

## · 经验交流 ·

# 应用流式细胞术检测乳腺癌患者外周血中 CK19 表达的临床研究

张月君 王本忠 王劲 徐晓军 颜蕴文 裴静 张敬杰

乳腺癌发病率呈逐年上升趋势,远处转移是导致患者不良预后的主要原因。外周血是肿瘤发生远处转移的必经途径。细胞角蛋白 19(CK19)存在于上皮细胞中,间叶组织(如血液、骨髓、淋巴结等)不表达,因此 CK19 可作为乳腺癌患者癌细胞进入血液循环的标志<sup>[1]</sup>。本研究采用流式细胞术检测外周血 CK19 阳性表达细胞,探讨其与乳腺癌临床分期、远处转移的相关性,并观察其临床意义。

## 1 资料和方法

### 1.1 临床资料

2006 年 4 月至 2006 年 11 月本科收治乳腺癌患者 37 例,中位年龄 45 岁。根据美国国家癌症综合治疗联盟(NCCN)分期标准:I 期 2 例、II 期 21 例、III 期 4 例、IV 期 10 例。所有患者均经手术或组织学穿刺病理证实为浸润性导管癌。10 例乳腺良性病变患者和 10 例健康女性分别作为阴性对照组。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 血液采集:**术前取静脉血 5 ml,用 10% EDTA 抗凝。为防止静脉壁及皮肤上皮细胞污染,弃去第 1 管血标本。血标本采集后立即送检。

**1.2.2 血细胞分离及抗体标记:**用红细胞裂解液 XR-I(安徽优品公司)将红细胞裂解后,100  $\mu$ l 多聚甲醛固定 1~2 h。PBS 洗涤、离心,加封闭液(小鼠血清)10  $\mu$ l,30 min 后加穿膜液 TritonX(BD 公司 美国)100  $\mu$ l,20 min 后加入 CK19-FITC 及阴性对照鼠抗人 Ig1-FITC(BD 公司 美国)过夜。PBS 洗涤 2 遍后转管,使用 FACSCalibur 流式细胞仪(BD 公司 美国)检测。

作者单位:230022 合肥,安徽医科大学第一附属医院乳腺外科

通讯作者:王本中,E-mail:wangbenzhong2459@126.com

**1.2.3 流式细胞仪分析:**设立空白对照,根据空白对照进行光路-流路校正,再对靶细胞群进行检测。全部数据由 WinMDIY2.9 软件分析。以 CK19 荧光强度  $>10^1$  为阳性。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件包统计分析,行确切概率法检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CK19 表达情况

10 例健康女性和 10 例乳腺良性病变患者 CK19 均为阴性(图 1)。而 37 例乳腺癌患者 CK19 阳性率为 29.73% (11/37,图 2)。Ⅳ期患者 CK19 阳性率为 100%。

