

· 临床研究 ·

乳腺小黏蛋白在检测乳腺癌患者外周血微转移中的意义

仲雷 张建国 郭宝良 杨学伟 单明

【摘要】 目的 探讨乳腺小黏蛋白 (small breast epithelial mucin, SBEM) mRNA 作为检测乳腺癌患者外周血微转移指标的临床意义。**方法** 用巢式逆转录-聚合酶链反应 (Nested-RT-PCR) 法检测 22 例女性胃癌、16 例结/直肠癌、107 例乳腺癌、40 例乳腺纤维腺瘤患者和 27 例健康志愿者外周血中 SBEM-mRNA 的表达情况。**结果** 107 例乳腺癌患者外周血中 SBEM-mRNA 有 57 例表达, 阳性率为 53.27%, 其余对照组中 SBEM-mRNA 表达均为阴性。两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。SBEM-mRNA 的阳性表达与患者的淋巴结转移状况和 TNM 分期均有相关性 (P 均 < 0.01); 而与患者的年龄、原发肿瘤大小、病理类型、ER、PR 等无相关性 ($P > 0.05$)。**结论** SBEM-mRNA 特异表达于乳腺癌患者的外周血, 可能成为检测乳腺癌患者外周血中微转移和判断预后的指标之一。

【关键词】 乳腺癌; 微转移; 巢式逆转录聚合酶链反应; SBEM-mRNA

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Detection of SBEM-mRNA level in peripheral blood of patients with breast cancer and its clinical significance ZHONG Lei, ZHANG Jian-guo, GUO Bao-liang, YANG Xue-wei, SHAN Ming. Department of Breast Surgery, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical College, Harbin 150086, China

【Abstract】 Objective To evaluate the clinical significance of SBEM (small breast epithelial mucin) mRNA as a micrometastases marker in peripheral blood of

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30672420);黑龙江省科技厅攻关项目(GB05C402-01)

作者单位:150086 哈尔滨,哈尔滨医科大学附属二院乳腺外科

breast cancer. **Methods** The SBEM-mRNA level in peripheral blood was detected in 22 patients with gastric cancer, 16 colon/rectal carcinoma, 107 breast cancer, 40 breast fibroadenoma and 27 healthy volunteers as controls using nested reverse transcription-polymerase chain reaction (Nested-RT-PCR). **Results** The positive expression rate of SBEM-mRNA in peripheral blood of breast cancer patients was 53. 27% (57/107 cases), and no positive SBEM-mRNA was found in other controls. There was a significant difference between the two groups ($P < 0.05$). SBEM-mRNA expression was correlated with axillary lymph nodes status and TNM ($P < 0.01$), but uncorrelated with other clinical parameters (age, tumor size, histopathology types, estrogen receptor and progesterone receptor). **Conclusion** SBEM-mRNA is sensitive and specific for breast cancer, and the positive expression in peripheral blood may be a marker in detecting micrometastases and judging prognosis.

【Key words】 Breast carcinoma; Micrometastasis; Nested-RT-PCR; SBEM-mRNA

乳腺癌的发病率占妇女肿瘤的 31%, 死亡率居第二位。远处转移是患者死亡的主要原因。乳腺癌转移无固定模式, 早期乳腺癌即可发生隐匿性转移^[1-3]。因此, 早期外周血微转移的检测, 对指导临床疾病治疗和判断预后具有重要意义。本研究利用较敏感的巢式逆转录聚合酶链反应 (Nested-RT-PCR) 技术, 以乳腺小黏蛋白 mRNA 作为标志, 检测乳腺癌患者外周血中的循环肿瘤细胞, 并初步探讨其在微转移检测中的意义。

1 资料和方法

1.1 检测对象

收集 2005 年 1 月至 2006 年 7 月在本院普外二科治疗的 107 例乳腺癌患者外周血标本。患者年龄 29 ~ 80 岁, 中位年龄 46.5 岁。乳腺癌组织学类型: 浸润性导管癌 96 例, 浸润性小叶癌 6 例, 黏液癌 4 例, 单纯癌 1 例。TNM 分期: I 期 20 例, II 期 73 例, III 期 14 例。雌激素受体 (ER) 阳性 67 例, ER 阴性 40 例; 孕激素受体 (PR) 阳性 44 例, PR 阴性 63 例。另收集 22 例女性胃癌、16 例结/直肠癌、40 例乳腺纤维腺瘤患者和 27 例健康志愿者的外周血标本作为对照组。全部患者均经病理学确诊, 乳腺癌患者术前胸片 X 线、B 超、CT 及骨扫描等检查未发现转移灶。

