

联合检测外周血 CK19 和 SCCAg mRNA 对早期宫颈癌患者微转移的诊断价值

魏向群¹⁾, 陈艳²⁾, 李瑞敏¹⁾, 张磊¹⁾

(1) 昆明医科大学第三附属医院妇瘤科; 2) 肿瘤研究所, 云南昆明 650118)

[摘要] **目的** 采用 qRT-PCR 技术检测早期宫颈癌患者根治术前外周血中 CK19 和 SCCAg mRNA 表达水平的变化, 研究联合检测外周血 CK19 和 SCCAg mRNA 对早期宫颈癌患者微转移的诊断价值. **方法** 昆明医科大学第三附属医院妇瘤科 30 例早期 (I A₂ ~ II A) 宫颈癌患者为实验组, 15 例子宫肌瘤患者和 15 例健康志愿者为阴性对照组, 15 例晚期 (II B ~ III B) 宫颈癌患者为阳性对照组. 收集外周血样本, qRT-PCR 技术检测外周血 CK19 和 SCCAg mRNA 表达水平的变化. **结果** 实验组外周血中 CK19 和 SCCAg mRNA 表达水平与阴性对照组、阳性对照组比较, 差异有明显统计学意义 ($P < 0.01$); 30 例宫颈癌患者手术前外周血 CK19 和 SCCAg mRNA 阳性检出率分别为 30% (9/30) 和 20% (6/30), 手术前联合检测二者的表达可使阳性检出率提高至 43.3%, 联合检测 2 种标志物的阳性检出率高于检测单一标志物, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$). **结论** 外周血 CK19 和 SCCAg mRNA 表达水平可能作为诊断早期宫颈癌微转移的标志物. qRT-PCR 技术联合检测两项指标, 可提高诊断微转移的敏感度和特异性.

[关键词] 宫颈癌; 微转移; CK19; SCCAg; qRT-PCR

[中图分类号] R737.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2013) 09-0007-06

The Diagnostic Value of Combined Detection of Peripheral Blood CK19 and SCCAg mRNA Expression in The Early Cervical Cancer Micrometastasis

WEI Xiang-qun¹⁾, CHEN Yan²⁾, LI Rui-min¹⁾, ZHANG Lei¹⁾

(1) Dept. of Gynecology; 2) Yunnan Tumor Institute, The 3rd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650118, China)

[Abstract] **Objective** Detect the change of relative expression level and positive rate of peripheral blood CK19 and SCCAg mRNA in early cervical cancer patients before receiving radical hysterectomy by qRT-PCR technique, then study the value of combined detection of peripheral blood CK19 and SCCAg mRNA expression in diagnosis of early cervical cancer micrometastasis. **Methods** Thirty patients with early (I A₂ ~ II A) cervical cancer from the department of gynecological tumors in the third affiliated hospital of Kunming Medical University were selected as experimental group, 15 patients with uterine myoma and 15 healthy volunteers as negative control group, and 15 advanced (II B ~ III B) cervical cancer patients as positive control group. Peripheral blood samples before receiving radical resection of experimental group and the same samples before treatment of control groups were collected. The changes of relative expression level and positive rate of peripheral blood CK19 and SCCAg mRNA were analyzed using qRT-PCR technique. **Results** There was significant difference in relative expression level of CK19 and SCCAg mRNA in the peripheral blood between experimental group and control groups ($P < 0.01$). And the positive rate of CK19 and SCCAg mRNA in the peripheral blood from 30 patients with early cervical cancer before operation in the experimental group was 30% (9/30) and 20% (6/30), respectively. Furthermore, combined

[基金项目] 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目 (2010DC182)

[作者简介] 魏向群 (1964~), 女, 云南通海县人, 医学硕士, 教授, 主要从事妇科肿瘤与妇科内镜临床研究工作.

detection of the expression of the two markers can improve the positive rate to 43.3%, much higher than single marker. There was also significant difference in the positive rate by combined detection of the two markers between the experimental group and control groups ($P < 0.05$). **Conclusion** CK19 and SCCAg mRNA could be used as the specific and suitable molecular markers for the detection of early cervical cancer micrometastasis. The combined detection of relative expression level and positive rate of peripheral blood CK19 and SCCAg mRNA by qRT-PCR array could significantly enhance the sensitivity and specificity for cancer cell detection.

