

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2009. 07. 011

早期乳腺癌 hMAM mRNA 阳性循环肿瘤细胞检测及其临床意义

陈 艳¹,伍治平¹,王熙才¹,金从国¹,刘 馨¹,周永春¹,谷玉兰¹,邹天宁²

Detection and Clinical Significance of hMAM mRNA-positive Circulating Tumor Cells in Early Breast Cancer

CHEN Yan¹, WU Zhi-ping¹, WANG Xi-cai¹, JIN Cong-guo¹, LIU Xin¹, ZHOU Yong-chun¹, GU Yu-lan¹, ZOU Tian-ning²

1. Tumor Institute, The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650118, China; 2. Department of Breast, The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical College

Abstract: Objective To study clinical significance of the presence of hMAM mRNA-positive circulating tumor cells in early breast cancer. **Methods** Peripheral blood was obtained from 50 early breast cancer patients after surgical removal of the primary tumor and before the initiation of adjuvant therapy and analyzed for the presence of hMAM mRNA-positive cells using a nested RT-PCR methodology. All patients were followed up. 20 healthy individuals and 24 patients with breast benign lesions served as controls. **Results** hMAM mRNA-positive cells were detected in 26. 0% of early breast cancer patients, 4. 2% of breast benign lesions patients, but not in healthy individuals($P = 0. 025$, $P = 0. 012$ respectively). A higher incidence of hMAM mRNA-positive cell detection was associated with overexpression of HER2 receptor on the primary tumor ($P = 0. 037$). 8/13 (61. 5%) of early breast patients with hMAM mRNA-positive cells relapsed during the follow-up period ($P = 0. 004$). Detection of peripheral-blood hMAM mRNA-positive cells was associated with reduced median relapse-free interval($P = 0. 002$). **Conclusion** hMAM mRNA is a specific and suitable molecular marker for the detection of circulating tumor cells in early breast cancer. Detection of peripheral blood hMAM mRNA-positive circulating tumor cells might have an important predictive and prognostic value as a marker of relapse and poor clinical outcome in early breast cancer patients.

Key words:Breast cancer; Circulating tumor cell; Micrometastasis; hMAM

摘 要:目的 研究早期乳腺癌 hMAM mRNA 阳性循环肿瘤细胞检测的临床意义。**方法** 巢式 RT-PCR 检测 50 例早期乳腺癌患者术后辅助治疗前外周血 hMAM mRNA 阳性细胞,随访。24 例乳腺良性疾病患者和 20 例健康体检志愿者作对照。**结果** 早期乳腺癌患者术后辅助治疗前外周血有核细胞 hMAM mRNA 阳性率 26. 0%,与良性乳腺疾病患者(4. 2%)、健康体检志愿者(0%)比较,差异有统计学意义(分别为 $P = 0. 025$ 、 $P = 0. 012$);其 hMAM mRNA 阳性率与癌组织 HER2 过表达相关($P = 0. 037$);13 例阳性患者中 8 例(61. 5%)随访出现复发转移($P = 0. 004$),中位无瘤生存期明显降低($P = 0. 002$)。**结论** hMAM mRNA 是检测乳腺癌循环肿瘤细胞较为理想的分子标记物。早期乳腺癌患者术后辅助治疗前 hMAM mRNA 阳性循环肿瘤细胞检测,可能是预测复发转移和预后不良的辅助指标。

关键词:乳腺肿瘤;循环肿瘤细胞;微转移;hMAM

中图分类号:R737. 9 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2009)07-0578-05

0 引言

早期乳腺癌患者首次治疗时,外周血已存在肿

瘤细胞的播散^[1-2]。人乳腺珠蛋白(human mammary-globin, hMAM)是一个很有价值的、特异的乳腺癌循环肿瘤细胞标记物。因此,我们采用巢式 RT-PCR(nested RT-PCR)技术,研究早期乳腺癌患者术后辅助治疗前外周血有核细胞 hMAM mRNA 表达,及其与临床病理学特征和预后的关系,探讨早期乳腺癌 hMAM mRNA 阳性循环肿瘤细胞检测的临床意义。

