

· 临床研究 ·

可手术非小细胞肺癌纵隔淋巴结的微转移

杨浩贤 吴一龙 丁嘉安 姜格宁 周晓 陈昶 高文 陈刚

【摘要】 目的 分析以 LUNX-mRNA 为标志物, RT-PCR 法检测非小细胞肺癌 (NSCLC) 纵隔淋巴结微转移的可行性, 从基因水平探讨肺癌系统性纵隔淋巴结清扫的必要性。方法 对 20 例 NSCLC 患者术中取纵隔淋巴结, 用 RT-PCR 法检测肺癌特异性基因 LUNX 在纵隔淋巴结的表达情况, 并与 10 例肺部良性疾病患者的纵隔淋巴结 LUNX 基因的表达进行对比。结果 20 例肺癌患者共送检 71 枚纵隔淋巴结。常规病理学检查阳性的淋巴结占 11.3%; 而 LUNX-mRNA 阳性的淋巴结占 32.4%, $P < 0.001$; 纵隔淋巴结微转移率为 25.4%; 在 I A ~ II B 期患者的 55 枚纵隔淋巴结中, LUNX-mRNA 阳性的淋巴结占 23.6%, 而在 III 期患者的 16 枚淋巴结中, LUNX-mRNA 阳性的淋巴结占 62.5% ($P = 0.003$)。结论 可手术 NSCLC 患者的纵隔淋巴结微转移发生率约为 25.4%; 系统性胸内淋巴结清扫应为 NSCLC 患者的标准术式之一。

【主题词】 肺肿瘤; 纵隔淋巴结; 微转移; 聚合酶链反应

Detection of micrometastasis in mediastinal lymph nodes in operable non-small cell lung cancers

YANG Hao-xian*, WU Yi-long, DING Jia-an, JIANG Ge-ning, ZHOU Xiao, CHEN Chang, GAO Wen, CHEN Gang. *Department of Thoracic Surgery, Shanghai Pulmonary Disease Hospital and the Pulmonary Disease Hospital of Tongji University, Shanghai, 200433, China
Corresponding author: WU Yi-long, E-mail: gzyilong@hotmail.com

【Abstract】 Objective Using the LUNX-mRNA as a marker and RT-PCR technique to assess mediastinal lymph nodes in patients with operable NSCLC, to evaluate at gene level the feasibility of this method in detection of micrometastasis in NSCLC and the necessity of systematic mediastinal lymphadenectomy during surgery. **Methods** Twenty patients with operable NSCLC were involved in this study. The mediastinal lymph nodes were taken during operation. RT-PCR assay was carried out to detect the LUNX-mRNA. Ten cases with benign lung disease were assayed by the same method as control. **Results** Seventy one mediastinal lymph nodes were obtained from 20 patients, 8 (11.3%) of which showed histologically metastasis with HE staining, while 23 (32.4%) were LUNX-mRNA positive by RT-PCR, $P < 0.001$. Micrometastasis was detected in 25.4% of all lymph nodes. LUNX-mRNA was found to be positive in 23.6% of lymph nodes from 15 patients with stage I A - II B NSCLC compared with 62.5% from 5 patients with stage III NSCLC, with a significant difference ($P = 0.003$). **Conclusion** About 25.4% of mediastinal lymph nodes are with micrometastasis in patients with operable NSCLC. Systematic mediastinal lymphadenectomy is necessary to deal with the regional lymph nodes during surgery.

【Subject words】 Lung neoplasm; Mediastinal lymph nodes; Micrometastasis; Polymerase chain reaction

我国城市肺癌发病率已占各种恶性肿瘤发病率的首位^[1], 但肺癌目前的治疗效果仍不尽如人意, 治疗失败的主要原因是术后复发和转移。这提示一些临床认为可手术的肺癌患者, 术前可能已经发生了微转移。我们通过对非小细胞肺癌 (non-small

cell lung cancer, NSCLC) 患者纵隔淋巴结微转移的检测, 从基因水平探讨系统性纵隔淋巴结清扫术的必要性; 分析以 LUNX-mRNA 为标志物, RT-PCR 法检测肺癌微转移的可行性, 以期更准确、合理地对 NSCLC 患者进行分期, 为多学科综合治疗措施的制订提供更多的信息。