[**Key words**] Cervical cancer; Micrometastasis; CK19; SCCAg; qRT-PCR

宫颈癌在我国是发病率第一的妇科恶性肿瘤,浸润和转移是其致死的主要原因,即使常规病理检查无淋巴结转移,仍有10%~15%的患者出现复发和转移^[1].这就要求笔者寻求可以更早检测到癌细胞的方法.肿瘤细胞进入血循环是肿瘤远处器官转移的重要起始步骤,及时检出循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)有助于临床上制定更有针对性的个体化疗方案,更好地指导临床治疗,从而减少复发和转移,改善患者预后.研究表明,采用多个标志物联合检测可提高准确性.本研究采用实时荧光定量 RT-PCR (real-time quantitative RT-PCR, qRT-PCR) 技术检测早期宫颈癌患者根治术前外周血中 CK19 和 SCCAg mRNA 表达水平的变化,研究联合检测外周血 CK19 和 SCCAg mRNA 对早期宫颈癌患者微转移的诊断价值.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 一般资料 实验组:选取昆明医科大学第三附属医院妇科2010年10月至2012年12月收治的早期(I A2~II A)宫颈癌患者30例,年龄29~65岁,平均(41.73±8.30)岁.采用国际妇产科联盟(FIGO)2009年更新的临床分期标准,其中I A2期患者2例,I B期患者26例,II A期患者2例;鳞癌23例,腺癌及腺鳞癌7例.均未接受放化疗,排除其他内外科合并症及第2种肿瘤.阳性对照组:选取15例临床FIGO分期及宫颈活检确诊为晚期(II B~III B)宫颈癌患者,年龄37~76岁,平均(49.35±1.37)岁,其中II B期患者9例,III B期患者6例,鳞癌12例,腺癌3例,均未接受放化疗;阴性对照组采集昆明医科大学第三附属医院术后病理确诊为子宫肌瘤患者15例,年龄32~55岁,平均(44.75±0.72)岁;排除身体其他疾病.健康体检者15例,年龄23~70岁,平均(43.12±7.23)岁.健康体检未发现内外科疾病.

1.1.2 主要试剂与仪器 总RNA提取试剂盒购自北京康为世纪公司,cDNA合成试剂盒、SYBRGreen实时荧光定量PCR试剂盒购自美国Bio-Rad公司.普通PCR仪为Bio-Rad公司,7500实时荧光定量PCR仪为美国ABI公司.

1.1.3 引物设计 根据荧光定量PCR引物设计基本原则,为避免基因组DNA污染,上下游引物设计为其中一条引物跨越2个外显子的拼接区,CK19、SCCAg及内参基因 β -actin的PCR引物序列来源于PubMed,通过primerbank设计,由上海Invitrogen公司合成.将引物稀释为100 μ M,-20℃冰箱保存备用.

CK19mRNA上游引物:5'-ACCAAGTTTGAGA-CGGAACAG-3',下游引物:5'-CCCTCAGCGTACT-GATTTCCT-3',扩增长度为181 bp.

SCCAgmRNA上游引物:5'-TGAGGTTAAGGC-GGCTAGGA-3',下游引物:5'-CATGGCGTACTCA-TCCCCATC-3',扩增长度:136 bp.

内参基因 β -actin上游引物:5'-CGGGAAAT-CGTGCGTGAC-3';下游引物:5'-CAGGAAGGAA-GGCTGGAAG-3';扩增长度:186 bp.

1.2 方法

1.2.1 外周血的收集 抽取研究对象空腹外周血5 mL,收集血液时为防止皮肤上皮细胞污染,将前面1 mL排掉,经肘静脉采集后面的血液,时间为清晨7点,常温存放于5 mL抗凝管中(枸橼酸钠抗凝剂),摇匀,为防止RNA降解,在采血后半小时内抽提RNA,标本中溶血标本和脂血标本不宜使用.