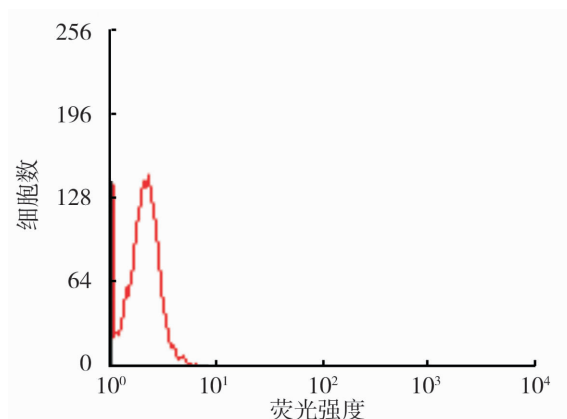


图 1 CK19 阴性表达

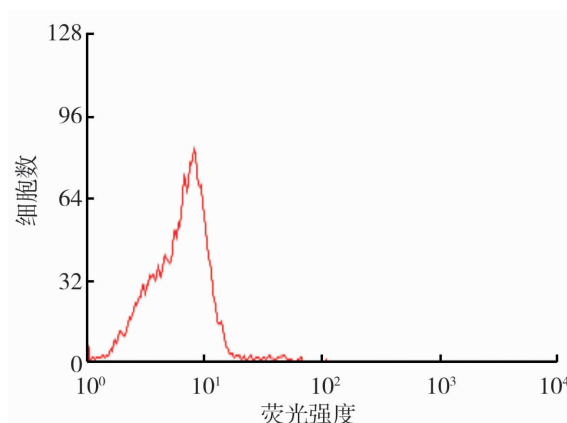


图 2 CK19 阳性表达

## 2.2 乳腺癌外周血 CK19 与临床病理学预后因素的关系

乳腺癌 I ~ III 期与 IV 期相比, CK19 表达的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而肿瘤的大小, 腋窝淋巴结有无转移, ER、PR、HER-2 表达情况间的差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 表 1)。

表 1 乳腺癌外周血 CK19 与病理预后因素的相关性

临床因素		例数	CK19 阳性(%)	P 值
TNM 分期	I、II、III	27	1(0.037)	0.00
	IV	10	10(100)	
腋窝淋	-	16	3(0.188)	0.29
	+	21	8(0.381)	
巴结转移	<5.0	25	6(0.240)	0.44
	≥5.0	12	5(0.417)	
ER	-	14	7(0.500)	0.06
	+	23	4(0.181)	
PR	-	16	7(0.438)	0.15
	+	21	4(0.190)	
HER-2	-	12	5(0.417)	0.44
	+	25	6(0.240)	

## 3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤, 手术是目前最主要的治疗手段之一。术后腋窝淋巴结转移与否是临床治疗和判断预后的重要参考指标。然而目前常规病理检查腋窝淋巴结阴性患者, 术后 5 年仍有 20% ~ 30% 出现复发转移<sup>[2]</sup>。大量证据表明: 原发肿瘤在早期阶段, 即可有肿瘤细胞脱落, 经循环系统形成微小转移灶, 最终导致不良预后。Diel 等<sup>[3]</sup>采用大样本乳腺癌多变量分析结果显示, 微转移是一个独立的预后指标, 其价值优于肿瘤的分级和分期。

乳腺癌绝大多数都起源于上皮组织, 若乳腺癌患者外周血中检测到 CK19 的表达, 应考虑是由乳腺癌细胞转移扩散而来。CK19 检测目前多采用 RT-PCR 方法。RT-PCR 的检出率在 36% 左右<sup>[4]</sup>, 特异性较低, 仅 62.9%<sup>[5]</sup>。其之所以难在临床广泛应用, 主要在于其假阳性率高、易污染、特异性低、费用高、费时、操作烦琐等缺点。本实验采用流式细胞术检测外周血 CK19 的表达。Borgen 等<sup>[6]</sup>认为该法的灵敏度可达到 1/500 000。王建中等<sup>[7]</sup>报道, 用多参数流式细胞法对乳腺癌前哨淋巴结检测发现, 灵敏度及特异度均优于常规病理

切片。而最近有学者使用多参数流式细胞仪检测以抗细胞角蛋白及 DNA 双染色标记的样本,可以在  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  个单核细胞中检测到一个肿瘤细胞,还可在肿瘤细胞中分析 DNA 倍体类型,从而进一步提高了检测特异性<sup>[8]</sup>。