资料与方法

1. 临床资料: 2003 年 9 月至 2003 年 12 月间, 广东省人民医院胸外科收治的 NSCLC 患者 20 例, 男性 17 例, 女性 3 例; 年龄 37 ~ 76 岁, 平均年龄 58 岁。腺癌 12 例, 鳞癌 6 例, 腺样囊腺癌 1 例, 大细胞

基金项目: 广东省重点医学科技攻关专项课题资助项目 (WSTJJ2003-1); 广州市科学技术局重点科技攻关计划项目 (2001-Z-044-01)

作者单位: 200433 上海市肺科医院同济大学附属肺科医院胸外科 (杨浩贤、丁嘉安、姜格宁、周晓、陈昶、高文); 广东省人民医院肿瘤中心 (吴一龙、陈刚)

通讯作者: 吴一龙, E-mail: gzyilong@hotmail.com

癌 1 例。病理分期 I A 期 4 例, I B 期 7 例, II B 期 4 例, III A 期 3 例, III B 期 2 例。肺部良性疾病患者 10 例,包括肺结核、炎性假瘤等。

2. 试剂和引物设计: Trizol 购自 GIBICO 公司; 红细胞裂解液、DEPC、随机引物、逆转录酶、Taq DNA 聚合酶、dNTP 等均购自 MBI 公司。LUNX 特异性引物根据 Iwao 等^[2]设计,由 Sangon 公司合成。LUNX 上下游引物分别为: 5'-CTCATTGTCTTCTAC-GGGCTGTTAG-3', 5'-CTTTATGCCGAGAGGGATGGT-3', 扩增 cDNA 片断长度为 396 bp。根据 β -actin 基因序列^[3]设计内参照, 扩增 155 bp 的 cDNA 片断。

3. 主要仪器设备: 离心机为德国 Sigma 3K30 型, JA12002 型毫克级天平由上海天平仪器厂生产, UV2201 紫外分光光度仪为日本岛津株式会社产品, PCR 扩增仪为德国 Hema4800 型。

4. 标本的收集: 系统性纵隔淋巴结清扫后立即解剖纵隔各站淋巴结。将每枚淋巴结平均切成两半, 一半置于 -80°C 冰箱冷冻保存, 另一半送病理检查。对于肺部良性疾病患者, 根据手术操作的方便程度, 摘取纵隔淋巴结一枚或数枚。为避免交叉污染, 每切开一枚淋巴结后都要将刀、剪清洗干净后才切分下一枚淋巴结。每例肺癌患者肺叶切除后, 均立即取一小块肿瘤组织液氮保存。

5. 总 RNA 的提取: 采用 Trizol 一步法抽提总 RNA, 用 30 μl DEPC 处理过的水溶解。

6. RT-PCR: 取总 RNA 4 μl 加入到以下反应体系中: Random primer 2 μl , $5 \times$ 反转录 Buffer 4 μl , 2.5 mmol/L dNTP 4 μl , M-MuLV 反转录酶 0.5 μl , RNA 酶抑制剂 0.5 μl , 加 DEPC 处理过的水至总体积 20 μl , 37°C 下孵育 1 h, 95°C 灭活 5 min。取 3 μl 逆转录混合物, 与 2.5 mmol/L dNTP 2 μl , 25 mmol/L MgCl_2 2 μl , $10 \times$ Buffer 2.5 μl , Taq 酶 0.5 μl 、上下游引物各 0.75 μl 以及 DEPC 处理过的水组成 25 μl 反应体系。PCR 反应程序为: 95°C 预变性 5 min, 94°C 变性 45 s, 55°C 复性 45 s, 72°C 延伸 1 min, 循环 35 次, 最后 72°C 补延伸 7 min 结束反应。

7. 统计方法: 采用 SPSS 10.0 统计软件对数据进行统计分析。RT-PCR 法和 HE 染色法对纵隔淋巴结转移检出率的比较, 以及各期患者纵隔淋巴结微转移检出率的比较采用 χ^2 检验。

结 果

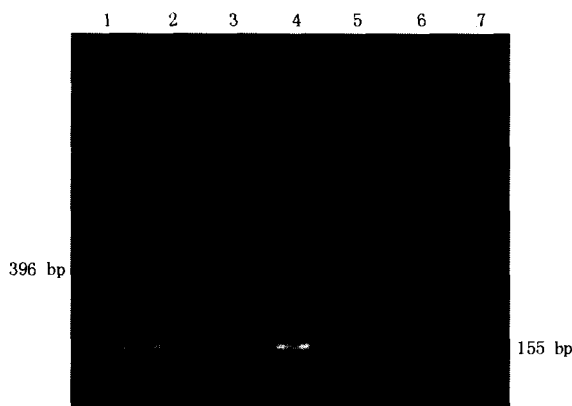
全部肿瘤组织均有 LUNX 的基因表达。本组 20 例 NSCLC 患者共收集纵隔淋巴结 71 枚, 其中有

