

· 临床研究 ·

CK19 和 CEA mRNA 表达与乳腺癌外周血微转移的相关性研究*

莫军扬, 韦长元[△], 黄平, 梁志东, 张敏敏

(广西医科大学第五附属医院乳腺外科, 广西柳州 545006)

摘要:目的 检测乳腺癌患者外周血中细胞角蛋白 19(CK19)和癌胚抗原(CEA)mRNA 的表达,探讨其表达是否可作为判断外周血微转移及预后的分子生物学指标。方法 采用逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)技术检测 45 例术前乳腺癌患者及 30 例乳腺良性病变患者外周血中 CK19 和 CEA mRNA 的表达情况。结果 CK19 和 CEA mRNA 在乳腺癌患者血清中阳性率分别为 62.2%和 53.3%,在 30 例乳腺良性患者血清中 CK19 mRNA 阳性率为 3.3%,无 CEA mRNA 表达。乳腺癌患者和良性肿瘤患者血清中 CK19、CEA mRNA 表达阳性率比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。CK19 和 CEA mRNA 阳性率与临床分期、淋巴结转移均有关,二者表达呈正相关($P < 0.01$)。结论 乳腺癌患者外周血中 CK19 和 CEA mRNA 表达与临床分期密切相关,提示两项指标有望预测乳腺癌外周血微转移和判断预后。

关键词:乳腺肿瘤;转移;角蛋白 19;癌胚抗原;RNA,信使

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.24.009

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)24-2415-03

The relationship between CK19 and CEA mRNA expression in peripheral blood of patients with breast carcinoma and tumor micrometastasis*

Mo Junyang, Wei Changyuan[△], Huang Ping, Liang Zhidong, Zhang Minmin

(Department of Breast Surgery, the Fifth Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou, Guangxi 545006, China)

Abstract: Objective To detect the expression of CK19 and CEA mRNA in peripheral blood of breast carcinoma and to discuss whether these levels can be used as molecular biological markers for predicting micrometastasis and evaluating prognosis. **Methods** Peripheral blood samples of 45 patients with breast carcinoma, 30 patients with benign breast lesions were collected. CK19 mRNA and CEA mRNA were assessed by RT-PCR. **Results** The positive rate of CK19 and CEA mRNA in breast carcinoma patients was 62.2% and 53.3% and the related benign breast lesions were 3.3%. CEA mRNA was not found in benign breast lesions. Significant differences were found in the expression of CK19 mRNA and CEA mRNA in peripheral blood among patients with benign breast lesions and patients with breast carcinoma ($P < 0.001$). The positive rates and related of CK19 and CEA mRNA were significantly correlated with clinical stage and lymph node metastasis ($P < 0.01$). There was a close relationship between expression of CK19 and the expression of CEA mRNA ($P < 0.05$). **Conclusion** CK19 mRNA and CEA mRNA can be detected in peripheral blood of breast carcinoma patients. The two markers can be used to predict micrometastasis and evaluate prognosis because they are closely correlated with clinical stage and survival.

Key words: breast neoplasms; metastasis; keratin 19; carcinoembryonic antigen; RNA, messenger

乳腺癌是中国常见的恶性肿瘤之一,其发病率呈逐年上升趋势,远处转移是导致患者预后不良的主要原因。外周血是肿瘤发生远处转移的必经途径。但是目前仍然不清楚乳腺癌发生、发展和浸润转移的具体分子机制,如果在早期能找到其浸润转移的指标,对于指导治疗、提高术后生存率有重要的意义。细胞角蛋白 19(cytokeratin 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,是上皮性肿瘤微转移检测的特异性标志^[1]。癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)过度表达在肠癌、消化道肿瘤、乳腺癌组织中。血清 CEA 水平与乳腺癌患者的导管受累情况、淋巴结转移数和肿瘤分期有关。因此 CK19 和 CEA mRNA 可作为乳腺癌患者癌细胞进入血液循环的标志。本研究采用逆转录-多聚酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)技术检测 CK19 和 CEA mRNA 在乳腺癌外周血中的表达情况,并探讨其与乳腺癌临床分期、远处转移的相关性,为揭示乳腺癌的生物学特性及临床治疗提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 45 例乳腺癌组织均取自 2006 年 6 月至 2008