1.2 试剂、仪器及设备

淋巴细胞分离液为天津 TBD 公司产品; RNA 提取及 RT-PCR 试剂盒和琼

脂糖均购自 Promega 公司;TaqDNA 酶购自 MBI 公司;DNA Marker 购自 Sangon 公司;EB 为华美公司产品;PCR 仪为美国 PE 公司产品;凝胶电泳成像系统为美国 Bio-Rad 公司产品;分光光度计为上海第二分析仪器厂产品。

1.3 引物设计

应用 DNA 分析软件进行引物设计,由上海生物工程技术有限公司合成。SBEM-mRNA 第 1 轮 PCR 上游引物序列:5'-TTA GCA GTC CTG GTA CTC TTG GG-3';下游引物序列:5'-AAG CTG ATT CCA TCT CAG GGA CA-3',扩增目的片段长度 278 bp;第 2 轮 PCR 上游引物序列:5'-CTG CCC AGA ATC CGA CAA CAG-3';下游引物序列:5'-AGC AGT GGT CGC AGT GGT TGC-3',扩增目的片段长度 116 bp。

1.4 标本的收集与总 RNA 的抽提

所有患者取血前均未进行辅助治疗。抽取 5 ml 外周血,EDTA 抗凝,淋巴细胞分离液提取单个核细胞。按 Promega 公司 Total RNA Isolation System 试剂盒说明 30 min 内提取总 RNA。吸光度法检测 RNA 纯度,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。

1.5 RT-PCR 扩增及产物分析

按照 Promega 公司 Access RT-PCR System 试剂盒说明书进行基因扩增。逆转录总反应体系为 20 μ l,其中 25 mmol/L $MgCl_2$ 4 μ l,10 \times Buffer 2 μ l,dNTPs 2 μ l,Ribonuclease inhibitor 0.5 μ l,AMV 反转录酶 0.7 μ l,Oligo(dT) 151 μ l,mRNA 样品 2 μ l,去核酶水 7.8 μ l。逆转录 42 $^{\circ}C$,15 min;逆转录酶变性 95 $^{\circ}C$,5 min。

第 1 轮 PCR 总反应体系为 25 μ l,其中 cDNA 1 μ l,dNTPs 0.5 μ l,25 mmol/L $MgCl_2$ 2 μ l,10 \times Buffer 2.5 μ l,上游引物和下游引物各 1 μ l,DNA 聚合酶 0.2 μ l,去核酶水 16.8 μ l。反应条件为 94 $^{\circ}C$,4 min 预变性;94 $^{\circ}C$,45 s 变性;55 $^{\circ}C$,45 s 退火;72 $^{\circ}C$,1 min 延伸(30 次循环扩增),末次延伸 72 $^{\circ}C$,10 min。第 2 轮 PCR 取第 1 轮 PCR 产物 1 μ l 作模板,加第 2 轮 PCR 上游引物和下游引物各 1 μ l,其余反应体系同前。反应条件为 94 $^{\circ}C$,4 min 预变性;94 $^{\circ}C$,45 s 变性;58 $^{\circ}C$,45 s 退火;72 $^{\circ}C$,1 min 延伸(30 次循环扩增),末次延伸 72 $^{\circ}C$,10 min。

DNA marker(100 bp ladder)作为相对分子质量标志,2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外监测仪下观察结果,UVP 拍照。

1.6 统计学处理

应用 SPSS10.0 统计软件进行数据处理,采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

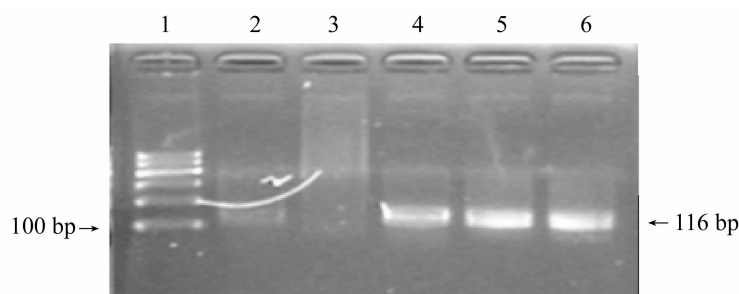
2.1 各组外周血中 SBEM-mRNA 的检测结果

107 例乳腺癌患者外周血中有 57 例 SBEM-mRNA 阳性,阳性率为 53.27%;对照组外周血中 SBEM-mRNA 无 1 例阳性表达。乳腺癌患者外周血阳性表达与对照组差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1,图 1)。

