

CEA和MUC-1 mRNA在大肠癌中的表达及临床意义

王 前¹, 郭兰栓¹, 徐丽绵², 郭 星¹, 李晓宁¹, 王 鹏³

(1. 保定市第一中心医院, 河北 保定 071051; 2. 保定市创伤专科医院, 河北 保定 071000; 3. 解放军第252医院, 河北 保定 071000)

摘 要: [目的] 探讨大肠癌患者外周血中 CEA、MUC-1 mRNA 的表达及临床意义。[方法] 应用巢式 RT-PCR 技术检测 20 名健康人、20 例大肠腺瘤疾病患者和 90 例大肠癌患者外周血 CEA mRNA 和 MUC-1 mRNA 的表达。[结果] 大肠癌患者 CEA mRNA 和 MUC-1 mRNA 表达的阳性率分别为 53.3% (48/90) 和 52.2% (47/90); 健康人外周血中无 CEA mRNA, 有 12 名 MUC-1 mRNA 表达, 表达率为 60.0% (12/20); 大肠腺瘤疾病患者无 CEA mRNA 表达, 有 10 例 MUC-1 mRNA 表达, 表达率为 50.0% (10/20)。大肠癌患者中 CEA、MUC-1 mRNA 表达与肿瘤分期、淋巴结转移有关 ($P < 0.05$)。[结论] CEA 作为检测大肠癌患者外周血微转移的分子标志物具有良好的灵敏度和特异性, 同时检测 CEA 和 MUC-1 可作为判断大肠癌病情进展的指标。

关键词: 肠肿瘤; 癌胚抗原; MUC-1

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)12-1022-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.12.B011

Expression of CEA and MUC-1 mRNA in Colorectal Cancer and Its Clinical Significance

WANG Qian¹, GUO Lan-shuan¹, XU Li-mian², et al.

(1. First Central Hospital of Baoding, Baoding 071051, China; 2. Trauma Special Hospital of Baoding, Baoding 071000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of CEA mRNA, MUC-1 mRNA in colorectal cancer and its significance. [Methods] Expression of CEA mRNA, MUC-1 mRNA was detected by nested RT-PCR in 20 healthy persons, 20 cases with colorectal adenoma and 90 cases with colorectal cancer. [Results] The positive expression rate of CEA mRNA and MUC-1 mRNA was 53.3% (48/90) and 52.2% (47/90) in colorectal cancer patients respectively. No CEA mRNA expression was found in healthy persons. The positive expression rate of MUC-1 mRNA in healthy persons was 60.0% (12/20). No CEA mRNA expression was found in 20 cases with colorectal adenoma diseases. The positive expression rate of MUC-1 mRNA in colorectal adenoma patients was 50.0%. CEA mRNA, MUC-1 mRNA expression significantly correlated with tumor stage and lymph node metastasis ($P < 0.05$). [Conclusion] Molecular marker CEA mRNA as the detection for micrometastasis in peripheral blood of patients with colorectal cancer has good sensitivity and specificity. Combined detection of CEA mRNA, MUC-1 mRNA can be used as markers to evaluate disease progression in patients with colorectal cancer.

Subject words: colorectal neoplasms; CEA; MUC-1

大肠癌是常见的恶性肿瘤之一, 目前在全世界范围内其发病率已处于恶性肿瘤的第3位, 并呈逐年上升趋势, 严重影响人们的身体健康和生活质量。早期大肠癌预后和生存质量较好, 但常因无症状或

症状不典型而被忽视和延误诊治。RT-PCR 技术的发展使检测外周血中微量癌细胞成为可能。尤其是巢式 RT-PCR, 更可使检测的灵敏度达 $10^6 \sim 10^7$, 但目前在大肠癌微转移的检测中, 缺少公认的特异的分子标志物^[1-4]。癌胚抗原(CEA)是消化道恶性肿瘤特异性标志物, 是组织分泌的一种糖蛋白, 在正常人

通讯作者: 王 鹏, 副主任医师, 硕士; 解放军第252医院普外一科, 河北省保定市百花东路991号(071000); E-mail: 2452883899@qq.com
收稿日期: 2014-04-02; **修回日期:** 2014-09-13

