

中山大学

硕士学位论文

食管鳞癌患者术前外周血CK19mRNA的表达及其临床意义

姓名：廖洪亮

申请学位级别：硕士

专业：肿瘤学

指导教师：林鹏

20100526

食管鳞癌患者术前外周血 CK19mRNA 的表达及其临床意义

专 业： 肿瘤学

硕士生： 廖洪亮

导 师： 林 鹏 副教授

中文摘要

背景:

食管癌是常见的恶性肿瘤,我国的食管癌发病率、死亡率居世界首位,2005年全国食管癌新发病例为185211例,估计每年约20万人死于食管癌。尽管食管癌的诊断和治疗的技术不断提高,可切除食管癌术后的5年生存率一直徘徊在30%左右。治疗失败的主要原因是局部复发和远处转移,而部分复发或转移的原因可能是行手术时已经存在常规病理检查无法发现的微转移。早期发现这些微转移并进行针对性治疗是提高食管癌治疗效果的有效途径,但目前临床上尚缺食管癌微转移的有效诊断手段。

目前,检测肿瘤微转移方法主要有:传统组织病理切片、免疫组织化学(IHC)、流式细胞学及聚合酶链反应(PCR)和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)等。RT-PCR无论是在敏感性还是特异性方面均优于其它方法,目前有大量肿瘤微转移的研究利用这种方法。由于多数实体瘤细胞缺乏肿瘤特异性基因,目前对微转移的研究多采用组织特异性基因。用于检测微转移上皮细胞组织特异性基因以细胞角蛋白最为常见。细胞角蛋白表达于正常上皮细胞和上皮癌细胞中,而在间叶组织来源的器官如血液、骨髓、淋巴结等中不表达,已经广泛应用于很多研究,尤其是其家族中的CK19。CK19 mRNA作为上皮特异性标志物,正常的食管上皮和食管癌组

织中存在高表达, 可以作为检测非上皮组织中食管癌肿瘤细胞存在的有用标志物。本研究组已经成功应用 RT-PCR 技术完成了对根治性术前食管鳞癌骨髓 CK19mRNA 的表达与临床、病理及预后关系的研究, 结果表明骨髓 CK19mRNA 的表达是其的预后差的独立预后因素。但骨髓取材是有创检查, 相对外周血更费时、疼痛, 不易得到术前或非手术患者的配合。目前认为血液中循环肿瘤细胞的存在是血源性播散并引起远处转移的预测性指标, 其出现是一个预后差的独立预后因素。外周血的检测相对于骨髓而言则方便了许多, 并且可以反复多次地采血, 易于动态观察外周血中肿瘤细胞的变化, 可以对疾病的诊断和辅助治疗有动态的指导意义。

本研究将利用 RT-PCR 技术, 检测根治性食管鳞癌患者术前外周血 CK19mRNA 的表达, 探讨其表达与临床、病理及预后的关系。

材料和方法:

(1) 建立食管癌外周血微转移模型, 进行微转移检测以确定其敏感性: 应用 10 倍稀释法, 分别在 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 和 0 个食管癌 EC81 细胞株中置入健康人 10^7 外周血单核细胞 (PBMN), 建成含不同 EC81 细胞数体外食管癌微转移模型, 行 CK19mRNA 的 RT-PCR 反应检测其敏感性。

(2) 食管及肺良性肿瘤患者外周血标本进行微转移检测以确定其特异性: 选择中山大学肿瘤防治中心自 2006 年 10 月到 2007 年 5 月间收治的 20 例食管及肺良性肿瘤患者, 术前空腹采集外周静脉血标本, 行 CK19mRNA 的 RT-PCR 反应检测其特异性。

(3) 行根治性食管鳞癌患者手术前外周血 CKmRNA 的表达: 收集中山大学肿瘤防治中心自 2006 年 10 月到 2007 年 5 月间收治的食管癌根治性手术患者 62 例, 术前空腹采集外周静脉血标本, 行 CK19mRNA 的 RT-PCR 反应检测其外周血 CK19mRNA 的表达情况。

(4) 收集实验数据、临床及随访资料, 进行统计学分析, 评估 62 例患者外周血 CK19mRNA 表达与临床病理因素之间及预后的关系。

结果:

CK19 mRNA RT-PCR 法检测食管癌外周血微转移的敏感性为 10^{-7} , 特异性为 100% (20例食管肺良性肿瘤患者行无一例表达), 是较好的食管癌外周血微转移检测方法。本研究中, 62例行根治性食管鳞癌患者中, CK19 mRNA在10例患者有表达, 阳性率为16.1% (10/62)。CK19 mRNA 的表达与根治性食管鳞癌患者的临床病理因素 (如: 性别、年龄、肿瘤位置、临床分期、肿瘤浸润深度、淋巴结转移情况、肿瘤细胞分化程度) 之间均没有相关性, 术后随访1-40个月, 平均26.4个月, 随访期间33例复发或转移 (33/62, 53.2%), 其中外周血CK19mRNA阳性患者复发或转移9例 (9/10, 90%), 外周血CK19mRNA阴性患者复发或转移24例 (24/52, 46.2%)。行根治性术前外周血CK19 mRNA阳性的患者有较高的复发率和有较差的生存期 (Fisher's Exact Test, $P=0.015$), 有较短的无瘤生存期 (Mann-Whitney U, $p=0.02$), 有较常见的肿瘤相关性死亡 (Fisher's Exact Test, $P=0.029$), 统计学均有差异。多因素分析表明行根治性食管鳞癌患者术前外周血CK19mRNA是其预后较差的独立预后因素 ($p=0.011$, RR, 6.528, 95% CI, 1.287~6.786)。

结论:

RT-PCR法检测食管癌患者外周血CK19mRNA的表达具有较高敏感性和特异性。CK19mRNA可以用来作为检测食管鳞癌患者外周血微转移的分子标志物。行根治性手术的食管鳞癌患者术前外周血CK19mRNA表达与临床病理因素之间无关, 术前外周血CK19 mRNA阳性的患者有较高的复发率和有较差的生存期。外周血CK19 mRNA的表达是其预后较差的独立预后因素。

关键词

外周血、食管癌、微转移、RT-PCR

CK19 mRNA expression in the peripheral blood of preoperative patients with esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance

Major: Oncology

Name: Liao Hongliang

Supervisor: Associate Professor Lin Peng

Abstract

Background

Esophageal cancer (EC) is the eighth most common cancer worldwide .The morbidity and mortality in china is on the top with 185,211 new cases in 2005 and almost 20,000 deaths each year. Despite some improvements achieved in diagnosis and treatment during recent decades, the 5-year survival rate in resectable patients with EC is still about 30%, and the failure is principally owned to local recurrence and remote micrometastasis of which the existing micrometastasis that cannot be detected by routine pathologic method is the major reason. Therefore early detecting the existence of micrometastasis and treating accordingly in time may improve the outcome of this subset of EC. However, there is no available assured diagnostic tool for the micrometastasis in EC at present.

Until now, most studies about micrometastasis have been carried out with the

tissue specific gene, due to lack of the tumor specific gene in the solid tumor cell. Cytokeratin (CK) was widely-used to detect micrometastasis as tissue gene of epithelium. Owing to organs or tissues such as bone marrow, blood, lymph node which originate from the mesenchyma do not normally express epithelial cell related genes, many studies have used cytokeratin(CK), especially CK19 (CK family clan) , as highly epithelial-specific histological marker, which are regularly and abundantly expressed by epithelial cells and their malignant descendents. CK19 mRNA is specific for epithelium and has been found to be highly expressed in normal esophageal epithelium and esophageal squamous carcinoma cells, so it serves as a good marker for the presence of esophageal cancer cells. Our previous study had explored the correlation between preoperative CK19 mRNA expression of bone marrow with the clinicopathologic features and prognosis in EC patients who underwent radical surgical resection, and the result was that none of these clinicopathologic features showed a statistically significant correlation with CK19 mRNA expression and CK19 mRNA expression was found to be an independent predictor of a poor outcome. Peripheral blood sample test is less invasive and pain, time-saving, more convenient and compliable. After some controversial findings in the beginning of the research on CTC it could be clearly shown in recent years, that the detection of CTC in the blood of tumor patients is a valid new parameter to monitor disease progression and to optimize therapy.

This study aimed to ascertain a possible correlation between CK19 mRNA expression with the clinicopathologic features and prognosis in resectable EC.

Material and method

(1) In vitro micrometastasis model system of peripheral blood of EC was detected in order to determine its sensitivity: In vitro EC micrometastasis model systems were established by adding respectively 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 and 0 of EC81 line cells to 10^7 PBMN of healthy volunteers by 10-fold serial dilution ,and then

determine the sensitivity of CK19mRNA by RT-PCR.

(2) Benign tumor of esophagus and lung was detected in order to determine their specificity: candidates who were diagnosed as benign tumors of esophagus or lung patients in the cancer center of YAT-SEN SUN University from October 2006 to May 2007 were enrolled in this study. Their peripheral blood sample was drawn pre-operatively on an empty stomach, and CK19mRNA expression was detected by RT-PCR to determine the specificity.

(3) Detecting CK19 mRNA expression in the peripheral blood of patients with EC before radical surgical resection: Sixty-two patients with EC underwent radical surgical resection at the Cancer Center of Sun Yat-Sen University from October 2006 to May 2007 were enrolled in this study. The peripheral blood specimen got pre-operatively on an empty stomach, and then CK19mRNA expression was detected by RT-PCR.

(4) Collecting the data from above experiment, relative clinicopathologic features and follow-up, reveal the correlation between CK19mRNA expression in peripheral blood, clinicopathologic features and prognosis by statistics analysis in this 62 patients.

Result

CK19 mRNA RT-PCR was a delightful method for detecting EC cells in the peripheral blood with the sensitivity of 10^{-7} and the specificity of 100% (20 benign pulmonary and esophageal disease patients who was assessed via CK19 mRNA RT-PCR, showed no signs of epithelial malignancy). In this study, 16.1% (10/62) were positive expression of CK19 mRNA in patients with EC underwent radical surgical resection. CK19 mRNA expression had no correlation with the clinicopathologic features such as age, gender, tumor location, TNM staging, pT, pN and tumor cell differentiation. With a follow-up of 1 to 40 months mean 26.4 months, 33 patients (33/62, 53.2%) developed tumor recurrence or metastasis, patients with CK19 mRNA positive in peripheral blood have 9 cases (9/10, 90%), 24

patients (24/52,46.2%) with CK19mRNA-negative in peripheral blood developed tumor recurrence or metastasis). Patients with CK19 mRNA positive in peripheral blood had earlier recurrence and shorter survival after radical surgery (Fisher's Exact Test , $P=0.015$) ,shorter disease free survival (Mann-Whitney U, $p=0.02$) , more Tumor-related death (Fisher's Exact Test , $P=0.029$) .In multivariate analysis, CK19mRNA was found to be an independent predictor of a poor outcome ($p=0.011$, RR, 6.528, 95%CI, 1.287~6.786).