表 1 SBEM-mRNA 在乳腺癌、乳腺纤维腺瘤及健康人外周血的表达

组别	例数	SBEM-mRNA 表达		阳性率/(%)
		阳性例数	阴性例数	
乳腺癌 ^a	107	57	50	53.27
乳腺纤维腺瘤	40	0	40	0.00
健康人	27	0	27	0.00

a: $P < 0.05$,与乳腺纤维腺瘤和健康人比较



1: 标记条带;2: 健康志愿者;3: 乳腺纤维瘤患者;
4: II 期乳腺癌患者;5: III 期乳腺癌患者;6: 阳性对照(乳腺癌组织)

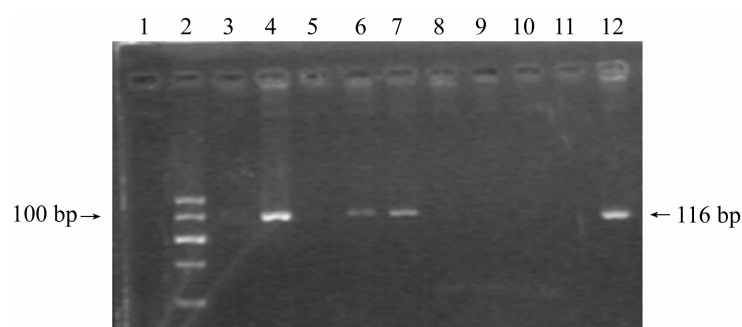
图 1 乳腺癌、健康志愿者外周血中 SBEM-mRNA 的表达

22 例女性胃癌、16 例女性结/直肠癌患者外周血中均未见 SBME-mRNA 表达,阳性率均为 0.00%,与乳腺癌组比较差异有统计学意义($P < 0.05$,表 2,图 2)。

表 2 女性不同恶性肿瘤患者外周血 SBEM-mRNA 的表达情况

组别	例数	SBEM-mRNA	阳性率/(%)
		表达阳性例数	
胃癌组	22	0	0.00
结/直肠癌组	16	0	0.00
乳腺癌组 ^a	107	57	

a: $P < 0.05$,分别与胃癌组和结/直肠组比较



1:水(阳性对照);2:标记条带;3:健康志愿者;4:乳腺癌;5:乳腺增生症;
6,7:乳腺癌;9:结肠癌;10:直肠癌;11:乳腺纤维腺瘤;12:乳腺癌组织(阳性对照)

图 2 不同研究对象 SBEM-mRNA 的表达情况

2.2 SBEM-mRNA 阳性表达与乳腺癌临床病理学特征的关系

SBEM-mRNA 的阳性表达与患者淋巴结转移状况和 TNM 分期有相关性 ($P < 0.01$);而与患者的年龄、原发肿瘤大小、病理类型、ER、PR 等无相关性 ($P > 0.05$,表 3)。

表 3 SBEM-mRNA 在乳腺癌外周血的表达情况与
临床病理学特征的关系

临床病理学参数	例数	阳性例数(%)	阴性例数(%)	χ^2 值	P 值
年龄/岁					
≤46.5	48	27(56.3)	21(43.7)	0.310	>0.05
>46.5	59	30(50.8)	29(49.2)		
肿瘤大小					
≤2 cm	39	22(56.4)	17(43.6)	0.243	>0.05
>2 cm	68	35(51.5)	33(48.5)		
病理类型					
浸润性导管癌	97	55(56.7)	42(43.3)	5.97	>0.05
浸润性小叶癌	6	2(33.3)	4(66.7)		
粘液癌	2	0(0.0)	2(100.0)		
单纯癌	2	0(0.0)	2(100.0)		
ER					
阳性	67	34(50.7)	33(49.3)	0.459	>0.05
阴性	40	23(57.5)	17(42.5)		
PR					
阳性	44	27(61.4)	17(38.6)	1.966	>0.05
阴性	63	30(47.6)	33(52.4)		
TNM 分期					
I	20	2(10.0)	18(90.0)	24.300	<0.01
II	73	51(69.9)	22(30.1)		
III	14	10(71.4)	4(28.6)		
淋巴结转移					
有	74	49(66.2)	25(33.8)	16.153	<0.01
无	33	8(24.2)	25(75.8)		

