

实时荧光定量 PCR 法检测乳腺癌外周血循环肿瘤细胞的临床价值

崇梅红,王 水*,查小明,刘晓安,凌立君,肇 毅

(南京医科大学第一附属医院乳腺外科,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**比较运用实时荧光定量 PCR 法联合不同生物标志物细胞角蛋白 19(cytokeratin 19,CK19)、乳珠蛋白(human mamaglobin,hMAM)、小黏蛋白(small breast epithelial mucin,SBEM)检测乳腺癌外周血循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)的临床价值。**方法:**运用实时荧光定量 PCR 法检测人乳腺癌细胞株 MCF-7 中的生物标志物 CK19、hMAM、SBEM 的表达情况,对 20 例健康志愿者和 20 例乳腺良性疾病患者(对照组人群)进行检测以确定 CK19、hMAM、SBEM 在外周血中的基础表达水平,检测 94 例可手术乳腺癌患者外周血中 CK19、hMAM、SBEM 表达情况。**结果:**人乳腺癌细胞株 MCF-7 中 CK19、hMAM、SBEM 均有表达,Ct 值分别为 13.87、34.47、20.14;40 例对照组人群中有 1 例表达 CK19,另有 1 例表达 hMAM,未检测到 SBEM 表达;94 例可手术乳腺癌患者中 CK19 表达率 49%、hMAM 表达率 34%、SBEM 表达率 13%,联合 CK19、hMAM、SBEM 阳性率为 56%。**结论:**运用多标志物(CK19、hMAM、SBEM)联合的实时荧光定量 PCR 法检测乳腺癌外周血 CTCs 具有较高的敏感性,同时特异性并不降低。

[关键词] 乳腺癌;循环肿瘤细胞;细胞角蛋白 19;乳珠蛋白;乳腺小黏蛋白

[中图分类号] R737.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)02-220-06

The clinical value of detecting circulating tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer by real time QPCR

CHONG Mei-hong, WANG Shui*, ZHA Xiao-ming, LIU Xiao-an, LING Li-jun, ZHAO Yi

(Department of Breast Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To compare clinical value of different biomarkers (CK19, hMAM, SBEM) used to detect circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood of patients with breast cancer using real-time quantitative PCR (QPCR) platform. **Methods:** The expression of CK19, hMAM, SBEM in human breast cancer cell lines MCF-7 was detected by real time QPCR, peripheral blood samples of 20 healthy volunteers and 20 patients with breast benign disease were detected to identify the base line expression of CK19, hMAM, SBEM. The expression of CK19, hMAM, SBEM in peripheral blood from 94 patients with operable breast cancer was detected also. **Results:** CK19, hMAM and SBEM were all detected in MCF-7, and the Ct value were 13.87, 34.47, and 20.14, respectively; among the 40 control persons, one sample expressed CK19, one sample expressed hMAM, and no sample expressed SBEM; among the 94 patients with operable breast cancer, 46 (49%) samples expressed CK19, 32 (34%) samples expressed hMAM, and 12 (13%) samples expressed SBEM, 53 (56%) samples were positive by combined detection using the three biomarkers. **Conclusion:** It is higher sensitivity to detect circulating tumor cells in peripheral blood of breast cancer combined detection using multimarkers (CK19, hMAM, SBEM) based on a real time QPCR platform, yet specificity was not depressed.

[Key words] breast cancer; circulating tumor cell; CK19; hMAM; SBEM

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(2): 220-225]

乳腺癌外周血循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTCs)可能代表了乳腺癌早期播散,成为研究

的热点。为了在血液中检出上皮来源的肿瘤细胞,通常选择上皮特异性或肿瘤相对特异性标志物,前者如上皮细胞黏蛋白 (epithelial cell adhesion molecule, EpCAM) 和细胞角蛋白 (cytokeratins, CK) 7、8、18、19、20; 后者如乳珠蛋白 (human mamma-

[基金项目] 国家自然科学基金(81071753);江苏省六大大人才高峰项目(2010-ws-079)