1.2.2 外周血总RNA提取 参照北京康为世纪公司血液RNA提取试剂盒说明书.1.5 mL全血样本中,加入5倍体积的1×BufferRBL,颠倒混匀.冰上孵育裂解红细胞.4℃,2 100 r/min离心10 min后弃上清.加入3 mL 1×Buffer RBL,充分摇匀,静置.4℃,2 100 r/min离心10 min后弃上清.加入600 μ L Buffer RL,混匀.向已装入2 mL收集管的过滤柱中加入所得液体,4℃,12 000 r/min离心2 min,收集滤液后弃掉过滤柱.向所得滤液中

加入 600 μL 用无 RNase 水配制的 70% 乙醇溶液, 充分颠倒混匀. 离心机 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心 15 s, 取出吸附柱, 将吸附柱重新放回收集管中. 向已放入收集管的吸附柱中加入 700 μL 的 Buffer RW1 溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心 15 s, 弃废液, 吸附柱中加入 500 μL 的 Buffer RW2 溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心 15 s, 弃废液, 重复以上操作 1 次到 2 次. 将吸附柱置于 1.5 μL 无 RNase 离心管中, 加入 30 μL RNase-Free Water, 室温放置 1 min, 12 000 r/min 离心 1 min, 收集 RNA 溶液, 分装 3 管, 每管 10 μL , -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存. 取 2 μL 总 RNA 样品, 1 μL 水稀释; 蒸馏水调零, 记录样品 260 nm 和 280 nm 的吸光度值; 用紫外分光光度仪测定在 260 nm 和 280 nm 的吸收峰值以确定 RNA 的纯度, OD 值在 1.9~2.0 范围内, 进行下一步实验. RNA 总量 (μg): 取 1 μL RNA 样品, 同时依下列公式计算: RNA 总量 (μg) = $40 \times \text{OD}_{260} \times \text{稀释倍数} (\mu\text{g}/\text{mL}) \times \text{总体积} (\text{mL})$. 取 1 μL 的血液总 RNA 在 1% 琼脂糖凝胶中电泳检测, 凝胶电泳紫外灯下照相, 判断 RNA 完整性.

1.2.3 逆转录合成 采用 Bio-Rad 公司 cDNA 合成试剂盒, 参考试剂盒说明书进行, 合成 cDNA 1 μg , 同时设空白对照、阴性对照及阳性对照. 反应体系和反应条件见试剂盒说明书. -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存 cDNA 备用.

1.2.4 实时荧光定量 PCR 扩增 采用 Bio-Rad 公司 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 试剂盒, 参考试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR 扩增. 反应体系: 2 \times SYBR Green PCR Mastermix 25 μL , 20 μM /L 上游引物 1.5 μL , 20 μM /L 下游引物 1.5 μL , 无 RNA 酶的水 17 μL , cDNA 2 μL (50 ng). PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 s, 40 个循环.

1.2.5 标准曲线的制备及线性范围的确定 对于实时荧光定量 PCR, 最为简单、准确的定量方法就是标准曲线法^[2]. 将宫颈癌 HeLa 细胞 cDNA (由云南省肿瘤研究所提供) 作为相对定量标准品, 分别按 1:10 倍稀释得到不同浓度的标准模板, 以起始拷贝数的自然对数为横坐标, 以 Ct 值为纵坐标, 根据公式 $E=10^{-1/\text{slope}}$ 计算实时定量 PCR 扩增效率. 实时荧光定量 PCR 仪自动处理分析数据, 生成 CK19、SCCAg 和 β -actin 基因实时荧光定量 PCR 的标准曲线^[3]. 文献表明, 曲线斜率接近 -3.3 结果最好, 但斜率在 -3.0~-3.9 之间都被认为是可行的^[4]. 扩增曲线扩增曲线相关系数 (R_2) > 0.98 时才符合使用 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 的方法分析 mRNA 相对表

达量的前提条件.

1.2.6 荧光定量 PCR 扩增数据处理 每次定量 PCR 扩增设立宫颈癌 HeLa 细胞 cDNA 作为阳性对照模板, 取健康志愿者外周血 cDNA 作为阴性模板对照、双蒸水为空白对照, 每个标本设 3 个复孔. 采用内参基因 β -actin 校正不同标本间 RNA 的质量和逆转录效率的差异. 用 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 分析计算 mRNA 表达水平^[5]. $\Delta\text{Ct} = \text{目的基因的平均 Ct 值 (样本组)} - \text{内参的平均 Ct 值 (样本组)}$, (1) 采用 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 比较 CK19、SCCAg mRNA 表达水平; (2) 临界值设定为健康对照组相对表达量 95% 的可信区间, 单个标志物相对表达量高于临界值则判断为阳性^[6].

