

早期宫颈癌患者术前外周血 CK19 mRNA 的检测及其临床意义

魏向群¹⁾, 陈艳²⁾, 李瑞敏¹⁾, 吴春秀¹⁾, 张芍¹⁾

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

[摘要] **目的** 研究早期宫颈癌患者外周血 CK19 mRNA 检测及其临床意义. **方法** 昆明医科大学第三附属医院妇科 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 表达水平的变化, 分析其与临床病理参数、预后的相关性. **结果** 实验组外周血中 CK19 表达水平与阴性对照组、阳性对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 30 例宫颈癌患者手术前外周血 CK19 mRNA 阳性检出率为 30% (9/30), 与淋巴结转移情况、肌层浸润、术后病理高危因素密切相关 ($P < 0.05$), 而与患者临床病理因素如年龄、临床分期 (FIGO)、肿瘤细胞分化程度、肿瘤直径、病理类型之间均无明显相关性 ($P > 0.05$). **结论** 宫颈癌根治术前外周血 CK19 mRNA 表达水平可作为诊断早期宫颈癌循环肿瘤细胞的标志物, 能够弥补影像学、肿瘤标志物等检查不足, 可能作为预测复发转移、判断预后的辅助指标, 为术后辅助治疗方案选择、判定预后提供依据.

[关键词] 宫颈癌; 循环肿瘤细胞; CK19; qRT-PCR

[中图分类号] R737.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2013) 10-0116-06

Detection of Early Cervical Cancer Patient's Peripheral Blood CK19 mRNA before Surgery and its Clinical Significance

WEI Xiang-qun¹⁾, CHEN Yan²⁾, LI Rui-min¹⁾, WU Chun-xiu¹⁾, ZHANG Shao¹⁾

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

[Abstract] **Objective** To investigate the detection of early cervical cancer patient's peripheral blood CK19 mRNA and its clinical significance. **Methods** 30 early (I A2~II A) cervical cancer patients 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, 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 change of relative expression level and positive rate of peripheral blood CK19 was analyzed using qRT-PCR technique, and its correlation with clinicopathological parameters and prognosis was further analyzed. **Results** There was significant difference in relative expression level of CK19 mRNA in the peripheral blood between experimental group and control groups ($P < 0.001$). And the positive rate of CK19 in the peripheral blood from 30 patients with early cervical cancer before operation in the experimental group was 30% (9/30). Furthermore, CK19 mRNA positive rate before surgery was correlated with lymph node metastasis, muscularis invasion and pathologic risk factors for postoperative ($P < 0.05$). There were no significant correlation between CK19 mRNA positive rate and other clinical and pathological features such as age, clinical stage (FIGO), tumor cell differentiation, tumor size, pathological type and etc ($P > 0.05$). **Conclusions** CK-19 mRNA is a specific and suitable molecular marker for the

[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, 主任医师, 教授, 主要从事妇科肿瘤及内镜研究工作.

detection of circulating tumor cells in early cervical cancer. Detection of peripheral blood CK19 mRNA expression before receiving radical hysterectomy in patients with early cervical cancer can also make up for the disadvantage of other methods such as the imaging, tumor marker detection. Most important of all, it can provide the basis for choosing a proper adjuvant therapy post-operation and estimating the relapse and prognosis.

[**Key words**] Cervical cancer; Circulating tumor cells; CK19; qRT-PCR

手术是早期宫颈癌的主要治疗手段, 而浸润和转移是其致死的主要原因, 特别是肿瘤的术后复发和转移是最主要的致命原因, 故及时检出术后早期转移的方法, 有助于临床上制定更有针对性的个体化疗方案, 更好的指导临床治疗, 减少复发和转移^[1]. CK19 mRNA 检测在肺癌、乳腺癌及胃癌的微转移中被广泛应用并具有高度敏感性和特异性, 但目前在宫颈癌外周血微转移检测的研究报道较少. 前期研究结果显示, 外周血 CK19 mRNA 表达水平可能作为诊断早期宫颈癌微转移的标志物. 故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术前外周血中 CK19 mRNA 表达水平的变化, 探讨其与术后临床病理参数、预后之间的关系.

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^[1], 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二种肿瘤. 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, 年龄分布 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; 阴性对照组采集我院术后病理确诊为子宫肌瘤患者 15 例, 年龄分布 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, 年龄分布 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 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 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用.