中不表达,而在胚胎性肿瘤、胃肠、肺、乳腺癌组织中表达^[5-9]。*MUC-1* mRNA 在肿瘤的发生和转移中发挥重要作用。黏蛋白是一类主要存在于黏液中的细胞表面糖蛋白,相关报道认为通过检测外周血 *MUC-1* mRNA 作为诊断实体瘤微转移的指标尚不成熟^[10-13],同时与大肠癌临床参数的关系还需要进一步探讨。本实验采用巢式 RT-PCR 技术检测了 90 例大肠癌患者外周血中 *CEA* mRNA、*MUC-1* mRNA 的表达,以探讨靶基因作为诊断大肠癌微转移的价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象

随机选择 2006 年 4 月至 2007 年 2 月在保定市第一中心医院普外科住院治疗的大肠癌患者 90 例,入选条件:①术前无放、化疗;②术后病理证实为管状腺癌或乳头状腺癌。并同期选择健康志愿者 20 名,大肠良性腺瘤患者 20 例。所有研究对象均遵循临床知情同意原则。

1.2 临床资料

90 例大肠癌患者,年龄 35~65 岁,中位年龄 53 岁,手术分期 TNM 分期标准,其中 I 期 8 例,II 期 13 例,III 期 29 例,IV 期 40 例;管状腺癌 50 例,乳头状腺癌 40 例。高分化 13 例,中分化 57 例,低分化 20 例。

1.3 试剂及引物设计

参照 GenBank,利用 Primer Premier 5.0 引物设计软件,引物由北京赛百盛公司合成(Table 1)。

1.4 标本收集及总 RNA 提取

抽取约 4ml 新鲜血弃去前 2ml 以防抽血过程中上皮细胞污染,留取 2ml 于 EDTA 抗凝管中,红细胞

裂解液裂解红细胞,分离有核细胞,采用 TRIzol 试剂 (Invitrogen 公司) 异硫氰酸胍/苯酚法抽提总 RNA。样本中加入 1ml TRIzol 试剂反复吹打使细胞裂解,加入 200 μ l 三氯甲烷剧烈震荡,冰上静置 2~5min,120000 转离心 15min,小心抽取上清放 EP 管中,加入等体积的预冷异丙醇与 -20℃ 静置 20min,120000 转离心 10min,可见管底有白色沉淀即是 RNA,弃去上清加入无核酸酶 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀,充分晾干加入 DEPC 水溶解 RNA,所得的 RNA 溶液用 RNase-free DNase I (Fermentas 公司) 处理以去除可能存在的 DNA 基因组污染,-80℃ 冰箱保存。

1.5 cDNA 合成及巢式 RT-PCR 扩增

使用 cDNA 合成试剂盒(Fermentas 公司),根据所测 RNA 浓度加入 2 μ g RNA,总反应体系为 20 μ l,按照说明书操作合成 cDNA 并进行 RT-PCR 扩增。

1.6 灵敏度测试

使用大肠癌细胞株 A544,由中南大学湘雅医学院提供,所测灵敏度可达 10⁶。

1.7 统计学处理

使用 SPSS 11.5 软件进行统计分析,相关数据采用 χ^2 检验和 Fisher 确切概率法进行处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 总 RNA 鉴定

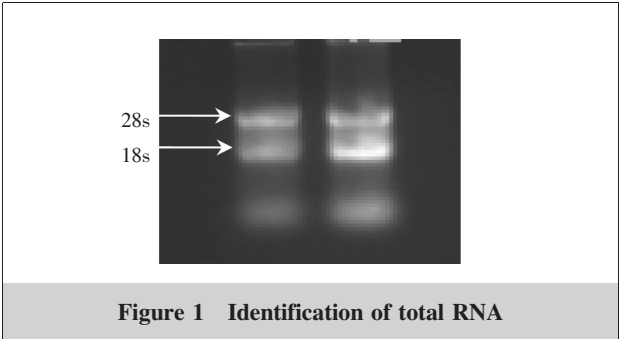
实验中抽取 RNA,OD_{260/280} 值在 1.78~1.99 之间,于 1%琼脂糖凝胶中电泳分析 EB 染色,凝胶成像系统中成像 28s、18s 条带清晰可见 (Figure 1),说明 RNA 的完整性和纯度可用于 RT-PCR。

