本研究探讨了 OCT 抑制人胃癌细胞株 MKN45 生长的作用机制,为 OCT 及其他 SS 类似物治疗胃实体瘤提供了一定的实验依据。

参考文献:

[1] Patel YC. Somatostatin and its receptor family [J]. Front Neuroendocrinol, 1999,20(3):157—198.

[2] Berruti A, Dogliotti L, Mosca A, et al. Effects of the somatostatin analog lanreotide on the circulating levels of chromogranin—A, prostate—specific antigen, and insulin—like growth factor—1 in advanced prostate cancer patients [J]. Prostate, 2001,47(3):205—211.

[3] Sharma K, Patel YC, Srikant CB. C—terminal region of human somatostatin receptor 5 is required for induction of Rb and G_1 cell cycle arrest [J]. Mol Endocrinol, 1999,13(1):82—90.

[4] Sharma K, Patel YC, Srikant CB. Subtype—selective induction of wild—type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3 [J]. Mol Endocrinol, 1996,10(12):1688—1696.

[5] Stetak A, Lankenau A, Vantus T, et al. The antitumor somatostatin analogue TT—232 induces cell cycle arrest through PKCdelta and c—Src [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001,285(2):483—488.

[6] Charland S, Boucher MJ, Houde M, et al. Somatostatin inhibits Akt phosphorylation and cell cycle entry, but not p42/p44 mitogen—activated protein (MAP) kinase activation in normal and tumoral pancreatic acinar cells [J]. Endocrinology, 2001,142(1):121—128.

[7] 王消冰,王 绪,张南征.奥曲肽抑制人胃癌细胞株 MKN45 的生长[J].徐州医学院学报,2002,22(4):307—309.

收稿日期:2002—01—22 **修回日期:**2002—05—13

本文编辑:吴 进

RT—PCR 测定非小细胞肺癌骨髓微转移*

王 伟[1],刘得林[2],朱广迎[2]

(1.徐州医学院附属医院胸心外科,江苏 徐州 221002;2.徐州医学院肿瘤研究所,江苏 徐州 221002)

摘要:目的 探讨 RT—PCR 法检测非小细胞肺癌骨髓微转移的临床可行性。方法 以 CK19 mRNA 作为标记物,运用 RT—PCR 方法检测 41 例非小细胞肺癌手术患者骨髓中 CK19 mRNA 的表达,并以肺癌组织作为对照。结果 肺癌组织中 CK19 mRNA 表达的阳性率 100%,41 例非小细胞肺癌患者骨髓中 CK19 mRNA 阳性 15 例,阳性率 36.64%,非肿瘤对照组均阴性。结论 以 CK19 mRNA 作为肿瘤标记物,用 RT—PCR 法作为检测骨髓中肺癌微转移的手段是敏感和可行的。

关键词:逆转录聚合酶链反应;肺肿瘤;角蛋白;微转移

中图分类号:R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1000—2065(2002)04—0312—03

Detection of bone marrow micrometastasis of non—small cell lung cancer by reverse transcriptase—polymerase chain reaction

WANG Wei, LIU De—lin, ZHU Guang—ying

(Department of Thoracic Cardiovascular Surgery, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: Objective To study the clinical possibility of detectiing bone marrow micrometastasis in patients with non—small cell lung carcinoma (NSCLC) by reverse transcriptase—polymerase chain reaction(RT—PCR). **Methods** Using CK19 mRNA as a marker, RT—PCR was employed to examine the specific expression of CK19 mRNA in the cancer tissue and bone marrow in 41 operable NSCLC. The results were compared with those of the controls of non—tumorous patients. **Results** The positive rate of CK19 mRNA in lung cancer tissue was 100%. Among 41 patients of NSCLC, 15 bone marrow samples were positive for CK19 mRNA, with the positive rate being 36.64%. However, no bone marrow samples from normal volunteer were positive. **Conclusion** RT—PCR amplification of CK19 mRNA is a sensitive and useful method to detect bone marrow micrometastasis in patients with lung cancer.

Key words: reverse transcriptase—polymerase chain reaction; lung neoplasms; keratin; micrometastasis

自 1869 年 Ashworth 首次证实在肿瘤患者的外周血中发现癌细胞以来,肿瘤微转移的概念在实践中逐步得到认识,并成为近年来肿瘤转移研究的热点[1]。免疫学和分子生物学技术的发展使肿瘤微转

* **作者简介:**王 伟(1967—),男,江苏徐州人,主治医师,硕士。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

移的检测成为现实。由于骨髓组织内存在大量网状结缔组织,它可以对经过血流的癌细胞起滤过作用,释放入血的癌细胞经过骨髓时即被扣留,因此骨髓已成为目前最理想的肿瘤微转移检测器官[2]。本研究在国外有关实验[3]基础上,以 CK19 mRNA 作为肺癌的组织特异性标记物,应用 RT－PCR 技术,从基因水平检测其在可手术非小细胞肺癌(NSCLC)患者骨髓中的表达。