1.3 统计学分析

所有数据采用 SPSS 软件包进行统计处理, 基因相对表达水平的比较采用 H 检验, 采用中位数 \pm 四分位数间距 ($M \pm Q$) 表示; 阳性率的比较采用 χ^2 检验、Fisher's 精确检验进行分析. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 血液总 RNA 提取

提取的血液总 RNA, A260/A280 在 1.8~2.0 之间, 说明所提取的 RNA 纯度较高. 经琼脂糖凝胶电泳检测, 见图 1, 28S、18S 两条带清晰可见, 28S:18S 为 2:1, 且无拖尾现象, 提示完整性好, 可以用于 qRT-PCR 反应.

2.2 实时定量 PCR 扩增效率

CK19 实时定量 PCR 扩增曲线的相关系数为 0.9897, 扩增效率为 99%, 斜率为 -3.30; SCCAg 实时定量 PCR 扩增曲线的相关系数为 0.999, 扩增效率为 100%, 斜率为 -3.38; 内参 β -actin 实时定量 PCR 扩增曲线的相关系数为 0.995, 扩增效率为 99.5%, 斜率为 -3.31. 3 个基因的斜率绝对值差值小于 0.1, 见图 2, 提示 CK19、SCCAg、 β -actin 的扩增效率相似, 符合使用 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 法分析 mRNA 相对表达量的前提条件.

2.3 早期宫颈癌患者根治术前外周血 CK19、SCCAg mRNA 表达水平

实验组术前 CK19 mRNA 的表达水平为 (0.79 \pm 0.69), 阴性对照组健康人群和子宫肌瘤组患者表达水平为 (0.21 \pm 0.12), 阳性对照组晚期宫颈癌组患者表达水平为 (1.69 \pm 0.44), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 实验组术前 SCCAg mRNA 的表达水平为 (0.19 \pm 0.11), 阴性对照组健康人群和子宫肌瘤组患者表达水平为 (0.15 \pm 0.14), 阳性对

照组晚期宫颈癌组患者表达水平为 (1.32 ± 0.21) ，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)，见表 1。

实验组中术前 30 例早期宫颈癌患者外周血 CK19 mRNA 阳性率为 30% (9/30)，SCCAg mRNA 阳性率 20% (6/30)；阴性对照组中，15 例子宫肌瘤患者 1 例 CK19 mRNA 阳性，其 SCCAg mRNA 阴性，15 例健康人群两基因 mRNA 均为阴性；阳性对照组中 15 例晚期宫颈癌患者 CK19 mRNA 阳性率为 60% (9/15)，SCCAg mRNA 阳性率为 46.66% (7/15)，实验组分别与阴性对照组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见表 2。

2.4 联合分析 2 种标志物

临床诊断试验方法：(1) 并联试验，又称平行试验，是同时作多种试验时，任何一种试验阳性便可判断为阳性，全部实验为阴性则判断为阴性。可提高诊断试验的灵敏性；(2) 串联试验，又称系列试验。指在一系列试验中每一项试验为阳性，才可判断为阳性，可提高诊断试验的特异性^[7]。

宫颈癌根治术前联合检测外周血 CK19、

SCCAg mRNA 阳性率，显示并联使用这 2 个标志物可使宫颈癌外周血微转移检出率提高至 43.3%，串联使用两种标志物可使特异性提高至 100%，见表 3，与单一标志物检测相比较，2 种标志物联合检测比单一标志物检测阳性率明显增高，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

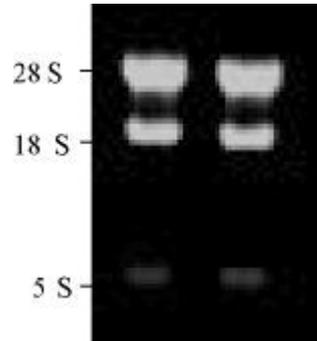


图 1 外周血总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of peripheral blood total RNA