2.3 测序结果

本研究所扩增的 SBEM-mRNA 片段序列,应用 GeneBank 之 BLAST 软件进行同源性比较分析,证实扩增产物为目的基因(SBEM-mRNA)片段。

3 讨论

近年来中国乳腺癌的发病率在女性恶性肿瘤中已跃居首位^[4]。它作为一种全身性疾病,早期即可发生微转移,已被大量临床研究所证实^[5-7]。血液循环中的肿瘤细胞是导致肿瘤转移和复发的重要原因之一,因此及时早期检测外周血中的肿瘤细胞不仅对预测复发、转移有重要的参考价值,而且有助于肿瘤患者的临床治疗。

目前在乳腺癌微转移检测指标中,尚缺乏公认的分子指标。常用的上皮组织标志由于其他基因的干扰、组织特异性基因低水平的非特异转录等常导致假阳性的发生。因此,选择特异性的指标基因是提高微转移检测可靠性的关键。2002 年 5 月 Miksicek 等^[8]利用表达序列标签技术(Expressed sequence Tag, EST)和基因表达系列分析(Serial Analysis of Gene expression, SAGE)首次报道了一种新的用于检测乳腺癌微转移的标志物-乳腺小黏蛋白(small breast epithelial mucin, SEBM)。SBEM 的基因位于染色体 12q13.2 上,具有一个 3 条 8 肽前后序列重复的疏水核心,类似唾液黏蛋白。Miksicek 等的进一步研究指出:该蛋白表达具有特异性,仅在乳腺和唾液腺中表达,与 muc-1 相比具有高度特异性,可用于乳腺癌微转移的检测,可作为临床早期诊断乳腺癌的生物学标志物。

RT-PCR 是一种很敏感的检测方法,能在 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个正常组织细胞中检出一个肿瘤细胞^[9]。近年来,在外周血肿瘤细胞的检测方法上,RT-PCR 技术通过扩增肿瘤细胞“标志性”靶 mRNA 来证实血中肿瘤细胞的存在,被广泛用于各种实体瘤微转移的检测^[10-12]。Nested-RT-PCR 是在 RT-PCR 的基础上,取外侧引物对指引下的第 1 轮 PCR 产物作为模板,用内侧引物对进行第 2 轮扩增,具有更高的敏感性和特异性。在本研究中,由于大量 RNA 酶的存在,血浆中不会有游离的 mRNA,利用 RT-PCR 技术检测到的 mRNA 显然来自外周血中完整的循环细胞^[13],除乳腺癌细胞外,正常乳腺细胞、乳腺良性肿瘤细胞不可能进入外周循环,因此特异标志物 SBEM-mRNA 阳性可以提示血循环中有乳腺癌细胞。