收稿日期:2008-01-14;修回日期:2008-10-24
基金项目:云南省教育厅基金资助项目(04Y029C)
作者单位:1. 650118 昆明医学院第三附属医院肿瘤研究所;2. 昆明医学院第三附属医院乳腺科
作者简介:陈艳(1973-),女,硕士,助理研究员,主要从事肿瘤分子生物学研究

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集云南省肿瘤医院从 2003 年 12 月~2007 年 7 月收治经病理确诊为乳腺癌患者 50 例,均为女性,年龄 29~69 岁,中位年龄 50 岁,术前均没有行辅助治疗,并经过胸片、CT、骨扫描、MRI、B 型超声等常规病理学、影像学和临床检测,确诊没有明显的局部复发或远处转移灶,行乳腺癌根治术至少 2 周后辅助治疗前抽取外周血;患者一般资料、病理参数来自病历资料,PR、ER、HER2 采用免疫组织化学法检测,- 或 + 为阴性,++ 或 +++ 为阳性;CEA、CA153 采用放射免疫法检测,CEA>15 ng/ml 和 CA153>30 Ku/L 为阳性;组织学类型按 WHO 乳腺肿瘤组织学标准分类:浸润性导管癌 44 例,单纯癌 6 例;TNM 分期按 1997 年国际抗癌联盟(UICC)标准^[2]:Ⅰ期 5 例,Ⅱ期 38 例,Ⅲ期 7 例;随访期间辅助化疗多采用 CAF 方案;选择我院从 2003 年 12 月至 2007 年 7 月接受手术治疗经病理确诊为良性乳腺病变的女性患者 24 例,年龄 18~72 岁,中位年龄 42 岁,组织学类型为乳腺纤维腺瘤;选择 20 例我院健康体检志愿者为正常对照组,年龄 31~65 岁,中位年龄 47.5 岁。

1.2 试剂和引物

Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司,胶回收试剂盒、RT-PCR 试剂盒购自 Qiagen 公司,PUC19 DNA 分子量标准购自 BBI 公司,Taq DNA 聚合酶购自 Promga 公司,6 孔细胞培养板、RPMI 1640 购自 GIBCO 公司,琼脂糖为上海生工公司 BBI 分装产品。引物设计参考文献^[3],见表 1。

表 1 引物序列和产物大小

Table 1 Primer sequence and RT-PCR product

Gene	5'-3' sequence	Size of PCR product
hMAM		
F1	5'-GAAGTTGCTGATGGTCCTCATGCTGGC-3'	325bp
R1	5'-CTCACCATACCTGTCAGTTCTGTGAGC-3'	
F2	5'-CTCCCAGCACTGCTACGCAGGCT-3'	
R2	5'-CACCTCAACATTGCTCAGAGTTTCATCCG-3'	201bp
β-actin		
F	5'-GTGGACATCCGCAAAGAC-3'	301bp
R	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'	

1.3 提取 RNA

抽取空腹静脉血 5 ml(EDTA 抗凝),严格无菌操作,防止污染。收集血液时,防止皮肤上皮细胞污染。抽血后半小时内用红细胞裂解液除掉红细胞,-80℃保存细胞沉淀。Trizol 试剂提取 RNA。核

