

文章编号:1005-6947(2007)11-1073-03

· 基础研究 ·

甲状腺癌淋巴结微转移的研究

李迅庚, 马宏岩, 金星

(山东大学山东省立医院 普通外科, 山东 济南 250021)

摘要:目的 探讨 MUC1 检测在甲状腺癌淋巴结微转移的可靠性和敏感性。方法 对 488 例甲状腺疾病手术患者于术前 24 h 用 1% 美兰 1.0~2.0 mL 注射于甲状腺结节或周围腺体, 术中显示蓝染淋巴结, 采用 RT-PCR 法测定临床蓝染淋巴结中的 MUC1。结果 蓝染淋巴结显示率甲状腺癌为 93%, 良性病例为 0。研究组 80 个蓝染淋巴结中发现有 MUC1 mRNA 表达的为 95%, 与病理诊断率(86%)相比有提高($P < 0.05$); 良性病变(阴性对照组)淋巴结均不存在 MUC1 mRNA 的表达; 阳性对照组的癌转移性淋巴结均存在 MUC1 mRNA 的表达。结论 MUC1 较病理检查敏感, PCR 产物点杂交进一步证实 MUC1 作为 PCR 标志物有较好的可靠性。 [中国普通外科杂志, 2007, 16(11): 1073-1075]

关键词: 甲状腺肿瘤/病理学; 淋巴结微转移; MUC1

中图分类号: R 736.1

文献标识码: A

Study of lymph node micrometastasis in thyroid carcinoma

LI Xun-geng, MA Hong-yan, JIN Xing

(Department of General Surgery, Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Jinan 250021, China)

Abstract: Objective To evaluate the reliability and sensitivity of detection of thyroid carcinoma lymph node micrometastasis with MUC1. **Methods** In 488 cases of thyroid disease, 1% methylene blue 1.0-2.0 mL was injected into the thyroid nodule or surrounding thyroid tissue 24 hours before operation. The dye-stained lymph nodes were detected at operation and RT-PCR method was used to determine MUC1 in the clinically blue-stained lymph nodes. **Results** The detection rate of the blue-stained lymph nodes in thyroid carcinoma was 93%, and in benign lesions was 0%. In the research group, 80 cases were found to have blue-stained lymph nodes, the detection rate was 95% and was higher than the pathologic diagnostic rate which was 86% ($P < 0.05$). In benign lesions (negative control group), expression of MUC1 mRNA was not found in any lymph node, while the expression of MUC1 mRNA was present in all of the metastatic lymph nodes.

Conclusions MUC1 is more sensitive than pathologic examination in detecting lymph node metastasis. PCR production spot hybridity further confirms that MUC1, as a PCR marker, has satisfactory reliability.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(11): 1073-1075]

Key words: Thyroid Neoplasms/pathol; Lymphatic Micrometastasis; MUC1

CLC number: R 736.1

Document code: A

癌转移的临床检测多靠病理及免疫组化检查, 敏感性较差。目前应用的一种连续切片以诊断微小转移灶检查方法, 可使微转移灶检出率提高^[1], 但费时费力, 不适用于常规检测。MUC1 是多形上皮细胞黏蛋白 (polymorphicepithelialmucin) 的核心蛋白基因, 在甲状腺及甲状腺癌组织中表达。

本文以 MUC1 cDNA 的特异序列为 RT-PCR 引物, 初步探讨采用 RT-PCR 方法, 以 MUC1 mRNA 作为标志物, 用于检测临床甲状腺癌及周围淋巴结微转移, 旨在发现甲状腺癌淋巴结隐匿性微转移, 指导临床手术术式的选择, 以提高甲状腺癌一次性手术的成功率。

1 材料与方法

1.1 临床资料

笔者 2002 年 5 月—2005 年 5 月共检测甲状

收稿日期: 2007-07-09; 修订日期: 2007-09-24。

作者简介: 李迅庚, 女, 吉林松原人, 山东大学山东省立医院主治医师, 主要从事甲状腺、乳腺基础和临床方面的研究。

通讯作者: 李迅庚 E-mail: lixungeng@163.com

腺疾病手术患者 488 例,术后病理诊断甲状腺乳头状癌 127 例,甲状腺滤泡状癌 10 例,甲状腺髓样癌 6 例,结节性甲状腺肿 325 例,桥本氏病 20 例,均经病理检查证实诊断。其中男 72 例,女 416 例;年龄 15~71 岁,中位年龄 40 岁。

1.2 主要实验仪器及试剂

超速低温离心机 (Sorvall super T21 杜邦公司), PCR 扩增仪 (PTC-200TM 美国), 电泳仪 (Power/PAC300 BIORAD), ULTROSPEC II 紫外分光光度计 (LKB Biochrom 公司), GIS 数码凝胶图象分析系统 (上海天能公司)。TRIzol 总 RNA 提取试剂 (GIBCOBRL 公司), RNA-PCR 试剂盒 (Takara shuzo 公司)。引物:购自大连宝生物工程(有限)公司,引物设计参照 Noguchi^[1] 的报道, MUC1 引物:上游引物 CGTCGTGGACATTGATGGTACC; 下游引物 GGTACCTCCTCACCTCCTCCAA, 可扩增 287bp 的 cDN 片段。内标 β -actin 引物:上游引物 CACTGTGTTGGCGTACAGGT; 下游引物 TCATCAC-CATTGGCAATGAG. 可扩增 154bp 的 cDNA 片段。