Conclusion

Detection of CK19mRNA expression in peripheral blood of EC patients by RT-PCR has high sensitivity and specificity, CK19 mRNA may be used as a molecular maker to detect peripheral blood micrometastases in patients with EC. None of clinicopathologic features showed a statistically significant correlation with CK19 mRNA expression . patients with CK19 mRNA positive in peripheral blood had earlier recurrence and shorter survival after radical surgery.CK19mRNA expression in peripheral blood was found to be an independent predictor of a poor outcome.

Key words

Peripheral blood; Esophageal cancer; Micrometastasis; RT-PCR.

中英文缩写词

逆转录聚合酶链反应	reverse-transcriptase polymerase chain reaction ,RT-PCR
食管鳞癌	esophageal cancer ,EC
细胞角蛋白	cytokeratin ,CK
微转移	micrometastasis
免疫组织化学	immunocytochemistry, IHC
外周血单核细胞	peripheral blood mononuclear cells, PBMN
流式细胞学	flow cytometry
癌胚抗原	carcino-embryonic antigen, CEA
鳞状上皮细胞癌抗原	squamous cell carcinoma, SCC
循环肿瘤细胞	circulating tumor cell, CTC
孤立肿瘤细胞	isolated tumor cells, ITC
播散肿瘤细胞	disseminated tumor cells, DTC

论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：邵晓

日期：2010年5月26日

学位论文使用授权声明

本人完全了解中山大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留学位论文并向国家主管部门或其指定机构送交论文的电子版和纸质版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆、院系资料室被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，可以采用复印、缩印或其他方法保存学位论文。

学位论文作者签名：邵晓

日期：2010年5月26日

导师签名：—

日期：2010年5月26日

食管鳞癌患者术前外周血 CK19mRNA 的表达及其临床意义

专 业： 肿瘤学

硕士生： 廖洪亮

导 师： 林 鹏 副教授

第一章 引 言

食管癌是常见的恶性肿瘤，其发病率在全世界恶性肿瘤中占第八位^[1]，据统计，2008年美国食管癌新发病例约为16,470人，死亡14,280人^[2]。食管癌在全球许多地区流行，特别是发展中国家^[3]。我国的食管癌发病率、死亡率居世界首位^[4]，2005年全国食管癌新发病例为185211例，估计我国每年约20余万人死于食管癌，占全球50%左右^[5]。尽管食管癌诊断和治疗技术不断提高，可切除食管癌患者术后的治疗效果并不理想。西方国家报道单纯外科治疗5年生存率15-24%，总的5年生存率<10%^[6]，日本Teruo Kakegawa^[7]报道食管切除术后5年生存率42%，我国报道的5年生存率约为30%左右，治疗失败和死亡的主要原因是局部复发和远处器官的转移^[8]。

食管癌TNM分期的制定对于食管癌的治疗有重要的指导意义，N分期中区域淋巴结转移，是影响食管癌预后的重要因素。理论上早期行根治切除术后食管癌患者5年生存率应达70%，然而临床这类患者复发、转移率可高达30%-50%^[9,10]。复

发或转移的部分原因可能是行根治性手术时已经存在常规病理检查无法发现的微转移^[11,12]。Kijima^[12] 等用RT-PCR技术对 21 例食管癌患者400 枚淋巴结进行 CEA mRNA 检测：结果373个传统病理阴性的淋巴结，CEA mRNA检测其中有79例阳性，并且CEA mRNA 淋巴结阳性者复发率显著高于阴性者。在常规病理检查淋巴结阴性的食管癌患者，骨髓和淋巴结内的孤立肿瘤细胞检出率可分别高达40%和25%~50%^[13]。目前研究认为肿瘤出现局部复发和显性转移是由这些微转移发展而来。

循环肿瘤细胞(circulating tumor cell ,CTC)的概念是由 1869 年 Ashworth 首次在 1 例因癌症死亡的患者外周血发现肿瘤细胞时提出的。1889 年出版的 Steven Paget' s 的种子与土壤理论一定程度上阐述了肿瘤转移与原发肿瘤的关系。历史上曾经用微小残存病灶、孤立肿瘤细胞、播散肿瘤细胞和微量转移细胞等名词描述微转移。然而孤立肿瘤细胞与微量转移细胞其实并不是同一概念，孤立肿瘤细胞主要是存在于淋巴结、骨髓和血液里面的单个肿瘤细胞或细胞簇^[13]。微转移通常伴有恶性活性的组织学证据，如接触血管壁或淋巴窦壁而溢出，引起血管外基质反应和肿瘤细胞增殖^[14]，通常只能靠组织学检查诊断。而孤立肿瘤细胞则不伴有组织学的恶性证据，诊断包括形态学上和非形态学上的方法，一般 RT-PCR 和流式细胞学等非形态学上的方法比免疫组化等敏感性和特异性高。微转移由 Huvos1971 年提出，目前的标准是将脱离原发灶的恶性肿瘤细胞在远处组织中增值为直径 1mm -2mm^[15,16]。目前，大多数认同微转移的概念为：非血液系统恶性肿瘤细胞播散并存活于血循环、淋巴道、骨髓以及肝、肺等组织器官中生长形成常规检查方法如 CT、MRI、普通病理检查等难以发现微转移灶^[17]。将存在于骨髓或血液里的称为微转移细胞，将在骨髓的为播散肿瘤细胞（DTC），外周血的为循环肿瘤细胞（CTC）^[14]。

目前检测微转移的标本主要有淋巴结、骨髓、外周血等。淋巴结微转移的检测主要通过对术后常规病理检查阴性淋巴结标本检测，了解淋巴结微转移情况及其与常规病理检查对比及预后之间的关系，可以为个体化治疗提供一定的帮助，有学者认为淋巴结微转移的检测可以完善TNM分期^[12,18-22]。Sato^[18]等角蛋白免疫

组化方法检测50例pN0期根治性食管癌患者的1840枚淋巴结,发现20例患者29个淋巴结存在微转移,多因素分析淋巴结的微转移与预后无关。然而Tajima等^[21]和Kodama等^[22]对早期食管癌研究表明有50%的区域淋巴结存在微转移,并且淋巴结微转移的存在是其预后较差的独立预后因素。目前对骨髓和外周血主要是播散和循环肿瘤细胞的研究。有研究表明肿瘤在发生发展的早期阶段即可有骨髓的转移,骨髓是肿瘤细胞向靶器官转移的中继站^[23]。骨髓中的血管有过滤和集中肿瘤细胞的作用,使得单位体积骨髓中细胞含量是血液的数倍,因此骨髓微转移的检出率要较外周血高。骨髓微转移的研究较外周血广泛,很多大样本的研究表明骨髓内播散肿瘤细胞的存在是预后差的独立的预后因素,患者骨髓中肿瘤细胞的检出率均可达30%~50%^[24-28], Braun^[24]等荟萃了包括I, II和III期4703例乳腺癌患者的分析表明:骨髓播散肿瘤的检出率为30.6%,这些乳腺癌患者一般较大的肿瘤,更高的组织分化,及更加常见的淋巴结转移和雌激素受体阴性, ($P<0.001$), 且骨髓播散肿瘤阳性率与患者总生存期和无病生存期明显相关,多因素分析骨髓播散肿瘤阳性是一个预后差的独立预后因素。Passlick等^[25]对139例非小细胞肺癌患者行骨髓播散肿瘤细胞检测分析,结果也同样认为播散肿瘤细胞阳性是一个预后差的独立的预后因素。Matsunami K等^[26]对行根治性手术的胃癌患者骨髓播散肿瘤细胞研究,53例患者中有16例阳性,阳性率为30%,得到了和Braun、Passlick类似的结论。Kaif^[27]等检测了136例食管癌患者的骨髓的CXCR4,结果证明骨髓微转移对于肿瘤生存期及总生存期都有统计学意义。本课题组^[28]已经完成对食管癌骨髓播散肿瘤细胞检测,其阳性率为21.3%。并且认为食管癌骨髓CK19mRNA的表达是其预后差的独立预后因素。但骨髓取材是有创检查,相对外周血更费时、疼痛,不易得到术前或非手术患者的配合。目前认为血液中循环肿瘤细胞的存在是血源性播散并引起远处转移的预测性指标,其出现是一个预后差的独立预后因素^[29-31]。外周血的检测相对于骨髓而言则方便了许多,并且可以反复多次地采血,易于动态观察外周血中循环肿瘤细胞的变化,可以对疾病的诊断和辅助治疗有动态的指导意义。

目前,随着免疫学和分子生物学技术的发展,微转移的检测也由组织水平、细胞水平发展到分子水平。检测微转移与播散肿瘤细胞的方法主要有:常规病理切片免疫组化(Immunocytochemistry, IHC)、流式细胞学(Flow cytometry)及聚合酶链反应和逆转录聚合酶链反应(Reverse-transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)等。常规病理切片相对简单,但由于连续切片法的检出率与切片的厚度和病理医师的经验有关,且费时费力,近年已很少使用。免疫组化(IHC)染色技术比较简便,其原理利用抗原抗体反应,筛选带有显色剂的特异性抗肿瘤细胞相关抗原的单克隆抗体,对受检的组织进行抗原抗体反应。外周血属间叶组织,针对肿瘤细胞表面非间叶组织来源的抗原进行免疫组化染色,一旦外周血成分中出现染色阳性的细胞,再结合阳性细胞所具备的恶性特征即可认为在外周血中检测的循环肿瘤细胞,敏感性一般 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ 之间^[32]。流式细胞技术:利用抗肿瘤细胞的单克隆抗体结合荧光物质使肿瘤细胞染色,然后通过流式细胞仪筛选,以得到阳性荧光细胞,优点是对整个组织进行分析,可在相对短的时间内通过一个或多个参数对上万个细胞进行分析,敏感性一般在 10^{-5} 左右,但这种方法耗时相对太长,价格也较昂贵^[33]。

