

• 实验研究 •

联合检测乳腺癌患者外周血中细胞角蛋白 19 及人乳腺球蛋白 mRNA 的意义

颜蕴文 张敬杰 徐晓军 王劲 裴静 任敏 许骏 王本忠

【摘要】 目的 通过检测分析乳腺癌患者外周血细胞角蛋白 19(cytokeratin19, CK19)及人乳腺球蛋白(human mammaglobin, hMAM) mRNA 表达, 探讨其作为判断乳腺癌的相关指标。**方法** 应用荧光定量 PCR(Fluorescence Quantification-Polymerase Chain Reaction, FQ-PCR)技术对 40 例乳腺癌患者及 10 名健康志愿者外周血中 CK19 及 hMAM mRNA 的表达进行测定。运用 χ^2 检验和 Fisher 确切概率法对各组间差别进行统计学分析; 乳腺癌患者 CK19 和 hMAM 表达相关性分析采用 Kappa 检验。**结果** 乳腺癌患者中 CK19 和 hMAM 阳性率分别为 52.5%(21/40)和 55%(22/40), 均显著高于正常对照组(CK19 阳性为 1/10, hMAM 均为阴性)($P < 0.050$)。乳腺癌患者 CK19 和 hMAM 阳性表达具有相关性($Kappa = 0.849, P = 0.000$)。CK19 阳性表达与肿瘤大小、淋巴结转移和 PR 有密切关系($P < 0.050$), 与 ER、HER-2 无关; hMAM 阳性表达与肿瘤大小、淋巴结转移、ER、HER-2 有关($P < 0.050$), 与 PR 无关。**结论** 联合检测乳腺肿瘤患者外周血中 CK19 及 hMAM 应用于临床动态监测, 可起到帮助临床诊断的作用。

【关键词】 乳腺肿瘤; 细胞角蛋白 19; 人乳腺球蛋白; 实时荧光定量 PCR

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Significance of detecting CK19 and hMAM in peripheral blood of breast cancer patients

YAN Yun-wen, ZHANG Jing-jie, XU Xiao-jun, WANG Jin, PEI Jing, REN Ming, XU Jun, WANG Ben-zhong. Department of Breast Surgery, First Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230022, China

【Abstract】 Objective To detect and analyze the expression of cytokeratin-19 (CK19) and human mammaglobin (hMAM) mRNA in peripheral blood of breast cancer patients to explore their clinical significance. **Methods** Fluorescence quantification-polymerase chain reaction (FQ-PCR) was used to detect the expressions of CK19 and hMAM mRNA in peripheral blood of 40 breast cancer patients and 10 healthy volunteers. Chi-square test and Fisher test were used for comparison between groups, and Kappa test was applied to analyze the correlation between CK19 and hMAM expressions. **Results** The positive expression rates of CK10 and hMAM in breast cancer patients were 52.5% (21/40) and 55% (22/40), respectively, significantly higher than those of the healthy controls ($P < 0.050$). There was a correlation between CK19 and hMAM expressions in the breast cancer patients

作者单位: 230022 合肥, 安徽医科大学第一附属医院乳腺外科

通信作者: 王本忠, E-mail: wangbenzhong2459@126.com

(Kappa = 0.849, $P=0.000$). The positive expression of CK19 was correlated with tumor size, lymph node metastasis and progesterone receptor (PR) ($P<0.050$), not correlated with estrogen receptor (ER) and human epidermal growth factor receptor2 (HER-2). The positive expression of hMAM was correlated with tumor size, lymph node metastasis, ER and HER-2 ($P<0.050$), but was not correlated with PR. **Conclusions** Detecting CK19 and hMAM mRNA in peripheral blood of breast cancer patients can be used in clinical dynamic monitoring, and is helpful in clinical diagnosis.