年 11 月广西柳州市人民医院乳腺外科住院患者,均为首次手术或空芯针穿刺诊断,且未经治疗的原发乳腺癌患者,病理诊断明确,均为女性。HE 切片病理分型、TNM 分期参考《中国肿瘤病理学分类》,其中 TNM 分期分为 I 期 10 例,II 期 18 例,III 期 17 例;无淋巴结转移 15 例,有淋巴结转移 30 例;病理类型:浸润性导管癌 25 例,单纯癌 11 例,黏液腺癌 3 例,导管内癌 6 例;乳腺良性病变患者 30 例,其中乳腺纤维腺瘤 20 例,乳腺囊性增生 8 例,导管内乳头状瘤 2 例。年龄 19~81 岁,平均 45 岁。术前胸部 X 线、B 超、CT 及核磁共振成像全身弥散等检查未发现远处转移灶。

1.2 主要试剂和仪器 RT-PCR 检测 CK19 mRNA 试剂盒(广州达晖生物技术有限公司);血清 CEA 蛋白试剂盒(美国 Abbott 公司);5700 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。CK19 的上游引物为 5'-CAG GTC AGT GGA GGT GGA T-3',下游引物为 5'-TTC GCA TGT CAC TCA GGA TCT T-3';CEA 的上游引物为 5'-TGT AGC TGT TGC AAA TGC TTT AGG AAG AAG C-3',下游引物为 5'-GGG CCA CTG TGG GCA TCA TGA TTG G-3'。cDNA 模板对照: β_2 微球蛋

* 基金项目:广西卫生厅科技攻关项目(Z2007305)。 [△] 通讯作者, Tel:13807715114; E-mail:mojunyang2006@163.com。

白的 cDNA; 阳性对照: 乳腺癌细胞系 MCF-7 的 cDNA; 阴性对照: 人纤维肉瘤细胞系 HT1080; 假基因扩增对照: 乳腺癌细胞系 MCF-7 的基因组 DNA。

1.3 RT-PCR 法检测 CK19、CEA mRNA 水平 (1) 抽提总 RNA, 抽取每例乳腺癌患者治疗前外周静脉血 5 mL, 均为肝素抗凝。留取血清检测 CK19 及 CEA mRNA。用试剂盒提供的 RNA 提取液提取 RNA。测光密度值 (optical density, OD) OD_{260} 、 OD_{280} , 并计算 RNA 含量。操作过程严格无菌并避免污染。(2) 逆转录反应, 制作 CK19、CEA mRNA 基因标志物的标准品浓度。原标准品浓度为 10^9 copy/mL, 稀释浓度后分别为 4×10^8 、 4×10^7 、 4×10^6 、 4×10^5 copy/mL。配制混合液, 每个反应需 RT 反应液 18 μ L, 鼠白血病毒 (M-MLV) 逆转录酶 1 μ L, RNA 酶 1 U, 共 20 μ L, 分别加入 5 μ L 的预变性 RNA、4 种浓度标准品、阳性及阴性对照, 混匀离心, 37 $^{\circ}$ C 水浴 60 min。(3) 定量 RT-PCR 测定, 配制 PCR 反应混合液, 每个反应所需 PCR 反应液 43 μ L, Taq E 2 μ L, 共计 45 μ L。取 45 μ L 反应液分别装入定量 PCR 小管中, 取 5 μ L RT 反应物加入上述管, 混匀离心, 入定量 PCR 仪。每次检测均同法加入不同浓度的标准品、阳性及阴性对照。反应程序如下: 预变性 93 $^{\circ}$ C 2 min; 93 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 60 s, 共 40 个循环; 延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min。记录结果。反应结束后分析实验数据, 仪器自动得出未知标本数值 M。最终计算结果按下列公式换算: $A(\text{拷贝数}/\mu\text{g 总 RNA}) = B(\text{拷贝数}/\mu\text{g cDNA}) \div OD_{260} \text{值} \times 5/6$ 。