PCR技术由Mullis 1985年发明并荣获诺贝尔奖,它利用肿瘤细胞中某些标志性基因的异常突变进行PCR扩增检测,从而确定标本中是否有肿瘤细胞存在。主要缺点是检测到异常的DNA序列并不意味着受检样品中存在一定存在有活性的肿瘤细胞,因为DNA分子相对稳定,DNA扩增的DNA片段既可是正常的肿瘤细胞也可是衰老破坏的肿瘤细胞。反转录聚合酶链反应(RT-PCR)以肿瘤或其他组织中提取的RNA,在反转录酶和特异核苷酸序列的引物的共同作用下进行RT-PCR扩增。RT-PCR是对某一肿瘤或者组织特定基因在mRNA水平的表达检测,故其检测微转移的敏感性和特异性均优于其它方法,其敏感性一般在 $10^{-6} \sim 10^{-7}$ 之间^[34]。RNA分子在细胞外环境中很不稳定,RT-PCR是检测检测组织或者体液中的标志物的RNA的存在,可以表示检测到具有活性的肿瘤细胞的存在。目前肿瘤微转移的研究多采用这种方法进行。

RT-PCR检测为肿瘤微转移的关键是选择合适的肿瘤细胞靶基因。目前肿瘤细胞靶基因主要包括两类:(1)肿瘤特异性基因:某种肿瘤细胞具有其所特有基

因mRNA的表达,并且几乎所有的这种肿瘤细胞均有表达,正常组织一般不伴有这些改变,检测该肿瘤特异性基因可诊断微转移。如p53、ras、DCC、erb-B2、及尤文氏瘤家族所特有的嵌合性EWS/PLI-1、EWS/ERG等^[35];(2)组织特异性基因:指在肿瘤起源组织中存在,而在其他组织中不存在,即指非肿瘤细胞所特有,肿瘤细胞及其相应正常组织均表达的基因。如CK19、MUC1,为上皮组织所特有,在正常上皮和上皮性肿瘤均有表达,但间叶组织来源的正常循环血液和骨髓中的细胞不表达^[36]。目前,由于多数实体瘤细胞缺乏肿瘤特异性基因,检测这类肿瘤多采用组织特异性基因mRNA。临床上应用于检测微转移的上皮细胞组织特异性基因主要有细胞角蛋白(CK)、癌胚抗原(CEA)、基质金属蛋白酶(MMPs)、粘蛋白-1(MUC1),及PSA等,其中以细胞角蛋白(Cytokeratin, CK)的应用最为广泛。细胞角蛋白存在于正常上皮细胞和上皮癌细胞中,为细胞骨架的组分之一,CK分子又不同的亚型,相对分子质量为 $40 \times 10^3 - 68 \times 10^3$,已知至少包括20个成员(CK1-CK20),分为酸性CK和碱性CK两大家族。细胞角蛋白在表达于正常上皮细胞和上皮癌细胞中,而在间叶组织如血液、骨髓、淋巴结等中不表达,其作为上皮细胞特异性标记物广泛用于检测上皮来源肿瘤微转移,是目前国内外公认的、最常见的上皮性组织特异性标志物,被认为是检测微转移的敏感标记物。其中又与其家族中的CK19应用最为广泛。CK19 mRNA 基因定位于人染色体17q21 ~ q23,编码细胞角蛋白19 亚型^[37]。CK19 属酸性(I型)细胞角蛋白,分子量为 40 kDa,是单层上皮细胞特有的细胞骨架结构,在所有的单层上皮细胞中表达,在淋巴结和血细胞中不表达。自20世纪90年代以来CK19 mRNA作为上皮细胞的一个标志物,被广泛应用于上皮来源肿瘤的术后淋巴结、骨髓以及外周血中微转移的检测,显示了很高的敏感性和特异性,包括乳腺癌^[31-34]、肺癌^[30]、胃癌^[38]、结肠癌^[39]等肿瘤的检测。食管癌的骨髓和外周血方面的微转移研究国内外均较少。

本研究组已经成功应用RT-PCR技术完成了对根治性术前食管鳞癌骨髓CK19mRNA表达与临床、病理及预后关系的研究,^[28]结果表明应用RT-PCR方法检测食管鳞癌患者骨髓CK19mRNA表达具有较高的敏感性和特异性,可作为检测食管癌患者骨髓播散肿瘤细胞的一种有效手段。食管鳞癌患者术前骨髓CK19mRNA表达

与临床病理因素之间无关,但骨髓CK19mRNA阳性患者预后较差,有较高复发风险和死亡风险,多因素分析表明骨髓CK19mRNA表达是食管癌患者预后差的独立预后因素。本研究中将应用RT-PCR技术检测根治性食管鳞癌患者外周血中CK19mRNA表达,探讨RT-PCR方法检测食管癌患者外周血CK19mRNA表达的敏感性和特异性,检测根治性食管鳞癌患者术前外周血中CK-19mRNA的表达情况,探讨其表达及其与临床、病理及预后之间的关系。

第二章 材料与方法

2.1.临床资料

2.1.1 研究对象

研究组：根据入选标准收集中山大学肿瘤防治中心 2006 年 10 月到 2007 年 5 月食管癌根治性手术患者 67 例，全部患者给予术前血常规、生化常规、胸部正侧位片及食管吞钡、胸部及上腹部 CT、电子胃镜，明确一般状态及有无远处转移，大多数患者行肿瘤标志物癌胚抗原(carcino-embryonic antigen CEA)及鳞状上皮细胞癌抗原(squamous cell carcinoma SCC)检查。根据术后病理 2 例为腺癌，3 例为不典型增生，给予剔除，逐对其中的 62 例患者进行分析：男性 43 例，女性 19 例；年龄在 40 岁到 75 岁之间，中位年龄 57.5 岁，60 岁以下 36 例，60 岁以上 26 例；肿瘤位置：胸上段 4 例，胸中段 32 例，胸下段 26 例；肿瘤细胞分化：高分化 16 例，中分化 35 例，低分化 11 例；按照国际抗癌联盟(UICC)1997 肿瘤 TNM 分期标准，术后病理分期：I 期：5 例，II 期：31 例，III 期：26 例。T1、T2、T3、T4 的患者分别为 6 例、9 例、44 例、3 例；N1 患者为 25 例，N0 患者为 37 例（见表 1

入选标准

- (1) 术后病理为鳞癌
- (2) 术前未行放化疗或其他治疗
- (3) 术前检查未发现远处转移
- (4) 既往无其他恶性肿瘤病史
- (5) 获得患者或家属知情同意书

剔除标准

- (1) 术后病理为腺癌
- (2) 术前检查发现其他系统恶性肿瘤

对照组：选择同期在我院 20 例食管及肺良性肿瘤患者，其中男性 13 例，女性 7 例，年龄在 27~68 岁之间，中位年龄 50 岁，术后病理食管平滑肌瘤 3 例，肺炎性假瘤 8 例，肺错构瘤 5 例，肺结核 4 例。

2.2. 实验标本的取材

空腹采集外周静脉血 6ml，分成两份，为了避免正常上皮细胞的污染，每一次抽血先弃去一开始的 2ml 血，再抽出 3ml 血，用 乙二胺四乙酸 (EDTA) 二钠抗凝，立即分离 PBMN。方法见下。

2.3. 主要试剂和仪器

2.3.1 实验细胞株

本实验所用食管癌细胞株 EC81 由中山大学肿瘤防治中心实验研究部所提供。

2.3.2 实验试剂及设备

2.3.2.1 一般试剂和器械:

NIKON 倒置显微镜、SANYO 细胞培养箱、ESCO 净化工作台、高纯度 CO₂ 和 CO₂ 罐、Millipore 水纯化装置、高压蒸气灭菌锅、25cm² 培养玻璃瓶、细胞计数板、玻璃刻度吸管、0.22μm 滤膜、滤器、磁力搅拌器、1×PBS 溶液、天平、量筒等。

DMEM 培养液 (Gibco 公司)、小牛血清 (FCS, Sigma)、0.25%胰蛋白酶 (1×PBS 溶液配制、加入 0.5mM EDTA)、青霉素、链霉素、DEPC、琼脂糖粉、无水乙醇、异丙醇、氯仿、TBE 电泳缓冲液

2.3.2.2 主要仪器和设备

-86℃低温冰箱	Thermo electron corporation
台式高速低温离心机 (Centrifuge 5403)	Eppendorf
PCR 仪 (2720)	美国 ABI 公司
紫外-可见分光光度仪 (Ultrospec 2000)	Pharmacia Biotech
电泳仪及电泳槽	BIO-RAD
核酸蛋白分析仪 DU640	美国 BECKMAN 公司
DL-5-B 低速大容量离心机	上海安亭科学仪器厂
倒置显微镜	日本 Olympus
凝胶成像系统 (GelDoc)	BIO-RAD

2.3.2.3 主要试剂

Trizol	invitrogen 公司
DNA Marker	大连 TaKaRa 公司 (货号: DL2000)
TaKaRa RNA PCR Kit	大连 TaKaRa 公司 (货号: DRR019A)
PCR 引物合成	Invitrogen 公司
PCR 引物测序	Invitrogen 公司

2.3.2.4 PCR 引物序列

CK19: 扩增片断 470bp。

Primer1: 5' -TCCGAACCAAGTTTGAGACG-3'

Primer2: 5' -TTCCAAGGCAGCTTTCATG-3'

β -actin: 扩增片断 619bp。

Primer1: 5' -CGGGACCTGACTGACTACCTCA-3'

Primer2: 5' -TCAAGAAAGGTGTAACGCAACTA-3'

2.4. 实验方法

2.4.1 细胞培养

2.4.1.1 培养用品的清洗、消毒和 DMEM 培养液配制

玻璃培养瓶、培养瓶盖子、玻璃离心管、DMEM 培养液 (使用前加入过滤除菌的青霉素和链霉素)、0.25% 胰蛋白酶消化液

DMEM 培养液使用前加 15% 小牛血清和无菌的青霉素和链霉素。

2.4.1.2 EC81 细胞培养

2.4.1.2.1. EC81 食管癌细胞株的复苏和传代

(1) 将我室液氮保存的 EC81 细胞株取出, 37℃ 温水浴不时摇动使其尽快迅速解冻;

(2) 75% 酒精消毒后转入预先加入 2ml 培养液离心管中, 室温 1000rpm 离心 5min 弃上清, 收集细胞;

(3) 加入 6ml 15% 小牛血清含双抗的 DMEM 培养液 DMEM;

(4) 37℃ 5%CO₂ 温箱培养, 至 90% 汇合度才传代。

2.4.1.2.2 EC81 食管癌细胞株传代

- (1) 待细胞株长满培养瓶后, 去掉培养瓶中的原培养液;
- (2) 用 2ml 的 1×PBS 溶液, 洗掉原培养液;
- (3) 加入 1.5ml 0.25%胰蛋白酶(含 1mM EDTA);
- (4) 37℃ 消化 1~5min, 显微镜下观察待几乎全部细胞变圆, 加入 2ml 15%小牛血清含双抗的 DMEM 培养液 DMEM 终止消化;
- (5) 用弯头吸管, 反复吹打细胞至脱落和成单过细胞;
- (6) 吸细胞悬液至无菌玻璃离心管, 1000rpm 室温离心 3~5min; 弃上清;
- (7) 在沉淀的细胞中加入 5ml 15%小牛血清含双抗的 DMEM 培养液, 按照 1:5 传代至新的培养瓶中。

