

· 论 著 ·

新辅助治疗后 RT-PCR 对前列腺癌盆腔淋巴结微转移的诊断价值

夏维木¹, 刘定益², 周文龙³, 王名伟⁴, 王 健², 王 颖⁵, 王树军⁵, 叶永峰¹, 王满琴¹, 许 胜¹, 夏 宇¹

【摘要】 目的 明确新辅助治疗后以逆转录酶-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测前列腺癌盆腔淋巴结微转移的意义。**方法** 本组 41 例临床局限性前列腺癌病例,术前行淋巴管造影显示盆腔淋巴结,对可疑淋巴结在 X 线定位下穿刺抽吸淋巴液,用 RT-PCR 法检测淋巴液中前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen, PSA) mRNA 和前列腺特异性膜抗原(prostate-specific membrane antigen, PSMA) mRNA 的表达;术后对淋巴结组织切片进行免疫组化检查,将 PSA mRNA 或 PSMA mRNA 阳性作为存在微转移。**结果** 对术前盆腔淋巴结穿刺抽吸淋巴液测 PSA mRNA 和 PSMA mRNA,证实有 21 例淋巴结存在微转移,术后对清扫淋巴结予免疫组化检查有 5 例存在淋巴结转移,组织学检查阳性组与 RT-PCR 检测证实微转移组 PSA mRNA 和 PSMA mRNA 的表达存在明显差异。**结论** 新辅助治疗后,采用 RT-PCR 法检测淋巴液中 PSA mRNA 和 PSMA mRNA 的表达有利于探测到淋巴结微转移。

【关键词】 逆转录酶链反应;前列腺肿瘤;前列腺癌根治术;微转移;新辅助治疗

【中图分类号】 R737.25 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2012)05-0399-03

The diagnostic value of real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction in detecting micrometastases of pelvic lymph nodes after neoadjuvant hormonal therapy

XIA Wei-mu¹, LIU Ding-yi², ZHOU Wen-long³, WANG Ming-wei⁴, WANG Jian², WANG Ying⁵, WANG Shu-jun⁵, YE Yong-feng¹, WANG Man-qin¹, XU Sheng¹, Xia Yu¹. 1. Department of Urology, 184 Hospital of PLA, Yingtan, Jiangxi 335000, China; 2. Department of Urology, Punan Hospital, Shanghai 200125, China; 3. Department of Urology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 4. Department of Urology, Luwan Branch of Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200020, China; 5. Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

【Abstract】 Objective To clarify the significance of real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in detecting micrometastases of pelvic lymph nodes after neoadjuvant hormonal therapy.

Methods The study included 41 patients with clinically localized prostate cancer who received neoadjuvant hormonal therapy (NHT). If positive lymph nodes are seen or suspected, a thin-walled 22 gauge needle is directed transabdominally under fluoroscopic control into the area and an aspirate is obtained after bipedal lymphangiography. The expression of prostate-specific antigen (PSA) and prostate-specific membrane antigen (PSMA) in aspirate were assessed by a fully quantitative real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. We regarded specimens in which either PSA or PSMA mRNA were positive as showing the "presence of micrometastasis". Lymph node specimens were also stained immunohistochemically with an antibody PSA after RP.

Results Lymph node metastases from 5 cases were detected by pathological examination, and real-time RT-PCR further identified lymph node micrometastases from 21 cases with no pathological evidence of nodal involvement. The expression level of PSA mRNA and PSMA mRNA were statistically significant in patients with histological confirmed lymph node metastases and micrometastases detected by real-time RT-PCR despite the lack of histological evidence. **Conclusion** Applying quantitative real-time RT-PCR targeting PSA and PSMA genes can

基金项目: 南京军区医学科技创新经费资助项目(07MO58)

作者简介: 夏维木(1963-),男,江西乐平人,硕士,主任医师,从事临床泌尿外科工作

作者单位: 1. 335000 江西鹰潭,解放军 184 医院泌尿外科; 2. 200125 上海,上海市浦东新区浦南医院泌尿外科; 3. 200025 上海,上海交通大学医学院附属瑞金医院泌尿外科; 4. 200020 上海,上海交通大学医学院附属瑞金医院卢湾分院泌尿外科; 5. 200025 上海,上海交通大学医学院

detect micrometastatic tumour foci in pelvic lymph nodes by fine needle aspiration biopsy of lymph nodes.