本研究显示 CK19 总检出率为 29.73% (11/37), IV 期患者 CK19 阳性率为 100%; 10 例良性乳腺疾病和 10 例健康人 CK19 均无表达,表明流式细胞术能灵敏地检测血循环中播散的肿瘤细胞。同时,本研究还比较了初治乳腺癌患者外周血 CK19 的表达与传统预后因素的相关性,结果显示外周血 CK19 的表达在 I ~ III 和 IV 期之间差异有统计学意义,而在肿瘤大小分级,腋窝淋巴结有无转移,ER、PR、HER-2 表达情况间的差异无统计学意义。其他文献也有类似的报道。Kahn 等<sup>[9]</sup>认为 CK19 的表达与远处转移呈显著相关性,但与淋巴结状况、肿瘤大小、组织类型、组织分期、病理组织学参数无关。本研究结果显示,10 例 IV 期乳腺癌的 CK19 毫无例外均为阳性,因此对于分期属于早期乳腺癌,但外周血中 CK19 持续表达的患者,应警惕远处转移的可能,争取术后尽早化疗,消灭可能已存在的微小转移灶。虽然 CK19 表达在肿瘤大小,有无淋巴结转移,ER、PR、HER-2 阴性、阳性表达间的差异无统计学意义,但本研究显示肿瘤较大( $\geq 5$  cm)、ER/PR 阴性、淋巴结阳性患者,CK19 表达的阳性率呈现高于肿瘤较小( $< 5$  cm)、ER/PR 阳性、淋巴结阴性患者的趋势,因此随着样本量的增加,CK19 的表达与肿瘤大小分级等病理学预后因素可能有差异性<sup>[10]</sup>。

综上所述,乳腺癌患者外周血 CK19 的表达状况与临床分期密切相关,并且是有一定价值的预后因素。进一步确立乳腺癌外周血 CK19 的临床价值,尚需在规范检测的基础上,进一步做大样本的前瞻性研究和长时间的随访。

**【关键词】** 流式细胞术; 乳腺癌; CK19

**【中图法分类号】** R737.9 **【文献标识码】** B

#### 参考文献

- [1] Kruger W, Krzizanowski C, Holweg M, *et al.* Reverse transcriptase/polymerase chain reaction detection of cytokeratin-19 mRNA in bone marrow and blood of breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1996, 122: 679 - 686.
- [2] Schoenfeld A, Iqmani Y, Smith D, *et al.* Detection of breast cancer micrometastases in axillary nodes by using polymerase chain reaction. *Cancer Res*, 1994, 54: 2986 - 2990.
- [3] Dile I J, Keafmann M, Costa S D, *et al.* Micrometastatic breast cancer cell in bone marrow at primary surgery: prognostic

value in comparison with nodal status. J Nation Cancer Institute, 1996, 88: 1652.

- [4] 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, 20: 3404 – 3412.
- [5] 邢光明, 路晴, 侯晓微, 等. 乳腺癌微转移的 CK19 和 CD44 表达研究. 中华普通外科杂志, 2003, 18: 491 – 493.
- [6] Borgen E, Beiske K, Trachsel S, *et al.* Immunocytochemical detection of isolated epithelial cells in bone marrow non-specific staining and contribution by plasma cells directly reactive to alkaline phosphatase. J Pathol. 1998, 185: 427 – 434.
- [7] 王建中. 临床流式细胞分析. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 459 – 490.
- [8] Cruz I, Ciudad J, Cruz J J, *et al.* Evaluation of multiparameter flow cytometry for detection of breast cancer tumor cells in blood samples. Am J Clin Pathol, 2005, 123: 66 – 74.
- [9] Kahn H J, Yang L Y, Blondal J, *et al.* RT-PCR amplification of CK19 mRNA in the blood of breast cancer patients: correlation with established prognostic parameters. Breast Cancer Res Treat, 2000, 60: 143 – 151.
- [10] 李金锋, 张蕾, 孙素莲, 等. 应用逆转录-聚合酶链反应技术检测乳腺癌骨髓微转移. 中华外科杂志, 2000, 20: 237.

(收稿日期: 2008-03-13)

(本文编辑: 罗承丽)

张月君, 王本忠, 王劲, 等. 应用流式细胞术检测乳腺癌患者外周血中 CK19 表达的临床研究[J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2008, 2(3): 339 – 343.