2.4.2 体外食管癌微转移模型的建立

- (1) 将新复苏的细胞培养 4-5 代后, 按上述 EC81 食管癌细胞株传代步骤, 制成 1×PBS 细胞悬液 (用 1×PBS 重悬细胞);
- (2) 取 20ul 显微镜下计数;
计数公式: 细胞数 (个) = 4 大格细胞数之和 ÷ 4 × 10⁴
- (3) 用 1×PBS 稀释细胞到 100ul 含有 10⁶ 个;
- (4) 以 10 倍稀释法稀释到 10⁵ 个/100ul、10⁴ 个/100ul、10³ 个/100ul、10² 个、10¹ 个、10⁰ 个/100ul 的不同梯度的细胞悬液;
- (5) 在 7 个无菌离心管中, 先放入 100ul 健康人外周血单核 (PBMN) 10⁷ 个细胞/管;
- (6) 在每一管中, 分别加入上述不同细胞梯度的 EC81 食管癌细胞悬液各 100ul; 制成食管癌微转移模型细胞悬液。即每 10⁷ 个外周血单核 (PBMN) 细胞含有 10⁵、10⁴、10³、10²、10¹、10⁰、0 个食管癌细胞。

2.4.3 RT-PCR CK19 敏感性的测定

2.4.3.1 细胞株总 RNA 的提取:

- (1) 匀浆化作用: 取食管癌微转移模型细胞悬液, 加入 1ml Trizzol, 用枪头反复吹打 20 次, 室温下放置 5 分钟。

(2) 相分离: 加入 0.2ml 氯仿, 用力摇晃 15 秒, 室温下放置 10 分钟, 之后置入离心机, 4℃下 12000 转/分离心 15 分钟。离心后分为三层: 下层为红色苯酚氯仿, 中间层和上层无色的水样层, RNA 全部在水样层。

(3) RNA 沉淀: 转移上层水样层至 RNase-free 的 1.5ml 离心管中, 加入 0.5ml 异丙醇混匀, 室温下放置 10 分钟, 置入离心机, 4℃下 12000 转/分离心 10 分钟。

(4) RNA 洗涤: 弃去上层液体, 留底下白色沉淀, 加入 DEPC 水配置的 75 %乙醇 1ml, 漩涡振荡后置入离心机, 4℃下 7500 转/分离心 15 分钟。

(5) RNA 再溶解: 用枪头除尽乙醇, 室温下放置 5 分钟, 将酒精全部挥发。加入 20 μ l DEPC 水, 55 度水浴 10 分钟后, 置-80℃冰箱保存备用。

2.4.3.2 细胞 RNA 的纯度与浓度测定

取 2 μ l RNA 液体加入 98 μ l DEPC 水, 用紫外分光光度仪检测吸光度值 (OD260 和 OD280 值), 计算 RNA 的纯度和浓度。OD260/OD280 值应在 1.8~2.0 之间。若低于此范围, 可能有蛋白污染; 若高于此范围, 则所提取的 RNA 降解, 需重新提取。

利用如下公式计算 RNA 浓度:

$$\text{RNA 浓度 (ug/u1)} = (\text{OD260} - \text{OD320}) \times \text{稀释倍数 (50)} \times 0.04$$

2.4.3.3 逆转录合成 cDNA

(1) 根据紫外分光光度仪所测量的 RNA 浓度, 计算 total RNA X μ l (保证 RNA 500ng 左右)

(2) 按照 mRNA 反转录试剂盒使用说明书进行操作, 在冰上按下列组成配制逆转录液, 之后振荡混匀。

MgCl ₂	2 μ l
10 \times RT Buffer	1 μ l
RNase Free H ₂ O	(4..75-X) μ l
dNTP Mixture (10mM)	1 μ l
RNase Inhibitor	0.25 μ l
AMV Reverse Transcriptase	0.5 μ l
Random 9 mers	0.5 μ l
Total RNA	X μ l
总量	10 μ l

(3) 按以下条件进行逆转录反应:

30 $^{\circ}$ C	10min
50 $^{\circ}$ C	30min
99 $^{\circ}$ C	5min
5 $^{\circ}$ C	5min

立即 PCR 反应或储存于-20 $^{\circ}$ C冰箱。

2.4.3.4 PCR 反应

(1) 按照 mRNA 反转录试剂盒使用说明书进行, 配制 PCR 反应液

5 \times PCR Buffer	10 μ l
灭菌蒸馏水	28.75 μ l
TaKaRa Ex Taq HS	0.25 μ l
Primer 1 (10 μ M)	0.5 μ l
Primer 2 (10 μ M)	0.5 μ l
总量	40 μ l

(2) 把 PCR- (1) 的反应液加入到逆转录合成 cDNA - (2) 中

(3) 按以下条件进行 PCR 反应

①预变性条件: 94 $^{\circ}$ C, 5 分钟;

②延伸反应条件: 热循环数 30 次, 解链温度 94 $^{\circ}$ C持续 45 秒, 退火温度 57 $^{\circ}$ C持续 30 秒, 延伸温度 72 $^{\circ}$ C持续 45 秒;

③修补延伸条件: 72 $^{\circ}$ C, 5 分钟。

PCR 产物立即行琼脂糖凝胶电泳或置于 -20°C 保存备用

2.4.4 RT-PCR CK19 特异性的测定及食管癌外周血 CK19mRNA 的测定

2.4.4.1 外周血单核细胞 (PBMC) 的提取

- (1) 抗凝管 3ml 血标本 室温 1800rpm 10min;
- (2) 弃去血浆, 加入 3ml 低张红细胞裂解液 (2%EDTA 6ml+500mlNS);
- (3) 吹匀, 直至血标本呈深暗红色 (裂解的红细胞);
- (4) 另一 1.5ml 离心管加入 3ml 淋巴细胞分离液, 将裂解的红细胞液缓慢加入淋巴细胞分离液中,
- (5) 离心 1800rpm, 20min, 此时可分为三层, 取中间单核细胞层 (云雾层), 置于 1.5ml 离心管中。
- (6) 10000rpm, 5min; 倒掉上清液。
- (7) 沉淀加入 300ul RNA 保护液, 置于无菌冻存试管中。
- (8) 先置于 -4°C 中过夜, 后置于 -80°C 保存。

2.4.4.2 RT-PCR 检测食管及肺良性病变和食管癌外周血标本 CK19 mRNA 的表达

2.4.4.2.1 细胞总 RNA 的提取

(1) 匀浆化作用: 取 3ml 外周血单核细胞冻存液, 解冻后移入 1.5ml 离心管, 离心机 4°C 下 1000 转/分离心 5 分钟, 弃去上清液, 底层细胞沉淀加入 1ml Trizol, 用枪头反复吹打 20 次, 室温下放置 5 分钟。

(2) 相分离: 加入 0.2ml 氯仿, 用力摇晃 15 秒, 室温下放置 10 分钟, 之后置入离心机, 4°C 下 12000 转/分离心 15 分钟。离心后分为三层: 下层为红色苯酚氯仿, 中间层和上层无色的水样层, RNA 全部在水样层。

(3) RNA 沉淀: 转移上层水样层至 RNase-free 的 1.5ml 离心管中, 加入 0.5ml 异丙醇混匀, 室温下放置 10 分钟, 置入离心机, 4°C 下 12000 转/分离心 10 分钟。

(4) RNA 洗涤: 弃去上层液体, 留底下白色沉淀, 加入 DEPC 水配置的 75%乙醇 1ml, 漩涡振荡后置入离心机, 4°C 下 7500 转/分离心 15 分钟。

(5) RNA 再溶解: 用枪头除尽乙醇, 室温下放置 5 分钟, 将酒精全部挥发。加入 20 μ l DEPC 水, 55 度水浴 10 分钟后, 置 -80℃ 冰箱保存备用。

2.4.4.2.2 细胞 RNA 的纯度与浓度测定

方法同 (2.4.3.2)

2.4.4.2.3 逆转录合成 cDNA

方法同 (2.4.3.3)

2.4.4.2.4 PCR 反应

方法同 (2.4.3.4)

2.4.5: RT-PCR 扩增产物分析

(1) 制备琼脂糖凝胶: 将琼脂糖溶解于电泳缓冲液中, 加热熔化后加入 EB 摇匀, 配制成含 EB (0.5 μ g/ml) 的 2% 琼脂糖凝胶, 倒入电泳槽中水平板, 注意不留气泡, 冷却后倒入电泳缓冲液。

(2) 点样: 取 4 μ l DNA Marker (DL-2000) 与 2 μ l DNA loading Buffer 混匀后进行点样, 取 6 μ l PCR 产物与 2 μ l DNA loading Buffer 混匀后进行点样。

(3) 电泳并进行拍照: 将电泳仪接通电源, 电压 90V, 35 分钟, 观察样本电泳条带情况, 电泳完毕, 在紫外灯下观察各条带并拍照。将结果逐一登记。

2.5: 随访及预后

生存期即确诊之日至末次随访日或死亡时间, 随访截止至 2010 年 3 月 22 日, 生存期最短 1 个月、最长 40 个月, 平均 26.4 个月。无瘤生存期即确定之日至肿瘤复发转移或死亡或末次随访日, 无瘤生存期最短 1 个月, 最长 40 个月, 平均 24.21 个月。

2.6: 统计分析

用统计软件 SPSS16.0 作为统计分析工具, 采用 Frequencies、卡方检验、Fisher 确切概率法、Mann-Whitney U 检验、Kaplan-Meier 法计算生存率, Log rank 法进行生存率显著性检验, Cox 比例风险回归模型进行单因素及多因素分析, logistic 多因素回归分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

第三章 实验结果

3.1 细胞总 RNA 的提取

3.1.1 细胞总 RNA 纯度的测定

实验所提取细胞总 RNA 经紫外分光光度仪分析, OD_{260}/OD_{280} 的比值均在 1.8~2.0 之间, 无 DNA 及蛋白质的污染。

3.1.2 细胞总 RNA 行内参基因 β -actin 的 RT-PCR 分析结果

本实验所提取细胞总 RNA 均行 β -actin 的 RT-PCR 检测, 电泳结果均见 β -actin 之 619bp 扩增条带出现 (见图 1), 表明提取的细胞总 RNA 是完整的, 逆转录合成的 cDNA 也充足。

