

• 临床研究 •

乳腺癌特异性标志物人乳腺小黏蛋白的检测及临床意义

刘剑仑 杨华伟 曹骥 杨南武

【摘要】 目的 通过检测乳腺癌特异性的标志物人乳腺小黏蛋白(hSBEM)在良、恶性乳腺组织及外周血中表达,探讨其作为乳腺癌细胞血行转移标志物的可能性。**方法** 应用巢式逆转录聚合酶链反应(nested-RT-PCR)技术,对 67 例乳腺癌、癌旁正常乳腺组织,16 例乳腺良性肿瘤组织和患者外周血,以及 20 位健康志愿者外周血 hSBEM 的表达进行检测;同时分析胃癌、大肠癌、食管癌、肺癌和卵巢癌各 5 例组织中 hSBEM 的表达情况。**结果** hSBEM 在乳腺癌、乳腺良性疾病及正常乳腺组织中的表达分别为 92.54% (62/67)、87.50% (14/16) 及 88.05% (59/67),3 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$);hSBEM 在非乳腺癌的其他癌组织中无表达。67 例乳腺癌患者外周血 hSBEM 检出率为 50.75% (34/67),转移性及伴淋巴结转移乳腺癌患者外周血中 hSBEM 表达率明显高于局限性乳腺癌及无淋巴结转移者 ($P < 0.05$);hSBEM 在健康人及乳腺良性疾病患者外周血中均无表达。hSBEM 的表达与患者的年龄、原发肿瘤大小、病理类型、ER 和 PR 的状态无关 ($P > 0.05$)。**结论** hSBEM 特异性表达于乳腺组织,乳腺癌患者外周血检测出 hSBEM 提示已有癌细胞进入血液循环,因此可作为检测乳腺癌血行微转移的标志物。

【关键词】 乳腺肿瘤;巢式逆转录聚合酶链反应;人乳腺小黏蛋白;微转移

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Detection of specific biomarker hSBEM in breast cancer and its clinical significance LIU Jian-lun, YANG Hua-wei, CAO Ji, YANG Nan-wu. Department of Gastrointestinal & Breast Surgery, Cancer Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

【Abstract】 Objective To explore the possibility of human small breast epithelial mucin (hSBEM) as a metastasis marker of breast cancer through blood route by detecting the expression of hSBEM in benign and malignant tumours and peripheral blood. **Methods** The expression of hSBEM was detected with nested reverse transcription polymerase chain reaction (nested RT-PCR) in 67 samples of breast cancer and adjacent normal breast tissue, 16 samples of breast benign lesion tissue, and 67 specimens of peripheral blood from patients with breast cancer, 16 specimens of benign breast lesions, and 20 specimens of healthy volunteers, meanwhile the hSBEM expressions tested by nested RT-PCR in 25 other carcinomas tissue samples, including gastric carcinoma ($n = 5$), colorectal carcinoma ($n = 5$), esophageal carcinoma ($n = 5$), lung carcinoma ($n = 5$), and ovary carcinoma ($n = 5$) were also analyzed. **Results** hSBEM expression was observed in 92.54% (62/67) of breast cancer, 87.50% (14/16) of breast benign lesions and 88.05% (59/67) of normal breast tissue, with no significant differences between them ($P > 0.05$). None of the samples from the 25 other cancer tissues were positive. In peripheral blood the expression of hSBEM was detected in 50.75% (34/67) patients with breast cancer, with significant increase ($P < 0.05$) in the cases of metastatic disease and those with lymph node metastasis compared with localized disease and without lymph node metastasis, but the expression was not found in peripheral blood of patients with benign breast lesions and healthy volunteers. The expression of hSBEM had no correlation with the age of the patients, size of primary tumor, histological type and estrogen or progesterone receptor status ($P > 0.05$). **Conclusions** hSBEM, as assessed by nested RT-PCR, shows a mammary-specific and mammary-sensitive expression, and is a sensitive indicator of hematogeneous spread of breast cancer cell. hSBEM is a promising molecular biomarker in detecting breast cancer micrometastases.

