*CK20* mRNA 的表达水平及相关关系。[方法] 应用 RT-PCR 结合 Real Time PCR 方法测定 85 例 IV 期肺腺癌患者外周血中 *CK19*、*CK20*、*MMP-9* mRNA 拷贝数。以良性疾病患者 34 例、健康志愿者 22 名作为对照。[结果] 晚期肺腺癌患者外周血中 *CK19*、*CK20*、*MMP-9* mRNA 中位值均显著高于健康对照及肺良性疾病人群, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。随着 *CK19* mRNA 的检测值增高, *CK20* mRNA 检测值也呈现增高趋势 ($r = 0.885$, $P = 0.000$)。而 *MMP-9* mRNA 表达与 *CK19* mRNA 或 *CK20* mRNA 无关。[结论] 晚期肺腺癌外周血中 *CK19*、*CK20* 和 *MMP-9* mRNA 显著高表达。*CK19* mRNA 和 *CK20* mRNA 的表达呈正相关, 且均与 *MMP-9* mRNA 表达无关。
关键词: 肺肿瘤; 腺癌; 外周血; 细胞角蛋白; 基质金属蛋白酶
中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)12-0964-06
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2013.12.B012

Expressions of *CK19*、*CK20*、*MMP-9* mRNA in Peripheral Blood in Patients with Advanced Lung Adenocarcinoma

GONG Lei, HUANG Zhi-yu, YANG Hai-yan, et al.

(Zhejiang Cancer Hospital, Zhejiang Key Laboratory of Diagnosis and Treatment Technology on Thoracic Oncology (Lung and Esophagus), Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Purpose] To investigate expressions of *MMP-9*, *CK19* and *CK20* mRNA in peripheral blood in patients with advanced lung adenocarcinoma and their correlation. [Methods] *MMP-9*, *CK19* and *CK20* mRNA were detected in peripheral blood of 85 cases with lung adenocarcinoma stage IV by RT-PCR combined with Real Time PCR, with 34 cases with benign lung disease and 22 healthy volunteers as controls. [Results] The median level of *MMP-9*, *CK19* and *CK20* mRNA in patients with advanced lung adenocarcinoma were higher than those in benign lung disease patients and healthy controls. *CK20* mRNA increased with the increasing of *CK19* mRNA ($r = 0.885$, $P = 0.000$). However, no correlation was found in *MMP-9* mRNA with *CK19* mRNA or *CK20* mRNA. [Conclusion] *MMP-9*, *CK19* and *CK20* mRNA are overexpressed in patients with advanced lung adenocarcinoma. Expressions of *CK19* mRNA and *CK20* mRNA are positively correlated, and but have no correlation with *MMP-9* mRNA expression.

Subject words: lung neoplasms; adenocarcinoma; peripheral blood; cytokeratin; matrix metalloproteinase

随着表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂药物的广泛应用, 肺腺癌成为近年来的研究热点。由于很多患者就诊时即存在远处转移, 对肿瘤转移有关因素的研究成为关注话题。肿瘤细胞进入血液循环是发生远处转移的关键步骤之一。外周血中存在

发生了上皮—间质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT) 的循环肿瘤细胞, 具有进一步向其他脏器转移的潜能^[1-3]。循环肿瘤细胞中各种细胞角蛋白 (cytokeratin, CK) 表达发生了什么变化, 与转移过程中的重要分子, 如基质金属蛋白酶类 (matrix metalloproteinases, MMP) 是否具有相关性? 我们以 *CK19*、*CK20*、*MMP-9* mRNA 为代表, 利用特异性引物和 Taqman 探针, 并结合荧光定量 RT-PCR 技术,

通讯作者: 范云, 主任医师, 硕士生导师, 硕士; 浙江省肿瘤医院肿瘤内科, 浙江省杭州市拱墅区半山桥广济路 38 号 (310022);
E-mail: fyunchen@gmail.com

收稿日期: 2013-10-14; **修回日期:** 2013-10-31

研究肺腺癌患者外周血有核细胞(含有肿瘤细胞)中三者的表达及其相关性。

1 资料与方法

1.1 临床资料

肺癌组:病理学明确诊断的既往未接受抗肿瘤治疗(化疗、靶向治疗、放疗或手术)的Ⅳ期肺腺癌患者共 85 例。其中男性 36 例,女性 49 例;年龄 32~72 岁,平均年龄 60.3 岁。按 AJCC 第 7 版非小细胞肺癌 TNM 分期方法进行分期。