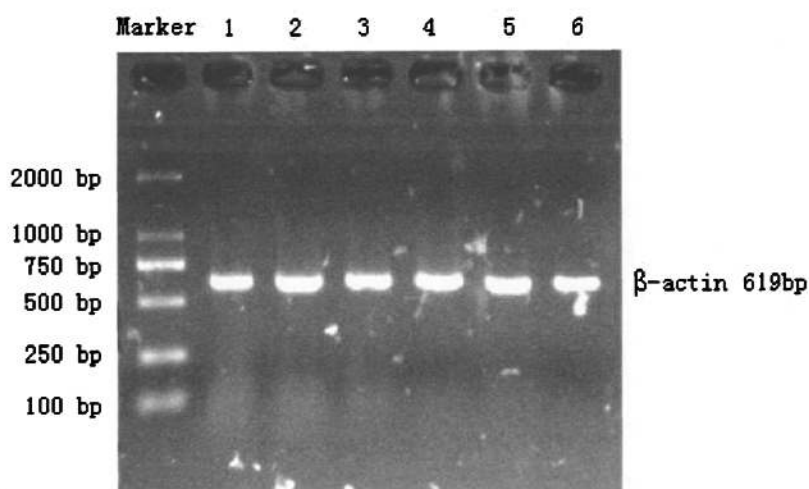


图 1 细胞总 RNA 均行 β -actin RT-PCR 检测电泳结果

3.2. RT-PCR 产物序列测定

本实验将 CK19 RT-PCR 产物进行序列测定分析（见图 2），并通过基因数据库（www.ncbi.nlm.nih.gov）与 CK19 DNA 序列配比，结果表明 RT-PCR 扩增产物为 CK19 DNA 片断。

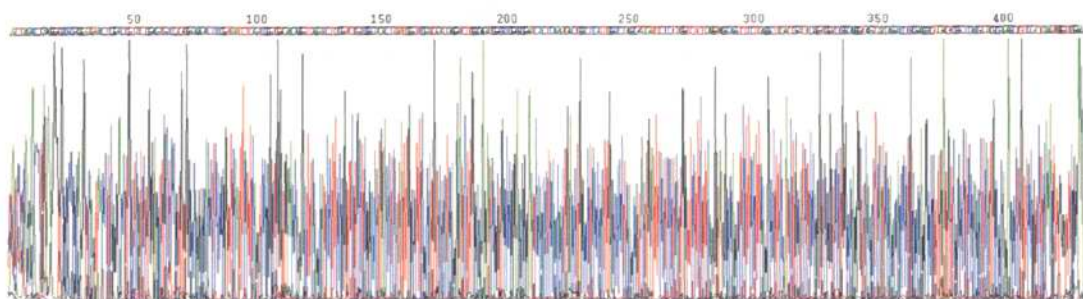


图 2 CK19 RT-PCR 产物测序图

3.3. RT-PCR 技术检测食管癌细胞株 CK19 mRNA 表达的敏感性

本实验在 6 个数量级细胞密度中，表明使用 RT-PCR 方法可在 10^7 个正常外周血单核细胞中检测出一个表达 CK19mRNA 的食管癌细胞，其敏感性较高。（见图 3）

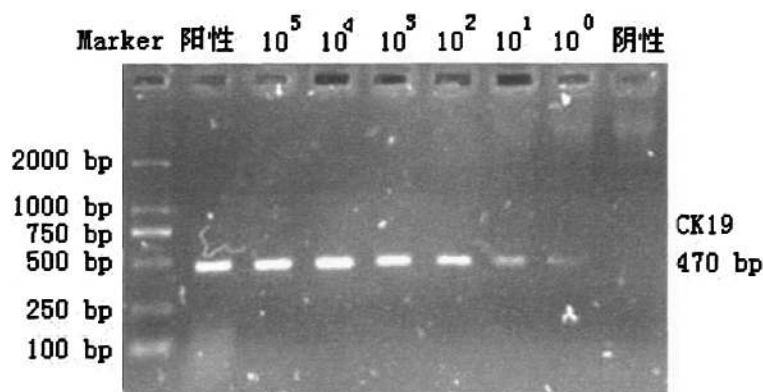


图 3 不同食管癌细胞浓度的 CK19mRNA RT-PCR 检测电泳结果

3.4. RT-PCR 技术检测 CK19 mRNA 表达的特异性

本实验中, 对 20 例食管及肺良性病变患者外周血标本行 CK19 mRNA 的 RT-PCR 分析后, 均未检测出 CK19mRNA 的表达 (见图 4) 表明本实验 RT-PCR 所用引物检测食管癌患者外周血 CK19mRNA 表达具有较好特异性。

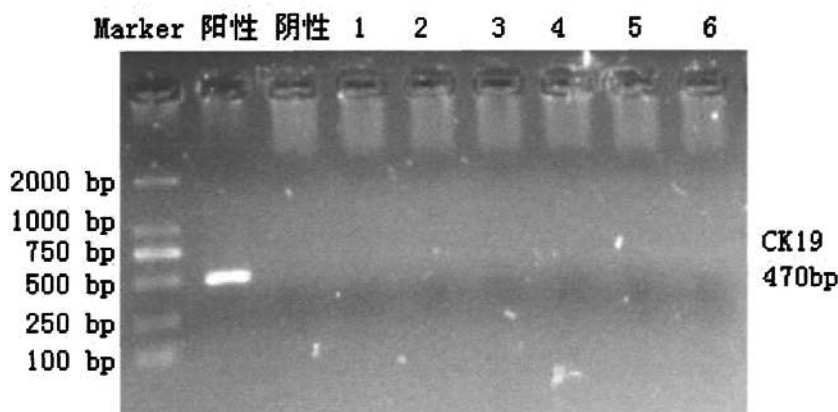


图 4 食管及肺良性病变患者外周血行 CK19mRNA RT-PCR 检测电泳结果

阳性对照: 为食管癌 EC81 细胞株; 阴性对照: 未加细胞 RNA 的标本;

1、2、3、4、5、6 食管及肺良性病变患者

3.5. RT-PCR 技术检测食管鳞癌患者中 CK19 mRNA 的表达

本研究中, 62 例食管癌患者外周血本中有 10 例出现 470bp (CK19mRNA) 特异性扩增条带 (见图 5), 阳性率为 16.1%, 全部患者细胞总 RNA 均行 β -actin 的 RT-PCR 检测, 电泳结果均见 β -actin 之 619bp 扩增条带出现, 表明提取的细胞总 RNA 是完整的, 逆转录合成的 cDNA 也充足。

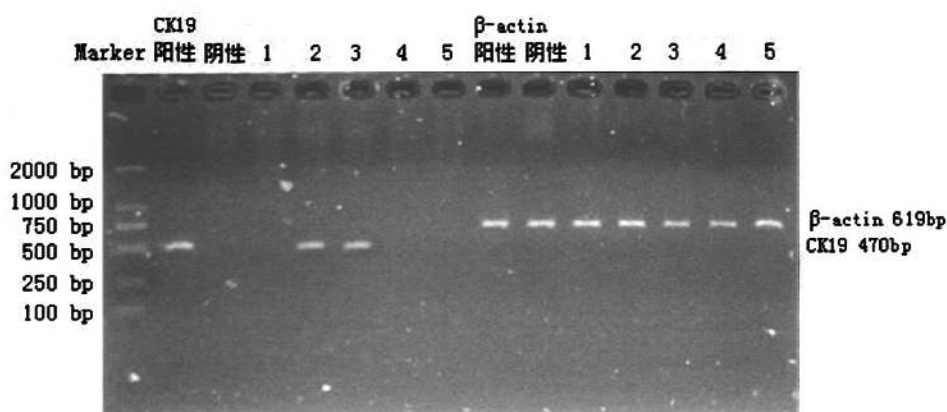


图5 食管癌患者外周血行 CK19mRNA RT-PCR 检测电泳结果

阳性对照：为食管癌 EC81 细胞株；阴性对照：正常患者的外周血标本；
2、3 为食管癌外周血阳性的患者，1、4、5 食管外周血阴性的患者。

3.6. 外周血 CK19mRNA 表达与食管鳞癌患者临床病理因素的关系

本实验中外周血 CK19mRNA 阳性患者有 10 例：其中男性 8 例，女性 2 例；年龄在 47 岁到 72 岁之间，中位年龄 61.5 岁，60 岁以下 4 例，60 岁以上 6 例；肿瘤位置：胸上段 0 例，胸中段 4 例，胸下段 6 例；肿瘤细胞分化：高分化 1 例，中分化 5 例，低分化 4 例；按照国际抗癌联盟（UICC）1997 肿瘤 TNM 分期标准，术后病理分期：I 期：0 例，II 期：4 例，III 期：6 例。T3、T4 的患者分别为 9 例、1 例；N1 患者为 6 例，N0 患者为 4 例；

食管鳞癌患者 CK19mRNA 表达与患者临床病理因素之间如性别、年龄（≥60 岁和 <60 岁之间）、临床分期（TNM 分期）肿瘤浸润深度（T 分期）、淋巴结转移情况（N 分期）、肿瘤细胞分化程度及等均无明显相关性（ $P>0.05$ ）（见表 1）。对有检测外周血肿瘤标志物 CEA 的 53 例患者，CK19mRNA 阴性的 44 例，阳性的 9 例，CK19mRNA 是否阳性在 CEA 表达上无明显差异（Mann-Whitney U $P=0.917$ ），对有检测的外周血肿瘤标志物 SCC 的 47 例患者，CK19mRNA 阴性的 40 例，阳性的 7 例，CK19mRNA 是否阳性在 SCC 表达上无明显差异（Mann-Whitney U $P=0.452$ ）。

表 1 外周血 CK19mRNA 表达与食管癌患者临床病理因素的关系

	患者例数	CK19mRNA		P 值
		阳性 (例数, %)	阴性 (例数)	
年龄				
<60 岁	36	4 (11.1%)	32	0.308
≥60 岁	26	6 (23.1%)	16	
性别				
男性	43	8 (18.6%)	35	0.710
女性	19	2 (10.5%)	17	
病变部位				
上段	4	0 (0%)	4	0.366
中段	32	4 (12.5%)	28	
下段	26	6 (23.8%)	20	
肿瘤细胞分化				
高分化	16	1 (6.3%)	15	0.102
中分化	35	5 (14.3%)	30	
低分化	11	4 (36.4%)	7	
T 分期				
pT1	6	0 (0%)	6	0.466
pT2	9	0 (0%)	9	
pT3	44	9 (20.5%)	35	
pT4	3	1 (33.3%)	2	
N 分期				
pN0	37	4 (10.8%)	33	0.308
pN1	25	6 (24.0%)	19	
TNM 分期				
I 期	5	0 (0%)	5	0.246
II 期	31	4 (12.9%)	27	
III 期	26	6 (23.8%)	20	
CEA	53	9 (17.0%)	44	0.917
SCC	47	7(14.9%)	40	0.452