【Key words】 Breast neoplasms; Nested reverse transcription polymerase chain reaction; Human small breast epithelial mucin; Micrometastases

乳腺癌是女性中最常见的恶性肿瘤,全球每年乳腺癌新发病例数达115万^[1],中国乳腺癌的发病率及死亡率呈持续性增长。虽经规范的外科手术、辅助性放化疗和内分泌治疗,但仍有30%的局限性乳腺癌患者最终出现远处转移^[2]。术前未检出的微小转移或术中肿瘤细胞进入血液是导致治疗失败和死亡的主要原因,因此早期发现外周血的乳腺癌细胞不仅对判断乳腺癌的微转移和复发具有重要价值,而且对指导临床制定治疗措施、提高乳腺癌的治愈率和生存率具有非常重要的临床意义^[3-4]。寻找组织及肿瘤特异性基因作为检测血液中乳腺癌细胞的诊断性生物学标志物,对乳腺癌的临床治疗具有重要意义。由于血液中癌细胞的数量很少,检测技术不仅需要高度敏感,而且需要高度特异性。理想的肿瘤标志物应仅在肿瘤组织中表达,正常组织不表达。人乳腺小黏蛋白(human small breast epithelial mucin, hSBEM)被发现仅在乳

腺和唾液腺中表达,较传统的标志物具有更高的特异性^[5]。该标志物的特性提示其可用于乳腺癌微转移的检测。本研究应用巢式逆转录聚合酶链反应(nested-RT-PCR)技术,对乳腺癌组织及乳腺癌患者外周血 hSBEM 的表达进行检测,探讨其在预测乳腺癌微转移方面的临床意义,评价其能否作为诊断乳腺癌微转移的标志物。

1 资料和方法

1.1 临床资料

选择广西医科大学附属肿瘤医院胃肠乳腺外科 2002 ~ 2003 年经病理证实为乳腺癌患者 67 例,均为女性,年龄 25 ~ 79 岁,中位年龄 46 岁,临床资料见表 1。乳腺良性病变患者 16 例,其中乳腺纤维瘤 10 例,乳腺上皮增生 4 例,乳管内乳头状瘤 2 例,年龄 19 ~ 53 岁,中位年龄 42 岁;健康志愿者 20 例(男 1 例、女 19 例),年龄 25 ~ 50 岁,中位年龄 32 岁;25 例其他恶性肿瘤,包括胃癌、大肠癌、食道癌、肺癌和卵巢癌各 5 例,男 16 例、女 9 例,年龄 22 ~ 63 岁,中位年龄 44 岁。所有患者手术前均未接受化疗或放射治疗。

1.2 检测方法

1.2.1 标本采集:乳腺癌、距癌旁 5 cm 以外的正常乳腺组织、乳腺良性病变组织,以及其他恶性肿瘤(包括胃癌、大肠癌、食道癌、肺癌和卵巢癌)组织标本于离体后 30 min 内采集。每例标本分为 2 份,1 份为常规切片,用于病理诊断;另 1 份置液氮冻存,用于 nested-RT-PCR 测定。取受检者 1.06 mmol/L 枸橼酸抗凝静脉外周血 5 ml,淋巴细胞分离液按密度梯度离心法常规分离有核细胞,液氮速冻后 -80 °C 冰箱保存。

1.2.2 RT-PCR 反应:总 RNA 抽提及逆转录反应均按说明书操作,引物设计参考文献^[5]。hSBEM 第 1 轮扩增,上游引物 5'-CTTTGAAGCATTTTGT CTGTG-3',下游引物 5'-AAGGTAAGTATGTGGAT GAAAT-3';扩增条件:94 °C 4 min 预变性;94 °C 45 s,55 °C 45 s,72 °C 45 s,35 个循环;72 °C 10 min 延伸。PCR 产物为 396 bp。第 2 轮扩增,上游引物 5'-CTGCCCAGAATCCGACAACAG-3',下游引物 5'-AGCAGTGGTCCGAGTGGTTGC-3';扩增条件:94 °C 5 min 预变性;94 °C 30 s,62 °C 30 s,72 °C 45 s,35 个循环;72 °C 10 min 延伸。PCR 产物为 117 bp。