肺部良性疾病组:肺部良性疾病患者 34 例,其中男性 21 例,女性 13 例;年龄 26~79 岁,平均年龄 63.9 岁。均在我院行手术切除,术后病理:硬化性血管瘤 6 例,炎性假瘤 8 例,结核性肉芽肿 5 例,炎症性病变 10 例,局灶性增生 2 例,错构瘤 3 例。

健康对照组:健康志愿者 22 名,其中男性 12 名,女性 10 名;年龄 24~69 岁,平均年龄 50.0 岁。

1.2 主要试剂与仪器

淋巴细胞分离液、DEPC 购自上海生工生物工程技术公司;Trizol 试剂(GIBCO 公司),逆转录 PCR 试剂盒及 Taq 酶等为 TaKaRa 公司产品,PCR 扩增仪(ABI Stepone plus)。引物由广州达晖生物公司设计合成。

1.3 方法

1.3.1 标本采集

抽取外周血 3~5ml 抗凝(EDTA 抗凝)后密封送检,其中肺癌组病例在治疗前抽血。

1.3.2 标本处理

淋巴细胞分离液分离有核细胞,再以 Trizol 抽提制备总 RNA。

1.3.3 逆转录反应

取灭菌 0.2ml 离心管,按以下要求配制逆转录体系 5×PrimeScript® Buffer 2μl;PrimeScript® RT Enzyme Mix I 0.5μl;Oligo dT Primer (50μmol/L)0.5μl;Random 6mers (100μmol/L)2μl,Total RNA,RNase Free dH₂O,加至 10μl×2。逆转录反应条件如下:37℃ 15min(逆转录反应),85℃ 5s(逆转录酶的失活反应)。将得到的 RT 反应液加入到下一步的 Real Time PCR 反应体系中。

1.3.4 PCR 扩增及荧光定量检测

按以下要求配制实时定量 PCR 体系。*CK19* (*CK20/MMP-9*)需准备反应数 $n=$ 样本数+1(阴性对照)+1(阳性对照)+4(定量标准品)。每反应需 *CK19*(*CK20/MMP-9*)反应液 22.8μl,Taq 酶 0.2μl。计算两试剂的使用量,加入一适当体积的离心管中,充分混匀后,按 23.0μl 量分别分装到不同的 PCR 反应管中,反应管中分别加入 2.0μl 的阴性对照、阳性对照、逆转录好的 cDNA 及定量标准品(标准品需倍比稀释成 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3),瞬时离心。将各反应管按一定顺序放入 PCR 仪上,反应程序如下:第一步预变性 94℃、3min;第二步 94℃、30s,60℃、35s,共 40 个循环。

荧光检测(Table 1):选择在第二步第二阶段采集 FAM 荧光信号。反应结束后保存检测数据文件。调节 baseline cycle 至 6~15,阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品的最高点,最后到 Reporter 窗口下记录仪器自动分析计算出的值。

Table 1 Sequences of fluorescence probes

Genes	Primer sequences
<i>MMP-9</i>	Primers
	CGCTGGGCTTAGATCATTCCTCAGGGCGAGGACCATAGAG
<i>CK19</i>	Fluorescence probe
	CAGTGCCGAGGCGCTCATGTAC
<i>CK20</i>	Primers
	CAGGAGATTGCCACCTACCGGAGGACCTTGGAGGCAGACA
<i>CK20</i>	Fluorescence probe
	CCTGCTCGAGGGACAGGAAGATCAC
<i>CK20</i>	Primers
	GGACGACACCCAGCGTTTAA
<i>CK20</i>	Fluorescence probe
	AGATCGCTCCCATAGTTCACCTGGAGTTGGAGATGCGGATGCC

1.4 统计学处理

数据分析使用 SPSS 16.0 统计软件。组间比较采用非参数检验(两独立样本 Mann-Whitney *U* 检验)。应用 Spearman 法行相关性分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。因不同患者 *CK19*、*CK20*、*MMP-9* mRNA 检测值差异性较大,采用中位值来描述。