*通讯作者, E-mail: ws0801@hotmail.com

globin, hMAM)、小黏蛋白 (small breast epithelial mucin, SBEM)、黏蛋白 1 (mucin 1, MUCL1)、表皮生长因子受体 2 (human epithelial growth factor receptor 2, HER2) 等。由于肿瘤细胞具有异质性、基因不稳定性以及缺少特异性抗原等特点, 迄今为止尚没有一个标志物可以敏感而又特异地用于检测乳腺癌外周血 CTCs, 因此必须改进检测方法, 采用多个标志物联合检测, 以提高 CTCs 检测的敏感性和特异性。本研究采用实时荧光定量 PCR 方法, 选择 CK19、hMAM 及 SBEM 3 种标志物, 研究其检测乳腺癌外周血 CTCs 的敏感性和特异性以及临床价值。

1 对象和方法

1.1 对象

2010 年 9 月~2011 年 5 月南京医科大学第一附属医院乳腺外科入院病理明确诊断的 94 例乳腺癌患者, 年龄 28~85 岁, 平均 54.5 岁, 术前体检及辅助检查未发现远处转移及其他恶性肿瘤, 均未行新辅助治疗, 其临床及病理学特征见表 1。为了定义 CK19、hMAM、SBEM 在正常人群中的表达水平, 选择 20 例健康志愿者 (年龄 26~72 岁, 平均 52.0 岁), 以及 20 例乳腺良性疾病患者 (年龄 28~65 岁, 平均 53.0 岁) 作为对照组人群。每名受试者清晨空腹采集外周血 10 ml。

1.2 方法

1.2.1 引物

CK19、SBEM 及内参照基因 β -actin 的引物参考 GenBank, 采用 Prime Primer 5.0 软件设计, hMAM 的引物参考以前发表的文献设计^[1], 所有引物由英潍捷基 (中国上海) 合成 (表 2)。

1.2.2 细胞标本处理

人淋巴细胞分离液 (TBD 公司, 中国天津) 分离外周血标本单个核细胞, 加入 TRIzol (TaKaRa 公司, 中国大连) 后放入 -70°C 冰箱准备提取 RNA。取对数生长期人乳腺癌细胞株 MCF-7 胰酶消化, 离心后重悬, 计数 1×10^6 个细胞, 离心后弃上清, 加入 TRIzol 后 -70°C 保存备 RNA 提取。

1.2.3 MCF-7 细胞、标本 RNA 的处理以及 cDNA 的合成

所有标本按照氯仿/异丙醇法提取 RNA, 核酸蛋白定量仪测定 RNA 浓度和纯度, $D(260 \text{ nm})/D(280 \text{ nm})$ 比值 1.8~2.0, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳显示完整, 进入下一步实验。cDNA 合成按照试剂盒说明书进行 (TaKaRa 公司, 中国大连), 取 2 μg RNA 反转成

表 1 94 例可手术乳腺癌患者临床病理特征

Table 1 Clinicopathological characteristics of 94 patients with operable breast cancer

临床病理指标	n (%)
绝经状态	
绝经前	38(40)
绝经后	56(60)
肿块大小(cm)	
≤ 2	28(30)
2~5	62(66)
> 5	4(4)
淋巴结转移数(个)	
0	49(52)
1~3	20(21)
4~9	13(14)
≥ 10	12(13)
临床分期	
I 期	17(18)
II 期	51(54)
III 期	26(28)
病理分级	
1 级	26(28)
2 级	41(44)
3 级	27(29)
激素受体	
阴性	28(30)
阳性	66(70)
HER2	
阴性	69(73)
阳性	25(27)

表 2 PCR 引物序列

Table 2 Primers sequences for PCR

名称	序列(5'→3')
CK19-F	TCCGAACCAAGTTTGAGACG
CK19-R	CCCTCAGCGTACTGATTTCCCT
hMAM-F	ATGAAGTTGCTGATGGTCTCAT
hMAM-R	GTCTTAGACACTTGTGGATTGATTGCT
SBEM-F	GTATCCAGCTACTGGTCTCTGCT
SBEM-R	CAATTGCAGAAGACTCAAGCTG
β -actin-F	GCTGTGCTATCCCTGTACGC
β -actin-R	TGCCTCAGGGCAGCGGAACC