2.2 CEA 和 *MUC-1* mRNA 的表达情况

20 名健康人外周血中无 *CEA* mRNA 表达,有 12 名 *MUC-1* mRNA 表达,表达率为 60%;20 例大肠良性腺瘤患者外周血中无 *CEA* mRNA 表达,有 10 例 *MUC-1* mRNA

Table 1 Three kinds of target gene primer sequences and product sizes

Genes	Primer sequences	Product size(bp)
CEA	1.A:5'-TCT GGA ACT TCT CCT GGT CTC TCA GCT GG-3'	136
	2.B:5'-TGT AGC TGT TGC AAA TGC TTT AAG GAA GAA GC-3'	
	3.C:5'-GGG CCA CTG TCG GCA TCA TGA TTG G-3'	
<i>MUC-1</i>	Outer-Muc-1 Upper reaches:5'-ATGCCAGTAGCACTCACCATAG-3'	510
	Outer-Muc-1 lower reaches:5'-CAGCCAAGGCAATGAGATAGAC-3'	
	Inter-Muc-1 Upper reaches: 5'-CGTCGTGGACATTGATGGTACC-3'	287
	Inter-Muc-1 lower reaches: 5'-GGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAA-3'	
β -actin	Upper reaches:5'-TCC TGT CCG ATC CAC GAA ACT-3'	315
	Lower reaches :5'-TAA TCA TTT GCGGTG GAC GAT-3'	



表达，表达率为 50%；90 例大肠癌患者外周血中 CEA mRNA 和 MUC-1 mRNA 表达的阳性率分别为 53.3%(48/90)和 52.2%(47/90)。大肠癌患者外周血中 CEA mRNA 表达率与健康人 and 大肠良性腺瘤患者有明显差异($\chi^2=10.004, P<0.05$)；大肠癌患者外周血中 MUC-1 mRNA 表达率与健康人 and 大肠良性腺瘤患者无明显差异($\chi^2=4.476, P>0.05$)(Table 2, Figure 2、3)。

2.3 CEA 和 MUC-1 mRNA 表达与大肠癌临床病理特征相关因素分析

90 例大肠癌患者中，I + II 期的 CEA 和 MUC-1 mRNA 表达率为 23.8%和 28.6%，III + IV 期表达率为 66.7%和 59.4%，差异均有显著性 (P 均为 0.000)。高、中分化组的 CEA mRNA 表达率为 51.4%，低分化组为 60.0%，差异无显著性($P>0.05$)。高、中分化

组 MUC-1 的表达率为 44.3%，低分化组为 80.0%，差异具有显著性($P<0.05$)。不伴有淋巴结转移的患者外周血 CEA 和 MUC-1 mRNA 表达率分别为 28.0%和 34.0%，伴有淋巴结转移的患者外周血 CEA 和 MUC-1 mRNA 表达率分别为 85.0%和 75.0%，差异均有显著性($P<0.05$)。管状腺癌患者外周血的 CEA 和 MUC-1 mRNA 表达率分别为 50.0%和 46.0%，乳头状腺癌分别为 57.5%和 60.0%，无显著性差异($P>0.05$)(Table 3)。

2.4 CEA 和 MUC-1 联合检测的意义

CEA mRNA 检测灵敏度为 58.9%，MUC-1 mRNA 为 52.2%；特异性 CEA mRNA 为 97.5%，MUC-1 mRNA 为 45.0%；准确率 CEA mRNA 为 70.8%，MUC-1 mRNA 为 50.0%。两者联合检测后可以提高检测的灵敏度(77.8%)和准确率(77.8%)(Table 4)。

3 讨 论

癌胚抗原(CEA)是消化道恶性肿瘤特异性标志物，是组织分泌的一种糖蛋白，在正常人中不表达或低表达，而在胚胎性肿瘤、胃肠、肺、乳腺癌组织中表达^[5-9]。CEA 基因由 2 个基因组构成，均位于 19 号染色体上。它是一种细胞表面分子，由柱状上皮细胞分泌，且常见于胃肠道恶性肿瘤中。大肠癌患者体液中 CEA 蛋白含量的检测已经成为比较成熟的预后检测指标。与常规的