β -actin 基因作为内参照质控指标,上游引物 5'-AACTCCATCATGAAGTGTGA-3',下游引物 5'-ACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3';扩增条件与 hSBEM 相同,但只进行一轮扩增。PCR 产物为 247 bp。阳性对照用乳腺癌组织 cDNA 作为扩增模板,

阴性对照用蒸馏水代替。

表 1 乳腺癌 hSBEM 表达与临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	hSBEM (组织) [阳性数(%)]	hSBEM(外周血) [阳性数(%)]
年龄(年)			
≤40	18	17 (94. 44)	5 (27. 78)
40 ~ 60	43	40 (93. 02)	14 (32. 56)
> 60	6	5 (83. 33)	1 (16. 66)
肿瘤大小/ cm			
≤2	11	9 (81. 82)	2 (18. 18)
2 ~ 5	43	40 (93. 02)	14 (32. 56)
> 5	13	13 (100. 00)	4 (30. 77)
TNM 分期			
I	8	7 (87. 50)	2 (25. 00)
II	24	22 (91. 67)	11 (45. 83)
III	16	14 (87. 50)	7 (43. 75)
IV	19	19 (100. 00)	14 (73. 68) ^a
淋巴结情况			
阳性	38	36 (94. 74)	26 (68. 42) ^b
阴性	29	26 (89. 65)	8 (27. 59)
ER 受体			
阳性	37	15 (40. 54)	12 (32. 43)
阴性	30	16 (53. 33)	14 (46. 67)
PR 受体			
阳性	32	14 (43. 75)	18 (56. 25)
阴性	35	19 (54. 28)	16 (45. 71)
组织学类型			
浸润性导管癌	48	46 (95. 83)	20 (41. 67)
低分化腺癌	7	6 (85. 70)	3 (42. 86)
单纯癌	5	4 (80. 00)	2 (40. 00)
髓样癌	4	3 (75. 00)	1 (25. 00)
湿疹样癌	2	2 (100. 00)	0 (00. 00)
浸润性小叶癌	1	1 (100. 00)	0 (00. 00)

a: $P < 0.05$, 与 I、II、III 期乳腺癌比较; b: $P < 0.05$, 与淋巴结阴性比较

1.2.3 PCR 产物鉴定:取 PCR 扩增产物 10 μ l, 上样于 1.7% 琼脂糖凝胶, 100 V 电压电泳 45 min, 0.5 mg/ml 溴乙锭染色 25 min, 在紫外光下自显影, 计算机扫描成像判定结果。

1.2.4 PCR 产物测序:PCR 扩增产物送广西医科大学医学科学实验中心测序、鉴别。

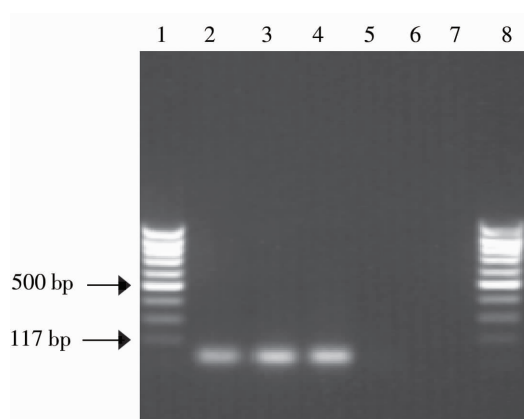
1.3 统计学分析

应用 SPSS 10.0 统计软件包行 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hSBEM 在组织及外周血中的表达

Nested-RT-PCR 检测乳腺癌组织、癌旁正常乳腺组织、乳腺良性病变组织、其他癌组织,以及乳腺癌、乳腺良性病变和健康志愿者外周血 hSBEM 的表达。乳腺癌、正常乳腺组织及乳腺良性病变组织中 hSBEM 阳性表达率分别为 92.54% (62/67)、88.05% (59/67) 及 87.50% (14/16), 3 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); hSBEM 在胃癌、大肠癌、食管癌、肺癌、卵巢癌组织中均无表达;乳腺癌患者外周血 hSBEM 阳性表达率为 50.75% (34/67), 而乳腺良性病变和健康志愿者外周血 hSBEM 表达为阴性(图 1)。