2 结果

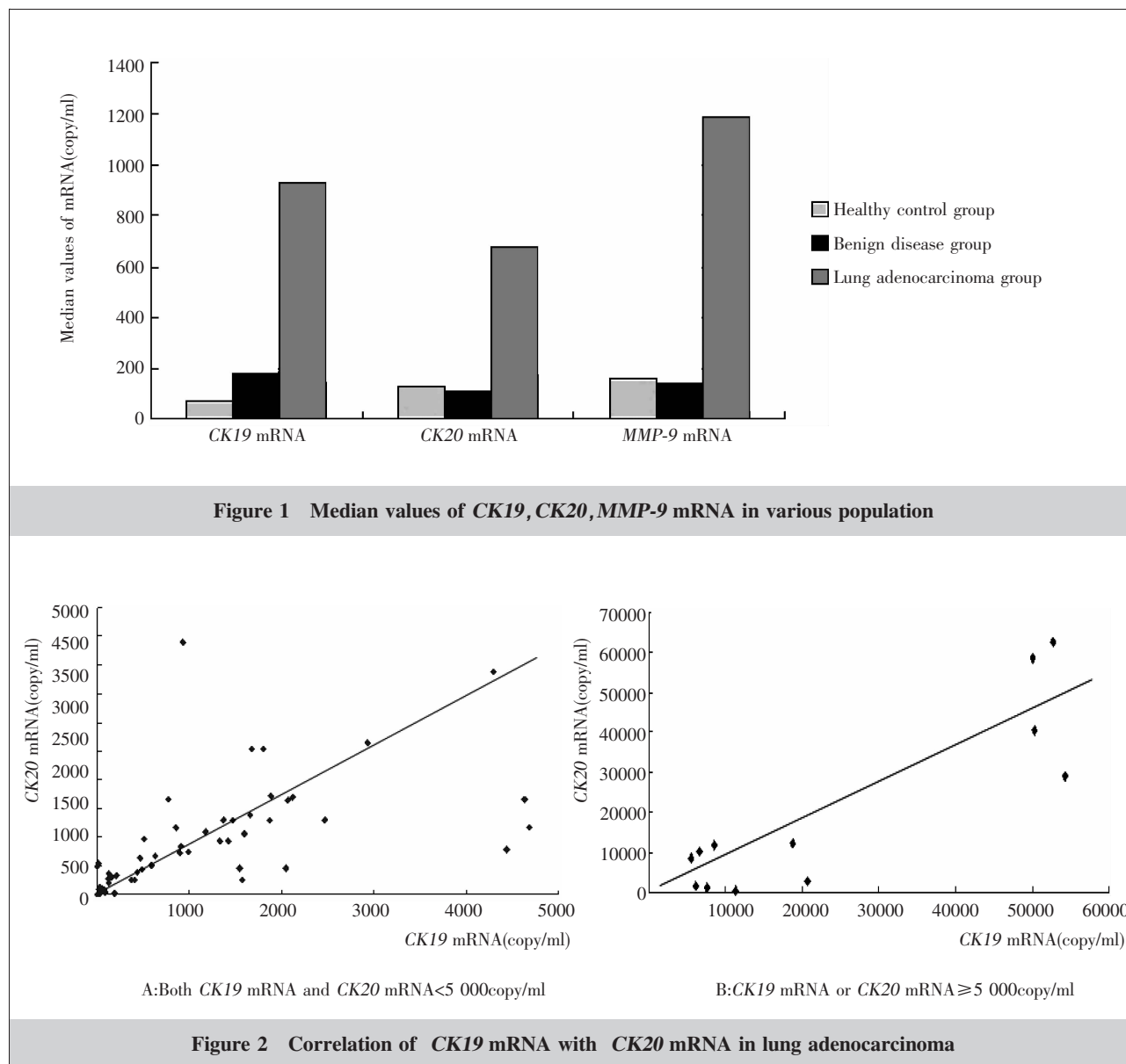
2.1 3 组人群 *CK19*、*CK20*、*MMP-9* mRNA 表达水平