3.7. 外周血 CK19mRNA 表达与食管鳞癌根治术后患者复发或转移和肿瘤相关性死亡的关系

本研究中全部食管鳞癌患者均行根治性手术（其中经左胸食管癌根治术 41 例，包括胃食管主动脉弓下吻合 2 例，弓上吻合 39 例；经右胸、上腹部和左颈部三切口食管癌根治术，胃食管左颈吻合术 21 例）。

全组患者术后随访 1-40 个月，末次随访时间为 2010 年 3 月 22 日，生存期最短 1 个月、最长 40 个月，平均 26.4 个月。全组患者 3 年生存率为 53%，其中外周血 CK19mRNA 阳性患者为 20%，外周血 CK19mRNA 阴性患者为 60%。随访期间 33 例复发或转移（33/62, 53.2%），其中外周血 CK19mRNA 阳性患者复发或转移 9 例（9/10, 90%），外周血 CK19mRNA 阴性患者复发或转移 24 例（24/52, 46.2%），外周血 CK19mRNA 阳性或阴性在复发与转移中有统计学差异（Fisher's Exact Test , $P=0.015$ ）（见表 2）。

表2 外周血CK19mRNA表达与食管鳞癌术后复发与转移

CK19mRNA	复发或转移	无复发与转移	总数
阳性	9 (90.0%)	1 (10.0%)	10
阴性	24 (46.2%)	28 (53.8%)	52
总数	33 (53.2%)	29 (46.8%)	

无瘤生存期即确定之日至肿瘤复发转移或死亡或末次随访日。全组患者无瘤生存期最短 1 个月，最长 40 个月，平均 24.21 个月。无瘤生存期在外周血 CK19mRNA 阳性或阴性中有统计学差异（Mann-Whitney U, $p=0.02$ ）

随访期间全组 28 例死亡（28/62, 45.2%），其中肿瘤相关性死亡共 25 例，3 例非肿瘤相关死亡。其中外周血 CK19mRNA 阳性患者死亡 8 例，肿瘤相关性死亡 7 例（7/10, 70%），1 例非肿瘤相关性死亡；外周血 CK19mRNA 阴性患者死亡 20 例，肿瘤相关性死亡 18 例（18/52, 34.6%），2 例非肿瘤相关性死亡，外周血 CK19mRNA 阳性或阴性在肿瘤相关性死亡中有统计学差异（Fisher's Exact Test , $P=0.029$ ）（见表 3）。

表3：外周血CK19mRNA表达与食管鳞癌术后肿瘤相关性死亡

CK19mRNA	肿瘤相关性死亡	存活	总数
阳性	7 (77.8%)	2 (22.2%)	9
阴性	18 (36.0%)	32 (64.0%)	50
总数	25 (53.2%)	34 (46.8%)	

3.8：预后分析

全组患者3年生存率为53%，其中外周血CK19mRNA阳性患者为20%，外周血CK19mRNA阴性患者为60%。采用Cox回归分析食管癌患者各临床病理因素及外周血CK19mRNA表达对术后患者生存率的影响，结果见表4，外周血CK19mRNA表达是影响食管癌患者术后生存率的独立预后因素（ $P=0.011$ ），外周血CK19mRNA表达的RR值为6.528，95% CI为1.287~6.786。生存曲线见图5，两者有统计学差异（Log Rank ,Mantel-Cox, $p=0.005$ ）。

表4 食管癌患者术后死亡风险的Cox回归分析

变量	wald	sig	Ex (B)	RR (95% CI)
CK19mRNA	6.528	0.011	2.954	1.287~6.786
pTNM	2.502	0.114	1.691	0.882~3.242
pT	-	0.158	-	-
pN	-	0.227	-	-
肿瘤细胞分化	-	0.443	-	-
肿瘤位置	-	0.532	-	-
性别	-	0.532	-	-
年龄(是否大于60岁)	-	0.270	-	-

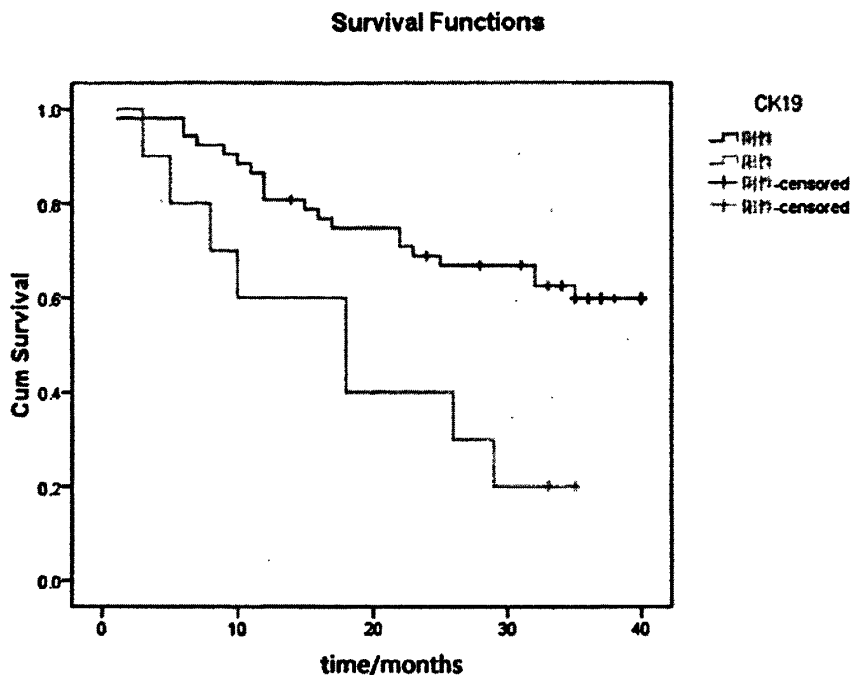


图 6 全部患者外周血 CK19mRNA 的表达的生存曲线

全组患者在随访期间33例复发或转移，全组患者无瘤生存期最短1个月，最长40个月，平均24.21个月，采用logistic回归分析食管癌患者各临床病理因素及外周血CK19mRNA表达对患者术后复发的影响，结果见表5，外周血CK19mRNA阳性与CK19mRNA阴性患者复发的OR值为10.50，95% CI为1.239~88.951，认为外周血CK19mRNA阳性患者术后局部复发或转移率均较阴性患者高

表5 食管鳞癌术后复发的多因素Logistic回归分析

因素	wald	sig	Exp(B)	OR (95% CI)
CK19mRNA	4.652	0.031	10.50	1.239~88.951
pTNM	1.317	0.251	1.618	0.711~3.679
pT	1.612	0.204	1.615	0.711~3.383
pN	0.696	0.404	1.540	0.557~4.247
肿瘤细胞分化	0.000	1.000	1.000	0.141~7.099
肿瘤位置	1.911	0.167	1.837	0.776~4.353
性别	1.344	0.246	1.910	0.640~5.702
年龄				
(是否大于60岁)	0.059	0.808	0.885	0.332~2.361

第四章 讨 论

4.1: RT-PCR 技术检测外周血 CK19 mRNA 表达的敏感性和特异性

利用 RT-PCR 方法检测外周血 CK19 mRNA 表达具有高度敏感性,据文献报道^[30,34]可达 $10^{-6} \sim 10^{-7}$,即在 10^7 个外周血正常细胞中可检测出 1—10 个循环肿瘤细胞,本实验的敏感性为 10^{-7} ,显然 RT-PCR 技术具有细胞形态学、免疫细胞化学技术不可比拟的敏感性,因而适用于循环肿瘤细胞的检测,被认为是目前循环肿瘤细胞的最有效的方法。但是这一方法检测循环肿瘤细胞可能会异致假阳性和假阴性的结果。假阳性产生的原因:(1)靶 RNA 非特异性表达:如白细胞中存在的有 MUC1 高度相关的同源基因序列;CK19mRNA 可在正常组织或细胞中表达^[40]等;(2)标本采集时有上皮细胞的污染;(3)引物设计不当:国外研究者发现 CK19 存在有伪基因序列 CK19a^[41]及 CK19b^[42],CK19b 信号起源于基因组 DNA,其序列的 84.7%与 CK19 相同,可引起假阳性结果;(4)PCR 扩增条件控制不当:如退火温度过低或循环次数过多等均易导致非特异性条带的扩增;(5)非特异性细胞低水平的非法转录。假阴性产生的原因:(1)提取的总 RNA 被灭活不全或被污染 RNA 酶降解;(2)靶基因低水平表达,达不到检测的限度要求;(3)标本的采集处于癌细胞释放的间歇期。

为避免出现假阳性和假阴性,本实验中采取的相应措施:(1)检测中加设阳性及阴性对照,以表达靶的肿瘤细胞作为阳性对照,以不表达靶的健康志愿者的血液标本或者未加入目标RNA的标本作为阴性对照;(2)设立内参对照,验证RNA提取的是否完整;(3)实验过程中采取一系列措施,防止污染,如采集标本时操作过程小心,避免针头接触皮肤而造成假阳性,本实验采用丢弃前2ml血标本,采血负压针头等用品均为一次性使用,以最大限度保证实验的可靠性^[30];及实验过程中使用一次性手套等措施。(4)优化RT-PCR反应条件;(5)使用特异的,

与假基因无同源序列的引物,清楚所选特异性标志物的基因序列,使设计的引物能跨越两个外显子的拼接区,使得实验中容易地将污染的基因组DNA扩增产物区分开。

文献报道 RT-PCR 法检测外周血 CK19mRNA 具有良好的特异性,在肺及食管良性肿瘤患者外周血中均未检测到 CK19mRNA 的表达,但也有学者认为肺及食管良性肿瘤患者外周血中 CK19mRNA 可有轻度的表达^[30],本实验使用 RT-PCR 方法检测食管癌患者术前外周血 CK19mRNA 的表达,敏感性达 10^{-7} 与国外报道基本一致,同时在 20 例肺及食管良性肿瘤患者外周血中均未检测出 CK19mRNA 的表达,具有较好的特异性。结果表明使用 RT-PCR 方法检测食管癌患者外周血 CK19mRNA 具有较好的敏感性和特异性,可作为检测食管癌外周血循环肿瘤细胞的一种方法。