1, 8: 标记条带; 2, 3: 乳腺癌; 4: 阳性对照; 5: 乳腺良性肿瘤;
6: 健康人; 7: 阴性对照

图 1 乳腺癌外周血 hSBEM 的测定结果

2.2 hSBEM 表达与乳腺癌临床病理学特征的关系

乳腺癌组织 hSBEM 阳性表达率与临床病理特征无显著相关性 ($P > 0.05$); 乳腺癌患者外周血 hSBEM 的阳性表达与临床 TNM 分期显著相关, IV 期乳腺癌患者外周血 hSBEM 阳性表达率为 14/19 (73.68%) 明显高于 I (25.00%)、II (45.83%) 及 III 期者 (43.75%) ($P < 0.05$), 且伴淋巴结转移者 hSBEM 阳性表达率 (68.42%) 明显高于无淋巴结转移者 (27.59%) ($P < 0.05$), 而 hSBEM 阳性表达率与患者的年龄、肿瘤大小及组织学类型状况无关 ($P > 0.05$) (表 1)。

2.3 测序结果

本研究 PCR 扩增产物的测序结果, 经 Genbank Blast 软件进行同源性比较分析, 证实所扩增的产物为 hSBEM 片段(图 2)。

|||||

3 讨论

人乳腺小黏蛋白(human small breast epithelial mucin, hSBEM)是2002年应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)筛选分离得到的新的乳腺特异性基因。该基因位于染色体12q13.2,长3.9 kb,包含4个外显子和3个内含子,其对应转录子约600~700 bp,编码为90个氨基酸的分泌性蛋白,提示hSBEM可能为一分泌性蛋白^[5,9-10]。hSBEM基因仅在乳腺和唾液腺中表达,在其他绝大多数正常组织无表达或低表达^[12]。进一步的RT-PCR检测结果证实,hSBEM在大部分乳腺上皮细胞系中表达,非乳腺细胞无表达,在乳腺肿瘤及转移性淋巴结中呈过度表达^[5,9,12]。这提示hSBEM可作为乳腺肿瘤标志物及乳腺癌治疗的特异性靶标。

本研究结果显示,hSBEM 特异表达于乳腺组织,且乳腺癌组织 hSBEM 呈

过度表达,但在其他非乳腺癌组织,包括胃癌、大肠癌、食管癌、肺癌、卵巢癌组织中均无表达。有研究显示,乳腺癌患者外周血癌细胞与复发及总生存率等预后显著相关^[13]。本研究发现,hSBEM 在乳腺良性疾病患者及健康人外周血中均无表达,而乳腺癌患者外周血 hSBEM 阳性表达率为 50.75% (34/67),且乳腺癌患者外周血 hSBEM 检出率与淋巴转移及临床分期显著相关,伴淋巴结转移者 hSBEM 阳性表达率(68.42%)明显高于无淋巴结转移者(27.59%)。Ⅳ期乳腺癌患者外周血 hSBEM 阳性表达率明显高于Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期者($P < 0.05$),提示病期越晚,发生远处转移的危险性也越大,因此 hSBEM 有可能作为检测乳腺癌转移的特异性标志物。但并非所有的晚期乳腺癌患者外周血中均能检测到 hSBEM,Ⅳ期乳腺癌患者中亦有 26.32% 的阴性率,其原因可能为^[14-15]:(1)肿瘤细胞成簇间断释放进入血液循环;(2)肿瘤基因表达上的异质性;(3)检测方法的敏感性差异。因此,增加取血次数和取血量,或定量分析可能有助于阳性率的提高。乳腺癌患者外周血肿瘤细胞 hSBEM 的扩增不仅取决于肿瘤细胞的数量,而且与单个细胞表达 hSBEM 的程度有关。由于 hSBEM 过度表达仅限于肿瘤细胞,因此癌症患者检测 hSBEM 具有绝对的特异性。值得注意的是,本研究也发现Ⅰ期乳腺癌患者亦有 25% 的阳性率,这也进一步证实乳腺癌作为一种全身性疾病早期即可能发生血循环的微转移,因此对外周血检测 hSBEM 阳性的乳腺癌患者,即使临床上判断为早期,亦应认为存在潜在复发、转移可能性的高危患者,在术后综合治疗中应更加重视并予以严密观察和长期随访。有研究表明 hSBEM 可表达于正常丝裂原刺激的外周血单核细胞^[16]。由于癌症的进展常伴随着炎症反应,因此对激活的淋巴细胞的检测应予以验证,以避免在检测转移肿瘤细胞时出现假阳性。由于本研究结果是初步的,hSBEM 能否作为临床发病前微转移的检测指标尚未确定,因此需要进一步以 RT-PCR 为基础的大规模、前瞻性临床相关的肿瘤细胞 hSBEM 检测证实。笔者认为若能对外周血 hSBEM 进行定量检测及其蛋白表达水平的检测,可提高其作为乳腺癌细胞标志物的特异性和实际应用价值,通过对 hSBEM 标志物进行连续动态观察可提高检测的敏感性和特异性。该指标有可能成为检测乳腺癌微转移、判断乳腺癌预后的具有较大临床应用价值的特异性乳腺癌标记物。