1.3 研究方法

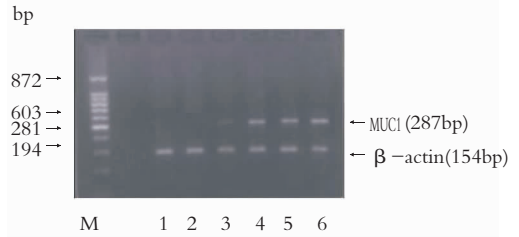
1.3.1 研究分组 1% 美兰 1.0~2.0 mL 于术前 24 h 在甲状腺肿瘤和结节内或周围注射。甲癌 143 例术中显示蓝染淋巴结 1 208 枚 (每例 0~10 枚, 平均 8 枚), 良性病变病例中均无蓝染淋巴结。将摘除之淋巴结标本沿长轴于中间切开, 标号后随机选取一半送常规病理检查 (包括连续切片病理检查), 另一半用锡箔纸包裹后浸入液氮中速冻, 然后置于 -70° 冰箱内保存待测。标本分组: (1) 研究组, 在蓝染的 1 208 枚淋巴结中随机抽取 80 枚测定; (2) 阴性对照组, 取 14 例甲状腺良性病变的淋巴结 15 枚; (3) 阳性对照组, 取 15 例甲状腺乳头状癌肿瘤标本 15 个及病理诊断为转移癌的甲状腺周围淋巴结 15 枚; (4) 正常对照组, 取 25 例甲状腺良性病变中正常侧腺叶的淋巴结 30 枚; (5) 空白对照组。

1.3.2 提取总 RNA 按 TRIzol 试剂说明书提取每例标本的总 RNA, 紫外分光光度仪测量、判定所提取 RNA 的纯度, 要求 OD260/OD280 > 1.7。

1.3.3 RT-PCR 将每例标本的总 RNA 反转录成 cDNA; 在下列反应体系中 PCR: 3 μ L 标本 cDNA, 10 \times Buffer 4 μ L, MUC1 上、下游引物各 1.5 μ L, β -actin 上、下游引物各 0.5 μ L, TaqDNA 聚合酶 0.25 μ L, 灭菌蒸馏水 34.75 μ L。PCR 条件: 94 $^{\circ}$ C 2 min, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 共 30 次循环。

1.3.4 电泳 PCR 产物 5 μ L 在 2% 琼脂糖凝胶

板上电泳, EB 染色, 应用 GIS 数码凝胶图象分析系统记录结果。在 287 bp 处显带者为 MUC1 mRNA 阳性 (附图)。



附图 MUC1 mRNA 表达 1 空白; 2 阴性对照; 3 正常对照; 4 阳性对照; 5 甲状腺癌组织; 6 癌组织淋巴结转移

1.3.5 PCR 产物测序 应用自动测序仪对阳性 PCR 产物测序, 由大连宝生物工程(有限)公司完成。

1.4 统计学方法

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数间的比较用 t 检验。数据用 SPSS11.0 统计软件处理。

2 结果

2.1 基因诊断的灵敏度及特异度

阳性对照组 30 个标本中, 30 个标本均检测到了 MUC1 基因 mRNA 的表达, 诊断灵敏度为 100%。对 RT-PCR 阳性产物测序结果显示, 所检测的 287bp 长度的 cDNA 片段与人类 MUC1 基因 100% 同源。阴性对照组的 15 个标本及正常组织的 30 个标本均未检测到 MUC1 基因 mRNA 的表达, 特异度为 100%。

2.2 实验组标本 MUC1 基因 mRNA 的表达率

研究组中, 80 枚淋巴结中 76 枚检测到了 MUC1 基因 mRNA 的表达, 检出率占 95.0% (76/80)。MUC1 mRNA 的表达阳性者即诊断为淋巴结隐匿性微转移。MUC1 基因 mRNA 在蓝染淋巴结、甲状腺癌及其淋巴结转移癌中表达情况见附表。

附表 MUC1 在甲状腺癌、蓝染淋巴结、正常组织的表达

组别	n	MUC1/ β actin 比值
蓝染淋巴结 (研究组)	80	0.534 \pm 0.021 ^{1), 2)}
甲状腺癌 (阳性对照)	15	0.559 \pm 0.020 ^{1), 2)}
阳性对照	15	0.563 \pm 0.022 ^{1), 2)}
正常组织	30	0.192 \pm 0.018
阴性对照	15	0.052 \pm 0.014
空白对照		0.047 \pm 0.021