本研究结果显示,SBEM-mRNA 在健康志愿者、乳腺纤维腺瘤患者、女性

胃癌和结/直肠癌患者外周血中表达均为阴性,而乳腺癌患者外周血中 SBEM-mRNA 的阳性率(53.27%)与对照组间的差异有统计学意义($P < 0.05$),表明 SBEM-mRNA 作为检测乳腺癌外周血循环肿瘤细胞的标志物具有很高的特异性。通过分析检测结果与患者临床病理学特征的关系,发现 SBEM-mRNA 的阳性率与患者的年龄、原发肿瘤大小、病理类型、ER、PR 等均无相关性($P > 0.05$),而与患者的 TNM 分期和淋巴结转移状态相关($P < 0.05$)。SBEM-mRNA 的阳性率随 TNM 分期的增加而增高,Ⅲ期达 71.4% (10/14)。这一结果符合恶性肿瘤细胞的生物学行为。同时,本研究结果显示 I 和 II 期乳腺癌患者亦有 10.0% 和 69.9% 的阳性率,提示部分 I、II 期乳腺癌患者可能已经有血循环的微转移。这再次说明乳腺癌是一种早期可出现转移的全身性疾病,因此对于临床上认为相对早期、但外周循环检测阳性的患者,在术后综合治疗中应加以重视。本研究还发现,并非所有乳腺癌患者外周血中均能检测到 SBEM-mRNA,包括 28.6% Ⅲ期乳腺癌患者。这提示肿瘤细胞可能是成簇间断释放入血液循环的,实际上血液循环中出现肿瘤细胞的机会很可能要高于仅凭一次取血检测得到的结果,因此,增加取血次数和每次取血量可能会提高阳性率。在乳腺癌预后指标中,腋窝淋巴结状态是重要参数之一。研究发现,有淋巴结转移的患者 SBEM-mRNA 阳性率为 66.2%,淋巴结阴性者 SBEM-mRNA 阳性率为 24.2%,两者比较差异有统计学意义。提示外周血中 SBEM-mRNA 阳性表达在一定程度上能够反映临床病期,对进一步指导治疗、判断预后有重要意义。

癌细胞脱离原发灶,播散至血循环或淋巴系统,最后进入靶器官实质是一个多步骤、多因素参与的极其复杂的过程,与肿瘤细胞自身生物学特性、机体免疫状况、局部微循环等多因素有关。因此,虽然本研究显示 SBEM-mRNA 是一个有价值的检测乳腺癌微转移的标志物,但还需对患者进行长期随访,以进一步明确微转移与复发、转移和预后的关系。

参考文献

- [1] Parker S L, Tong T, Bolden S, *et al.* Cancer statistics 1997. CA Cancer J Clin, 1997, 47: 5 - 27.
- [2] Bundred N J. Prognostic and predictive factors in breast cancer. Cancer Treat Rev, 2001, 27: 137 - 142.
- [3] Fisher B. Personal contributions to progress in breast cancer research and treatment. Semin Oncol, 1996, 23: 414 - 427.
- [4] 张嘉庆, 王殊, 乔新民. 乳腺癌的现状与远景. 中华外科杂志, 2002, 40: 161 - 163.
- [5] Grunewald K, Haun M, Urbanek M, *et al.* Mammaglobin gene express; a superior marker of breast cancer cells in peripheral blood in comparison to epidermal-growth-factor receptor and cytokeratin-19. Lab Invest, 2000, 80: 1071 - 1077.

- [6] Zhu L, Lam C K, Chow L W. Sentinel lymph node biopsy or detection of micrometastasis in bone marrow: which might be an alternative to axillary lymph node dissection in breast cancer patients. *Asian J Surg*, 2004, 27: 279-283.
- [7] Gardner B, Feldman J. Are positive axillary nodes in breast cancer markers for incurable disease? *Ann Surg*, 1993, 218: 270 - 275.
- [8] Miksicek R J, Myal Y, Watson P H, *et al*. Identification of a novel breast- and salivary gland-specific, mucin-like gene strongly expressed in normal and tumor human mammary epithelium. *Cancer Res*, 2002, 62: 2736 - 2740.
- [9] Ghossein R A, Rosai J. The polymerase chain reaction in the detection of micrometastases and circulating tumor cells: present status and future potential. *Anat Pathol*, 1998, 3: 233 - 251.
- [10] Zach O, Kasparu H, Krieger O, *et al*. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients *via* a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mamaglobin mRNA. *J Clin Oncol*, 1999, 17: 2015 - 2019.
- [11] Raj G V, Moreno J G, Gomella L G. Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors. *Cancer*, 1998, 82: 1419 - 1442.
- [12] 耿强, 王水, 范萍, 等. 乳腺癌前哨淋巴结和骨髓和外周血微小转移的联合检测. *肿瘤防治杂志*, 2005, 2: 85 - 88.
- [13] 陈兵, 王云海. 胃癌患者外周血肿瘤细胞的检测及其临床意义. *中华医学实践杂志*, 2004, 3: 509 - 511.

(收稿日期: 2007-09-07)

(本文编辑: 罗承丽)

仲雷, 张建国, 郭宝良, 等. 乳腺小黏蛋白在检测乳腺癌患者外周血微转移中的意义[J/CD]. *中华乳腺病杂志: 电子版*, 2008, 2(1): 40 - 47.