4.2: 外周血 CK19 mRNA 表达与临床及病理之间的关系

外周血循环肿瘤细胞的检出率一般比骨髓播散肿瘤细胞的检出率低,本实验中可手术切除的食管鳞癌患者术前外周血 CK19mRNA 表达的阳性率为 16.1% (10/62),本研究组对于同类型的食管鳞癌术前骨髓的 CK19mRNA 表达的阳性率为 21.3% (13/61)^[28], Stathopoulou^[43] 等研究 148 例早期乳腺癌患者,外周血 CK19 的阳性率为 29.7%, Braun^[24] 等荟萃分析 4703 例早期乳腺癌患者骨髓播散肿瘤细胞的检出率为 30.6%, Schoenfeld 等^[37] 利用 RT-PCR 技术同时对 113 例乳腺癌患者的外周血和骨髓标本性角蛋白 19mRNA 检测发现其阳性率分别为 25% 和 35%。主要因为骨髓中的血管有过滤和集中肿瘤细胞的作用,使得单位体积骨髓中细胞含量是血液的数倍,使得骨髓对肿瘤细胞有一般是肿瘤播散细胞有聚集作用,而外周血是稀释作用^[44]。

外周血循环肿瘤细胞的存在与临床及病理之间的关系存在不同的观点。本实验的结果食管癌患者外周血 CK19mRNA 的表达与临床病理因素之间如年龄、性别、肿瘤部位、细胞分化、肿瘤浸润深度 (T 分期)、淋巴结状况 (N 分期)、临床分期 (TNM 分期) 及肿瘤细胞分化程度等均无明显相关性 ($P > 0.05$)。与 Stathopoulou

和Honma H等学者研究一致^[43,45], Stathopoulou^[43] 等研究利用RT-PCR技术对148例早期乳腺癌患者外周血标本研究, 结果外周血CK-19 mRNA的表达与患者的月经周期、疾病的状态、肿瘤的大小及病理分级, 淋巴结转移情况及雌激素受体和孕激素受体状态均没有统计学差异。Honma H^[45]对46例食管癌患者行定量RT-PCR检测结果表明高SCC-Ag mRNA和低SCC-Ag mRNA表达在在肿瘤的大小及病理分期等因素中无明显相关性, 然而很多学者持相反观点^[30,46-50]。Chen TF^[30] 等应用CK19mRNA对行放化疗治疗的非小细胞肺癌外周血研究表明: 化疗前CK19的表达及与肿瘤的N分期有关, 化疗后其表达与肿瘤的病理类型(鳞癌或腺癌)、体重下降、KPS评分和N分期。Pierga^[46] 等对94名随访9年的乳腺癌患者应用MUC1和CK19mRNA对其外周血行RT-PCR研究表明, 肿瘤的分期与其两者的表达均有统计学差异(P值分别为0.02和0.04)。Slade^[47]等将根据原发肿瘤是否大于3个分为低危组和高危组, 并设置正常人群为对照组, 结果表明低危组与高危组之间CK19的表达有明显的差异。Huang Peilin^[48]等利用RT-PCR技术对胃肠道肿瘤外周血CEA、CK19及CK20研究表明: CK19的表达明显与肿瘤浸润的深度、淋巴结的转移和远处转移有关, 但是与肿瘤的分化无关。LIU Z^[49]等研究认为53个食管癌术前外周血CEAmRNA的表达与淋巴结的状态机病理分期有关。最近^[50]的研究表明食管癌外周血循环肿瘤细胞的阳性率与肿瘤浸润的深度, 脉管浸润、淋巴结状态和病理分期有关。本实验与些学者的观点存在不一致性可能与标本的选择, 本实验选择为早期可切除食管癌术前的外周血, 和肿瘤标志物的选择不同有关, 具体原因有待进一步研究。

4.3: 外周血 CK19 mRNA 表达与预后之间的关系

外周血检测到循环肿瘤细胞并不是代表肿瘤一定会发生转移, 但它们的出现显性转移和复发的主要原因。目前研究认为, 临床转移是由微转移发展而来, 血液循环肿瘤细胞的存在被认为是血源性播散并引起远处转移的预测性指标, 血液中循环肿瘤细胞的出现是一个预后不良的独立预后因素^[29-31]。本实验中62例

根治性手术的食管癌患者，外周血CK19mRNA阴性患者为60%。随访期间33例复发或转移（33/62, 53.2%），其中外周血CK19mRNA阳性患者复发或转移9例（9/10, 90%），外周血CK19mRNA阴性患者复发或转移24例（24/52, 46.2%），外周血CK19mRNA阳性或阴性在复发与转移中有统计学差异（Fisher's Exact Test, $P=0.015$ ）。全组患者无瘤生存期最短1个月，最长40个月，平均24.21个月，采用logistic回归分析食管癌患者各临床病理因素及外周血CK19mRNA表达对患者术后复发的影响，结果表明外周血CK19mRNA阳性与CK19mRNA阴性患者复发的OR值为10.50，95% CI为1.239~88.951。Cao M^[50]等利用RT-PCR对术前未行化放疗的108食管鳞癌患者术前外周血survivin表达，同时行术后行类似并且随访完整的48例患者分析表明：27例外周血survivin表达的患者有15例复发，21例外周血survivin未表达的患者只有3例复发，survivin表达者复发明显高于未表达者（ $P = 0.002$, log-rank test），并且认为外周血survivin表达作为可以预测食管鳞癌的复发的独立指标。本实验外周血CK19mRNA阳性患者死亡8例，肿瘤相关性死亡7例（7/10, 70%），1例非肿瘤相关性死亡；外周血CK19mRNA阴性患者死亡20例，肿瘤相关性死亡18例（18/52, 34.6%），2例非肿瘤相关性死亡，外周血CK19mRNA阳性或阴性在肿瘤相关性死亡中有统计学差异（Fisher's Exact Test, $P=0.029$ ）。Cao M^[50]等研究48例患者随访33个月，21例肿瘤相关性死亡，其中27例外周血survivin表达的患者有15例死亡，21例外周血survivin未表达的患者只有6例复发，survivin表达者肿瘤相关死亡明显高于未表达者（ $P = 0.016$, log-rank test）。目前许多研究表达术前外周血循环肿瘤细胞的存在是肿瘤预后较差的独立的预后因素。Pierga^[46]等对94名随访9年的乳腺癌患者应用MUC1和CK19mRNA对其外周血行RT-PCR研究预后分析示T分期、N分期、和肿瘤的分化及激素受体的状态，及CK19和MUC1mRNA的表达统计学意义。hen TF^[30]等应用CK19mRNA对行放化疗治疗的非小细胞肺癌外周血研究：多因素分析表明治疗后CK19mRNA表达是其独立的预后因素。Yamashita J^[51]对利用RT-PCR技术对103例非小细胞肺癌根治性术前外周血行CEAmRNA检测，结果表明术前外周血CEAmRNA表达的患者预后较差，并且多因素分析表明是其独立的预后因素。最近文献报道^[52,53]早期乳

腺癌利用RT-PCR技术新辅助化疗前外周血CK19mRNA阳性表达是肿瘤复发和生存期下降的独立预后因素。Stathopoulou^[43]等研究148例早期乳腺癌患者，外周血CK19mRNA的表达与无瘤生存期的减少和总的生存期密切相关，具有统计学意义，P值分别为0.007 和0.01，多因素分析表明外周血CK19mRNA的表达是其预后差的独立的预后因素。最近对于食管癌外周血的研究认为外周血微转移的存在食管癌患者的一个独立预后因素^[45,50,54,55]。本实验，采用Cox 回归分析发现，外周血CK19mRNA表达是影响食管癌患者术后生存率的独立因素（ $p=0.011$, RR, 6.528, 95% CI, 1.287~6.786）。与Cao M^[50]、Hoffmann ACC^[55]、Honma H^[45]等学者研究结果一致。Cao M^[50]研究认为相对于外周血survivin阴性的表达，survivin阳性的患者具有较高的复发率和更短的生存期，多因素分析表明是其预后差的独立预后因素。Hoffmann AC^[55]等对62例食管癌患者术前1天和术后10天的外周血Survivin (SVV) mRNA行定量RT-PCR研究发现术前外周血SVV的表达在总的生存期是重要和独立的预后因素($p = 0.002$, 95% CI, 1.97-22.12)。Honma H^[45]认为根治性食管癌患者术前外周血 SCC-Ag mRNA 的水平是预测肿瘤复发的最好的指标，多因素分析是其独立的预后因素。Liu Z^[54]等也同样认为CEA 和surviving 对预测肿瘤复发和转移具有较高的敏感性。因此，我们认为，对于行根治性手术的食管鳞癌患者，术前外周血CK19mRNA的表达阳性具有较高的复发率和更短的生存期，外周血CK19mRNA的表达阳性是食管癌患者的预后差的独立预后因素。

第五章 结 论

1. RT-PCR法检测食管癌患者外周血CK19mRNA表达具有较高敏感性和特异性
可作为检测食管癌患者外周血循环肿瘤细胞的一种有效手段；
2. 行根治性术的食管癌患者术前外周血CK19mRNA的表达与临床病理因素之间无关；
3. 术前外周血CK19mrRNA的表达具有较高的复发率和更短的生存期；
4. 术前外周血CK19mRNA的表达是食管癌患者的预后差的独立预后因素。

第六章 参考文献

1. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol*. 2006 May 10;24(14):2137-2150.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008 Mar-Apr;58(2):71-96.
3. Day NE, Varghese C. Oesophageal cancer. *Cancer Surv*. 1994;19-20:43-54..
4. 曾昭华, 曾雪萍. 中国食管癌与土壤环境中元素的相关性. *河南地质*, 2000, 18(1):76-80.
5. 赵平, 陈万青主编. 中国肿瘤登记年报 2008 中国肿瘤登记地区2005年发病死亡. 北京市: 军事医学科学出版社。
6. Mariette C, Piessen G, Triboulet JP. The therapeutic strategies in oesophageal carcinoma: role of surgery and other modalities. *Lancet Oncol*. 2007 Jun;8(6):545-553.
7. Teruo Kakegawa. Forty years' experience in surgical treatment for esophageal cancer. *Int J Clin Oncol*. 2003 Oct;8(5):277-288.
8. 邵令方, 高宗人, 卫功铨等, 食管癌和贲门癌的外科治疗. *中华外科杂志*, 2001, 39(1):44-46.
9. Eloubeidi MA, Desmond R, Arguedas MR, et al. Prognostic factors for the survival of patients with esophageal carcinoma in the U.S.: the importance of tumor length and lymph node status. *Cancer*. 2002 Oct 1;95(7):1434-1443.
10. Raja S, Luketich JD, Kelly LA, et al. Rapid, quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction: application to intraoperative molecular