F: 上游引物; R: 下游引物。

40 μl cDNA 体系放入 -20°C 冰箱备用。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 体系的建立

实时荧光定量 PCR 采用 SYBR Green I 法, PCR 反应在 Eppendorf Realplex (德国) 上进行, 检测荧光超过背景荧光时的循环数定义为 Ct 值。

使用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (TaKaRa 公司, 中国大连) 试剂进行实时荧光定量 PCR 反应, 反应体系如下: 反应体系 20 μl , 2 \times SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 10

μl, 50×ROX Reference Dye 0.4 μl, cDNA 2 μl, 灭菌蒸馏水 6.8 μl, 10 μmol/L 上游及下游引物各 0.4 μl。反应条件为: 95℃预变性 10 min, 95℃变性 10 s, 55℃退火 15 s, 72℃延伸 45 s, 循环 40 次, 分析熔解曲线。

使用 96 孔板进行实时荧光定量 PCR 反应, 每个体系取 3 个复孔测试, 取平均值为 Ct 值, 按照 $2^{-\Delta Ct}$ 法计算基因的相对定量表达^[2]。选择 1 名健康志愿者作为参照, 其外周血 CK19、hMAM、SBEM 相对基因表达(relative gene expression, RGE)设定为 1。

实时荧光定量 PCR 切点阈值设置为对照组人群相应标志物(CK19、hMAM、SBEM)均值加上 3 倍标准差^[3], 高于该值即为阳性表达。

1.3 统计学方法

应用 SPSS12.0 软件进行统计学处理, 3 个标志物(CK19、hMAM、SBEM)阳性率差异采用条件 Logistic 回归分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。不同标志物/组合的检测效果采用 ROC 分析。

2 结果

2.1 CK19、hMAM、SBEM 在 MCF-7 中的表达

结果显示, CK19、hMAM、SBEM 在 MCF-7 中均有表达, 其 Ct 值分别为 13.87、34.47、20.14; MCF-7 中 CK19 表达最高, 其次为 SBEM, hMAM 表达最弱。图 1 显示 MCF-7 目的基因 CK19、hMAM、SBEM 及“看家基因”β-actin 的扩增曲线和熔解曲线。

2.2 CK19、hMAM、SBEM 在对照组人群中的表达

对照组人群, CK19 相对基因表达分布为 0.52~0.89, 均值 0.88; hMAM 相对基因表达分布为 0.72~6.88, 均值 1.38; SBEM 相对基因表达分布为 0.56~2.79, 均值 1.04, 图 2 显示了 40 例对照组人群 CK19、hMAM、SBEM 相对基因表达的分布。为了增加检测的特异性, 阳性切点阈值设定为均值加上 3 倍标准差($\bar{x} \pm 3s$), 分别为 3.77、6.62、3.27。40 例对照组人群中 有 1 例 CK19 为阳性, 其相对基因表达为 5.89; 有 1 例 hMAM 为阳性, 其相对基因表达为 6.88; CK19、hMAM、SBEM 在对照组人群中的特异性分别为 98%、98%、100%。

2.3 CK19、hMAM、SBEM 在乳腺癌患者外周血中的表达

共有 94 例 I~III 期可手术乳腺癌患者进行了外周血 CK19、hMAM、SBEM 的测定。CK19 相对基因表达分布为 0.42~53.38, 46 例(49%) > 3.77(切点阈值), 为表达阳性; hMAM 相对基因表达分布为

0.55~509.64, 32 例(34%) > 6.62(切点阈值), 为表达阳性; SBEM 相对基因表达分布为 0.58~20.44, 12 例(13%) > 3.27(切点阈值), 为表达阳性。条件 Logistic 回归分析显示 3 个标志物阳性率有统计学差异($P = 0.000$); 另外, 3 个标志物均为阳性的有 5 例(5%), 3 个标志物中任意 1 个为阳性的为 53 例(56%)。图 3 显示 94 例可手术乳腺癌患者外周血 CK19、hMAM、SBEM 相对基因表达分布。表 3 为单个标志物、2 个标志物联合、3 个标志物联合检测乳腺癌外周血 CTCs 敏感性、特异性及效率的分析, 结果显示联合运用 3 个标志物(CK19、hMAM、SBEM)检测较单个标志物、2 个标志物联合具有更高的敏感性, 为 56%, 且特异性为 95%。