健康对照组、肺良性疾病组及肺腺癌组 3 组人群 *CK19* mRNA 的检测中位值分别为:71.0 (0~927.16)

copy/ml、185.6(0~857.2)copy/ml 和 931.13(0~54 200) copy/ml。CK20 mRNA 的检测中位值分别为 129.3(0~739.66) copy/ml、116(0~1 172.8)copy/ml 和 77671(0~62 500)copy/ml。MMP-9 mRNA 检测中位值分别为 162.3(0~568.4)copy/ml、139.29(0~2 545.4)copy/ml 和 1 185.905 (0~280 000)copy/ml。晚期肺腺癌组患者 CK19、CK20、MMP-9 mRNA 中位检测值均显著高于健康对照组及肺良性疾组 (Figure 1)。应用两独立样本 Mann-Whitney U 检验分析 CK19、CK20、MMP-9 mRNA 3 项指标在晚期肺腺癌组与肺良性疾组及健康对照组的表达差异, P 值均为 0.000, 差异具有统计学意义。

2.2 肺腺癌组 CK19、CK20、MMP-9 mRNA 关系分析

散点图分析中,以横坐标表示 CK19 mRNA,纵坐标表示 CK20 mRNA,由于在不同晚期肺腺癌患者中,CK19、CK20、MMP-9 mRNA 的检测值差异极大,分两个图表示两者的相关性:CK19 mRNA 和 CK20 mRNA 检测值均 <5 000copy/ml 患者 (Figure 2A),以及 CK19 mRNA 或 CK20 mRNA 检测值 $\geq$ 5 000copy/ml 的患者 (Figure 2B)。从图中可见,随着 CK19 mRNA 的检测值增高,CK20 mRNA 检测值也具有增高的趋势。而用相同的作图方法作图可见, MMP-9 mRNA 的检测值不随 CK19 mRNA 或 CK20 mRNA 的增高而增高,其分布无明显规律 (Figure 3、4)。



