

• 论 著 •

## 乳腺癌外周血骨桥蛋白、细胞角蛋白 19 及粘蛋白 1 检测及临床意义\*

杨 莉

(东南大学附属南京江北人民医院检验科, 南京 210048)

**摘要:**目的 应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测乳腺癌患者外周血单个核细胞中骨桥蛋白(OPN)mRNA、细胞角蛋白 19(CK19)mRNA、粘蛋白 1(MUC1)mRNA 的表达,探讨联合检测 OPN、CK19、MUC1 在诊断乳腺癌微转移中的应用价值。方法 应用 RT-PCR 技术检测 41 例乳腺癌患者外周血中靶基因的表达,并以 8 例乳腺良性纤维瘤及 12 例健康人外周血作为对照。结果 OPN mRNA、CK19 mRNA、MUC1 mRNA 在乳腺癌中表达的阳性率分别为 60.98%(25/41)、39.02%(16/41)、29.26%(12/41),对照组中 8 例良性纤维瘤 OPN mRNA 阳性率为 12.5%(1/8),CK19 mRNA、MUC1 mRNA 无表达,12 例健康人外周血中均无靶基因表达。结论 OPN mRNA、CK19 mRNA、MUC1 mRNA 联合检测在乳腺癌患者微转移的诊断和预后判断中具有应用价值。

**关键词:**乳腺肿瘤; 骨桥蛋白; 角蛋白 19; 逆转录聚合酶链反应; 粘蛋白 1; 微转移

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.009

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2011)03-0305-02

### Detection of OPN, CK19 and MUC1 in peripheral blood from patients with breast cancer and its clinical significance<sup>\*</sup>

Yang Li

(Jiangbei People's Hospital of Nanjing, the Affiliated Southeast University, Nanjing 210048, China)

**Abstract: Objective** Using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) with specific primers for osteopontin (OPN), cytokeratin 19(CK19) and mucin 1(MUC1) to detect cells in peripheral blood (PB) from patients with breast cancer, and to find out the relationship between the breast cancer and micrometastasis. **Methods** The expression of OPN mRNA, CK19 mRNA and MUC1 mRNA in PB were analyzed with RT-PCR in 41 patients with breast cancer, compared with 8 breast benign lesions and 12 healthy volunteers. **Results** The positive expression rates of OPN mRNA, CK19 mRNA and MUC1 mRNA were 60.98%(25/41), 39.02%(16/41), 29.26%(12/41), respectively in patients with breast cancer. Only one was detected in benign lesion with OPN mRNA, no CK19 mRNA or MUC1 mRNA was detected in patients with breast benign lesions and healthy volunteers. **Conclusion** OPN mRNA, CK19 mRNA and MUC1 mRNA are expressed in PB of breast cancer patients, and each of them may be a marker of micrometastasis of breast cancer.

**Key words:** breast neoplasm; osteopontin; keratin-19; reverse transcriptase polymerase chain reaction; mucin 1; micrometastasis

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,在中国,其发病率每年以 3% 的速度递增。及时发现乳腺癌的微转移可以明显提高患者的生存率。本试验用逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测乳腺癌患者外周血中骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、细胞角蛋白 19(cytokeratin 19, CK19)和粘蛋白 1(mucin 1, MUC1)的 mRNA 的表达,以探讨三者早期发现乳腺癌微转移的诊断和预后判断中的应用价值。

#### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集本院 2006 年 3 月至 2007 年 10 月经病理检查证实的乳腺癌患者外周血标本 41 例,年龄 38~78 岁,中位年龄 51 岁,按照国际抗癌联盟(UICC)TNM 分期标准,Ⅰ期 8 例,Ⅱ期 19 例,Ⅲ期 10 例,Ⅳ期 4 例,其中浸润性导管癌 34 例,黏液性腺癌 6 例,浸润性导管癌与黏液腺癌混合癌 1 例,有淋巴结转移 24 例,无淋巴结转移 17 例;对照组中,良性纤维瘤 8 例,年龄 32~47 岁,中位年龄 41 岁;排除乳腺和其他疾病