[Key words] quantitative real-time PCR; prostate cancer; radical prostatectomy; micrometastasis; neoadjuvant hormonal therapy

2007 年 8 月至 2011 年 3 月,我们对 41 例局限性前列腺癌实施前列腺癌根治术(radical prostatectomy, RP)的病例术前行淋巴管造影^[1-2],用逆转录酶-聚合酶链反应(reverse-transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)方法检测可疑淋巴结淋巴液中前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen, PSA) mRNA 和前列腺特异性膜抗原(prostate-specific membrane antigen, PSMA) mRNA 的表达,以了解 RP 前前列腺癌盆腔淋巴结微转移的情况,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象 全组 41 例,平均年龄 67.5 (53 ~ 76) 岁,PSA 2.16 ~ 56.16 ng/ml,术前均经病理证实为前列腺癌,Gleason 4 ~ 6 分 20 例、7 分 21 例; T_2a 14 例, T_2b 27 例。同位素骨扫描正常。确定 RP 者予新辅助治疗(neoadjuvant hormonal therapy, NHT)前行双足背淋巴管造影,每侧足背注入 2 ~ 3 ml 乙碘油,24h 后摄腹部平片,显示盆腔淋巴结外形和结构^[1,3],如造影确定盆腔淋巴结转移者放弃 RP,改行内分泌治疗。41 例术前均接受 3 个月 NHT 治疗,如氟他胺 0.25 g,3 次/d 或比卡鲁胺 50 mg,1 次/d,2 周后戈舍瑞林 3.6 mg 腹部皮下注射,1 次/28 d。RP 术前麻醉后在 X 线监视下对盆腔可疑淋巴结穿刺抽吸淋巴液并注入盛有 0.5 ml 生理盐水试管中,随后行 RP 并对盆腔淋巴结进行清扫。RP 切除淋巴组织和(或)髂血管淋巴结,一半淋巴结组织与淋巴结抽取液放于 -80℃,待 PSA mRNA 和 PSMA mRNA 测定,另一半淋巴结组织予免疫组化检查。对照组为同样处理的 6 例女性膀胱癌,盆腔淋巴结病理证实均无癌转移。

1.2 实验方法

1.2.1 实验试剂和设备 实验器材:荧光定量 PCR 仪 7500(美国 Applied Biosystems 公司)。主要试剂:Trizol RNA 抽提试剂(美国 Invitrogen 公司);逆转录反应试剂盒(德国 Fermentas 公司);RT-PCR 试剂(大连宝生物公司)。

1.2.2 实验方法 cDNA 合成,按 Trizol 说明书提取总 RNA;取总 RNA 1 μ l,以逆转录反应试剂盒合成 cDNA。RT-PCR:取相应剂量 cDNA 行 PCR 扩增,PSA mRNA 上游引物:5'-AGTcTGCGGCGGTGT-

TCT-3',下游引物:5'-GTGCCGACCCAGCAAGAT-3';PSMA mRNA 上游引物:5'-CCACATTTAGCAGGAACA-3',下游引物:5'-TGAGTCTTATTTGGGTAGG-3';内参照 GAPDH 上游引物:5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGAT-3,下游引物:5'-CCTGGAAGATGCTGATGGG-3'。95℃ 预变性 30 s,95℃ 变性 5 s,60℃ 退火、延伸 34 s,共 40 个循环。再由 PCR 仪对扩增产物进行荧光定量,将目的基因与参照基因进行对比,得出扩增产物的相对计量值。