1.4 结果判断 用 RT-PCR 检测 CK19 mRNA 的表达时, 在实验中用人纤维肉瘤细胞系 HT1080 的 cDNA 作为阴性对照, 用乳腺癌细胞系 MCF-7 的 cDNA 作为阳性对照, 用乳腺癌细胞系 MCF-7 的基因组 DNA 作为假基因扩增对照。结果显示阴性对照和假基因扩增对照均无扩增条带, 而阳性对照有扩增条带。CEA mRNA 结果判断: 以试剂盒给定的阳性界值, CEA mRNA 为 10 ng/mL, 高于正常值为阳性。

1.5 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计学软件对数据进行 χ^2 检验, 相对系数采用 t 检验和单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CK19 和 CEA mRNA 在乳腺癌患者外周血中表达 在乳腺癌患者外周血中, CK19 和 CEA mRNA 阳性率分别为 62.2%、53.3%; 乳腺癌患者与乳腺良性疾病患者比较, 二者阳性率差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 外周血中 CK19 和 CEA mRNA 表达的检测
结果 [n (%)]

组别	n	CK19 阳性	CEA mRNA 阳性	P 值
乳腺癌组	45	28(62.2)	24(53.3)	
乳腺良性疾病组	30	1(3.3)	0(0.00)	<0.01

2.2 CK19 和 CEA mRNA 与乳腺癌病理特征及临床分期关系 乳腺癌外周血 CK19 与临床分期阳性率差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 随着临床分期的增加, CK19 阳性率水平呈逐渐增加趋势。其中 I、II 期和 III 期乳腺癌患者 CK19 阳性表达率分别为 30.0%、61.1%、82.4%; 有淋巴结转移阳性率达 83.3%, 在有淋巴结转移患者中其阳性率高于无转移者, 两两相比较 CK19 的阳性表达率差异均统计学意义 ($P < 0.01$)。CEA mRNA 阳性率与临床分期、淋巴结转移相关 ($P < 0.01$)。两者阳性率与肿瘤大小无关 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 CK19 和 MCM5 表达的相关性 应用 SPSS13.0 软件,

采用 t 检验和单因素方差分析 CK19 和 CEA mRNA 的表达具有相关性 (相关系数法得相关系数 $r = 0.604$ ($P < 0.05$)), CK19 和 CEA mRNA 在乳腺癌中的表达呈正相关。见表 3。

表 2 乳腺癌患者血清 CK19 和 CEA mRNA 表达与 TNM 分期、肿瘤大小及腋窝淋巴结转移的关系

临床病理参数	n	CK19			CEA mRNA				
		-	+	阳性率(%)	P	-	+	阳性率(%)	P
肿瘤大小									
≤ 2 cm	15	6	9	60.0		8	7	46.7	
> 2 cm	30	11	19	63.3	>0.05	13	17	56.7	>0.05
TNM 分期									
I	10	7	3	30.0		8	2	20.0	
II	18	7	11	61.1		5	13	72.2	
III	17	3	14	82.4	<0.01	8	9	52.9	<0.01
淋巴结转移									
无	15	7	8	53.3		12	3	20.2	
有	30	6	25	83.3	<0.01	9	21	70.0	<0.01

表 3 乳腺癌组织中 CK19 和 CEA mRNA 表达相关性

CEA mRNA 的表达	CK19 的表达		相关系数
	-	+	
-	13	8	$r = 0.604$
+	4	20	

3 讨 论

自 1869 年 Ashworth 在外周血中发现癌细胞以来, 肿瘤微转移的概念便在临床中建立起来, 并逐渐成为研究热点之一。血行转移是乳腺癌转移的主要途径之一, 如果能在亚临床阶段检测到微小转移灶, 则对肿瘤的分期、治疗和预后具有重要意义。Pretlow 等^[2] 从有远处转移的前列腺癌患者外周血中获得癌细胞, 将其注入裸鼠体内, 结果在部分肺内形成了转移灶, 因此, 循环血液中检测出癌细胞, 在一定程度上表明肿瘤具有较强的转移倾向, 有助于临床肿瘤的分期和治疗方案的选择。Cote 等^[3] 报道将乳腺癌患者骨髓中分离出来的癌细胞在体外克隆, 接种于裸鼠可形成肿瘤, 亦提示临床检测乳腺癌患者微转移对预测复发、转移具有重要意义。随着分子生物学技术的发展, 尤其是 RT-PCR 技术的成熟和完善, 被认为是目前检测外周血微转移的有效方法。

