

# 外周血 CK20、uPA mRNA 在肺腺癌胸腔积液患者合并远处转移患者中的作用

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] 探讨细胞角蛋白 19(cytokeratin 19, CK 19)mRNA, 细胞角蛋白 20(cytokeratin 20, CK20) mRNA, 基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9, MMP9) mRNA, 尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase plasminogen activator, uPA) mRNA 在肺腺癌胸腔积液患者发生转移的作用。[方法] 采用 PCR 技术和荧光定量 RT-PCR 检测 47 例经病理学确诊的肺腺癌合并胸腔积液患者中的 CK19、CK20、MMP9、uPA mRNA 水平。[结果] 47 例肺腺癌合并恶性胸腔积液患者 CK19 mRNA 0~52 700copies/ml, CK20 mRNA 0~62 900copies/ml。肺腺癌恶性胸腔积液患者合并骨转移者 CK20mRNA 较无骨转移患者高(1 060 copies/ml vs 566.7 copies/ml,  $P=0.045$ )。伴有区域淋巴结转移患者 uPA mRNA 较无区域淋巴结转移患者高(553.4 copies/ml vs 173.7 copies/ml,  $P=0.048$ )。[结论] 外周血 CK20 mRNA 高表达可能使肺腺癌合并胸膜转移患者更易发生骨转移。uPA mRNA 表达可能与肺腺癌胸膜转移患者存在区域淋巴结转移相关。

**关键词:** 肺恶性肿瘤; 细胞角蛋白; 转移

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2013)11-0922-04

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2013.11.A018

## The Role of Peripheral CK20, uPA mRNA in Metastasis of Lung Adenocarcinoma Patients with Malignant Pleural Effusion

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 evaluate the role of cytokeratin 19(CK19)mRNA, cytokeratin 20 (CK20) mRNA, matrix metalloproteinase-9(MMP9) mRNA and urokinase plasminogen activator(uPA) mRNA in metastasis of lung adenocarcinoma patients with malignant pleural effusion. [Methods] CK19 mRNA, CK20 mRNA, MMP 9 mRNA, uPA mRNA in 47 pathologically proven lung adenocarcinoma patients with malignant pleural effusion were detected by RT-PCR combined with Real Time PCR. [Results] The range of CK19 mRNA and CK20 mRNA in lung adenocarcinoma patients with malignant pleural effusion was 0~52 700copies/ml, 0~62 900copies/ml, respectively. CK20 mRNA median was higher in patients with bone metastasis than that without bone metastasis(1 060 copies/ml vs 566.7 copies/ml,  $P=0.045$ ). uPA mRNA median was higher in patients with local lymph node metastasis than that without local lymph node metastasis (553.4 copies/ml vs 173.7 copies/ml,  $P=0.048$ ). [Conclusions] High expression of CK20 mRNA in peripheral blood in lung adenocarcinoma patients with malignant pleural effusion is likely to have bone metastasis. uPA mRNA expression might be correlated to local lymph node metastasis.

**Key words:** lung carcinoma; cytokeratin; metastasis

恶性胸腔积液是肺腺癌的常见转移表现<sup>[1,2]</sup>。临床上部分肺腺癌患者初发即合并胸膜转移, 胸腔积液, 无其他远处转移, 虽经反复多线药物治疗, 胸腔

积液不能控制反复存在, 但仍可无其他远处转移。而另一些患者则诊断时即为恶性胸腔积液合并有其他远处转移, 如骨、脑、肾上腺、肝脏等, 如抗肿瘤治疗后远处转移部位病灶控制, 一般情况下胸腔积液也得到控制。探寻肺腺癌患者发生不同部位转移的规

收稿日期: 2013-09-06; 修回日期: 2013-10-09

通讯作者: 范云, E-mail: fyunchen@gmail.com

律及其机制原因,有可能为临床诊治提供思路。

本研究利用 CK19、CK20、MMP9、uPA mRNA 特异性引物和 Taqman 探针,并结合荧光定量 RT-PCR 技术,定量检测合并恶性胸腔积液的肺腺癌患者外周血标本单个核细胞(肿瘤细胞,单核细胞,淋巴细胞)中 CK19、CK20、MMP9、uPA mRNA 水平,并分析是否与合并特定转移部位有关。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