酸蛋白定量仪测定 RNA 浓度和纯度,A260/A280 比值 1.9~2.1。2%琼脂糖凝胶电泳判断完整性。

1.4 巢式 RT-PCR 扩增

同时设空白对照、阴性对照及阳性对照(MCF-7)。RT-PCR 反应体系为 50 μl,其中 5×RT-PCR buffer 10 μl,10 mM dNTP 2 μl,RT-PCR Enzyme mix 2 μl,5×Q Solution 10 μl,20 μM 引物各 1.5 μl,总 RNA 500 ng。PCR 反应体系为 25 μl,其中 10×buffer 1 μl,2.5 mM dNTP mix 0.8 μl,Taq DNA 聚合酶 0.3 μl,20 μM 引物各 0.3 μl,DNA 模板 100 ng。RT-PCR 反应参数:50℃逆转录 30 min,95℃15 min 灭活逆转录酶,95℃变性 25 s,58℃退火 25 s,72℃延伸 25 s,40 个循环,72℃延伸 10 min。PCR 反应参数:95℃3 min。95℃变性 25 s,58℃退火 20 s,72℃延伸 25 s,35 个循环,72℃延伸 10 min。β-actin 反应参数:50℃30 min,95℃15 min。94℃30 s,52℃45 s,72℃1 min,35 个循环。取扩增反应液 5 μl,2%琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统拍照。hMAM 巢式 RT-PCR 产物由上海 Invitrogen 公司测序证实。

1.5 随访

从抽血检查开始随访至第一次出现转移复发时止或最后一次随访时间止,随访至 2007 年 7 月,随访时间 3~43 月,中位随访时间 20 月,发现远处转移 11 例,局部复发 4 例,余病例无瘤生存。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 11.5 软件进行数据处理,比较各组基因标记物的表达用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法,预后采用 Kaplan-Meier 生存分析及 Log-rank 比较分析,以 $P<0.05$ 作为差异有统计学意义的检验标准。

2 结果

2.1 早期乳腺癌外周血有核细胞 hMAM mRNA 的表达及其与临床病理特征关系

外周血有核细胞 β-actin 扩增产物有 301 bp 条带,提示 RNA 完整性好,见图 1;外周血有核细胞 hMAM mRNA,巢式 RT-PCR 扩增产物有 201 bp 条带,并测序证实,见图 2、3。

早期乳腺癌患者外周血有核细胞 hMAM mRNA 阳性率为 26.0%,与良性乳腺疾病患者(4.2%)、健康体检志愿者(0)比较,差异有统计学意义(分别为 $P=0.025$; $P=0.012$),见表 2;其阳性率与年龄、月经状况、TNM 分期、肿瘤大小、淋巴结转移状况、病理分化、激素受体状况、血清 CA153 水平异常、血清 CEA 水平异常无关(分别 $P>0.05$),而

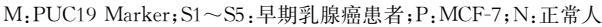


Figure 1 β -actin mRNA expression in Peripheral blood cells

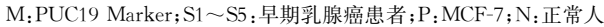


Figure 2 hMAM mRNA expression in peripheral blood cells



Figure 3 Validation of hMAM nested RT-PCR products by sequencing

与癌组织 HER2 过表达相关($P=0.037$),见表 3。

Table 2 hMAM mRNA expression in peripheral blood cells

Groups	<i>n</i>	hMAM mRNA +
Healthy individuals	20	0/20(0%)
Patients with breast benign lesions	24	1/24(4, 2%)
Early breast cancer patients	50	13/50(26, 0%)

2.2 早期乳腺癌的预后分析

13 例外周血有核细胞 hMAM mRNA 阳性患者有 8 例(61.5%)随访期出现复发转移,与阴性患者比较,差异有统计学意义($P = 0.004$),见表 4。Kaplan-Meier 分析显示,阳性患者中位无瘤生存期(median relapse-free interval)明显降低($P = 0.0026$),见图 4。

3 讨论

约 30% 腋淋巴结阴性、肿块小的患者手术前后常规检测并未发现明显转移灶, 却死于复发、转移, 提示早期乳腺癌客观存在微转移^[1, 4]。早期乳腺癌骨髓微转移检测具有重要的预后价值^[5]。骨髓穿刺不易被患者接受。循环肿瘤细胞 (circulating tumor cell, CTC) 检测标本易获得、创伤性小, 易于动态观察。Watson 等^[6]从乳腺癌上皮细胞中克隆出一个分子量 10 kD 分泌性差异表达蛋白, 被命名为人乳腺珠蛋白 (human mammaglobin, hMAM), 是乳腺组织特异性蛋白, 仅在正常乳腺组织和乳腺