在乳腺癌分子预后指标的研究上, 已发现了多种具有诊断和治疗价值的标记物^[4]。CK19 是上皮组织来源的组织特异性标志, 是一相对分子质量为 40×10^3 的酸性蛋白质, 为上皮细胞骨架的一部分, 在恶性上皮细胞中, 激活的蛋白酶加速了细胞角蛋白降解, 使得大量片段入血, CK19 在乳腺癌发生早期即上升, 且与疗效、肿瘤转移密切相关。其表达与乳腺癌微转移和疗效密切相关^[5]。作为上皮来源肿瘤, 表达于上皮来源性细胞生物学特征的 CK19 在间叶组织来源的血液中无表达, 基于这一特性, 利用 RT-PCR 技术检测血液中 CK19 可以判断是否存在微转移。因此在淋巴结、骨髓和外周血中查获上皮膜抗原和角蛋白的表达阳性, 可以认为是乳腺癌诊断及微转移的指标^[6]。Parikh 等^[7] 研究发现其表达缺失和乳腺癌的局部复发明显著相关, 也和远处的转移和总生存率有关。王梅等^[8] 研究也发现术后 CK19 mRNA 的表达水平增加与肿瘤术后临床复发有一定关系, 并且认为局部控制好坏与分子水平缓解密切相关。

本研究结果显示,CK19 和 CEA mRNA 阳性率分别为 62.2%、53.3%;本实验发现 30 例乳腺良性病变患者中有 1 例 CK19 表达阳性,可能原因:(1)RT-PCR 灵敏度高,存在假阳性可能;(2)有癌前病变可能。淋巴结转移者和无淋巴结转移者 CK19 阳性表达率分别为 83.3%、53.3%,两两相比较 CK19 的阳性表达率差异均有统计学意义。结果表明 RT-PCR 技术能检出常规病理检查不能发现的微转移灶,可显著提高对乳腺癌外周血转移诊断的敏感度及准确率。

乳腺癌患者外周血 CK19 mRNA 的水平在 TNM 分级组间差异有统计学意义($P < 0.01$),并随着临床分期的递增,CK19 mRNA 的水平及阳性检出率逐渐升高,提示患者发生肿瘤细胞血行播散的危险随着临床分期的递增有增加的趋势,本研究结果显示,II、III 期患者 CK19 的表达水平高于 I 期患者,各期间 CK19 表达阳性率差异均有统计学意义。结果与 Wong 等^[9]的报道一致。这些结果提示 CK19 的表达与乳腺癌的生物学行为及恶性程度有关,CK19 的检测将有助于临床评估乳腺癌患者的预后。

CEA 是相对分子质量为 180×10^3 的糖蛋白,由 686 个氨基酸残基组成,主要表达于胚胎性肿瘤、肺、胃肠、乳腺癌组织,CEA mRNA 属于上皮组织特异性标志基因,在正常人的间叶组织不表达,为检测外周血中微转移提供了可能。CEA 在绝大多数浸润性导管癌组织中呈阳性,而原位癌、小叶癌的阳性率仅 30%,乳腺良性病变很少阳性^[10],它可以促进肿瘤细胞与正常细胞的结合,并对肿瘤的转移起重要的作用。

本实验结果显示乳腺癌患者外周血中 CEA mRNA 表达阳性率为 53.3%,其阳性表达与乳腺良性疾病患者比较差异有统计学意义,CEA mRNA 的表达与乳腺癌患者的淋巴结转移状况、TNM 分期有相关性,而与肿瘤大小无明显相关性。