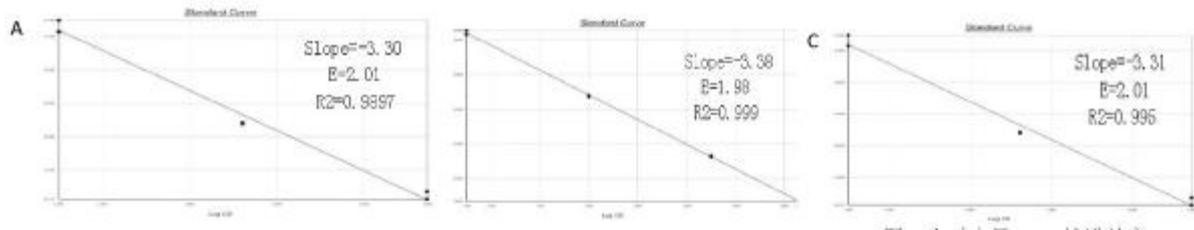


图 2 实时定量 PCR 扩增效率

Fig. 2 qPCR amplification efficiency

A:CK19; B:SCCAg; C:β-actin

表 1 q RT-PCR 检测实验组与对照组外周血 CK19、SCCAg mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The expression levels of CK19 and SCCAg mRNA in peripheral blood from experimental group and control groups detected by qRT-PCR ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	CK19	SCCAg
实验组	30	0.79 ± 0.21	0.69 ± 0.11
阴性对照组	30	0.21 ± 0.12**	0.15 ± 0.14**
阳性对照组	15	1.69 ± 0.44**	1.32 ± 0.21** ^{△△}

与实验组比较 ** $P < 0.01$ ；与阴性对照组比较，^{△△} $P < 0.01$ 。

表 2 q RT-PCR 检测实验组与对照组外周血 CK19、SCCAg mRNA 阳性率 [n (%)]

Tab. 2 The positive rates of CK19 and SCCAg mRNA in peripheral blood from experimental group and control groups detected by q RT-PCR [n (%)]

组 别	n	CK19		SCCAg	
		阳性	阴性	阳性	阴性
实验组	30	9(30.0)	21(17.0)	6(20.0)	24(80.0)
阴性对照组	30	1(3.3)*	30(96.7)*	0(0.0)	30(100.0)
阳性对照组	15	9(60.0) [△]	6(40.0) [△]	7(46.7)	8(53.3) [△]

与实验组比较 * $P < 0.05$ ；与阴性对照组比较，[△] $P < 0.05$ 。

表 3 单一和联合检测早期宫颈癌患者外周血 CK19、SCCAg mRNA 表达阳性率比较

Tab. 3 Comparison of single and combined detection of the positive rates of CK19 and SCCAg mRNA in peripheral blood from patients with early cervical cancer before operation

指标	阳性率 (%)	特异性 (%)
CK19	30.0	95.2
SCCAg	20.0*	79.1*
CK19/SCCAg ^a	43.3	63.3
CK19/SCCAg ^b	6.7*	100.0*

a 并联试验, 任一标志物为阳性, 即为阳性; b 串联试验, 两者均为阳性, 才为阳性. 与同组别 CK19/SCCAg^a 比较, * $P < 0.05$.

3 讨论

微转移是指用常规检查方法如影像常规病理检查方法难以发现的播散并存活于血循环、淋巴结、骨髓及其他组织器官中的肿瘤细胞. 大量实验已经证实微转移检测将有助于宫颈癌早期诊断、监测复发转移、判断患者预后、指导术后辅助治疗等, 且外周血标本与淋巴结、骨髓相比有易获得、创伤性小、可反复采集的优点, 临床较适用. 文献表明, CTCs 有助于早期发现肿瘤的微转移, 可评估预后, 在治疗的监测及个体化治疗上都具有重要意义^[8].

CTCs 是通过诱发新生血管或经周围血管进入循环系统, 目前定义为外周血中由肿瘤原发灶或转移灶释放入血、具有肿瘤特异性抗原或基因特征的肿瘤细胞^[9]. 这些肿瘤细胞从实体瘤间断脱落进入血液系统, 随血流迁移定植在远处器官, 有的处于静息状态, 但可在治疗后多年重新活动, 形成复发, 有的直接侵袭远处部位, 形成新的病灶^[10]. 这些进入血液系统的肿瘤细胞是发生远处转移的前兆, 这意味着依靠传统的检测手段和诊断标准对肿瘤患者确诊时, 可能为时已晚, 而引入 CTCs 这个新工具后的综合评估, 将有助于肿瘤的早期诊断. 虽然 qRT-PCR 很大程度上提高了检测 CTCs 的敏感性, 但是也导致了结果的假阳性, 这使得肿瘤特异性标志物的选择至关重要^[11]. 笔者选择了宫颈癌研究应用较多的 CK19 和 SCCAg.