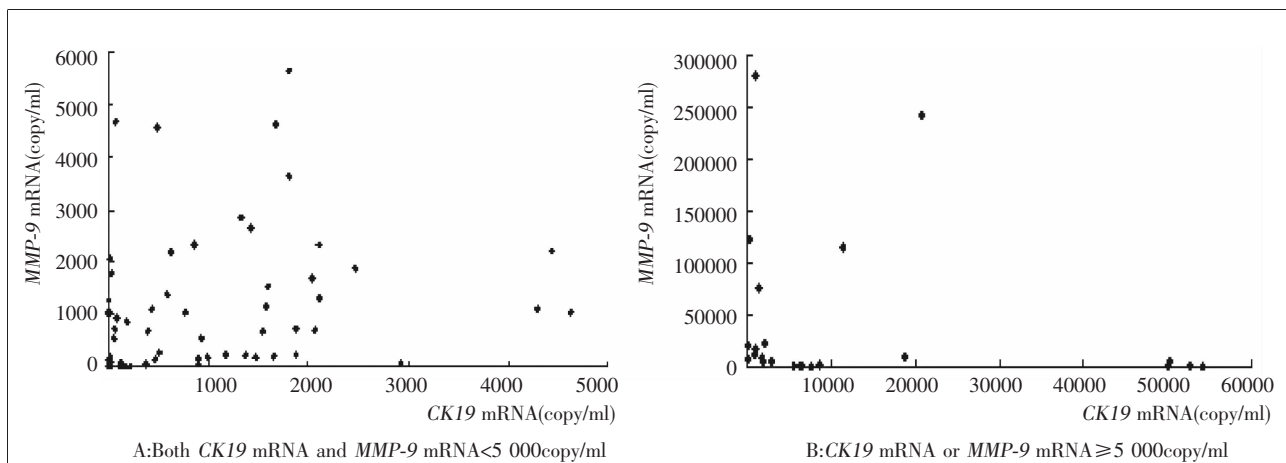


Figure 3 Scatter diagram for *MMP-9* mRNA and *CK19* mRNA

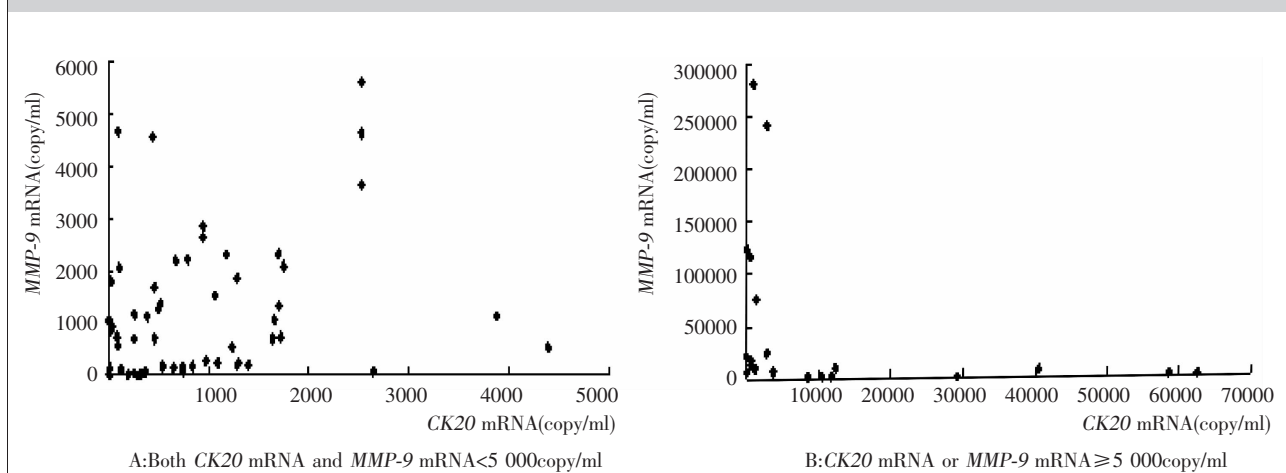


Figure 4 Scatter diagram for *MMP-9* mRNA and *CK20* mRNA

应用 SPSS 双变量 Spearman 相关性分析,*CK19* mRNA 与 *CK20* mRNA 的相关系数 r 为 0.885($P=0.000$); *CK19* mRNA 和 *MMP-9* mRNA 的相关系数 r 为 0.172($P=0.248$); *CK20* mRNA 和 *MMP-9* mRNA 相关系数 r 为 -0.029($P=0.848$)。提示 *CK19* mRNA 与 *CK20* mRNA 线性正相关, 具有统计学差异。而 *MMP-9* mRNA 与 *CK19* mRNA 或 *CK20* mRNA 无明显相关性。

3 讨论

肿瘤细胞进入血液循环是肺癌发生远处转移的关键步骤之一。源于肺癌实体瘤的瘤细胞不断增殖, 通过上皮—间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT), 失去上皮细胞性状如细胞间的粘附, 顶—基底极性和运动缺乏并获得间叶细胞特性如运

动, 变成具有侵袭转移能力的外周血循环肿瘤细胞, 随后循环肿瘤细胞溢出脉管系统, 通过 EMT 定植于远隔器官形成转移病灶^[1-4]。CK 是上皮细胞骨架中间丝的成分蛋白, 是上皮分化的可靠标志物, 其功能是使细胞和细胞器的形态保持完整, 并参与细胞运动和细胞分裂。CK 广泛存在于上皮组织细胞中, 而在间叶组织(如血液、骨髓、淋巴结等)中缺乏表达。CK 有 20 种之多, 按其相对分子量和等电点不同可分为 2 型: I 型 CK(CK9~CK20)相对分子量小, 呈酸性, 其基因被定位在染色体 17q; II 型 CK(CK1~CK8)相对分子量较大, 呈碱性, 其基因被定位在染色体 12q。由于进入血的肿瘤细胞可保留起源细胞的 CK 类型, 由此便可通过测定 CK 来识别肿瘤细胞。CK19 和 CK20 出现在单层上皮及其起源的肿瘤细胞中, 常作为肿瘤标志物用来检测恶性肿瘤微转

移情况^[5-7]。

MMP 是降解细胞外基质的重要酶类。现已发现 26 种 MMP, 称为 MMP 家族。MMP 能通过破坏基质的降解平衡而促进肿瘤细胞突破基底膜和细胞外基质构成的组织屏障作用, 从而侵袭周围组织。MMP-9 又称明胶酶 B, 是其中一个相当重要的 MMP, 可以降解基底膜及细胞外基质的主要结构蛋白 IV 型胶原, 在肿瘤转移中起到很关键的作用^[8-12]。文献报道在肿瘤细胞系, 癌组织均可检测到过高表达的 MMP-9 蛋白及 mRNA^[13-17]。