的健康人 12 例,为本院健康体检人员,中位年龄 45 岁。

**1.2 标本采集及有核细胞分离** 分别取乳腺癌患者、良性纤维瘤患者及健康体检人员外周静脉血 5 mL, EDTA 抗凝,按人淋巴细胞分离液(天津灏洋公司)说明书操作,分离单个核细胞,生理盐水洗涤 3 次后,置 -80 °C 冰箱保存备用。

**1.3 引物** 根据 OPN、CK19 和 MUC1 序列设计引物,由 Invitrogen 公司合成。OPN 上游引物序列:5'-AGA GTC GTT CGA GTC AAT GG-3',下游引物序列:5'-CAG TTG CAG CCT TCT CAG CC-3',扩增产物长度为 330 bp;CK19 上游引物序列:5'-TCG CCA AGA TCC TGA GTG A-3';下游引物序列:5'-TCC GTT TCT GCC AGT GTG T-3',扩增产物长度为 250 bp;MUC1 上游引物序列:5'-TTG TCT ACT GGG GTC TCT TTC TTT-3',下游引物序列:5'-TGT ACC ACC ACA GAT CCT GG-3',扩增产物长度为 200 bp;内参照  $\beta$ -Actin 上游引物序列:5'-AGC GGG AAA TCG TGC GTG-3',下游引物序列:5'-CAG GGT ACA TGG TGG TGC C-3',扩增产物长度

\* 基金项目:南京市医学科技发展项目(YKK05137)。

为 309 bp。

**1.4 方法** (1)总 RNA 提取及鉴定:用 Trizol(Invitrogen 公司)提取总 RNA、用 15  $\mu$ L 焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)溶液溶解,取适量 RNA 溶液,再用 DEPC 水稀释,用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度,1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。(2)应用 RT-PCR 检测 OPN、CK19 和 MUC1 mRNA 的表达:一步法 RT-PCR 试剂盒由 Invitrogen 公司提供,按照说明书操作,逆转录和 cDNA 的扩增在同一扩增管中进行。cDNA 合成反应条件为 55  $^{\circ}$ C 温育 30 min, 94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min, cDNA 扩增条件为 94  $^{\circ}$ C 15 s, 58  $^{\circ}$ C 30 s, 68  $^{\circ}$ C 60 s, 40 个循环,最后延伸 68  $^{\circ}$ C 5 min。扩增仪为 Gene-star9625。(3)PCR 产物分析:以 DNA marker 为相对分子质量标志,1.5%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,紫外光下观察结果。出现特异性条带者为阳性。

**1.5 统计学处理** 采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 OPN、CK19 和 MUC1 在乳腺癌外周血中的表达** OPN、CK19、MUC1 在乳腺癌中的表达分别与良性纤维瘤和健康对照相比,  $P < 0.05$ , 差异均有统计学意义, 见表 1。

**表 1 外周血 OPN、CK19 和 MUC1 的表达情况[n(%)]**

组别	n	OPN 阳性表达	CK19 阳性表达	MUC1 阳性表达
乳腺癌	41	25(60.98)	16(39.02)	12(29.26)
良性纤维瘤	8	1(12.50)	0(0.00)	0(0.00)
健康对照	12	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)

**2.2 OPN、CK19 和 MUC1 的表达与淋巴结转移情况** 见表 2, CK19 和 MUC1 阳性表达在淋巴结转移和未转移 2 组间进行比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); OPN 阳性表达在淋巴结转移和未转移 2 组间进行比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。41 例乳腺癌中, OPN、CK19 和 MUC1 均表达的有 6 例, 且均为淋巴结转移患者, 其中 2 例临床分期是 III 期, 4 例临床分期是 IV 期; 三者均阴性的仅 8 例, 均为淋巴结未转移患者, 其余 27 例均有不同程度 OPN、CK19 和 MUC1 的表达。

**表 2 OPN、CK19 和 MUC1 的表达与淋巴结转移的关系[n(%)]**

组别	n	OPN 阳性表达	CK19 阳性表达	MUC1 阳性表达
淋巴结转移	24	18(75.0)	12(50.0)	9(37.5)
淋巴结未转移	17	7(41.1)	4(23.5)	3(17.7)