CK19 片段是一种细胞骨架标志, 在多种上皮类肿瘤的上皮细胞胞浆内表达, 在造血细胞和血细胞无表达. 如果在外周血中检测出 CK19, 理论上可认为有 CTCs 的存在^[12].

本研究结果显示, 宫颈癌根治术术前外周血

CK19 mRNA 表达的阳性率为 30%. 早期宫颈癌患者外周血 CK19 mRNA 的表达水平以及阳性率与晚期宫颈癌患者、子宫肌瘤患者以及健康人群比较, 存在明显差异, 而晚期宫颈癌患者的外周血中比早期患者检测到更多的肿瘤细胞, 这与程玺等的结果基本一致^[13], 提示 qRT-PCR 可以作为外周血 CK19mRNA 表达的检测方法, CK19 mRNA 可以作为检测宫颈癌患者 CTCs 的基因标志物.

SCCAg 是鳞状细胞癌的特异性肿瘤标志物, 随着对 SCCAg 研究的深入, 发现其在间叶组织中不表达, 一般作为鳞状细胞癌微转移的检测指标. 研究表明, SCCAg 和临床病情监测及预后相关. Duk 等^[14]检测 653 例宫颈癌患者显示治疗前 SCCAg 升高, 其复发率是 SCCAg 正常者的 3 倍, 46% ~ 92% 患者在复发之前 (0 ~ 7.8) 个月, 即可检测到 SCCAg 的水平升高. 因此认为血清 SCCAg 水平的检测可预示患者可能存在微转移而用来帮助筛选预后不良患者. Long H 等^[15]通过对经根治术治疗的 960 例 Ib ~ IIb 期宫颈癌患者的髂总淋巴结转移特征、相关危险、治疗及预后进行分析后表明, 治疗前血清 SCCAg 检测 $> 4 \mu\text{g/L}$ 的宫颈癌患者髂总淋巴结转移的风险是治疗后 SCCAg 检测 $\leq 4 \mu\text{g/L}$ 的宫颈癌患者, 淋巴结转移的风险是治疗 SCCAg 检测 $\leq 4 \mu\text{g/L}$ 的宫颈癌患者的 2.3 倍, 提示了以 $4 \mu\text{g/L}$ 为界值对判断髂总淋巴结转移的风险有重要意义. 为宫颈癌的独立预后指标. Stenman 等^[16]采用 RT-PCR 技术检测 15 例患者的外周血 SCCAg 的阳性率为 40% (6/15), 随访 2 a, 6 例 SCCAg 阳性者中 3 例复发, 而 9 例阴性者 1 例复发, 1 例病情进展, 结果显示该指标有助于宫颈癌的分期和预后判断.

现在临床上一般多使用酶联免疫吸附试验检测 SCCAg, 其对宫颈癌有较高的诊断价值. 检测 SCCAg 对宫颈鳞癌患者来说具有双重意义, 既能通过对血清水平的检测来证实治疗效果, 又能对患者的微转移及预后进行判断. 但对早期宫颈癌来说此方法较难反映血中肿瘤细胞的情况. 笔者用 ELISA 和 q-PCR 的方法检测 SCCAg 进行了比较, q-PCR 的方法检出率明显高于 ELISA 的方法 (数据未发表), 提示 q-PCR 的敏感度高, 更容易发现微转移.

笔者研究结果显示, 宫颈癌根治术术前外周血 SCCAg mRNA 阳性率 20%, 与晚期宫颈癌患者、子宫肌瘤患者和健康人群比较, 存在明显差异. 实验组中有一部分腺癌患者, 而实验结果中 SCCAg mRNA 在单纯的宫颈腺癌患者中零表达. 有研究认

为 SCCAg 对腺癌表达不敏感,故 SCCAg 不能单独用作所有宫颈癌的筛查^[7],笔者结果也证实了这一点,SCCAg 只可以作为宫颈鳞癌患者 CTCs 的检测指标。

与单一标志物检测相比,多种标志物联合检测能显著提高检测循环肿瘤细胞的灵敏度。本研究中,笔者应用 qRT-PCR 方法检测宫颈癌患者外周血中 CK19 和 SCCAg mRNA 的表达,提高了诊断的灵敏度。结果显示,宫颈癌患者根治术前 CK19、SCCAg mRNA 的阳性率分别为 30%、20%,CK19、SCCAg mRNA 并联实验后阳性率增加到 44.33%,阳性率显著增加。而串联后特异性为 100%,与单个标志物相比特异性显著增加。且与单个检测 CK19 或 SCCAg mRNA 相比较,CK19 与 SCCAg mRNA 并联标志物检测阳性率增高。