23 枚 (32.4%) 淋巴结检测出有 LUNX 基因的表达, 显示淋巴结转移的存在; 而常规病理切片只发现 8 枚 (11.3%) 纵隔淋巴结发生癌转移, χ^2 检验 $P < 0.001$, 表明两种方法检出率的差异有统计学意义, RT-PCR 法检出率更高。常规病理切片发现有癌细胞转移的 8 枚纵隔淋巴结中, 有 7 枚淋巴结发现 LUNX 基因的表达。由此可见, 如果以常规病理切片法作为金标准, LUNX-mRNA 为指标诊断纵隔淋巴结转移的敏感性为 87.5%。在 10 例良性疾病患者的 20 枚纵隔淋巴结中, 仅有 1 例患者的 2 枚纵隔淋巴结 LUNX-mRNA 阳性, 由此可以计算出该方法的特异性为 90%。

在常规病理学检查阴性的 63 枚纵隔淋巴结中, 用 RT-PCR 法发现其中 16 枚 (25.4%) LUNX-mRNA 阳性, 显示了微转移的存在。

本组从 15 例 I ~ II 期患者中, 共收集纵隔淋巴结 55 枚, 其中 11 例 (73.3%) 患者的 13 枚 (23.6%) 淋巴结有 LUNX 基因的表达; 从 5 例 III 期患者中共收集纵隔淋巴结 16 枚, 其中 5 例患者的 10 枚 (62.5%) 淋巴结有 LUNX 基因的表达。 χ^2 检验发现, I ~ II 期患者和 III 期患者纵隔淋巴结中 LUNX 基因表达的差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。

图 1 为 1 例患者纵隔淋巴结微转移的检测结果。来自该患者的 6 枚纵隔淋巴结 (分别见第 1 ~ 6 泳道), 经常规病理学检查均未发现癌转移, 而其中有 2 枚淋巴结检测到 LUNX 基因的表达, 显示微转移的存在。



1~6: 各枚淋巴结均见 155 bp β -actin 内参照条带; 3、6: 发现 396 bp LUNX-mRNA 条带, 显示微转移; 1、2、4、5: 未见 396 bp 条带, 未显示微转移; 7: 分子量标志 DNA ladder

图 1 6 枚常规病理学阴性的纵隔淋巴结微转移的检测结果

讨 论

微转移是指恶性肿瘤细胞在发展过程中, 播散

并存活于血循环、淋巴道、骨髓及各种组织器官中,尚未形成转移结节,且无任何相关的临床表现,常规检查方法如影像学、临床病理学等难以检测到的微量转移^[4]。

目前常用的肿瘤微转移检测方法很多,其中 RT-PCR 法因其敏感性高,可在 10^6 至 10^7 细胞中找到 1 个癌细胞,从而被广泛地运用到肿瘤微转移的检测领域^[5]。目前用于肿瘤微转移检测的标志物也很多,如 CKs 家族、MUC1 等,但都存在一定程度的假阳性和假阴性问题^[6,7],因而大大限制了它们的应用。

Iwao 等^[2]用 mRNA 差异显示技术分离了一个肺组织特异性基因—LUNX。它定位于 20p11.1 ~ q12,全长 1015 bp,功能未明。研究发现,在肺癌外周血微转移的检测中,LUNX-mRNA 是一个比 CK19-mRNA 更敏感、更特异的指标^[8,9]。

在常规病理学检查阳性的 8 枚淋巴结中,有 1 枚 LUNX-mRNA 阴性,说明虽然本实验所采用的方法敏感性高达 87.5%,但也应注意假阴性的存在。因为肿瘤组织全部表达 LUNX 基因,而转移灶的癌细胞保留其来源组织的细胞生物学特性,因此,假阴性可能是操作过程中 RNA 酶的污染导致 mRNA 降解所致。