3 讨论

转移是癌症相关性死亡的根本原因。Fisher 认为乳腺癌一开始就是一种全身性疾病^[4], 最近的研究也证实了乳腺癌发生血行转移可以发生在疾病的早期阶段^[5]。对于早期乳腺癌, 即使运用高分辨率的影像学技术也不能够发现转移, 然而, 运用现代生物学技术包括免疫细胞化学(immunocytochemistry, ICC)技术或者 RT-PCR 技术, 却能够在其外周血或者骨髓中检测到肿瘤细胞, 称为 CTCs 或者播散肿瘤细胞(disseminated tumor cells, DTCs), CTCs 或者 DTCs 可能代表了乳腺癌早期血行转移, 成为研究的热点。然而, 由于 CTCs 非常稀少并且肿瘤细胞异质性及基因表达的不稳定性特点, 迄今为止, 在 CTCs 的检测方面, 并没有公认的特定的检测方法。

实时荧光定量 PCR 具有高度的敏感性及特异性, 在乳腺癌外周血 CTCs 检测中应用较多。Stathopoulou 等^[6]通过绝对定量的方法对乳腺癌患者外周血 CK19 mRNA 表达进行了测定。绝对定量是对样品绝对量(拷贝数)进行测定的方法, 对于 mRNA 表达量解析并不能得到准确的结果。Livak 和 Schmittgen^[2]在 2001 年首先提出运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行基因表达相对定量解析, Benoy 等^[1]使用该法对乳腺癌患者外周血 CK19 mRNA 及 hMAM mRNA 进行了测定; Mikhitarian 等^[3]也运用相对定量的方法对实时荧光定量 PCR 原始数据进行了解析, 不过他们使用的是 ΔCt 法, 而非 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法, 由于基因是呈 2^n 指数扩增, 用 ΔCt 法并不能有效地反映样品之间的原始差异^[2]。本研究结合了 Benoy 和 Mikhitarian 的研究思路对原始数据进行了解析, 即将对照组人群外