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)的合并恶性胸腔积液肺腺癌患者共 47 例。其中 27 例患者胸腔积液中找到癌细胞,3 例患者找到可疑癌细胞,17 例患者未找到癌细胞但临床诊断为恶性积液。男性 26 例,女性 21 例;年龄 31~70 岁,平均年龄 60 岁。19 例合并骨转移,6 例合并脑转移,8 例合并对侧肺转移,2 例合并肝转移,2 例合并肾上腺转移,17 例合并区域淋巴结转移。骨转移经全身骨显像及 CT/MRI 两种方法确定。

### 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有限公司;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),高速冷冻离心机。引物由广州达晖生物公司设计合成。

### 1.3 方法

标本采集:抽取外周血 3~5ml 抗凝(EDTA 抗凝)后密封送检。

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。

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 2 μl;PrimeScript® RT Enzyme Mix I 0.5 μl;Oligo dT Primer (50 μM)0.5 μl;Random 6 mers (100 μM)2 μl,Total RNA, RNase Free dH<sub>2</sub>O, up to 10 μl×2。反转录反应条件如下:37℃ 15min (反转录反应);85℃ 5s (反转录酶的失活反应)。将得到的 cDNA 5 倍稀释后加入到下一步的 Real Time PCR 反应体系中。

PCR 扩增:按以下要求配制实时定量 PCR 体

系。CK19(CK20/MMP9)需准备反应数=样本数+1 (阴性对照)+1 (阳性对照)+4 (定量标准品)。每步骤反应需 CK19 (CK20/MMP9 uPA) 反应液 22.8 μl, Taq 酶 0.2 μl。计算试剂的使用量,加入一适当体积的离心管中,充分混匀后,按 23.0 μl 量分别分装到不同的 PCR 反应管中,反应管中分别加入 2.0 μl 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<sup>7</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>),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。

荧光定量检测:选择在第二步第二阶段采集 FAM 荧光信号。荧光探针序列见 Table 1。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 Taqman genotyping primer and primer sequences

| Gene | Primer sequence                                  |
|------|--------------------------------------------------|
| MMP9 | Primer CGCTGGGCTTAGATCATTCCTCAGGGCGAGGACCATAGAG  |
|      | Fluorescent probe CAGTGCCGGAGGCGCTCATGTAC        |
| CK19 | Primer CAGGAGATTGCCACCTACCGGAGGACCTTGGAGGCAGACA  |
|      | Fluorescent probe CCTGCTCGAGGGACAGGAAGATCAC      |
| CK20 | Primer GGACGACACCCAGCGTTTAAAGATCGCTCCCATAGTTCACC |
|      | Fluorescent probe CTGGAGTTGGAGATGCGGATGCC        |
| uPA  | Primer GACCCCTCGTCTGTTCCCTCTGAGACTCTCGTGTAGACGCC |
|      | Fluorescent probe AAGGCCGCATGACTTTGACTGGAA       |

### 1.4 统计学处理

数据分析采用 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)。P<0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

全组 47 例肺腺癌合并恶性胸腔积液患者 CK19 mRNA 检测值范围 0~52 700copies/ml, CK20 mRNA 检测值范围 0~62 900copies/ml。合并骨转移患者 CK20 mRNA 中位值 1 060copies/ml, 显著性高于无

骨转移患者中位值 566.77copies/ml, 两独立样本 Mann-Whitney *U* 检验显示, 差异具有统计学意义( $P=0.045$ )。合并骨转移患者 CK19 mRNA 中位值也高于无骨转移患者, 但差异无统计学意义( $P=0.368$ )。合并对侧肺转移的患者 CK19 mRNA 和 MMP9 mRNA 中位值高于未合并对侧肺转移患者, 合并对侧肺转移者 uPA mRNA 检测值低于无对侧肺转移患者, 但差异均无统计学意义( $P$  值分别为 0.531, 0.901, 0.989)。合并区域淋巴结转移患者 MMP9 mRNA 和 uPA mRNA 均高于无区域淋巴结转移患者, 但统计学分析发现仅 uPA mRNA 在两组中差异具有统计学意义( $P=0.048$ )。CK19 mRNA 及 CK20 mRNA 在有无区域淋巴结转移患者组差异无统计学意义 ( $P=0.419, 0.245$ )。在脑转移患者中, CK19 mRNA 表达水平与无脑转移患者相仿( $P=0.768$ ), CK20 mRNA 差异无统计学意义( $P=0.721$ )(Table 2, 3)。

### 3 讨 论

细胞角蛋白(cytokeratins, CKs)是上皮细胞中间丝的成分蛋白, 是上皮分化的可靠标志物。由于循环肿瘤细胞大多保留起源细胞的 CKs 类型, 由此便可