癌中表达^[7-8],早期乳腺癌 hMAM mRNA 阳性循环肿瘤细胞检测的临床意义仍然存在着争议^[9-10]。

RT-PCR 技术敏感性较好^[11],巢式 RT-PCR 技术可进一步改善检测的敏感性和特异性。因此,我们选用巢式 RT-PCR 技术。

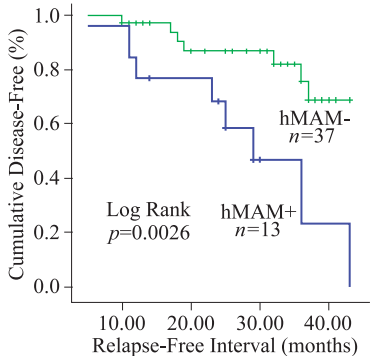


图 4 早期乳腺癌外周血有核细胞 hMAM mRNA
阳性和阴性组无瘤生存期比较

Figure 4 Relapse-free interval in the positive and negative patients of hMAM mRNA marker in peripheral blood of early breast cancer patients

我们发现,早期乳腺癌患者外周血有核细胞 hMAM mRNA 阳性率(26%)明显高于健康体检者、良性乳腺疾病患者,与 Ntoulia 等^[12]的结果一致,提示 hMAM mRNA 作为检测乳腺癌循环肿瘤细胞标志物,具有较高的特异性。部分患者有阳性表达,提示对这些高危患者给予积极辅助治疗,或进行 hMAM mRNA 阳性肿瘤细胞靶向治疗,可能有

助于降低复发转移率。赫赛汀治疗在早期乳腺癌术后的辅助治疗取得了很好的疗效^[13]。临床上把癌

表 3 早期乳腺癌术后外周血有核细胞 hMAM mRNA 阳性率与临床病理学特征关系				
Table 3 Correlation between detection of hMAM for circulating tumor cells in peripheral blood of early breast cancer patients and clinicopathological characteristics				
Clinical characters	n	hMAM mRNA (%)		P
		-	+	
Patients enrolled	50	37/50(74.0)	13/50(26.0)	
Age, years				
<50	24	21/24(87.5)	3/24(12.5)	
≥50	26	16/26(61.5)	10/26(38.5)	0.054
Menopausal status				
Premenopausal	27	22/27(81.5)	5/27(18.5)	
Postmenopausal	23	15/23(65.2)	8/23(34.8)	0.191
Clinical stage				
I	5	2/5(40.0)	3/5(60.0)	
II	38	28/38(73.7)	10/38(26.3)	
III	7	7/7(100.0)	0/7(0.0)	0.063
Tumor size				
<2cm	8	5/8(62.5)	3/8(37.5)	
2~5cm	35	25/35(71.4)	10/35(28.6)	
>5cm	7	7/7(100.0)	0/7(0.0)	0.209
Axillary lymph				
Node metastasis				
0	23	17/23(73.9)	6/23(26.1)	
1~3	17	13/17(76.5)	4/17(23.5)	
4~9	6	5/6(83.3)	1/6(16.7)	
>9	4	2/4(50.0)	2/4(50.0)	0.709
Histological				
Grading				
I	8	8/8(100.0)	0/8(0)	
II	25	19/25(76.0)	6/25(24.0)	
III	17	10/17(58.8)	7/17(41.2)	0.089
PR				
Positive	21	15/21(71.4)	6/21(28.6)	
Negative	29	22/29(75.9)	7/29(24.1)	0.724
ER				
Positive	21	17/21(81.0)	4/21(19.0)	
Negative	29	20/29(69.0)	9/29(31.0)	0.340
HER2				
Positive	26	16/26(61.5)	10/26(38.5)	
Negative	24	21/24(87.5)	3/24(12.5)	0.037
Serum CEA				
Positive	6	3/6(50.0)	3/6(50.0)	
Negative	44	34/44(77.3)	10/44(22.7)	0.173
Serum CA153				
Positive	5	4/5(80.0)	1/5(20.0)	
Negative	45	33/45(73.3)	12/45(26.7)	1.000