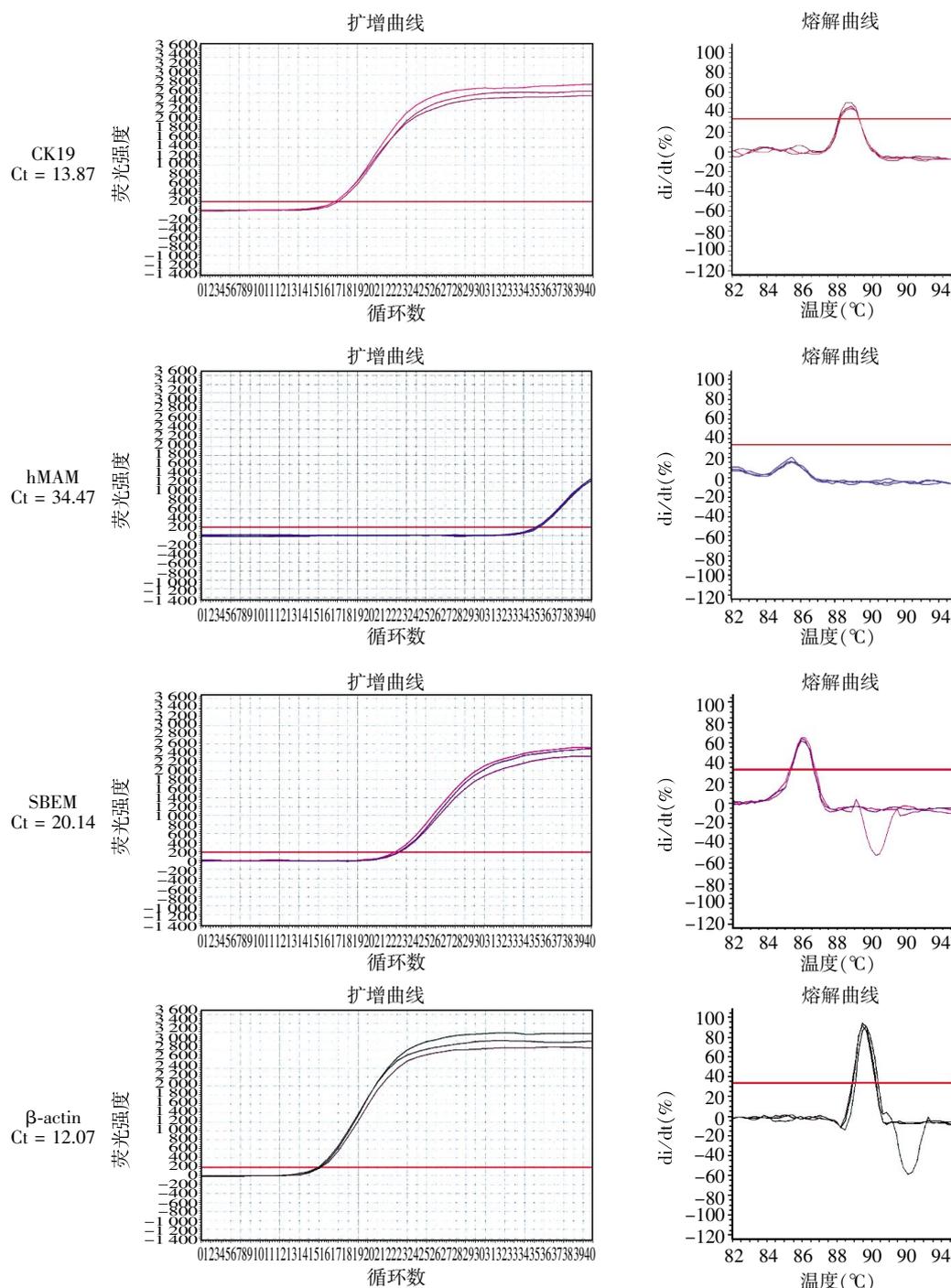


图 1 CK19,hMAM、SBEM 及 β -actin 在 MCF-7 中的表达

Figure 1 The expression of CK19,hMAM,SBEM in the MCF-7 cell line

周血相关标志物 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 均值加上 3 倍标准差 ($\bar{x} \pm 3s$) 设定为阳性的切点阈值,结果显示具有较好的敏感性 & 特异性。

CK19 系广谱的上皮细胞标志物,广泛用于乳腺癌外周血 CTCs 的检测^[7-8],其优点是检出率高,假阳性是其缺点。hMAM 系子宫珠蛋白家族成员之一,于 1996 年被 Waston 和 Fleming^[9]首先在乳腺癌原发灶中鉴定出来,限于在成人乳腺及乳腺癌细胞

株中表达,具有高度的组织特异性,研究显示乳腺癌患者外周血 hMAM mRNA 表达具有诊断及预后价值^[10-13]。SBEM 也称作为 MUCL1,限于在人唾液腺及乳腺中表达^[14],组织特异性高,曾用于检测乳腺癌骨髓孤立肿瘤细胞(isolating tumour cell,ITC),在激素受体阴性的亚组中显示出预后价值^[15]。实时荧光定量 PCR 法检测人乳腺癌细胞株 MCF-7 中 CK19、hMAM、SBEM 表达,Ct 值分别为 13.87、34.47、