**3 讨 论**

乳腺癌是女性高发的恶性肿瘤, 在肿瘤发生的早期即可能发生癌细胞的播散。肿瘤细胞突破基底膜侵入血液循环是发生远处转移的起始步骤, 外周血肿瘤标志物水平的上调常常比临床表现提早数月<sup>[1]</sup>。早期发现检测血液循环中是否存在肿瘤细胞的播散, 就可以选择合适的治疗方案, 使患者有良好的预后。

OPN 最早由 Senger 等<sup>[2]</sup>报道, 是骨骼和牙齿矿化细胞外

基质蛋白, 另有研究认为, 乳腺癌微钙化灶多由骨特异性矿物羟基磷灰石构成, 乳腺癌组织表达 OPN 可能与乳腺癌内羟基磷灰石的形成和沉积有关。OPN 在乳腺癌微转移中发挥作用, 可能与 OPN 的生理功能有关, OPN 能够参与细胞的迁移, 调节细胞粘附和运动, 参与血管网络的构建, 从而激发肿瘤的转移潜能<sup>[3]</sup>。新生血管形成是肿瘤细胞生长存活和浸润转移的基础, OPN 与血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 可共同促进乳腺癌的新生血管形成, 修复和再生, OPN 也有可能通过刺激内皮细胞粘附和迁移而加速血管修复。同时, OPN 主要位于肿瘤浸润的前沿, 它的表达与某些肿瘤相关基因如 ras、v-myc 等的表达密切相关, 在细胞表达部位随肿瘤恶化的发生、发展而改变<sup>[4]</sup>。因此, 外周血检测到 OPN 提示乳腺癌有发生微转移的可能。

细胞角蛋白是细胞骨架中间丝的主要成分, 广泛存在于正常上皮细胞及上皮性癌细胞中。CK19 是细胞角蛋白家族的重要成员之一, 在间叶来源的组织细胞中 (如血液、骨髓、淋巴结等) 几乎不表达, 是上皮组织来源的组织特异性标志, 一旦于血液、淋巴液和骨髓组织中发现, 就提示上述组织中有癌细胞的存在, 因此, CK19 可以作为上皮性肿瘤微转移检测的标志, 也可以作为乳腺癌的肿瘤标志物<sup>[5-6]</sup>。

粘蛋白是一类高相对分子质量的糖蛋白, 分为分泌型和膜结合型, MUC1 正常情况下主要存在于胃肠道、呼吸道、泌尿生殖道及乳腺等多种上皮组织中, 对正常的上皮起润滑和保护作用, 呈极性分布, 在肿瘤组织中多出现异常表达, 极性分布丧失, 影响细胞表面分子间的相互粘附作用, 使肿瘤细胞逃避免疫系统的监视, 利于肿瘤细胞的转移和生长, 近年来发现乳腺癌的发生、发展与 MUC1 异常表达密切相关<sup>[7-10]</sup>。

在本试验中, OPN、CK19 和 MUC1 在乳腺癌外周血中被检测到, 且多发生于淋巴结转移患者, 检测结果阳性预示患者有肿瘤细胞的播散或发生远处转移的可能。从结果中也可以发现, 淋巴结转移的病例靶基因阳性率明显高于未转移的病例, 提示淋巴结转移患者肿瘤细胞血行播散的危险性有增加的趋势, 对于淋巴结转移且靶基因阳性的患者, 应作为重点人群采取积极的治疗措施, 防止术后复发和远处转移。另外, 在淋巴结未转移而靶基因阳性患者中, 虽然尚无证据表明已形成转移灶, 但外周血中的肿瘤细胞至少增加了远处转移的危险, 应给予及时的预后监测和预防性治疗。肿瘤转移是一个复杂的多步骤过程, 血液中检测到或存在播散的肿瘤细胞, 并不意味着将来必定发展为转移灶, 因为肿瘤细胞的脱落、侵袭并进入血液循环只是转移的最初过程。由于外周血标本来源方便, 作者可以通过动态监测患者的情况, 对病情预后作出正确判断, 积极采取措施, 从而提高患者的生存率<sup>[11-12]</sup>。

**参考文献**

[1] 刘莉莉, 陈亮, 林林志, 等. 血清 CA153、CA125 和 CEA 联合检测在乳腺癌诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(9): 858-859.  
 [2] Senger DR, Wirth DF, Hynes RO. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins[J]. Cell, 1979, 16(4): 885-893.  
 [3] 俞文华, 张国新. 骨桥蛋白: 一种新的肿瘤标志物(下转第 309 页)