表 4 早期乳腺癌外周血有核细胞 hMAM mRNA 阳性和阴性组随访期复发转移率比较			
Table 4 Incidence of clinical relapses in early breast cancer patients according to detection of hMAM mRNA for circulating tumor cells			
Groups	Clinical relapses		
	n	%	P
hMAM mRNA postitive(n=13)	8	61.5	0.004
hMAM mRNA negatitive(n=37)	7	18.9	

组织 HER2 过表达作为赫赛汀治疗的主要参考指标。我们的结果显示,早期乳腺癌有核细胞 hMAM mRNA 阳性率与癌组织 HER2 过量表达相关,提示赫赛汀在过量表达 HER2 的早期乳腺癌术后辅助治疗取得较好疗效,一定程度上也可能是因为针对 hMAM mRNA 阳性循环肿瘤细胞的治疗有效。肿瘤的复发转移涉及肿瘤与肿瘤微环境的多种相互作用,扩大病例和延长随访时间,深入研究循环肿瘤细胞分子机制,有助于了解乳腺癌循环肿瘤细胞生物学特性和疗效评价^[14]。有核细胞 hMAM mRNA 阳性率与淋巴结转移状况无关,提示乳腺癌血行播散与淋巴结转移可能是互相独立的途径。我们还发现,早期乳腺癌外周血有核细胞 hMAM mRNA 阳性患者发生复发转移的相对危险性增加,提示外周血有核细胞 hMAM mRNA 阳性可能是判断患者预后不良的重要因素,值得延长随访时间和积累更多病例,进一步证实其临床价值。部分有核细胞 hMAM mRNA 阴性的早期乳腺癌患者术后亦出现复发转移,提示循环肿瘤细胞基因表达具有异质性特点,基因标记物联合检测循环肿瘤细胞以及靶向循环肿瘤细胞治疗的研究,可能有助于降低早期乳腺癌患者术后复发转移率。

参考文献:

[1] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials[J]. Lancet, 2005, 365(9472): 1687-1717.

[2] 汤钊猷. 现代肿瘤学[M]. 2 版. 上海: 上海医科大学出版社, 2000: 513-514.

[3] Zach O, Kasparu H, Krieger O, et al. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA[J]. J Clin Oncol, 1999, 17 (7):2015-2019.

[4] Bernards R, Weigelt B. A progression puzzle[J]. Nature, 2002, 428(6981): 431-437.

[5] Braus S, Vogl FD, Naume B, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer[J]. N Engl J Med, 2005, 353 (8):793-802.

[6] Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in hu-

man breast cancer[J]. Cancer Res, 1996, 56 (4): 860-865.

[7] Zehentner BK, Carter D. Mammaglobin: a candidate diagnostic marker for breast cancer[J]. Clin Biochem, 2004, 37 (4): 249-257.

[8] Zehentner BK, Persing DH, Deme A, et al. Mammaglobin as a novel breast cancer biomarker: multigene reverse transcription-PCR assay and sandwich ELISA[J]. Clin Chem, 2004, 50 (11): 2069-2076.

[9] Suchy B, Austrup F, Driesel G, et al. Detection of Mammaglobin expressing cells in blood of breast cancer patients[J]. Cancer Lett, 2000, 158(2):171-178.

[10] Lin YC, Chen SC, Hsueh S, et al. Lack of correlation between expression of human Mammaglobin mRNA in peripheral blood and known prognostic factors for breast cancer patients [J]. Cancer Sci, 2003, 94 (1): 99-102.

[11] Ring AE, Zabaglo L, Ormerod MG, et al. Detection of circu-

lating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques[J]. Br J Cancer, 2005, 92 (5): 906-912.

[12] Ntoulia M, Stathopoulou A, Ignatiadis M, et al. Detection of Mammaglobin A-mRNA-positive circulating tumor cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer with nested RT-PCR[J]. Clin Biochem, 2006, 39 (9): 879-887.