Table 2 Expressions of CEA and MUC-1 mRNA

Groups	N	CEA mRNA		χ^2	P	MUC-1 mRNA		χ^2	P
		+	-			+	-		
Colorectal cancer	90	48	42			47	43		
Benign colorectal adenoma	20	0	20	10.004	<0.05	10	10	4.476	>0.05
Healthy persons	20	0	20			12	8		

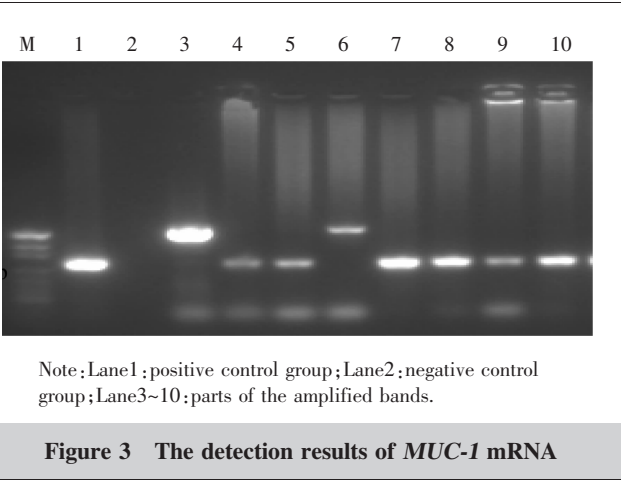
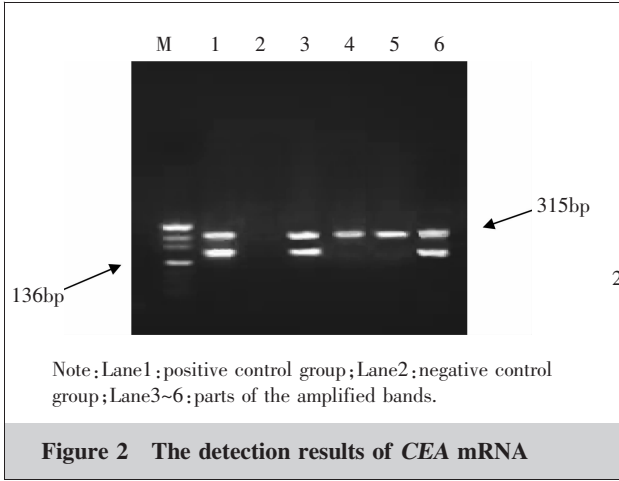


Table 3 The relationship between CEA,MUC-1 mRNA expression and colorectal cancer clinical factors

Related factors	N	CEA			MUC-1		
		n	%	P	n	%	P
TNM stage							
I + II	21	5	23.8	0.000	6	28.6	0.000
III + IV	69	43	66.7		41	59.4	
Degree of differentiation							
High and middle	70	36	51.4	0.300	30	44.3	0.001
Low	20	12	60.0		17	80.0	
Lymph node metastasis							
No	50	14	28.0	0.000	17	34.0	0.000
Yes	40	34	85.0		30	75.0	
Pathologic types							
Tubular	50	25	50.0	0.848	23	46.0	0.186
Papillary	40	23	57.5		24	60.0	

Table 4 Analysis of the sensitivity,specificity and accuracy(%)

Testing items	Sensitivity	Specificity	Accuracy
CEA mRNA	58.9(53/90)	97.5(39/40)	70.8(92/130)
MUC-1 mRNA	52.2(47/90)	45.0(18/40)	50.0(65/130)
CEA mRNA+MUC-1 mRNA	77.8(70/90)	97.5(39/40)	77.8(101/130)

CEA 蛋白表达水平的检测方法相比,RT-PCR 方法从基因水平检测,无疑是一种灵敏度和特异度更高的方法^[1-4]。

MUC-1 mRNA 在肿瘤的发生和转移中发挥重要作用。目前已经成为研究的热点,黏蛋白是一类主要存在于黏液中的细胞表面糖蛋白,共有 mucin 1、2、3、4、5a 和 5b 等 6 个成员。基因位于人染色体 1q21~q24 区域,编码上皮组织细胞膜上黏蛋白的核心蛋白^[10-13]。国外一些报道发现 MUC-1 与实体瘤关系密切,同时也有相关报道称在健康人外周血中同样也发现 MUC-1 的存在,所以认为通过检测外周血 MUC-1 mRNA 作为诊断实体瘤微转移的指标尚不成熟^[14-16],同时与大肠癌临床参数的关系还需要进一步探讨。目前研究 CEA mRNA、MUC-1 mRNA 作为肿瘤筛选的一种肿瘤特异性标志物已经基本确立,但与肿瘤临床参数的一些研究已经成为热点^[17-19]。