1 材料和方法

1.1 *标本* NSCLC 患者肿瘤组织及骨髓标本,均取自徐州医学院附属医院胸心外科接受手术治疗的患者,共 41 例。同期非肿瘤患者 18 例。术前全麻状态下抽取肝素化骨髓标本 5 ml 经液氮速冻,于－80 ℃低温保存。另于手术中切取一小块新鲜肿瘤组织,经液氮速冻后转入－80 ℃冰箱保存。

1.2 *主要试剂和引物* 逆转录试剂盒购自 GIBICO 公司,DEPC(焦炭酸二乙酯)购自 Amresco 公司,Trizol 为 MBI 公司产品,淋巴细胞分离液为上海恒信化学试剂有限公司产品,Taq 酶、DNA Marker 购自 Sangon 公司,6－mer 引物、dNTPs、溴化乙锭、琼脂糖为华美公司产品。

参考文献[4]设计 CK19 特异性引物序列,由 Sangon 公司合成。CK19 上、下游引物分别为:5′－AGG TGG ATT CCG CTC CGG GCA－3′、5′－ATC TTC CTG TCC CTC GAG CA－3′,扩增片段长度为 460 bp。另设计看家基因 3－磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde－3－phosphate dehydrogenase,GAPDH)基因作为内参照,以检验 RNA 的完整性,其上、下游引物序列为[5]:5′－CGG AGT CAA CGG ATT GGT CGT AT－3′、5′－AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC－3′,扩增 306 bp 片段。

1.3 *总 RNA 的提取与鉴定* 骨髓标本用淋巴细胞分离液进行有核细胞的分离,Trizol 试剂溶解细胞。硫氰酸胍－酚－氯仿一步法抽提总 RNA[6]。取 50～100 mg 肺癌组织行总 RNA 抽取。对所抽取的总 RNA 进行紫外分光光度定量,并行 1%琼脂糖凝胶电泳观察。

1.4 *cDNA 第一链合成与 PCR 扩增 CK19 mRNA* 取样品总 RNA 约 2 μg 加入 20 μl 反应体系中按照试剂盒提供的条件进行逆转录。CK19 一步 PCR 反应体系 30 μl,其中 10×缓冲液 3.5 μl,Taq 酶 1 U,4 种 dNTPs 各 200 μmol,$MgCl_2$ 2 mmol,CK19 上下游引物各 1.6 mmol,GAPDH 上下游引物各 0.8 mmol。反应条件:95 ℃预变性 5 min,循环扩增 30 次,95 ℃,30 s,63 ℃,50 s,72 ℃ 1 min,最后 72 ℃补延伸 5 min,冰上冷却。

1.5 *PCR 产物分析* CK19 mRNA 扩增产物 5 μl 加上样缓冲液 1 μl 在 1.7%琼脂糖凝胶上电泳,80 V 恒压,60 min,溴化乙锭染色,在 UVP 凝胶成像系统下摄片。

1.6 *统计学处理* 采用 χ^2 检验进行统计学处理,检验水准:$\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 *CK19 检测结果* 以肺癌组织的 cDNA 为模板特异性扩增 460 bp 基因片段为 CK19 阳性表达。为校正取样不均一性及加样量的误差,在 PCR 扩增中以表达较为稳定的 GAPDH 基因为内参照,其扩增条带为 306 bp。扩增结果表明:CK19 mRNA 在 41 例肺癌组织中均为阳性,骨髓标本中 CK19 mRNA 阳性 15 例,阳性率 36.64%(图 1);18 例非肿瘤患者骨髓标本均为阴性。

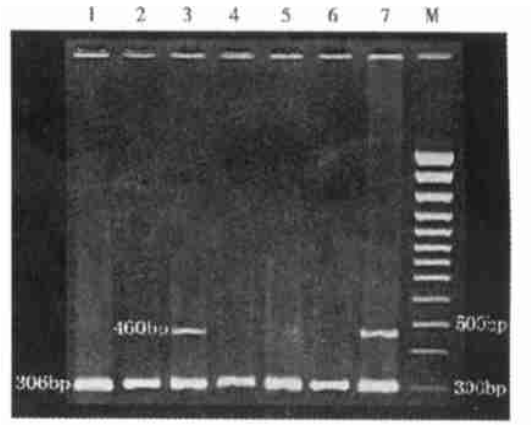

图 1 M 为 DNA Marker,1～6 为 6 例肺癌患者外周血 CK19 mRNA 检测结果,其中 3、7 泳道出现 460 bp 条带,为 CK19 mRNA 阳性

2.2 *骨髓微转移与临床病理指标的关系* 表 1 结果显示 NSCLC 患者骨髓微转移与其细胞分化程度及分期均存在密切关系($P<0.05$)。

表 1 NSCLC 患者骨髓微转移与肿瘤分化程度及临床病理分期的关系[例(%)]