- detection of occult metastases in esophageal cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002 Mar;123(3):475-82; discussion 482-483.
11. Tony E. Godfrey, Siva Raja, et al. Prognostic value of quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in lymph node-negative esophageal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2001 Dec;7(12):4041-4048..
 12. Kijima F , Natsugoe S, Takao S, et al .Detection and clinical significance of lymph node micrometastasis determined by reverse transcription-polymerase chain reaction in patients with esophageal carcinoma. *Oncology.* 2000;58(1): 38-44.
 13. Hermanek P, Hutter RV, Sobin LH, et al. International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer.* 1999 Dec 15;86(12):2668-2673.
 14. Hermanek P. Disseminated tumor cells versus micrometastasis: definitions and problems. *Anticancer Res.* 1999 Jul-Aug;19(4A):2771-2774.
 15. Diel IJ. Bone marrow staging for breast cancer: is it better than axillary node dissection? *Semin Oncol.* 2001 Jun;28(3):236-344.
 16. Leong AS. The prognostic dilemma of nodal micrometastases in breast carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2000 May;27 Suppl 2:315-320.
 17. Raj GV, Moreno JG, Gomella LG. Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors .*Cancer.* 1998 Apr 15;82(8):1419-1442.
 18. Sato F, Shimada Y, Li Z, et al. Lymph node micrometastasis and prognosis in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Surg.* 2001 Mar;88(3): 426-432.
 19. Nakashima S, Natsugoe S, Matsumoto M, et al. Biological properties of biopsy specimens are useful for predicting lymph node micrometastasis in esophageal carcinoma.. *Anticancer Res.* 2002 Sep-Oct;22(5):2951-2956.
 20. Nakamura T, Ide H, Eguchi R, et al. Clinical implications of lymph node micrometastasis in patients with histologically node-negative (pN0) esophageal carcinoma. *J Surg Oncol.* 2002 Apr;79(4):224-249.

21. Tajima Y, Nakanishi Y, Ochiai A, et al. Histopathologic findings predicting lymph node metastasis and prognosis of patients with superficial esophageal carcinoma: analysis of 240 surgically resected tumors. *Cancer*. 2000 Mar 15;88(6):1285-1293.
22. Kodama M, Kakegawa T. Treatment of superficial cancer of the esophagus: A summary of responses to a questionnaire on superficial cancer of the esophagus in Japan[J]. *Surgery*. 1998 Apr;123(4):432-439.
23. Pantel K, Woelfle U. Micrometastasis in breast cancer and other solid tumors. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2004 Apr-Jun;18(2):120-125.
24. Braun S, Vogl FD, Naume B, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Aug 25;353(8):793-802.
25. Passlick B, Kubuschok B, Izbicki J R, et al. Isolated tumor cells in bone marrow predicts reduced survival in lymph node negative non-small-cell lung cancer. *Pneumologie*. 2000 Aug;54(8):355-360.
26. .Katsuhiro Matsunami, Tsutomu Nakamura, Hidetoshi Oguma et al. Detection of bone marrow micrometastasis in gastric cancer patients by immunomagnetic separation. *Ann Surg Oncol*. 2003 Mar;10(2):171-175.
27. Kaifi JT, Yekebas EF, Schurr P, et al. Tumor-cell homing to lymph nodes and bone marrow and CXCR4 expression in esophageal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Dec 21;97(24):1840-1847.
28. Zhang X, Chen SB, Chen JX, et al. CK19 mRNA expression in the bone marrow of patients with esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Dis Esophagus*. 2010 Jan 20.
29. Kimura H, Kato H, Faried A, Sohda M, et al. Prognostic significance of EpCAM expression in human esophageal cancer. *Int J Oncol*. 2007 Jan;30(1):171-179
30. Chen TF, Jiang GL, Fu XL, CK19 mRNA expression measured by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in the peripheral blood of patients with non-small cell lung cancer treated by chemo-radiation: an independent prognostic factor. *Lung Cancer*. 2007 Apr;56(1):105-114.
31. Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, et al. Real-time quantification of CK-19

- mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the light cycler system. *Clin Cancer Res*. 2003 Nov 1;9(14):5145-5151.
32. Sugio K, Kase S, Sakada T, et al. Micrometastasis in the bone marrow of patients with lung cancer associated with a reduced expression of E-cadherin and beta-catenin: risk assessment by immunohistochemistry. *Surgery*. 2002 Jan;131(1 Suppl):S226-31.
 33. Wang L, Wang Y, Liu Y, et al. Flow cytometric analysis of CK19 expression in the peripheral blood of breast carcinoma patients: relevance for circulating tumor cell detection. *J Exp Clin Cancer Res*. 2009 Apr 28;28:57.
 34. Nogi H, Takeyama H, Uchida K, et al. Detection of MUC1 and keratin 19 mRNAs in the bone marrow by quantitative RT-PCR predicts the risk of distant metastasis in breast cancer patients. *Breast Cancer*, 2003, 10(1):74-81.
 35. Pflleiderer C, Zoubek A, Gruber B, et al. Detection of tumour cells in peripheral blood and bone marrow from Ewing tumour patients by RT-PCR. *Int J Cancer*. 1995 Apr 21;64(2):135-139.
 36. Abati A, Liotta LA. Looking forward in diagnostic pathology: the molecular superhighway. *Cancer*. 1996 Jul 1;78(1):10-16.
 37. Schoenfeld A, Kruger KH, Gomm J, et al. The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19. *Eur J Cancer*. 1997 May;33(6):854-861.
 38. Suo J, Wang Q, Jin HJ, Li H, Zhao H, et al. K-19 mRNA RT-PCR in detecting micrometastasis in regional lymph nodes of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2006 Aug 28;12(32):5219-5222.
 39. Denis MG, Lipart C, Leborgne J, et al. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 1997 Oct 21;74(5):540-544.
 40. Pelkey TJ, Frierson HF Jr, Bruns DE. Molecular and immunological detection of circulating tumor cells and micrometastases from solid tumors. *Clin Chem*. 1996 Sep;42(9):1369-1381.

41. Ruud P, Fodstad O, Hovig E, et al. Identification of a novel cytokeratin19 pseudo gene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells . *Int J Cancer*. 1999 Jan 5;80(1):119-125.
42. Savtchenko ES, Sciff TA, Jiang C K, et al. Embryonic expression of the human 40KD keratin: evidence from a processed pseudo gene sequence. *Am J Hum Genet*. 1988 Nov;43(5):630-637.
43. Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol*. 2002 Aug 15;20(16):3404-3412.
44. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2008 May;8(5):329-340.
45. Honma H, Kanda T, Ito H et al. Squamous cell carcinoma-antigen messenger RNA level in peripheral blood predicts recurrence after resection in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Surgery*. 2006 May;139(5):678-685.
46. Pierga JY, Bidard FC, Denis MG, et al. Prognostic value of peripheral blood double detection of CK19 and MUC1 mRNA positive cells detected by RT-quantitative PCR in 94 breast cancer patients with a follow up of 9 years. *Mol Oncol*. 2007 Dec;1(3):267-268.
47. Slade MJ, Payne R, Riethdorf S et al. Comparison of bone marrow, disseminated tumour cells and blood-circulating tumour cells in breast cancer patients after primary treatment. *Br J Cancer*. 2009 Jan 13;100(1):160-166.
48. Huang P, Wang J, Guo Y, Xie W. Molecular detection of disseminated tumor cells in the peripheral blood in patients with gastrointestinal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003 Mar;129(3):192-198.
49. Z. Liu, M. Jiang, J.H. Zhao, H.X. Ju, Circulating tumor cells in perioperative esophageal cancer patients: quantitative assay system and potential clinical utility, *Clin Cancer Res*. 2007 May 15;13(10):2992-2997.

50. Cao M, Yie SM, Wu SM, et al. Detection of survivin-expressing circulating cancer cells in the peripheral blood of patients with esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Clin Exp Metastasis*. 2009;26(7):751-758..
51. Yamashita J, Matsuo A, Kurusu Y, et al. Preoperative evidence of circulating tumor cells by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen messenger RNA is an independent predictor of survival in non-small cell lung cancer: a prospective study. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002 Aug;124(2):299-305.
52. Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, et al. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 2006 Aug 10;24(23):3756-3762.
53. Ignatiadis M, Xenidis N, Perraki M, et al. Different prognostic value of cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 20;25(33):5194-5202.
54. Z. Liu, M. Jiang, J.H et al. Multipoint quantification of multimarker genes in peripheral blood and micrometastasis characteristic in peri-operative esophageal cancer patients. *Cancer Lett*. 2008 Mar 8;261(1):46-54.
55. Hoffmann AC, Vallböhmer D, Grimminger P, et al. Preoperative survivin mRNA detection in peripheral blood is an independent predictor of outcome in esophageal carcinoma. *Pharmacogenomics*. 2010 Mar;11(3):341-347.

致 谢

本人在三年攻读硕士期间，得到了恩师林鹏教授的精心指导。林教授临床技术扎实，临床思维严谨，科研思路独特，将给我今后的临床和科研之路有了深刻的影响。在此我衷心感谢恩师林鹏教授在这三年期间在学术上、科研和临床等方面的精心指导，感谢在生活上对我的细心关怀。愿林教授身体健康全家幸福。

衷心的感谢张旭教授在课题的开展及实验过程中对我的指导和帮助，在工作、学习和生活上的关心和支持！衷心感谢文静、张丽仪师姐和张兴同学在实验过程中给我的帮助。

衷心感谢戎铁华教授、傅剑华教授、张兰军教授、龙浩教授、王思愚教授、王欣教授、温浙盛教授、李小东教授、韦尉东教授、王军业教授、苏晓东教授、马国伟教授的悉心点拨，感谢林勇斌老师、余辉老师、朱志华老师、杨弘师兄的谆谆教诲；

感谢徐光川教授、李威教授、马刚教授、娄宁教授、饶慧兰教授、徐菲、张赧老师等的指导；

感谢陈捷鑫、解明然，陈少斌师兄、吴正清同门师兄的教诲和帮助、感谢郑斌、司徒冬荣、戴云，谢询、李小海、刘金耿等师兄、感谢王武平、周佳亮、李永锋、孙海波、张明、马骏等兄弟，感谢方勤，曹训、李盼等师弟、师妹的支持帮助！

感谢刘莉护长以及胸科护士对我的指点、支持和帮助！

感谢我的家人对我的学业给予了极大的鼓励与支持。

感谢所有帮助、关心我的老师、同学、朋友。