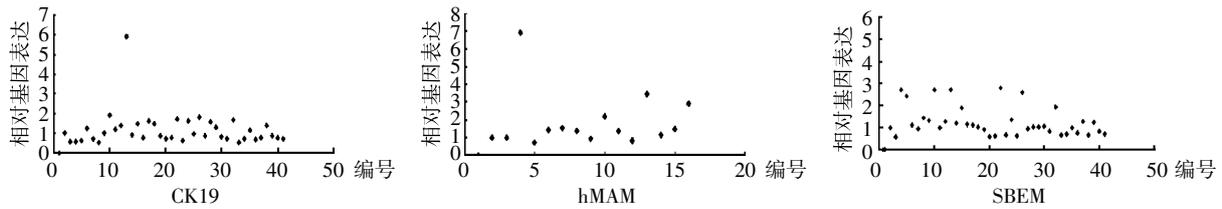


图 2 40 例对照组人群外周血 CK19、hMAM、SBEM 相对基因表达的分布
Figure 2 The expression of CK19, hMAM, and SBEM in the control group

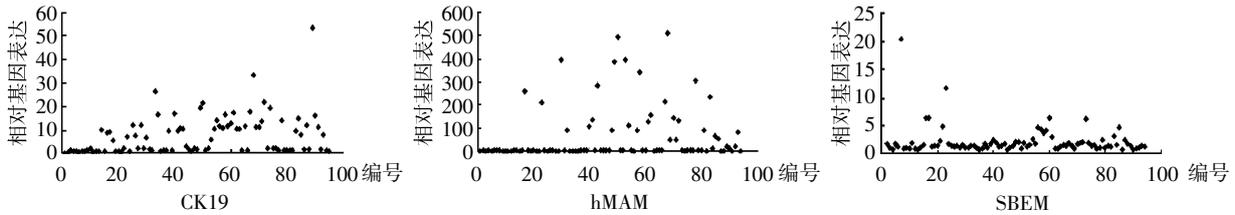


图 3 94 例可手术乳腺癌患者外周血 CK19、hMAM、SBEM 相对基因表达的分布
Figure 3 The expression of CK19, hMAM, and SBEM in the patients with operable breast cancer

表 3 比较不同标志物检测乳腺癌外周血循环肿瘤细胞差异

Table 3 Difference of detection of circulating tumor cells by different biomarkers

标志物	敏感性	特异性	准确度	ROC
CK19	46/94(49%)	39/40(98%)	85/134(63%)	0.73
SBEM	12/94(13%)	40/40(100%)	52/134(39%)	0.50
hMAM	32/94(34%)	39/40(98%)	71/134(53%)	0.66
CK19 + SBEM	9/94(10%)	40/40(100%)	49/134(37%)	0.50
CK19 / SBEM	49/94(52%)	39/40(98%)	88/134(66%)	0.75
CK19 + hMAM	28/94(30%)	40/40(100%)	68/134(51%)	0.50
CK19 / hMAM	51/94(54%)	38/40(95%)	89/134(66%)	0.75
SBEM + hMAM	6/94(6%)	40/40(100%)	46/134(34%)	0.50
SBEM / hMAM	38/94(40%)	39/40(98%)	77/134(57%)	0.69
CK19 + hMAM + SBEM	5/94(5%)	40/40(100%)	45/134(34%)	0.50
CK19 / hMAM / SBEM	53/94(56%)	38/40(95%)	91/134(68%)	0.76

+:串联试验,标志物同时为阳性;/:并联试验,任一标志物为阳性。

20.14,显示不同标志物表达的差异。94 例可手术乳腺癌患者外周血中,CK19 阳性率为 49%,hMAM 次之,为 34%,SBEM 阳性率最低,为 13%,三者同为阳性的比例仅为 5%,证实了选用不同标志物检测结果的差异性,这种差异性可能归因于肿瘤细胞的异质性,因而客观上要求联合使用标志物进行乳腺癌外周血 CTCs 检测,本研究显示联合使用这 3 个标志物可使乳腺癌外周血 CTCs 检出率提高至 56%,而特异性并不显著降低。然而,本研究也显示 16% (15/94) 的可手术乳腺癌患者仅仅 CK19 为阳性而 hMAM、SBEM 均为阴性,对于这部分患者,由于 CK19 存在假阳性可能,其检测结果需谨慎对待。