【Key words】 Breast neoplasms; Cytokeratin-19; Human mammaglobin; Fluorescence quantitative PCR

近年来,乳腺癌的发病率上升明显,以上海,北京,广州等发达城市为著,乳腺癌已成为白领女性健康的最大威胁^[1]。早期发现早期治疗对临床治疗有着重要的指导意义。寻找一些特异性强、敏感度高的指标成为广大临床工作者的目标。近年来,分子生物学技术有着突飞猛进的发展,特别是目前用于检测外周血肿瘤细胞的荧光定量 PCR (Fluorescence Quantification-Polymerase Chain Reaction, FQ-PCR) 技术的成熟和完善。检测外周血微转移肿瘤细胞已成为目前研究的热点。本文通过对乳腺癌患者外周血细胞角蛋白(cytokeratin19, CK19)及人乳腺球蛋白(human mammaglobin, hMAM) mRNA 表达的检测及分析,探讨其作为乳腺癌判断指标的可行性。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集 2008 年 1 月至 2009 年 1 月本院乳腺癌患者 40 例(乳腺癌组),男性 1 例,女性 39 例;年龄 32~68 岁,中位年龄 45 岁;术后均经病理证实为浸润性导管癌。其中 35 例术前体格检查,胸片、肝脏 B 超、骨扫描等未见远处转移,4 例行骨扫描提示骨转移,1 例肺转移伴胸腔积液。根据 UICC 分期,0 期 1 例、I 期 2 例、II 期 22 例、III 期 10 例、IV 期 4 例及复发转移 1 例。对照组为 10 例健康志愿者,均为女性,年龄 21~39 岁,中位年龄 33 岁。39 例行外科手术(包括保乳手术、改良根治术或乳腺癌根治术);1 例未行手术治疗。0 期患者仅接受外科手术治疗;I 和 II 期均在术后给与相应化疗、放射治疗、内分泌治疗等续贯治疗;III 期乳腺癌患者均行新辅助化疗 3、4 个疗程达临床部分缓解(PR)后行根治性手术;4 例 IV 期乳癌先行术前化疗 6 个周期后行姑息性外科手术;复发转移 1 例行姑息性化疗。

1.2 细胞分离和总 RNA 的提取

分别在患者初诊治疗前抽取静脉血 5 ml (弃去开始的 1 ml,以防上皮细胞污染),乙二胺四乙酸(EDTA)(1 mg/ml)抗凝,将抗凝血放在 4 °C 或碎冰内,3 h 以内进行 RNA 提取。抽血和收集过程中要避免红细胞溶解,因为红

细胞内有大量 RNA 酶,会降解 RNA。采用 Trizol 法提取细胞总量 RNA 用于检测(外周血单个核细胞+Trizol 500 μ l 混匀),提取的总 RNA 置入 1.5 ml 无菌离心管中,放于 -80°C 冰箱备用,成批检测。

1.3 主要试剂与仪器

Trizol 试剂(Invitrogen 公司),特异引物(specific primer)逆转录酶(TaKaRa 公司),Tag 酶(TaKaRa 公司);Light Cycler 荧光 PCR 仪(美国罗氏公司),高速 4°C 离心机(Eppendorf 公司)。

1.4 引物序列

引物序列由上海生工生物技术有限公司合成。

β -actin 引物:上游引物 5'-TTG CCG ACA GGA TGC AGA A-3',下游引物 5'-GCC GAT CCA CAC GGA GTA CTT-3',探针 FAM-5'-TCA TTG CTC CTC CTG AGC-3'-TAMRA。

CK19 引物:上游引物 5'-ACT ACA GCC ACT ACT ACA CGA C-3',下游引物 5'-CAG AGC CTG TTC CGT CTC AAA C-3',探针 FAM-5'-TCT GGC TGC AGA TGA CTT CCG AAC CA-3'-TAMRA。

H-mam 引物:上游引物 5'-TGA AGT TGC TGA TGG TCC TCA T-3',下游引物 5'-TCA GTC TTA GAC ACT TGT GGA TTG ATT-3',探针 FAM-5'-AGC ACT GCT ACG CAG GCT CTG GCT-3'-TAMRA。

1.5 FQ-PCR 步骤及结果判断

1.5.1 cDNA 的合成:将提取的 RNA 放入 1.5 ml 无菌离心管,点动离心后,将三磷酸脱氧核苷酸(dNTP)混合物及反转录缓冲液全部加入逆转录酶管中配置成反转录反应液,混匀。反转录体系及反应条件参照 TaKaRa 试剂说明书。10 μ l 的反应体系包括细胞总 RNA 500 ng,随机引物 2 μ l, $5\times$ 逆转录反应缓冲液 2 μ l,寡聚脱氧胸苷引物(Oligo dt rimepr)0.5 μ l,反转录酶 0.5 μ l,去离子水加至 10 μ l,反应条件: 37°C 15 min, 85°C 5 s。