本组 20 例 NSCLC 的 71 枚纵隔淋巴结中,RT-PCR 法阳性的淋巴结 23 枚,检出率 32.4%,而常规病理学阳性的仅有 8 枚,检出率 11.3%,差异有统计学意义。表明在 NSCLC 患者的纵隔淋巴结中,的确有常规病理学检查无法诊断的微转移灶存在。在 15 例 I A ~ II B 期患者的 55 枚淋巴结中,有 11 例 (73.3%) 患者的 13 枚 (23.6%) 纵隔淋巴结 LUNX-mRNA 阳性,即 73.3% 的患者分期得以提高,说明进行微转移的检测以获得更为准确的分期是必要的,也是可行的,能够为制定多学科综合治疗方案提供更准确的依据。在常规病理学检查阴性的 63 枚淋巴结中,发现 25.4% 的淋巴结发生微转移,这一结果也解释了系统性纵隔淋巴结清扫术为什么比淋巴结采样术更能够提高 NSCLC 的生存率^[10],原因在于只有系统性的纵隔淋巴结清扫,才能更有效地切除有微转移的淋巴结,才是真正意义上的肺癌完全切除术。统计分析发现, I ~ II 期患者纵隔淋巴结微转移的检出率低于 III 期患者,表明微转移的发生与病理分期呈正相关。

本组研究中,未检测到淋巴结微转移的 4 例患者均为 I 期患者,其中 3 例为管内型,1 例为周围型

(直径 1.7 cm)。可见无纵隔淋巴结微转移的患者原发病灶都很小,大部分是管内型,这与临床观察到的 NSCLC 患者预后情况完全吻合,提示这类患者预后佳的原因是容易发生淋巴结转移。

本组 10 例良性疾病患者的 20 枚纵隔淋巴结中,1 例患者的 2 枚淋巴结 LUNX-mRNA 阳性。该患者为 70 岁女性,以低热、咳嗽伴血丝痰 2 周入院,胸部 CT 以及 PET 检查均误诊为左上肺癌并纵隔淋巴结转移,而术后病理诊断为:左上肺慢性炎症性改变,各站纵隔淋巴结均呈反应性增生。以上结果显示,本研究所采用的方法也存在假阳性的可能性,在炎症假瘤患者中需引起重视。回顾纵隔淋巴结取材的过程,虽然我们采取了一些方法尽量避免淋巴结受到污染,特别是来自肺组织的污染,但由于 RT-PCR 法高度敏感,仍不能排除肺组织污染导致假阳性产生的可能性。

目前已有大量关于微转移与预后关系的研究,但其对制订综合治疗措施方面的价值尚未见报道。为了提高患者生存率、改善患者生活质量,有必要对全部患者进行严密随访,进一步研究微转移与预后的关系,探讨其对指导治疗的意义。

参 考 文 献

- 1 李连弟,鲁凤珠,张思维,等. 中国恶性肿瘤死亡率 20 年变化趋势和近期预测分析. 中华肿瘤杂志, 1997, 19:3-9.
- 2 Iwao K, Watanabe T, Fujiwara Y, et al. Isolation of a novel human lung-specific gene, lunx, a potential molecular marker for detection of micrometastasis in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer*, 2001, 91: 433-437.
- 3 Nakajima-Iijima S, Hamada H, Reddy P, et al. Molecular structure of the human cytoplasmic β -actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985, 82: 6133-6137.
- 4 Pantel K, Izbicki JR, Passlick B, et al. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small cell lung cancer without overt metastases. *Lancet*, 1996, 347: 649-653.
- 5 Ghossein RA, Rosai J. Polymerase chain reaction in the detection of micrometastases and circulating tumor cells. *Cancer*, 1996, 78:10-16.
- 6 Dent GA, Civalier CJ, Brecher ME, et al. MUC1 expression in hematopoietic tissues. *Am J Clin Pathol*, 1999, 111: 741-747.
- 7 Jung R, Kruger W, Hosch S, et al. Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro. *Br J Cancer*, 1998, 78: 1194-1198.
- 8 Mitas M, Hoover L, Silvestri G, et al. Lunx is a superior molecular marker for detection of non-small lung cell cancer in peripheral blood. *J Mol Diagn*, 2003, 5:237-242.
- 9 杨浩贤,吴一龙,陈刚,等. RT-PCR 法检测外周血 LUNX-mRNA 诊断非小细胞肺癌微转移的研究. *肿瘤防治研究*, 2004, 31:464-466.
- 10 吴一龙,王思愚,黄植蕃,等. I ~ III a 期非小细胞肺癌淋巴结清扫范围的前瞻性研究. *中华肿瘤杂志*, 2001, 23:43-54.

(收稿日期:2005-05-19)