CK19mRNA 上游引物: 5'-ACCAAGTTTGAGA-CGGAACAG-3', 下游引物: 5'-CCCTCAGCGTACT-GATTTCCCT-3', 扩增长度为 181 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 抽取研究对象的空腹外周血 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 × Buffer RBL, 颠倒混匀. 冰上孵育裂解红细胞. 4 $^{\circ}$ C, 2 100 rpm 离心 10 min 后弃上清. 加入 3 mL 1 × Buffer RBL, 充分摇匀, 静置. 4 $^{\circ}$ C, 2 100 rpm 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 $^{\circ}$ C, 12 000 rpm 离心 2 min, 收集滤液后弃掉过滤柱. 向所得滤液中加入 600 μ L 用无 RNase 水配制的 70% 乙醇溶液, 充分颠倒混匀. 离心机 4 $^{\circ}$ C, 12 000 rpm 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 μ L 的 Buffer RW1 溶液, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 rpm 离心 15 s, 弃废液, 吸附柱中加入 500 μ L 的 Buffer RW2 溶液, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 rpm 离心 15 s, 弃废液, 重复以上操作 1 ~ 2 次. 将吸附柱置于 1.5 mL 无 RNase 离心管中, 加入 30

μL RNase-Free Water, 室温放置 1 min, 12 000 rpm 离心 1 min, 收集 RNA 溶液, 分装 3 管, 每管 10 μL , -80°C 冰箱保存. 取 2 μL 总 RNA 样品, 1 mL 水稀释; 蒸馏水调零, 记录样品 260 nm 和 280 nm 的吸光度值; 用紫外分光光度计测定在 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°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 SYBRGreen 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 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物 1.5 μL , 20 $\mu\text{mol/L}$ 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°C 变性 3 min; 95°C 变性 10 s, 58°C 退火 15 s, 72°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 (由云南省肿瘤医院提供) 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 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]. ΔCt = 目的基因的平均 Ct 值 (样本组)

- 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].

1.2.7 随访 30 例早期 (I A₂ ~ II A) 宫颈癌患者从抽血检查开始随访至第 1 次出现复发转移时止或最后 1 次随访时间止, 随访至 2013 年 4 月, 随访时间 3 ~ 43 个月, 中位随访时间 20 个月, 发现远处转移的 1 例, 余病例无瘤生存.

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 Wilcoxon 非参数秩和检验, 采用中位数 \pm 四分位数间距 ($M \pm Q$) 表示; 阳性率的比较采用卡方检验、Fisher's 精确检验进行分析. 相关性比较采用 spearman 相关性分析. $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

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.

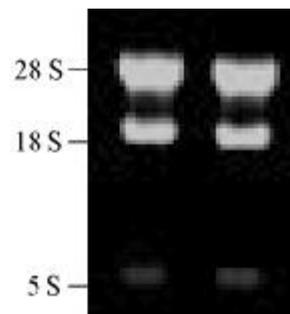


图 1 外周血总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of peripheral blood total RNA

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; 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. 两个基因的斜率绝对值差值小于 0.1, 见图 2, 提示 CK19、 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.

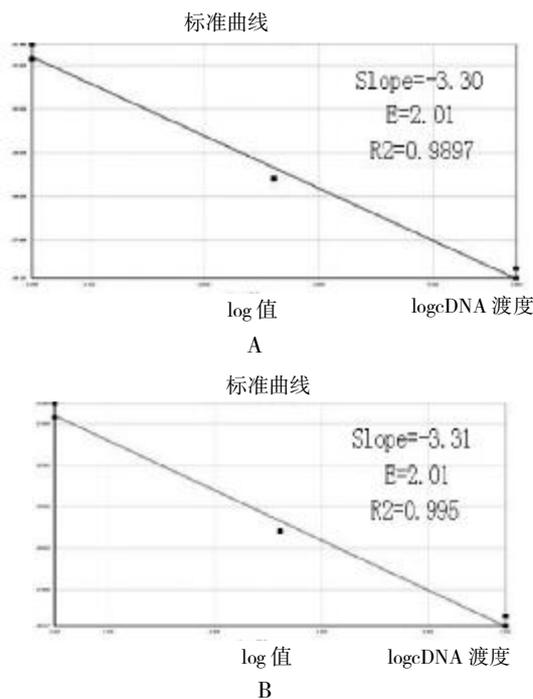


图 2 实时定量 PCR 扩增效率
Fig. 2 qPCR amplification efficiency
A: CK19; B: β -actin

2.3 早期宫颈癌患者根治术前外周血 CK19 mRNA 表达水平

实验组术前 CK19 mRNA 的表达水平为 (0.89 ± 0.21) , 阴性对照组健康人群和子宫肌瘤组患者表达水平为 (0.21 ± 0.12) , 阳性对照组晚期宫颈癌组患者表达水平为 (1.69 ± 0.44) , 实验组与阴性对照组, 阴性组与阳性组对照, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 1.

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

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

组别	n	CK19 mRNA
实验组	30	0.89 ± 0.21
阴性对照组	30	$0.21 \pm 0.12^{**}$
阳性对照组	15	$1.69 \pm 0.44^{\Delta\Delta}$

与实验组比较, $**P < 0.01$; 与阴性组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$.