1.5.2 标准品的处理:本研究将标准品贮存液(2×10^6 拷贝数/ml)梯度稀释为 2×10^5 、 2×10^3 、 2×10^2 、 2×10 拷贝数/ml。

1.5.3 FQ-PCR:加入探针及 PCR 缓冲液,配置成 PCR 反应液,在 M \times 3000p 型定量 PCR 仪(罗氏公司)上进行扩增,反应体系为:模板 5.0 μ l、PCR 反应液 15.0 μ l、水 5.0 μ l。其中模板为实验组样品反转录产物或对照组样品反转录产物。PCR 反应条件:(1)预变性: 95°C 30 s,1 个循环;(2)PCR 反应 95°C 5 s, 60°C 20 s, 40 个循环。

1.5.4 标准曲线:标准品扩增曲线:采用 BIECHE^[2]的标准曲线制备方法,每次扩增均使用标准品制备标准曲线,范围为 $10^2\sim 10^6$ 拷贝数/ml;定量分析根据标准曲线,仪器自动计算出标本中每毫升 CK19、hMAM 的拷贝数;结果判断以 RNA

浓度 $\geq 1.0 \times 10^3$ 拷贝数/ml 为阳性, $< 1.0 \times 10^3$ 拷贝数/ml 为阴性^[3](图 1)。

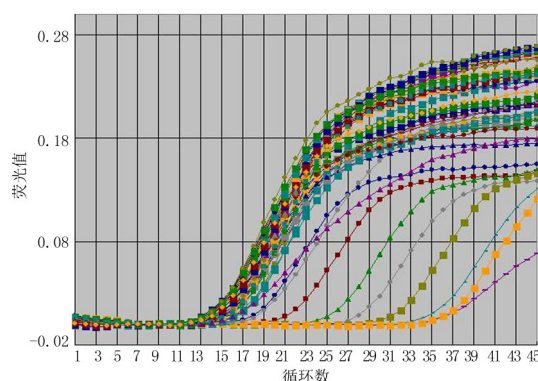


图 1 40 例患者和 10 例正常对照组 β -actin 扩增曲线

1.6 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行统计处理,运用 χ^2 检验和 Fisher 确切概率法对各组间差别进行统计学分析,乳腺癌患者 CK19 和 hMAM 阳性表达相关性分析采用 Kappa 检验,检验水准 $\alpha=0.050$ 。

2 结果

2.1 乳腺癌患者与对照组外周血 CK19 及 hMAM 的表达

外周血 CK19 及 hMAM 在两组中的表达见图 2、3。乳腺癌患者中 CK19 和 hMAM 阳性率分别为 52.5%(21/40)和 55%(22/40),均显著高于正常对照组(CK19 阳性为 1/10,hMAM 均为阴性)($P<0.050$,表 1)。乳腺癌患者 CK19 和 hMAM 阳性表达具有相关性($Kappa=0.849$, $P=0.000$,表 2)。

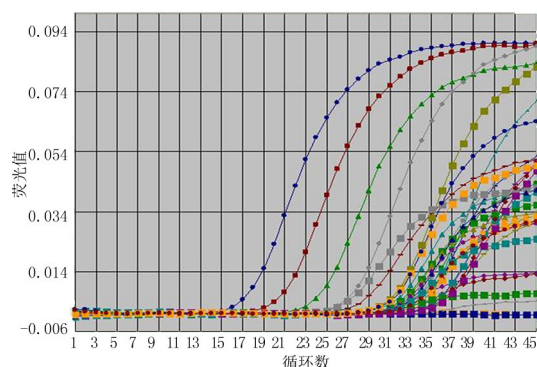


图 2 CK19 扩增曲线

2.2 乳腺癌外周血 CK19 及 hMAM 表达与病理特征的关系

CK19 阳性表达与肿瘤大小、淋巴结转移和 PR 有密切关系($P<0.050$),与 ER、HER-2 无关;hMAM 阳性表达与肿瘤大小、淋巴结转移、ER、HER-2 有关($P<0.050$),与 PR 无关(表 3)。