Saintigny 等^[20]以 CEA、CK7 及 MUC-1 mRNA 为指标用实时定量 RT-PCR 检测大肠癌患者外周血,认为 CEA mRNA 在病例组有较高的表达,在健康志愿者外周血中不表达,并认为 CEA mRNA 与大肠癌的发生有关。本研究表明,大肠癌患者外周血的阳性率要比健康志愿者和结肠良性腺瘤患者明显高,差

异具有统计学意义($P<0.05$)。大肠癌患者外周血中 MUC1 mRNA 的表达与健康人和大肠腺瘤良性疾病患者的 MUC1 mRNA 的表达无统计学差异($P>0.05$),MUC1 mRNA 作为大肠癌微转移的特异性标志物还需进一步探讨。

本研究还发现 CEA 和 MUC-1 mRNA III~IV 期大肠癌患者外周血中的阳性率明显高于 I~II 期大肠癌患者,差异具有统计学意义($P<0.05$)。本研究亦发现 MUC-1 mRNA 在低分化大肠癌患者外周血中的阳性率明显高于高和中分化大肠癌患者,差异具有统计学意义($P<0.05$),然而 CEA mRNA 在低分化大肠癌患者外周血中的阳性

率高于高和中分化大肠癌患者,但差异不具有统计学意义($P>0.05$)。

理论上起源于上皮组织的大肠癌保留着某些上皮组织特异性标志物的表达,而间叶组织中一般无上皮组织标志物表达。如果在大肠癌外周血中检测到上皮组织特异性标志物,即可诊断为转移。早在 1997 年 Oosterkamp 等^[21]应用 RT-PCR、Northern blot 分析及放射免疫沉淀的方法研究人类上皮细胞及非上皮细胞来源的细胞系表达 CEA mRNA 情况,证明有不同数量的 CEA mRNA 及蛋白被检测出,但是在非上皮来源的肿瘤细胞中的量比上皮来源的肿瘤中量要低得多。本研究发现 CEA 和 MUC-1 mRNA 在伴有转移灶的大肠癌患者外周血中的阳性率明显高于只有原发灶的大肠癌患者,差异具有统计学意义($P<0.05$)。本研究还分析了 CEA 和 MUC-1 mRNA 在大肠癌患者病理类型的关系,此两项指标与病理类型之间的差异均不具有统计学意义($P>0.05$)。

综上所述,在大肠癌患者外周血中,CEA mRNA 表达上调,CEA mRNA 与大肠癌的生长和转移过程发挥着重要作用,而 MUC-1 mRNA 表达与健康人及良性病变者无明显差异,但两者联合检测,可明显提高检测的灵敏度和准确率,CEA 和 MUC-1 mRNA

的表达与大肠癌的分期及转移有关,可作为判断大肠癌预后的指标。

参考文献:

- [1] Huerla S, Goulet EJ, Livingston EH. Colon cancer and apoptosis [J]. *Am J Surg*, 2006, 191(4): 517-526.
- [2] Ito S, Nakanishi H, Hirai T, et al. Quantitative detection of CEA expressing free tumor cells in the peripheral blood of colorectal cancer patients during surgery with real time RT-PCR on a Light Cycler [J]. *Cancer Lett*, 2011, 183(2): 195-203.
- [3] Ahmed FE. Colon cancer: prevalence, screening, gene expression and mutation, and risk factors and assessment [J]. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2009, 21(2): 65-131.
- [4] Zhang WJ. Dukes' B phase detection of lymph node micrometastasis in colorectal carcinoma and its clinical significance [J]. *Journal of Abdominal Surgery*, 2002, 15(4): 232-233. [张伟健. Dukes' B 期大肠癌淋巴结微转移的检测及其临床意义 [J]. *腹部外科*, 2002, 15(4): 232-233.]
- [5] Pelkey TJ, Frison HF, Bruns DE. Molecular and immunological detection of circulating tumor cells and micrometastasis from solid tumor [J]. *Clin Chem*, 2006, 2(9): 1369-1381.
- [6] Lan MY, Zhou MF, Xiang Y, et al. Analysis of clinical characteristics of gastrointestinal malignant tumors after operation due to recurrence of intestinal obstruction [J]. *Journal of Abdominal Surgery*, 2007, 20(1): 27-28. [兰明银, 周猛符, 湘云, 等. 胃肠道恶性肿瘤术后复发所致肠梗阻的临床特点分析 [J]. *腹部外科*, 2007, 20(1): 27-28.]
- [7] Corfield AP, Carroll D, Myersoough, et al. Mucins in the gastrointestinal tract in the health and disease [J]. *Fron Biosci*, 2001, 6: D1321-D1357.
- [8] Asselah T, Condat B, Cazals-Hatem D, et al. Ectopic hepatocellular carcinoma arising in the left chest wall: a long-term follow-up [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 13(7): 873-875.
- [9] Kim KA, Park CM, Kim CH, et al. Hepatocellular carcinoma in an ectopic liver: CT findings [J]. *Eur Radiol*, 2013, 13(4): 45-47.
- [10] Moil K, Iwata J, Miyazaki M, et al. Bystander killing effect of thymidine kinase gene—transduced adult bone marrow stromal cells with ganciclovir on malignant glioma cells [J]. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2010, 50(7): 545-553.
- [11] Krüger W, Kröger N, Zander AR. MUC1 expression in hemopoietic tissues [J]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2010, 9(4): 409-410.
- [12] Reis CA, David L, Correa P, et al. Intestinal metaplasia of human stomach displays distinct patterns of mucin (MUC1, MUC2, MUC5 AC, and MUC6) expression [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(5): 1003-1007.
- [13] Scott TE, Carroll M, Coglianò FD, et al. A case-control assessment of risk factors for gallbladder carcinoma [J]. *Dig Dis Sci*, 1999, 44(8): 1619-1625.
- [14] Huang XH, Xu YX, Li R, et al. The relationship between MUC1~MUC2, MUC5AC and colorectal cancer [J]. *Medical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 2008, 33(2): 184-186. [黄晓辉, 徐迎新, 李荣, 等. 血清 MUC1~MUC2 及 MUC5AC 表达和结直肠癌的关系 [J]. *解放军医学杂志*, 2008, 33(2): 184-186.]
- [15] Wang Q, An ZW. Expression of CEA mRNA in colorectal cancer and its significance [J]. *Abdominal Surgery*, 2014, 26(5): 345-347. [王前, 安泽武. 大肠癌患者外周血中癌胚抗原 mRNA 的表达及意义 [J]. *腹部外科*, 2014, 26(5): 345-347.]
- [16] Wang Q, Liu J, An ZW. Expression of CK-19 and MUC-1 Mrna in colorectal cancer and its significance [J]. *Chinese Clinical Oncology*, 2014, 19(3): 204-207. [王前, 刘洁, 安泽武. 大肠癌患者外周血 CK19 和 MUC-1 mRNA 水平及其临床意义 [J]. *临床肿瘤学*, 2014, 19(3): 204-207.]
- [17] Duarte S, Carle G, Faneca H, et al. Suicide gene therapy in cancer: where do we stand now? [J]. *Cancer Lett*, 2012, 324(2): 160-170.
- [18] Kocer B, Soran A, Erdogan S, et al. Expression of MUC5AC in colorectal carcinoma relationship with prognosis [J]. *Pathol Int*, 2012, 52(7): 470-477.
- [19] Tsushimi T, Enoki T, Harada E, et al. Ectopic hepatocellular carcinoma arising in the bile duct [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2005, 12(3): 266-268.
- [20] Saintigny P, Coulon S, Kambouchner M, et al. Real-time RT-PCR detection of CEA, CK7 and MUC-1 mRNA for diagnosis of lymph node micrometastases in non small cell lung carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2005, 115(5): 777-782.
- [21] Oosterkamp HM, Scheiner L, Stefanova MC, et al. Comparison of MUC-1 expression in epithelial and non-epithelial cancer cell lines and demonstration of a new short variant form (MUC-1/Z) [J]. *Int J Cancer*, 1997, 72(1): 87-94.