1.3 实验分组 取自对照组 6 例女性膀胱癌盆腔,其 22 个淋巴结穿刺液的 PSA mRNA 及 PSMA mRNA 平均值分别为 38.5 和 12.3,术后淋巴结组织 PSA mRNA 及 PSMA mRNA 平均值分别为 9.0 和 13.6,以这组值作为阈值,超过任一阈值即为前列腺癌盆腔淋巴结转移,该组亦作为对照组(D 组)。病理检查阳性(转移)组为 A 组;RT-PCR 检查 PSA mRNA 及 PSMA mRNA 阳性组(去除病理检查阳性的病例)为 B 组;病理检查、PSA mRNA 及 PSMA mRNA 均阴性为 C 组。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 12.0 软件分析数据,检测数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

A 组 5 例前列腺癌中 28 枚淋巴结内,13 枚经病理证实为癌转移,PSA mRNA 和 PSMA mRNA 均呈阳性表达;15 枚病理检查未见癌转移,但其中 8 枚淋巴结检测 PSA mRNA 和 PSMA mRNA 呈阳性表达。B 组 16 例 73 枚淋巴结病理检查均未见癌转移,但其中 31 枚 PSA mRNA 和 PSMA mRNA 呈阳性表达,另 42 枚为阴性表达。C 组 20 例前列腺癌,102 枚淋巴结病理检查和 PSA mRNA 和 PSMA mRNA 均呈阴性表达。

比较 A 组与 B 组与 C、D 组的淋巴液和淋巴结 PSA mRNA、PSMA mRNA,发现差异均有统计学意义($P < 0.01$)。比较 A 组和 B 组发现淋巴液中 PSA mRNA 和 PSMA mRNA 的表达高于淋巴结,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。比较 C 组与 D 组淋巴液与淋巴结内 PSA mRNA 和 PSMA mRNA 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

表 1 四组淋巴液及淋巴结 PSA mRNA 和 PSMA mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 淋巴液($\times 10^{-3}$) | | 淋巴结($\times 10^{-3}$) | |
|-----|----|--|--|-----------------------------|-----------------------------|
| | | PSA mRNA | PSMA mRNA | PSA mRNA | PSMA mRNA |
| A 组 | 5 | 372.8 \pm 50.6 ^{*Δ} | 217.6 \pm 35.7 ^{*Δ} | 18.6 \pm 4.5 [*] | 59.7 \pm 8.6 [*] |
| B 组 | 16 | 140.3 \pm 30.2 ^{*Δ} | 141.3 \pm 40.9 ^{*Δ} | 67.9 \pm 9.8 [*] | 23.6 \pm 3.5 [*] |
| C 组 | 20 | 37.6 \pm 6.5 | 11.1 \pm 2.3 | 7.9 \pm 1.8 | 11.6 \pm 3.6 |
| D 组 | 6 | 38.5 \pm 7.0 | 12.3 \pm 2.1 | 9.0 \pm 3.7 | 13.6 \pm 4.9 |

注:与 C、D 组比较, * $P < 0.01$; 与同组淋巴结比较, $\Delta P < 0.01$

3 讨 论

前列腺根治切除术前行 NHT 的目的是为了诱导肿瘤消退和改善肿瘤的长期控制率^[4-5], 有研究^[6]证实 NHT 能够明显降低血清 PSA 水平、前列腺体积和切端阳性率, 然而还没有研究证实 NHT 对 RP 后的预后改善, 可能是 NHT 后常规的病理检查难以准确地检测切除标本中癌细胞, 可能遗漏淋巴结标本中微小的转移癌灶, 虽然盆腔淋巴结是 RP 后预测肿瘤复发的重要因素。有研究^[7-8]认为, 探测盆腔淋巴结微小前列腺癌细胞转移灶, 分子和免疫组化技术比常规的病理检查敏感性明显要高, 但由于 RP 病例术前难以获得淋巴结标本, 所以对盆腔淋巴结微转移灶的精确诊断存在困难。