参考文献

- [1] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, *et al.* Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005, 55: 74-108.

- [2] Gianni L, Valagussa P, Zambetti M, *et al.* Adjuvant and neoadjuvant treatment of breast cancer. *Semin Oncol*, 2001, 28:13 – 29.
- [3] Giesing M, Austrup F, Bockmann B, *et al.* Independent prognostication and therapy monitoring of breast cancer patients by DNA/RNA typing of minimal residual cancer cells. *Int J Biol Markers*, 2000, 15:94 – 99.
- [4] Ring A, Smith I E, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol*, 2004, 5:79 – 88.
- [5] 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.
- [6] Corradini P, Voena C, Astolfi M, *et al.* Maspin and mammaglobin genes are specific markers for RT-PCR detection of minimal residual disease in patients with breast cancer. *Ann Oncol*, 2001, 12:1693 – 1698.
- [7] Grunewald K, Haun M, Urbanek M, *et al.* Mammaglobin gene expression: 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.
- [8] Bost ick P J, Chatterjee S, Chi D D, *et al.* Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. *J Clin Oncol*, 1998, 16:2632 – 2640.
- [9] Colpitts T L, Billing P, Granados E, *et al.* Identification and immunohistochemical characterization of a mucin-like glycoprotein expressed in early stage breast carcinoma. *Tumour Biol*, 2002, 23:263 – 278.
- [10] Clark H F, Gurney A L, Abaya E, *et al.* The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: a bioinformatics assessment. *Genome Res*, 2003, 13:2265 – 2270.
- [11] Houghton R L, Dillon D C, Molesh D A, *et al.* Transcriptional complementarity in breast cancer: application to detection of circulating tumor cells. *Mol Diagn*, 2001, 6:79 – 91.
- [12] Weigelt B, Verduijn P, Bosma A J, *et al.* Detection of metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients by multiple mRNA markers. *Br J Cancer*, 2004, 90:1531 – 1537.
- [13] Pantel K, Cote R J, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91:1113 – 1124.
- [14] Ghossein R A, Bhattacharya S, Rosai J. Molecular detection of micrometastasis and circulating tumor cells in solid tumors. *Clin Cancer Res*, 1999, 5:1950 – 1960.
- [15] Fetsch P A, Cowan K H, Weng D E, *et al.* Detection of circulating tumor cells and micrometastases in stage II, III, and IV breast cancer patients utilizing cytology and immunocytochemistry. *Diagn Cytopathol*, 2000, 22:323 – 328.
- [16] Kowalewska M, Chechlinska M, Markowicz S, *et al.* The relevance of RT-PCR detection of disseminated tumour cells is hampered by the expression of markers regarded as tumour-specific in activated lymphocytes. *Eur J Cancer*, 2006, 42: 2671 – 2674.

(收稿日期:2008-02-03)

(本文编辑:罗承丽)

刘剑仑, 杨华伟, 曹骥, 等. 乳腺癌特异性标志物人乳腺小黏蛋白的检测及临床意义[J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2008, 2(2): 149 – 156.