注: 1) 与阳性对照组比较, $P < 0.01$; 2) 与正常对照组比较, $P < 0.01$

3 讨论

MUC1 是多型上皮细胞黏蛋白的核心蛋白基因,其表达产物是一类高分子量膜糖蛋白,在正常腺细胞表达很低,在癌组织中存在畸形糖基化和糖基化不完全,使 MUC1 的核心蛋白暴露出新的蛋白表位或新的糖抗原,分布于整个癌细胞表面,可为免疫系统识别,成为肿瘤特异的抗原。再者,MUC1 黏蛋白主要存在于某些上皮性组织和器官中,特别是在所有正常及癌变组织中均表达,而在间叶组织来源的淋巴结中不表达^[2],因此 MUC1 可作为某些上皮性肿瘤发生淋巴结转移的有效标志物。Magrina 等^[3]认为,用 RT-PCR 检测 MUC1 表达可作为甲状腺癌术前细针穿刺分子生物学诊断的依据。Kamprath 等^[4]研究发现,75% 的甲状腺乳头状癌患者细胞胞浆内 MUC1 阳性染色。因此 MUC1 可用于检测甲状腺癌淋巴结微转移。

本研究以 RT-PCR 方法对甲状腺癌及周围淋巴结进行了检测,发现 MUC1 基因在甲状腺癌组织的表达率为 100%,表明 MUC1 mRNA 可作为检测甲状腺癌淋巴结转移的标志物。采用 MUC1 mRNA 分析用于甲状腺癌周围蓝染淋巴结微转移灶的诊断。结果在 80 个淋巴结中有 76 个发现有 MUC1 mRNA 的表达,阳性检出率为 95.0%,与病理诊断率(86.0%)相比有明显提高($P < 0.05$),提示 RT-PCR 检测淋巴结中 MUC1 mRNA 的表达作为一种监测癌细胞淋巴结隐匿性微转移的手段是可行的,可用以指导甲状腺癌患者术中和术后的治疗方案,降低复发率,提高治愈率。

MUC1 在肿瘤发生、发展中起双重作用:一方面,MUC1 异常表达,极性分布丧失,影响细胞表面分子间的相互黏附作用,使肿瘤细胞逃避免疫系统的监视,而利于癌细胞的转移和生长。另一方面,MUC1 本身是一种半抗原,由于糖基化不全,出现新的糖链及肽表位,可诱导抗肿瘤的免疫应答,使 MUC1 成为一种肿瘤生物治疗的靶分子。RT-PCR 检测的敏感性已被公认,但也常出现非特异扩增。由于目前尚无较 RT-PCR 更敏感的方法来对 RT-PCR 的临床检测结果的特异性进行验证^[5-7],本文尝试以酶切分析法及 DNA 点杂交法

对扩增产物进行分析,其根据在于若能证实扩增产物的特异性即可确定 RT-PCR 检测结果的可靠性;同时对临床样品也作了选择,特选了取自非甲状腺癌患者的淋巴结(不存在甲状腺癌转移)来进行 RT-PCR 检测,较全面地考察了本法的特异性,显示 MUC1 作为 RT-PCR 法检测甲状腺癌淋巴结转移的标志基因具有较高的可靠性及应用价值。当然,RT-PCR 检测技术的潜力还受到肿瘤标志物的特异性、样品收集、保存等诸多因素所限,但仍远远敏感于免疫组化法,两者相辅相成。将其应用于其它上皮性肿瘤微转移灶诊断仍有待于进一步的探讨。

本研究结果显示:采用 RT-PCR 法,以 MUC1 mRNA 作为标志物检测临床甲状腺及其区域淋巴结微转移,可判断淋巴结转移和转移的范围,可指导临床手术式选择,有助于提高甲状腺乳头状癌一次性手术的成功率。MUC1 作为 RT-PCR 法检测甲状腺癌区域淋巴结微转移的标志基因具有较高的可靠性及应用价值和前景。

参考文献:

- [1] 钟国辉,易立新,朱湘生,等. 亚甲蓝染色法检测甲状腺乳头状癌淋巴结的临床研究[J]. 中国普通外科杂志,2005,14(9): 651-652.
- [2] Mori M, Mimori K, Inoue H, *et al.* Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction [J]. *Cancer Res*, 1995, 55 (15): 3417-3420.
- [3] Magrina JF, Goodrich MA, Lidner TK, *et al.* Modified radical hysterectomy in the treatment of early squamous cervical cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 1999, 72 (2): 183-186.
- [4] Kamprath S, Possover M, Schneider A. Laparoscopic sentinel node detection in patients with cervical cancer [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2000, 182 (6): 1648-1648.
- [5] Noguchi S, Aihara T, Nakamori S, *et al.* The detection of breast carcinoma micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction [J]. *Cancer*, 1994, 74 (15): 952-956.
- [6] Malur S, Krause N, Kohler C, *et al.* Sentinel lymph node detection in patients with cervical cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2001, 80 (2): 254-257.
- [7] Rhim CC, Park JS, Bae SN, *et al.* Sentinel node biopsy as an indicator for pelvic nodes dissection in early stage cervical cancer [J]. *Korean Med Sci*, 2002, 17 (4): 507-511.