总之,qRT-PCR 检测宫颈患者外周血 CK19、SCCAg mRNA 的表达对监测早期阶段的宫颈癌患者,及时发现宫颈癌患者的微转移,以及预后具有重要的临床意义,多种标志物能够增加检测的灵敏性。虽然宫颈癌的微转移研究大部分采用淋巴结检测,但用外周血检测 CTCs 能够提供一种简单、非创伤的早期检测宫颈癌微转移的方法。然而,这些分子标志物的临床应用还需要大量患者的随访资料来进一步证实。

[参考文献]

- [1] BENEDET J,ODICINO F,MAISONNEUVE P,et al Carcinoma of the cervix uteri FIGO annual report on the results of treatment in gynecology cancer [J]. *Epidemiol Biostat*, 1998,3(1):5-34.
- [2] KELD,CHEN Z,YUNG W K. A reliability test of standard-based quantitative PCR exogenous endogenous standards[J]. *Mol Cell Probes*,2000,14(2):127-135.
- [3] CASTELLO R,ESTELLES A,VAZQUEZ C,et al. Quantitative real-time reverse transcription-PCR assay for urokinase plasminogen activator,plasminogen activator inhibitor 1, and tissue metalloproteinase inhibitor type 1 gene expressions in primary breast cancer [J]. *Clin Chem*, 2002,48(8):1288-1295.
- [4] VELDEN V H,HOCHHAUS A,CAZZANIGA G,et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR:Principles, approaches, and laboratory aspects [J]. *Leukemia*,2003,17(6):1013-1034.
- [5] LIVAK K J,SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta CT} Method [J]. *Methods*,2001,25(4):402-408.
- [6] 沈长新. 实时荧光定量PCR检测外周血循环肿瘤细胞的研究[D]. 武汉:华中科技大学,2009.
- [7] LLOYD J M,MELVER C M,STEPHENSON SA,et al. Identification of early-stage colorectal cancer Patients at risk of relapse Post-resection by immunobead reverse transcription-PCR analysis of peritoneal lavage fluid for malignant cells[J]. *Clin Cancer Res*,2006,12(2):417-423.
- [8] 余泽前,周家华. 肿瘤微转移研究进展[J]. *国际外科学杂志*,2007,34(8):536-540.
- [9] MAVROUDIS D. Circulating cancer cells [J]. *Annals of Oncology*,2010,21(suppl.7):95-100.
- [10] BIREHMEIER C,BIRCHMEIER W,GHERARDI E, et al. Metastasis motility and more [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2003,4(12):915-925.
- [11] ZACH O,LUTZ D. Tumor cell detection in peripheral blood and bone marrow [J]. *Curr Opin Oncol*,2006,18(1):48-56.
- [12] 张宏伟,于晓锋,王晓杰. RT-PCR 法检测非小细胞肺癌患者外周血CK19mRNA的临床意义[J]. *中国肿瘤临床*,2005,32(18):1042-1044.
- [13] 程玺,蔡树模,李子庭,等. 宫颈癌患者淋巴结CK19mRNA 的检测及其临床意义[J]. *中国癌症杂志*,2006,16(1):926-930.
- [14] DUK J M,GROENIER K H,DE BRUIJN H W,et al. Pre-treatment serum squamous cell carcinoma antigen;a newly identified prognostic factor in early-stage cervical carcinoma [J]. *J Clin Oncol*,1996,14(1):111-118.
- [15] HUANG L,ZHENG M,LIU J H,et al. Risk factors and prognosis of I B-II B cervical carcinoma with common iliac lymph node metastasis [J]. *Chin J Cancer*,2010,29(4):431-435.
- [16] STENMAN J,LINTULA S,HOTAKAINEN K,et al. Detection of squamous cell carcinoma antigen expressing tumour cells in blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in cancer of the uterine cervix [J]. *Int J Cancer*, 1997,74(1):75-80.
- [17] 连利娟. 林巧稚妇科肿瘤学[M]. 第4版. 北京:人民卫生出版社,2006:343-353.

(2013-06-12 收稿)