通过测定 CKs 来检测循环肿瘤细胞。CK19 在各种腺上皮和腺上皮起源的恶性肿瘤中均有表达。CK20 主要用于检测胃肠道、肺、乳腺及前列腺的恶性肿瘤。此外, RNA 在细胞外环境中非常不稳定, 如在肺癌患者外周血中检测出 CK19 mRNA、CK20 mRNA, 理论上可以认为外周血中有循环肿瘤细胞存在<sup>[3-7]</sup>。

鉴于肿瘤细胞转移过程中存在上皮间充质化及间充质上皮化两个过程, 循环肿瘤细胞表面标记的表达不是“全或无”的, 可以有间充质的标志, 如波形蛋白阳性, 也可以有上皮的标志, 如细胞角蛋白<sup>[4]</sup>。用 RT-PCR 方法结合 Real time PCR 方法检测外周血单个核细胞(肿瘤细胞, 单核细胞, 淋巴细胞)的细胞角蛋白 CK19、CK20 mRNA 水平, 相当于检测循环肿瘤细胞的一个亚群。利用 RT-PCR 结合 Real time PCR 方法反映循环肿瘤细胞, 或者说是循环肿瘤细胞的一个亚群是可取的<sup>[5,6]</sup>。文献显示 RT-PCR 方法检测循环肿瘤细胞可达到与目前相对较理想的 Cell Search 方法较一致的检测结果<sup>[8]</sup>。在前列腺癌中发现, 循环肿瘤细胞与存在骨转移及患者预后有关<sup>[8,9]</sup>。同时在乳腺癌研究中也发现, 循环肿瘤细胞与 PET-CT 检测出来的骨转移有关<sup>[10]</sup>。本研究提示, 肺腺癌恶性胸腔积液患者是否合并其他远处转移部

**Table 2 The median values of CK19、CK20 mRNA in lung adenocarcinoma with malignant pleural effusion**

| Location           | Metastasis | CK19 mRNA (Q25~Q75)  | <i>P</i> | CK20 mRNA(Q25~Q75)    | <i>P</i> |
|--------------------|------------|----------------------|----------|-----------------------|----------|
| Bone               | Yes        | 1420(440.7, 2921.1)  | 0.368    | 1060(464.7, 2650.5)   | 0.045    |
|                    | No         | 680.52(62.5, 2074.9) |          | 566.7(25.7, 1331.2)   |          |
| Contralateral lung | Yes        | 1580(1423.5, 2080.2) | 0.531    | 899.8(617.09, 2530)   | 0.728    |
|                    | No         | 627.3(68, 2435.5)    |          | 670.8(94.0, 1643.1)   |          |
| Lymph node         | Yes        | 485.1(80, 1590)      | 0.419    | 435.8(89.2, 965.9)    | 0.245    |
|                    | No         | 1380(81, 4199.4)     |          | 984.8(207.9, 2136.1)  |          |
| Brain              | Yes        | 979.5(130.5, 2640.8) | 0.768    | 1421.8(224.1, 2620.4) | 0.721    |
|                    | No         | 927.1(71, 2110.6)    |          | 717.9(98.9, 1633.3)   |          |

**Table 3 The median values of MMP9, uPA mRNA in lung adenocarcinoma with malignant pleural effusion**

| Location           | Metastasis | MMP9 mRNA(Q25~Q75)    | <i>P</i> | UPA mRNA(Q25~Q75)    | <i>P</i> |
|--------------------|------------|-----------------------|----------|----------------------|----------|
| Bone               | Yes        | 1540(306.6, 3618.7)   | 0.940    | 327(102.6, 543.1)    | 0.974    |
|                    | No         | 1285(168.2, 5066)     |          | 404.2(54.0, 1693.3)  |          |
| Contralateral lung | Yes        | 1550(1199.4, 4650)    | 0.901    | 442.2(60.4, 3510)    | 0.989    |
|                    | No         | 1270(250.4, 4633.7)   |          | 341.2(102.6, 1217.9) |          |
| Lymph node         | Yes        | 2660(276.1, 5760.7)   | 0.642    | 553.4(327, 1221.5)   | 0.048    |
|                    | No         | 1159.5(265.7, 2183.7) |          | 173.7(57.0, 604.1)   |          |
| Brain              | Yes        | 749.6(25.1, 3843.9)   | 0.408    | 332.6(124.9, 4215.1) | 0.988    |
|                    | No         | 1550(388.4, 4577.5)   |          | 373.9(93.9, 1214.4)  |          |