本研究显示实时荧光定量 PCR 法检测乳腺癌外周血 CTCs 具有较高的敏感性及特异性,选用不同的标志物 CK19、hMAM、SBEM 检测结果具有差异,联合使用 CK19、hMAM、SBEM 则可以显著提高

检测的敏感性。然而,如何实现乳腺癌外周血 CTCs 检测的标准化,仍需要进一步的研究。

[参考文献]

[1] Benoy IH, Elst H, Van der Auwera I, et al. Real-time RT-PCR correlates with immunocytochemistry for the detection of disseminated epithelial cells in bone marrow aspirates of patients with breast cancer [J]. Br J Cancer, 2004, 91(10):1813-1820

[2] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408

[3] Mikhitarian K, Martin RH, Ruppel MB, et al. Detection of mammaglobin mRNA in peripheral blood is associated with high grade breast cancer: interim results of a prospective cohort study [J]. BMC Cancer, 2008, 8:55

[4] Fisher B. A commentary on the role of the surgeon in

- primary breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 1981, 1(1):17-26
- [5] Fisher B, Anderson S, Bryant J, et al. Twenty-year follow up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer [J]. N Engl J Med, 2002, 347(16):1233-1241
- [6] Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, et al. Real-time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(14):5145-5151
- [7] Daskalaki A, Agelaki S, Perraki M, et al. Detection of cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with operable breast cancer [J]. Br J Cancer, 2009, 101(4):589-597
- [8] Saloustros E, Mavroudis D. Cytokeratin 19-positive circulating tumor cells in early breast cancer prognosis[J]. Future Oncol, 2010, 6(2):209-219
- [9] Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer[J]. Cancer Res, 1996, 56(4):860-865
- [10] Tjensvoll K, Gilje B, Oltedal S, et al. A small subgroup of operable breast cancer patients with poor prognosis identified by quantitative real-time RT-PCR detection of mammaglobin A and trefoil factor 1 mRNA expression in bone marrow[J]. Breast Cancer Res Treat, 2009, 116(2):329-338
- [11] Shen C, Hu L, Xia L, et al. The detection of circulating tumor cells of breast cancer patients by using multimarker (Survivin, hTERT and hMAM) quantitative real-time PCR [J]. Clin Biochem, 2009, 42(3):194-200
- [12] Ferro P, Franceschini MC, Bacigalupo B, et al. Detection of circulating tumour cells in breast cancer patients using human mammaglobin RT-PCR; association with clinical prognostic factors [J]. Anticancer Res, 2010, 30(6):2377-2382
- [13] Chen Y, Zou TN, Wu ZP, et al. Detection of cytokeratin 19, human mammaglobin, and carcinoembryonic antigen-positive circulating tumor cells by three-marker reverse transcription-PCR assay and its relation to clinical outcome in early breast cancer[J]. Int J Biol Markers, 2010, 25(2):59-68
- [14] Miksicek RJ, Myal Y, Watson PH, et al. Identification of a novel breast- and salivary gland-specific, mucin-like gene strongly expressed in normal and tumor human mammary epithelium[J]. Cancer Res, 2002, 62(10):2736-2740
- [15] Valladares-Ayerbes M, Iglesias-Diaz P, Diaz-Prado S, et al. Diagnostic accuracy of small breast epithelial mucin mRNA as a marker for bone marrow micrometastasis in breast cancer; a pilot study [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135(9):1185-1195

[收稿日期] 2011-10-18

科技出版物中文字与标点符号的书写

1. 汉字的使用应严格执行国家的有关规定,除特殊需要外,不得使用已废除的繁体字、异体字等不规范汉字。
2. 标点符号的用法应以 GB/T 15834-1995《标点符号用法》为准,根据科技书刊的习惯,建议:
 - (1) 省略号用 2 个三连点,其后不写“等”字,外文字符只用 1 个三连点;
 - (2) 波浪号“~”用于表示数值范围;
 - (3) 一字线“—”用于表示地域范围、走向、相关、递进等;
 - (4) 半字线“-”用于表示复合名词等;
 - (5) 外文中的标点符号应遵循外文的习惯用法,如连字符“-”。

(本刊编辑:接雅俐)