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); 阴性对照组中, 15 例子宫颈癌患者 1 例 CK19 mRNA 阳性, 15 例健康人群 CK19 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), 实验组与阴性对照组比较, 差异有

统计学意义 ($P < 0.001$), 见表 2.

表 2 q RT-PCR 检测实验组与对照组外周血 CK19 mRNA 阳性率

Tab. 2 The positive rates of CK19 mRNA in peripheral blood from experimental group and control groups detected by q RT-PCR

组别	n	CK19	
		阳性 (%)	阴性 (%)
实验组	30	9(30.0)	21(70.0)
阴性对照组	30	1(3.31)*	30(96.7)
阳性对照组	15	9(60.0) $\Delta\Delta$	6(40.0)

与实验组比较, $*P < 0.05$; 与阴性组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$.

2.4 早期宫颈癌患者根治术前外周血 CK19 mRNA 表达水平与临床病理特征的相关性

实验组中术前早期宫颈癌患者外周血 CK19 mRNA 的阳性表达率与患者术后临床病理特征如年龄、临床分期 (FIGO)、肿瘤细胞分化程度、肿瘤直径、病理类型之间均无明显相关性 ($P > 0.05$), 而与淋巴结转移情况和肌层浸润有关 ($P < 0.05$), 见表 3.

2.5 早期宫颈癌患者根治术前外周血 CK19 mRNA 表达水平与术后患者预后的关系

30 例早期宫颈癌患者均随访到 2013 年 4 月, 失访 1 例, 左锁骨上淋巴结转移 1 例, 余者均未发现复发转移, 随访率 97%. 该例转移患者 CK19 mRNA 表达为阳性, 但临床病理特征中无任何高危病理因素. 笔者将宫颈癌 2012 年 NCCN 指南规定的原发性肿瘤体积较大、有深层间质浸润、淋巴脉管间隙浸润、淋巴结阳性、切缘阳性、宫旁浸润作为高危病理因素, 与 CK19mRNA 阳性表达进行 Spearman 相关性分析. 分析结果显示, 临床病理因素与 CK19mRNA 阳性表达有正相关性 ($P < 0.05$).

3 讨论

文献表明, 循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, 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^[7].

现在研究 CTCs 比较热门的标志物之一是细胞角蛋白 (Cytokeratin). 细胞角蛋白起源于上皮细胞, 是上皮细胞和上皮来源的恶性肿瘤细胞中间丝的组成成分, 几乎占细胞总数 85%^[8]. 其理论依据是角蛋白广泛分布在单层上皮细胞内, 而间叶

表 3 早期宫颈癌患者根治术术前 CK19 mRNA 阳性表达与术后临床病理参数的关系 (n)

Tab. 3 The correlation between peripheral blood CK19 mRNA positive rate and clinical and pathological features in patients with early cervical cancer before receiving radical hysterectomy (n)

项 目	n	CK19 mRNA			P
		阳性	阴性	阳性率(%)	
年龄					
≤35 岁	8	3	5	37.5	0.666
>35 岁	22	6	16	27.3	
临床分期 (FIGO)					
IA2-IB1	25	6	19	24	0.143
IB2-II A	5	3	2	60	
分化程度					
高、中分化	10	2	8	20	0.675
低分化	20	7	13	35	
肿瘤直径					
≤4 cm	26	6	20	23.1	0.069
>4 cm	4	3	1	75	
淋巴结转移					
无	27	6	21	22.2	0.021
有	3	3	0	100	
病理类型					
鳞癌	23	7	16	30.4	1
腺癌、鳞腺癌	7	2	5	28.6	
肌层浸润					
< 1/2	19	3	16	15.8	0.042
≥1/2	11	6	5	54.5	

组织缺乏角蛋白, 在细胞恶变和肿瘤发生过程中, 角蛋白继续存在于上皮性肿瘤内, 间叶细胞恶变后仍不表达角蛋白, 其中以 CK19 的应用最为广泛. 近年来 CK19 作为检测外周血中循环肿瘤细胞的生物标记物, 在国内外已广泛应用于检测胃肠、食管、乳腺及肺等部位的恶性肿瘤^[9-11]. 程玺等^[12]采用 RT-PCR 技术检测淋巴结中 CK19 的表达, 该方法将淋巴结转移的检测率由传统的病理组织学 (11.7%) 上升到 RT-PCR (21.4%), 常规染色阴性的 182 枚淋巴结中, 29 枚检测到 CK19 表达阳性, 微转移的检出率为 15.9% (29/182), 淋巴结 CK19 的检出率与年龄、分期、组织学类型、宫颈肿瘤大小、肌层浸润深度、宫旁浸润、脉管癌栓均无明显关系, 而与癌细胞分化相关, 结果显示低分化患者淋巴结 CK19 检出率 (87.5%) 高于中-高分化患者 (63.3%), 从而提示细胞分化程度越低, 越容易发生淋巴结转移.