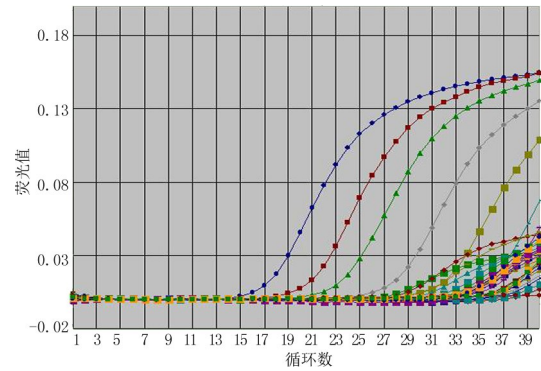


图 3 乳腺球蛋白扩增曲线

表 1 两组外周血中 CK19、hMAM 阳性表达状况

组别	例数	CK19				hMAM			
		阳性(例)	阴性(例)	χ^2 值	P 值	阳性(例)	阴性(例)	χ^2 值	P 值
对照组	10	1	9	4.266	0.039	0	10	7.716	0.005
乳腺癌组	40	21	19			22	18		

CK19:细胞角蛋白 19;hMAM:人乳腺球蛋白

表 2 乳腺癌患者 CK19 和 hMAM 表达的相关性 (例)

CK19	hMAM		
	阳性	阴性	合计
阳性	20	1	21
阴性	2	17	19
合计	22	18	40

CK19:细胞角蛋白 19;hMAM:人乳腺球蛋白; $Kappa=0.849, P=0.000$

表 3 乳腺癌外周血 CK19、hMAM 表达与病理特征的关系

病理因素	例数	CK19		P 值	hMAM		P 值
		阳性例数	阴性例数		阳性例数	阴性例数	
肿瘤大小				0.003			0.009
≥2cm	25	18	7		18	7	
<2cm	15	3	12		4	11	
淋巴结转移				0.000			0.003
有	24	19	5		18	6	
无	16	2	14		4	12	
ER				0.112			0.001
+	21	14	7		17	4	
-	19	7	12		5	14	
PR				0.001			0.216
+	18	15	3		12	6	
-	22	6	16		10	12	
HER-2				0.538			0.004
+	17	10	7		14	3	
-	23	11	12		8	15	

CK19:细胞角蛋白 19;hMAM:人乳腺球蛋白

3 讨论

细胞角蛋白是上皮细胞骨架系统中间丝成分之一,表达于正常上皮及上皮源性原发肿瘤及其转移肿瘤细胞,CK19 是其中一种组分,在各种腺上皮和

腺上皮起源的恶性肿瘤中均有表达,在上皮性肿瘤组织中表达稳定^[4],但在正常外周血、骨髓组织、淋巴结中则不表达,其敏感性较高而特异性不足。Watson 等^[5]发现 hMAM 基因只在乳腺上皮细胞中表达,且在乳腺癌中过度表达。由于其在乳腺特异性的表达,hMAM mRNA 和蛋白可作为乳腺癌诊断标记。肿瘤微转移时脱落的癌细胞数量少,浓度低。以往的免疫组化、形态学等方法无法检测出血液、骨髓、淋巴结等处的微转移。随着分子生物学技术的发展,FQ-PCR 方法敏感性高,运用该技术联合检测 CK19 及 hMAM 的基因表达,可作为判断游离肿瘤细胞存在、微转移及预后的一种可行方法^[6]。

FQ-PCR 主要是利用 Taq 酶 5'-3'外切酶活性,在常规 PCR 基础上加入荧光标记探针进行核酸定量分析^[7],可靠的灵敏度和特异性,其自动化的检测能最大限度减少污染,显著减少假阳性的发生率^[8]。