关于 CK、MMP 在循环肿瘤细胞中表达的相关性报道很少见。我们以 CK19、CK20、MMP-9 这三个代表性分子在 PBMC 中的表达初步探索了这一问题。本研究表明, 相对于正常人群及肺良性疾病患者而言, CK19、CK20 和 MMP-9 mRNA 在晚期肺腺癌外周血有核细胞中显著高表达。这与其他学者的报道相符合^[5-7, 17]。尽管同为晚期肺腺癌, 不同患者 CK19、CK20、MMP-9 mRNA 的表达差异极大, 在确定仔细排除检测误差的基础上, 笔者认为可能的原因有: ①不同患者外周血循环肿瘤细胞数量差别较大^[18]。②不同患者同等数量的循环肿瘤细胞由于存在不同的亚群, 所以表达的 CK19、CK20、MMP-9 各有差异^[2, 4]。外周血有核细胞中 CK19 mRNA 和 CK20 mRNA 的表达具有协同性: 即 CK19 mRNA 高表达时, CK20 mRNA 也高表达; 反之当 CK19 mRNA 低表达时, CK20 mRNA 也低表达。这一结果提示在 EMT 过程中循环肿瘤细胞部分 CK 类分子的表达仍可能具有同步性。而为何两者能保持同步性的机制尚需深入研究。

本研究提示, 与 CK19 mRNA 和 CK20 mRNA 相似, 晚期肺腺癌患者外周血有核细胞中 MMP-9 mRNA 较正常人及肺良性疾病患者显著高表达, 但 MMP-9 mRNA 的表达与 CK19、CK20 mRNA 不具有相关性。低表达 CK19、CK20 mRNA 的 PBMC 可以低表达 MMP-9 mRNA, 也可以高表达 MMP-9 mRNA。而高表达 CK19、CK20 mRNA 的外周血有核细胞中可以低表达, 也可以高表达 MMP-9 mRNA。分析这种状况, 可能的原因有: ①MMP-9 在肿瘤细胞脱离原发灶, 浸润转移入血, 及从血液转移到远处脏器过程, 需要持续发挥作用, 因而持续表达。②部分存在于外周血中的循环肿瘤细胞可能并不具有再

次转移到远处脏器的能力, 比如说缺乏 MMP-9 等关键分子的高表达。③可能与肿瘤细胞间质上皮化不典型性有关。间质上皮化的肿瘤细胞兼有间质细胞和上皮细胞的性状特点, 同时又是“非全或无”的动态演变^[2-4]。④本实验检测的 MMP-9 mRNA 不仅来源于肿瘤细胞, 可能也来自其他细胞, 如单核细胞。因为由单核细胞演化而来的巨噬细胞可表达 MMP-9^[19]。

本研究着重探讨了外周血有核细胞中 CK19、CK20、MMP-9 三者的表达及其相关性, 我们正对这些晚期肺癌患者密切随访, 在明确三者间关系的基础上, 以进一步分析三者与临床特征、治疗疗效、预后等的关系。

参考文献:

- [1] Young R, Pailler E, Billiot F, et al. Circulating tumor cells in lung cancer[J]. Acta Cytol, 2012, 56(6):655-660.
- [2] Pirozzi G, Tirino V, Camerlingo R, et al. Prognostic value of cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition and circulating tumor cells in lung cancer[J]. Oncol Rep, 2013, 29(5):1763-1768.
- [3] Gorges TM, Pantel K. Circulating tumor cells as therapy-related biomarkers in cancer patients [J]. Cancer Immunol Immunother, 2013, 62(5):931-939.
- [4] O'Flaherty JD, Gray S, Richard D, et al. Circulating tumour cells, their role in metastasis and their clinical utility in lung cancer[J]. Lung Cancer, 2012, 76(1):19-25.
- [5] Sheu C, Chang M, Chang H, et al. Combined detection of CEA, CK-19 and c-met mRNAs in peripheral blood: a highly sensitive panel for potential molecular diagnosis of non-small cell lung cancer[J]. Oncology, 2006, 70(3):203-211.
- [6] Hwang SB, Bae JW, Lee HY, et al. Circulating tumor cells detected by RT-PCR for CK-20 before surgery indicate worse prognostic impact in triple-negative and HER2 subtype breast cancer [J]. J Breast Cancer, 2012, 15(1):34-42.
- [7] Tsouma A, Aggeli C, Lembessis P, et al. Multiplex RT-PCR-based detections of CEA, CK20 and EGFR in colorectal cancer patients [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16 (47):5965-5974.
- [8] Schweigert D, Cicenias S, Bruzas S, et al. The value of MMP-9 for breast and non-small cell lung cancer patients' survival[J]. Adv Med Sci, 2013, 58(1):73-82.
- [9] Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-