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^[13].

笔者的研究结果显示, 早期宫颈癌患者根治术术前外周血 CK19 mRNA 表达的阳性率为 30% (9/30), 与子宫肌瘤患者和健康人群比较存在明显差异, 提示 CK19mRNA 高度特异地表达在宫颈癌患者中, 可作为诊断早期宫颈癌 CTCs 的标志物. 晚期宫颈癌患者 CK19 mRNA 表达的阳性率比早期宫颈癌患者高, 提示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, 这与程玺的结果^[14]基本一致. 笔者的研究结果还表明, qRT-PCR 技术灵敏度高, 适用于临床检测外周血 CK19 mRNA 表达.

研究结果显示, 宫颈癌根治术术前外周血 CK19 mRNA 的表达水平与淋巴结转移情况、肌层浸润有关, 与其他学者基本一致^[15]. 故据可考虑对深肌层浸润和淋巴结转移的患者在术后严密监测, 及时补充术后治疗.

在临床上, 手术补充治疗病例的后续处理仍根

据术后病理检查结果决定^[6], 原发肿瘤体积较大、有深层间质浸润、淋巴脉管间隙浸润、淋巴结阳性、切缘阳性、宫旁浸润是给予术后补充治疗的标准, 也是临床上被认为的病理高危因素。笔者发现, 宫颈癌根治术术前外周血 CK19 mRNA 的阳性表达与病理高危因素密切相关, 术后 30 d 表达阳性患者均为术前表达阳性的患者, 提示可能作为预测复发转移、判断预后的指标, 宫颈癌根治术术前外周血 CK19 mRNA 阳性表达的患者术后更应该进行重点随访。笔者发现, 2 例患者开始不存在病理高危因素, 但术后 30 d CK19 mRNA 表达仍为阳性。随访中这 2 例患者有 1 例发现远处复发转移的迹象, 因此仅根据术后病理检查结果来决定术后补充治疗的方法可能存在不足, 可能会遗漏一部分需要术后补充治疗患者, 但这需要大量样本的实验和长期的随访观察来证实。虽然 qRT-PCR 检测结果还没有作为临床上判断是否有转移的标准, 但是, 随着这方面研究的不断深入和研究技术不断进步, 可望为临床上检测复发转移、制定宫颈癌术后治疗方案、预后判断提供依据。

[参考文献]

- [1] PECORELLI S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix and endometrium [J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2009, 105(2): 103 - 104.
- [2] KELD, CHEN Z, YUNG W K. A reliability test of standard-based quantitative PCR exogenous endogenous standards[J]. *Mol Cell Probes*, 2000, (14):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 type 1, and tissue metalloproteinase inhibitor type 1 gene expressions in Primary breast cancer [J]. *Clin Chem* 2002, 48(8):1 288 - 1 295.
- [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):1 013 - 1 034.
- [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] 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.
- [8] FUCHS E. Keratins as biochemical markers of epithelial differentiation[J]. *Trends Genet*, 1988, 4(10):277 - 281.
- [9] 董学君, 郑专. 乳腺癌患者外周血 CK19 基因表达的检测及临床价值分析[J]. *浙江医学*, 2007, 29(1):15 - 17.
- [10] 金阳, 白明, 熊先智, 等. 非小细胞肺癌外周血 CK19mRNA 的表达及与临床的关系[J]. *中国肿瘤临床*, 2006, 33(12):699 - 701.
- [11] 王景美, 杜艳, 吴平平, 等. 食管癌患者外周血 CK20mRNA、CK19mRNA、CEAmRNA 的表达及其临床病理意义[J]. *东南大学学报*, 2006, 25(6):414 - 418.
- [12] 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.
- [13] 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):1 042 - 1 044.
- [14] 程玺, 蔡树模, 李子庭, 等. 宫颈癌患者外周血中 CK19mRNA 和HPVmRNA基因的检测及其意义[J]. *中国癌症杂志*, 2004, 14(4):313 - 316.
- [15] 陈雅卿, 冯建国, 羊正炎. 宫颈癌患者外周CK19和CK20mRNA 的检测及其临床意义[J]. *中国癌症杂志*, 2005, 15(4):389 - 391.
- [16] 吴妙芳, 李晶, 林仲秋. 《2012年NCCN宫颈癌临床实践指南》解读[J]. *国际妇产科学杂志*, 2012, 39(1):103 - 106.

(2013 - 08 - 10 收稿)