本研究应用 FQ-PCR 技术对 40 例乳腺癌患者和 10 例健康志愿者外周血中 CK19 和 hMAM 进行检测,以外周血中目的基因和 β -actin 的比值作为该基因的表达水平,结果发现,健康志愿者外周血中 CK19 的阳性表达(1/10)和 hMAM 阳性表达(零例阳性),明显低于乳腺癌患者[CK19:52.5%(21/40),hMAM:55.0%(22/40)],两者间差异有统计学意义($P < 0.050$)。CK19 及 hMAM 在乳腺癌患者外周血中的表达可作为乳腺癌特异性标志物。CK19 及 hMAM 表达与病理因素的关系分析显示,CK19 阳性表达与肿瘤大小、淋巴结转移有关($P < 0.050$),与文献^[9]报道相一致,也与 PR 有关($P < 0.050$),但与 ER、HER-2 无关;hMAM 阳性表达与肿瘤大小、淋巴结转移、ER、HER-2 有关($P < 0.050$),与 PR 无关。这说明外周血 hMAM 阳性表达能够反映病期。CK19 和 hMAM 阳性表达有相关性($Kappa = 0.849, P = 0.000$)。

近年研究也表明循环血液中肿瘤细胞存在与乳腺癌患者复发及预后相关,但是并非所有循环血液中肿瘤细胞均能引起临床转移,部分肿瘤细胞处于 G₀ 期,不具侵袭力,但循环血液仍然是肿瘤细胞发生转移的重要通道。通过外周血探查肿瘤,是一种被患者所能接受的方式,但是经多年的研究与实践证实,迄今尚无理想结果^[10]。本研究发现 CK19 及 hMAM 是检测乳腺癌微转移较有价值的标记物,与文献报道一致^[11-12]。有瘤细胞的检出提示转移的高危性,相信随着长期随访的建立及检测学方法的不断改进,微转移检测的意义及其临床价值会得到进一步证实^[13]。微转移的早期发现对于判断病情,术后监测,指导预后方面,有一定的可行性,鉴于本研究样本量较小,有待进一步证实。

参考文献

- [1] 唐丽丽. 乳腺癌患者的心理社会问题//林本耀,李金峰,王天峰,等. 乳腺癌. 北京:中国医药科技出版社,2007:421.

- [2] Desjardin LE, Chen Y, Perkins MD, et al. Comparison of the ABI 7700 system (TaqMan) and competitive PCR for quantification of IS6110 DNA in sputum during treatment of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 1998, 36:1964-1968.
- [3] Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol*, 2003, 21:3469-3478.
- [4] Jung R, Kruger W, Hosch S, et al. Specification of etranscriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokertins in vitro and in vitro. *Br J Cancer*, 1998, 78:1194-1198.
- [5] Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res*, 1996, 56:860-865.
- [6] 颜蕴文, 王本忠, 张敬杰. 乳腺癌患者外周血肿瘤细胞及相关基因检测研究进展. *中华内分泌外科杂志*, 2009, 3:417-418, 423.
- [7] 梁志东, 庄亚强, 廖启洪, 等. 定量 RT-PCR 法检测乳腺癌前哨淋巴结 CK19 的研究. *柳州医学*, 2009, 22:29-30.
- [8] Mita M, Mikhitarian K, Christian W, et al. Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multi-gene marker panel. *Int J Cance*, 2001, 93:162-171.
- [9] 姚宏, 郭江泽, 魏正俐, 等. 乳腺癌腋窝淋巴结微转移 CK19 mRNA 基因检测的临床意义. *中国药物与临床*, 2008, 8:365-367.
- [10] 张敬杰, 欧阳涛, 万文徽, 等. 乳腺癌患者外周血清中游离的肿瘤相关 DNA 检测及其临床价值. *中华肿瘤杂志*, 2007, 29:609.
- [11] Varangot M, Barrios E, Sonora C, et al. Clinical evaluation of a panel of mRNA markers in the detection of disseminated tumor cells in patients with operable breast cancer. *Oncol Rep*, 2005, 14:537-545.
- [12] O'Brien N, Maguire TM, O'Donovan N, et al. Mammaglobin: a promising marker for breast cancer. *Clin Chem*, 2002, 48:1362-1364.
- [13] 高继绪. CK19 mRNA 监测乳腺癌血行微转移的对照研究. *肿瘤预防与治疗*, 2008, 21:270-272.

(收稿日期:2010-02-17)

(本文编辑:赵彬)

颜蕴文, 张敬杰, 徐晓军, 等. 联合检测乳腺癌患者外周血中细胞角蛋白 19 及人乳腺球蛋白 mRNA 的意义[J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2010, 4(2):193-199.