位,其 CK19 mRNA,CK20 mRNA 表达有差异。肺腺癌恶性胸腔积液患者如合并骨转移、脑转移、对侧肺转移者,外周血单个核细胞 CK19 mRNA、CK20 mRNA 表达水平较高,但仅合并骨转移患者与无骨转移患者相比较差异有统计学意义。本研究发现外周血单个核细胞 CK20 mRNA 高表达使肺腺癌胸膜转移患者更容易发生骨转移。我们或许可以进一步推论,表达上皮标志的循环肿瘤细胞亚群可能与骨转移有关。

研究表明,MMP-9 及 uPA 与肺癌、大肠癌和胃癌等多种肿瘤浸润转移相关<sup>[11-16]</sup>。本研究发现外周血单个核细胞 MMP9 mRNA 在合并骨、对侧肺转移及区域淋巴结转移患者中表达水平较高,但差异均无统计学意义。外周血单个核细胞 uPA mRNA 与区域淋巴结转移相关。

综上所述,外周血单个核细胞 CK20 mRNA 高表达使肺腺癌合并胸膜转移患者更容易发生骨转移。表达上皮标志的循环肿瘤细胞亚群可能与骨转移有关。循环肿瘤细胞 uPA mRNA 的表达可能与肺腺癌胸膜转移患者存在区域淋巴结转移相关。

## 参考文献:

- [1] Liu X, Lu Y, Zhu G, et al. The diagnostic accuracy of pleural effusion and plasma samples versus tumour tissue for detection of EGFR mutation in patients with advanced non-small cell lung cancer: comparison of methodologies [J]. *J Clin Pathol*, 2013 Jul 25. [Epub ahead of print]
- [2] Vazakidou ME, Magkouta S, Moschos C, et al. mTOR inhibition does not prevent lung adenocarcinoma-induced malignant pleural effusion [J]. *Respirology*, 2013 Jul 2. [Epub ahead of print]
- [3] Wendel M, Bazhenova L, Boshuizen R, et al. Fluid biopsy for circulating tumor cell identification in patients with early- and late-stage non-small cell lung cancer: a glimpse into lung cancer biology [J]. *Phys Biol*, 2012, 9(1): 016005.
- [4] 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.
- [5] Ge M, Shi D, Wu Q, et al. Fluctuation of circulating tumor cells in patients with lung cancer by real-time fluorescent quantitative-PCR approach before and after radiotherapy [J]. *J Cancer Res Ther*, 2005, 1(4): 221-226.
- [6] Wong CS, Cheung MT, Ma BB, et al. Isolated tumor cells and circulating CK20 mRNA in pN0 colorectal cancer patients [J]. *Int J Surg Pathol*, 2008, 16(2): 119-126.
- [7] Gorges TM, Pantel K. Circulating tumor cells as therapy-related biomarkers in cancer patients [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(5): 931-939.
- [8] Helo P, Cronin AM, Danila DC, et al. Circulating prostate tumor cells detected by reverse transcription-PCR in men with localized or castration-refractory prostate cancer: concordance with Cell Search assay and association with bone metastases and with survival [J]. *Clin Chem*, 2009, 55(4): 765-773.
- [9] Saad F, Pantel K. The current role of circulating tumor cells in the diagnosis and management of bone metastases in advanced prostate cancer [J]. *Future Oncol*, 2012, 8(3): 321-331.
- [10] De Giorgi U, Valero V, Rohren E, et al. Circulating tumor cells and bone metastases as detected by FDG-PET/CT in patients with metastatic breast cancer [J]. *Ann Oncol*, 2010, 21(1): 33-39.
- [11] Ding Y, Zhang H, Zhong M, et al. Clinical significance of the uPA system in gastric cancer with peritoneal metastasis [J]. *Eur J Med Res*, 2013, 18(1): 28.
- [12] Tomic-Brzac H, Bracic I, Kusacic-Kuna S, et al. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor type-1 as prognostic factors in differentiated thyroid carcinoma patients [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2013, 149(4): 533-540.
- [13] Harbeck N, Schmitt M, Meisner C, et al. Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients [J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(8): 1825-1835.
- [14] Sánchez-Tilló E, de Barrios O, Siles L, et al. ZEB1 promotes invasiveness of colorectal carcinoma cells through the opposing regulation of uPA and PAI-1 [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(5): 1071-1082.
- [15] Schveigert D, Cicens 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.
- [16] 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.