本文在 RP 前穿刺抽吸可疑淋巴结液, 进行 RT-PCR 检测 PSA mRNA 和 PSMA mRNA 表达, 结果显示 A 组 5 例前列腺癌 28 枚淋巴结中病理诊断 13 枚淋巴结癌转移, PSA mRNA 和 PSMA mRNA 均呈阳性表达, 而病理诊断未见癌转移的 15 枚淋巴结中 PSA mRNA 和 PSMA mRNA 呈阳性表达 8 枚。B 组 16 例前列腺癌中 73 枚淋巴结病理检查均无淋巴结癌转移, 而有 31 枚淋巴结 PSA mRNA 和 PSMA mRNA 呈阳性表达。A 组及 B 组淋巴液的 PSA mRNA 和 PSMA mRNA 表达均显著高于淋巴结的表达 ($P < 0.01$), 显示淋巴液 PSA mRNA 和 PSMA mRNA 的表达对前列腺癌盆腔淋巴结的诊断有较好的特异性^[9]。本组部分病例术后已有 4 年, 一直进行内分泌治疗, 微转移患者尚未出现临床复发或转移, 但有部分患者的 PSA 升高, 似有可能出现临床复发。

本研究显示, 在对前列腺癌盆腔淋巴结微转移诊断缺乏有效方法的情况下^[10-13], 对前列腺癌患者行足背淋巴管造影显示盆腔淋巴结, 在 X 线监视下对盆腔可疑淋巴结穿刺抽吸淋巴液, 进行 RT-PCR 检测 NHT 后淋巴液的 PSA mRNA 和 PSMA mRNA 的表达, 对前列腺癌盆腔淋巴结的微转移有较好的诊断价值。

【参考文献】

[1] 刘定益, 王 健, 王名伟, 等. 淋巴管造影对前列腺癌淋巴结转移的诊断价值[J]. 中华泌尿外科杂志, 2004, 25(1): 36-37.

[2] 王 健, 刘定益, 姚 敏, 等. 淋巴管造影对前列腺癌盆腔淋巴结转移的诊断价值[J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(10): 1259-1260.

[3] 刘定益. 淋巴管造影术[M]. 江苏: 江苏科技出版社, 1989: 27-36.

[4] Fitpatrick JM. Is hormone ablation still the right choice for advance prostate cancer[J]. BJU Int, 2007, 100(supplement): 36-39.

[5] Gibod LB. Adjuvant treatment to surgery[J]. BJU Int, 2007, 100(supplement): 40-43.

[6] Miyake H, Kurahashi T, Hara I, et al. Significance of micrometastase in pelvic lymph nodes detected by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with clinically localized prostate cancer undergoing radical prostatectomy after neoadjuvant hormonal therapy[J]. BJU Int, 2007, 99(2): 315-320.

[7] Okegawa, T, Nutahara K, Higashihara E. Detection of micrometastatic prostate cancer cells in the lymph nodes by reverse transcriptase polymerase chain reaction is predictive of biochemical recurrence in pathological stage T2 prostate cancer[J]. J Urol, 2000, 163(4): 1183-1188.

[8] Potter SR, Mangold LA, Shue MJ, et al. Molecular and immunohistochemical staging of men with seminal vesicle invasion and negative pelvic lymph nodes at radical prostatectomy[J]. Cancer, 2000, 89(12): 2577-2586.

[9] 夏维木, 刘定益, 周文龙, 等. 前列腺癌根治术前盆腔淋巴结微转移检测的研究[J]. 中华外科杂志, 2010, 48(20): 1565-1568.

[10] Dave AS, Hricak H, Kattan MW, et al. The utility of magnetic resonance imaging and spectroscopy for predicting insignificant prostate cancer: an initial analysis[J]. BJU Int, 2007, 99(4): 786-793.

[11] Miyake H, Fujisawa M. Significance of micrometastases in pelvic lymph nodes from patients with localized prostate cancer[J]. Nihon Rinsho, 2011, 69(Suppl 5): 651-655.

[12] Sfoungaristos S, Perimenis P. Preoperative prostate specific antigen and prostate volume are significant predictors of seminal vesicle invasion in patients with prostate cancer[J]. Prague Med Rep, 2011, 112(4): 263-271.

[13] 周晨曦, 丁建华, 李国波. 中晚期前列腺癌 35 例临床分析[J]. 东南国防医药, 2007, 9(2): 122-123.

(收稿日期: 2011-12-13; 修回日期: 2012-05-04)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)