[13] Piccart-Gebhart MJ, Procter RM, Leyland JB, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer[J]. N Engl J Med, 2005, 353 (16): 1659-1672.

[14] Kallergi G, Mavroudis D, Georgoulas V, et al. Phosphorylation of FAK, PI-3K, and impaired actin organization in CK-positive micrometastatic breast cancer cells[J]. Mol Med, 2007, 13(1-2): 79-88.

[编辑:安 凤;校对:贺 文]

(上接第 577 页)

胃癌中,临床分期在Ⅲ期以上、组织学分型为低分化腺癌、有淋巴结转移的均高达 25 例,浸润至浆膜层者达 26 例;在两者均表达阴性的 7 例患者,均为高、中分化腺癌,仅 3 例浸润至浆膜层,且仅 2 例临床分期在Ⅲ期以上及有淋巴结转移,提示 HGF 与 c-Met 的共同高表达,与胃癌的发生、发展、浸润、转移密切相关,可能与其更易形成 HGF/c-Met 信号转导通路促进胃癌的恶性发展有关,也有可能是其他因素促进了 HGF 的分泌及 c-Met 的表达。

由本试验结果可推断 HGF 及 c-Met,尤其是 HGF 在胃癌的发生、发展、浸润、转移中可能起重要作用,联合检测 HGF 和 c-Met 有助于胃癌的病情估计及预后判断,阻断 HGF 与 c-Met 的结合亦可能成为一个抗肿瘤治疗的新靶点。

参考文献:

[1] 尹芳,乔泰东,时永全,等. 紧密连接分子 Occludin mRNA 在胃癌中的表达和分布[J]. 中华肿瘤杂志, 2002,24(12):557-560.

[2] Shijubo N, Uede T, Kon S, et al. Vascular endothelial growth factor and osteopontin in stage I lung adenocarcinoma [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 160(4): 1269-1273.

[3] Michalopoulos GK, Zarnegar R. Hepatocyte growth factor [J]. Hepatology, 1992, 15(1):149-155.

[4] Cooper CS, Park M, Blair DG, et al. Molecular cloning of a

new transforming gene from a chemically transformed human cell line[J]. Nature, 1984, 311(5981): 29-33.

[5] Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, et al. Identification of hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product [J]. Science, 1991, 251(2): 802.

[6] Kim CH, Moon SK, Bae JU, et al. Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in hypopharyngeal squamous cell carcinoma[J]. Acta Otolaryngol, 2006, 126(1): 88-94.

[7] Horiguchi N, Takayama H, Toyoda M, et al. Hepatocyte growth factor promotes hepatic carcinogenesis through c-Met autocrine activation and enhanced angiogenesis in transgenic mice treated with diethylnitrosamine[J]. Oncogene, 2002, 21 (12): 1791-1799.

[8] 彭挺生,李智,邱锯世,等. 细胞因子 HGF 体外增强骨肉瘤细胞株的增殖和黏附性[J]. 中山大学学报(医学科学版),2006, 27(5): 529-532.

[9] 赵仲升,茹国庆,马杰. IGF-II 和 HGFmRNA 表达与胃癌微血管密度的关系[J]. 中华肿瘤杂志,2004,26(11): 673-677.

[10] 江晨,崔琳,纪萍,等. 胃癌组织中 HGF/c-Met 的组织芯片检测及其与肿瘤血管生成关系[J]. 齐鲁医学杂志,2005,20(3): 211-213.

[11] 姜虹,吴焕明. HGF-c-met 信号转导与肿瘤侵袭和转移的关系 [J]. 国外医学·生理、病理科学与临床分册,2003,23(3): 235-237.

[12] Tomita N, Morishita R, Taniyama Y, et al. Angiogenic property of hepatocyte growth factor is dependent on upregulation of essential transcription factor for angiogenesis, ets-1[J]. Circulation, 2003, 107(10): 1411-1417.

[编辑:安 凤;校对:贺 文]