临床病理指标	n	阳 性	阴 性
肿瘤分化程度			
低分化	13	8(61.5)*	5(38.5)
中、高分化	28	7(25.0)	21(75.0)
临床病理分期			
Ⅰ、Ⅱ	20	4(20.0)*	16(80.0)
Ⅲ	21	11(52.4)	10(47.6)

组间比较:* $P<0.05$

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨 论

细胞角蛋白(cytokeratin, CKs)广泛存在于上皮组织细胞中,而在间叶组织中缺乏表达,因此它已成为上皮细胞和上皮性肿瘤细胞较为敏感和特异的标记物[7]。国外大多数研究证实,CK19 在间叶组织中无转录,而在正常肺组织及其癌组织中稳定表达,因此适合作为 NSCLC 微转移检测的分子标记[3]。本研究中,41 例肺癌组织均存在 CK19 的表达,证实了 CK19 具有很高的特异性。

本研究观察到 NSCLC 患者骨髓微转移与肿瘤细胞分化程度、临床病理分期均有密切关系。分化程度差和晚期肺癌患者 CK19 有较高的表达率,这与 Richard 等[8]的报道相一致。

本组的研究对象为临床上认为可以手术的 NSCLC 患者,并以现有的临床检查手段无法证实其存在肿瘤转移。从结果看有较高的骨髓微转移率,但微转移的存在并非意味着肿瘤的全身性转移。目前多数观点认为癌细胞进入血液和淋巴循环仅是肿瘤转移多阶段、多步骤中的一步,转移最终是否形成受到癌细胞自身生物学特性、机体免疫状态、局部微循环等多种因素的影响。但微转移的存在至少预示着转移危险性增加[9]。我们正对参与实验的患者进行随访,并扩大样本数,以便进一步阐明微转移与肺癌复发、转移的关系。

参考文献:

[1] Ronald AG, Juan R. Polymerase chain reaction in the detection of micrometastases and circulating tumor cells[J]. Cancer, 1996, 78(1): 10-16.

[2] Klaus P, Jakob I, Bemward P, et al. Frequency and prognostic significance of isolated tumor cells in bone marrow of patients with non-small cell lung cancer without overt metastases[J]. Lancet, 1996, 347(30): 649-653.

[3] Peck K, Sher YP, Shih JY, et al. Detection and quantitation of circulating cancer cells in the peripheral blood of lung cancer patients[J]. Cancer Res, 1998, 58(13): 2761-2765.

[4] Noguchi S, Aihara T, Motormura K, et al. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction[J]. Am J Pathol, 1996, 148(2): 649-656.

[5] Toyota M, Ho C, Ahuja N, et al. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification[J]. Cancer Res, 1999, 59(10): 2307-2312.

[6] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biolchem, 1987, 162(1): 156-159.

[7] Traweek ST, Liu J, Battifora H, et al. Keratin gene expression in non-epithelial tissue-detection with polymerase chain reaction[J]. Am J Pathol, 1993, 142(4): 1111-1118.

[8] Richard JC, Edward JB, Benjaporn C, et al. Detection of occult bone marrow micrometastases in patients with operable lung carcinoma[J]. Ann Surg, 1995, 222(4): 415-425.

[9] Wolfgang J, Stephan G, Christina K, et al. Prognostic significance of an increased number of micrometastatic tumor cells in the bone marrow of patients with first recurrence of breast carcinoma[J]. Cancer, 2000, 88(10): 2252-2259.

收稿日期:2002-02-13 **修回日期:**2002-06-08

本文编辑:吴 进

浅低温心脏不停搏心内直视手术对心肌保护作用的临床研究*

周晓彤[1],王志萍[2], 薛 涛[1],孙全胜[1],张中明[1]

(1.徐州医学院附属医院胸心外科,江苏 徐州 221002;2.徐州医学院附属医院麻醉科)

摘要:目的 探讨浅低温心脏不停搏心内直视手术对心肌的保护作用。方法 采用静脉复合麻醉,全身肝素化,常规插管,在浅低温心脏不停搏及低温心脏停搏状态下分别行房间隔缺损或室间隔缺损修补术各 20 例,观察 2 组患者术中体外循环时间、最低鼻咽温度,术后 48 h 内各时间点收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、心率(HR)、中心静脉压(CVP)、体温(T)以及术后呼吸机支持时间,心包、纵隔引流量等。结果 不停搏组体外循环时间较停搏组明显缩短,转流期间最低灌注压和最低鼻咽温度明显高于停搏组;不停搏组术后血流动力学稳定,而停搏组入室后 2 h 时 SBP 较入室时显著降低($P<0.05$),且术后升压药使用例数、输血例数及心率失常发生例数均较不停搏组多;入室 24 h 时停搏组体温较不停搏组升高($P<0.05$),术后呼吸机支持时间较不停搏组明显延长($P<0.05$)。结论 浅低温不停搏心脏手术有很好的心肌保护作用。

* **基金项目:**江苏省教育厅资助课题(00KJB 320011)

作者简介:周晓彤(1968-),男,江苏徐州人,讲师,主治医师,硕士。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net