乳腺癌患者外周血均可检测出不同表达量的 CK19 和 CEA mRNA,综合 CK19 和 CEA mRNA 阳性率在乳腺癌随临床分期增高而增加的结果,提示 CK19 和 CEA mRNA 的表达可能受到包括肿瘤细胞的特性等多种因素的影响。本组实验显示,CK19 和 CEA mRNA 在病理分布的总阳性率比较接近,两者在乳腺癌 TNM 分期、淋巴结转移阳性患者中表达呈正相关关系($P < 0.01$)。提示 CK19、CEA 基因及蛋白表达变化对于乳腺癌预后均有不同程度的意义。对基因与乳腺癌预后评价的进一步研究,尤其是对乳腺癌相关基因及蛋白表达水平的定量检测和不同基因关联作用及相关新基因的研究,更加明确基因与乳腺癌的细胞分子生物学关系,这有助于检测肿瘤细胞的早期血行转移。但结果亦显示 CK19 和 CEA mRNA 在乳腺癌外周血中阳性率仅为 62.2%、53.3%,对此可能的解释有:(1)肿瘤细胞可能呈间歇性释放入血^[11];(2)由于肿瘤在基因表达上具有异质性,加上微循环的某种因素,血液循环中肿瘤细胞也许不表达该基因,有别于组织标本^[12];(3)标志物的特异性或检测的方法的敏感性有待提高。故本组采用多次采血、多种肿瘤标志基因联合检测方法以提高检测的阳性率。

综上所述,在乳腺组织中,CK19 和 CEA mRNA 均是较可靠的反映细胞增殖及微转移灶存在的较敏感标记物,它能较准确地反映细胞的增殖活性,对判断临床分期有一定参考价值,

并可作为肿瘤浸润转移、指导治疗和估计预后的参考指标。

参考文献:

- [1] Stathopoulou A, Mavorudis D, Perraki M, et al. Molecular detection of cancer cells in the peripheral blood of patients with breast cancer—comparison of CK-19, CEA and maspin as detection markers[J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(2C): 1883.
- [2] Pretlow TG, Schwartz S, Giaconia JM, et al. Prostate cancer and other xenografts from cells in peripheral blood of patients[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(15): 4033-4036.
- [3] Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, et al. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases[J]. *J Clin Oncol*, 1991, 9(10): 1749-1756.
- [4] Cleator S, Heller W, Coombes RC. Triple-negative breast cancer: therapeutic options[J]. *Lancet Oncol*, 2007, 8(3): 235-244.
- [5] Ikeda N, Miyoshi Y, Motomura K, et al. Prognostic significance of occult bone marrow micrometastases of breast cancer detected by quantitative polymerase chain reaction for cytokeratin 19 mRNA[J]. *Jpn J Cancer Res*, 2000, 91(9): 918-924.
- [6] Zhang J, Shen KW, Liu G, et al. Antigenic profiles of disseminated breast tumor cells and microenvironment in bone marrow[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2003, 29(2): 121-126.
- [7] Parikh RR, Yang Q, Higgins SA, et al. Outcomes in young women with breast cancer of triple-negative phenotype: the prognostic significance of CK19 expression[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008, 70(1): 35-42.
- [8] 王梅, 葛明建. 非小细胞肺癌患者术后化疗过程中外周血 CK19 mRNA 表达水平的变化及其临床意义[J]. *重庆医学*, 2009, 38(19): 2423-2425.
- [9] Wong IH, Yeo W, Chna AT, et al. Quantitative correlation of cytokeratin-19 mRNA level in peripheral blood with disease stage and metastasis in breast cancer patients: potential prognostic implications[J]. *Int J Oncol*, 2001, 18(3): 633.
- [10] 纪小龙, 施作霖. 诊断免疫组化[M]. 北京: 北京军事医学科学出版社, 1997: 212.
- [11] Glaves D, Huben RP, Weiss L. Haematogenous dissemination of cells from human renal adenocarcinomas[J]. *Br J Cancer*, 1988, 57(1): 32-35.
- [12] Hoon DS, Wang Y, Dale PS, et al. Detection of occult melanoma cells in blood with a multiple-marker polymerase chain reaction assay[J]. *J Clin Oncol*, 1995, 13(8): 2109-2116.

(收稿日期: 2010-12-10 修回日期: 2011-04-10)