- 2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1825(1): 29–36.
- [10] Tang ZP, Cui QZ, Dong QZ, et al. Ataxia-telangiectasia group D complementing gene (ATDC) upregulates matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) to promote lung cancer cell invasion by activating ERK and JNK pathways[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(5): 2835–2842.
- [11] Hwang BM, Chae HS, Jeong YJ, et al. Protein tyrosine phosphatase controls breast cancer invasion through the expression of matrix metalloproteinase-9[J]. *BMB Rep*, 2013. [Epub ahead of print]
- [12] Li LN, Zhou X, Gu Y, et al. Prognostic value of MMP-9 in ovarian cancer: a meta-analysis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(7): 4107–4113.
- [13] Nanda DP, Sil H, Moulik S, et al. Matrix metalloproteinase-9 as a potential tumor marker in breast cancer[J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2013, 32(2): 115–129.
- [14] De Mingo M, Moran A, Sanchez-Pernaute A, et al. Expression of MMP-9 and TIMP-1 as prognostic markers in gastric carcinoma[J]. *Hepatogastroenterology*, 2007, 54(73): 315–319.
- [15] Zhao M, Gao Y, Wang L, et al. Overexpression of integrin-linked kinase promotes lung cancer cell migration and invasion via NF- κ B-mediated upregulation of matrix metalloproteinase-9[J]. *Int J Med Sci*, 2013, 10(8): 995–1002.
- [16] Jia W, Gao XJ, Zhang ZD, et al. S100A4 silencing suppresses proliferation, angiogenesis and invasion of thyroid cancer cells through downregulation of MMP-9 and VEGF[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(11): 1495–1508.
- [17] Kopczynska E, Dancewicz M, Kowalewski J, et al. The serum concentration of metalloproteinase 9 and 2 in non-small cell lung cancer patients [J]. *Pol Merkuri Lekarski*, 2007, 22(132): 539–541.
- [18] Krebs MG, Hou JM, Sloane R, et al. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and independent approaches [J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(2): 306–315.
- [19] Nunes de Carvalho S, Helal-Neto E, de Andrade DC, et al. Bone marrow mononuclear cell transplantation increases metalloproteinase-9 and 13 and decreases tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and 2 expression in the liver of cholestatic rats [J]. *Cells Tissues Organs*, 2013. [Epub ahead of print]

关于启用稿件远程处理系统的通知

本刊已启用稿件远程处理系统,该系统包括作者在线投稿/查询、主编办公、专家审稿、编辑办公等功能,通过网上投稿、网上查稿、网上审稿,实现作者、编辑、审稿专家的一体化在线协作处理,从而构建一个协作化、网络化、角色化的编辑稿件业务处理平台。对于广大作者而言,该系统最大的优点是支持在线投稿,方便作者及时了解稿件处理进程,缩短稿件处理时滞。使用过程中具体注意事项如下:

(1)第1次使用本系统投稿的作者,必须在“作者登录”中先注册,才能投稿。注册时各项信息请填写完整。作者自己设定用户名和密码,该用户名密码长期有效。

(2)已注册过的作者,请不要重复注册,否则将导致查询稿件信息不完整。如果遗忘密码,可以致电编辑部查询。

(3)作者投稿请点击“作者登录”,登录后按照提示操作即可。投稿成功后,系统自动发送回执邮件,作者投稿后请随时关注邮箱提示,也可随时点击“作者登录”,获知该稿件的审理情况、处理进展、审稿意见等。

(4)网上投稿成功1周内,请将稿件处理费20元通过邮局汇款至编辑部(务必注明第一作者姓名、稿号和详细地址);并将以下文件邮寄至编辑部:①单位介绍信;②文章若属于基金项目资助,附上基金项目批文的复印件。编辑部收到稿件处理费和上述文件后,稿件将进入审稿程序。

稿件远程处理系统启用后,我刊只接受网上投稿,不再接收电子邮件投稿和纸质稿,《肿瘤学杂志》网址:
<http://www.chinaoncology.cn>。

如有任何问题,请与编辑部联系!联系电话:0571-88122280。

《肿瘤学杂志》编辑部