变,这些改变导致浆核比例出现变化,细胞浆内复杂性增强,表现为 NE、LY、MO 的传导性、激光散射性参数的改变,与国内外报道基本一致<sup>[4-8]</sup>。但是在本研究中,NEC、NES、LYC-SD、MOC 的改变与国内一些报道略有不同。其中,NES 明显下降的原因是 NE 核左移后引起散射光减少要远远大于因胞质中毒颗粒增多等引起散射光增大<sup>[8]</sup>。NEC、LYC-SD、MOC 值的增大原因还需要进一步探讨。因此,白细胞的 VCS 参数在一定程度上可以反映细菌感染的程度,可作为了解细菌感染程度的辅助指标之一。

本次回顾性研究中对细菌感染性疾病患者的分组比较中发现,在患者 WBC 还在正常甚至低于正常的情况下,其白细胞的体积、浆核比例和细胞浆内复杂性也已经发生了明显变化,表现为白细胞的 VCS 参数的变化,与国内外研究结果一致。在国内外研究中还发现,NEC、NES、NEV-SD、NEC-SD 较 WBC 和 NE(%) 具有更高的敏感度和特异度,其中用 NEV-SD 对细菌感染的诊断性能稍优于其他 3 种<sup>[5,8-9]</sup>,由于本研究的局限性,对此并没有进行观察。

VCS 数据来源于血常规分析得出的结果,具有快速、客观、可靠等优点,有很好的临床应用前景。临床上有很多疾病可以引起机体 WBC 增高,其中最常见的是急性细菌性感染,但是不是所有的感染者都会有升高,同样也不是所有 WBC 的升高都是由细菌感染引起的,如果同时能给予白细胞的 VCS 结果,对临床疾病的诊断能起到较好的作用,若能进一步对其各个参数制定正常参考范围,则对临床的疾病诊断更有意义。

参考文献

- [1] 孟婵群,徐伟文,周彩萍. 发热患者外周血白细胞形态观察临床意义[J]. 现代中西医结合杂志,2008,17(13):2030.
- [2] 熊立帆. 临床检验基础[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:36-49.
- [3] 陈文彬,潘祥林. 诊断学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:253-256.
- [4] Chaves F, Tierno B, Xu DS. Neutrophil volume distribution width: a new automated hematologic parameter for acute infection[J]. Arch Pathol Lab Med, 2006, 130(3): 378-380.
- [5] Chaves F, Tierno B, Xu DS. Quantitative determination of neutrophil VCS parameters by the Coulter automated hematology analyzer: new and reliable indicator for acute bacterial infection[J]. Am J Clin Pathol, 2005, 124(3): 440-444.
- [6] 许东升. 血细胞分析仪临床应用进展[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(7): 747-750.
- [7] 赵尉宁,董华. 氨苄西林-舒巴坦钠治疗下呼吸道感染疗效观察[J]. 山东医药, 2006, 46(7): 51.
- [8] 吕美艳,王明山,杨丽红,等. 细菌感染性疾病患者白细胞 VCS 参数的变化及临床意义[J]. 检验医学, 2007, 22(5): 578-580.
- [9] 金艳慧,王明山,杨红丽,等. 中性粒细胞体积与浆核复杂性在感染和应激性疾病的变化及意义[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(3): 326-330.

(收稿日期:2010-06-06)

(上接第 306 页)

- [J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(12): 1109-1111.
- [4] 张红军. 骨桥蛋白的功能及与消化系统等疾病的关系[J]. 国外医学:生理病理及临床分册, 1999, 19(6): 524-527.
- [5] Stathopoulou A, Mavroudis 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): 1883-1890.
- [6] 邱林,丛笑,贾立群,等. 肿瘤细胞株和癌组织角蛋白 19、20 mRNA 表达及临床意义[J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 22(1): 32-35.
- [7] Zaretsky JZ, Barnea I, Aylon Y, et al. MUC1 gene overexpressed in breast cancer: structure and transcriptional activity of the MUC1 promoter and role of estrogen receptor alpha (ER- alpha) in regulation of the MUC1 gene expression[J]. Mol Cancer, 2006, 5: 57-

- 70.
- [8] 李斌,陈武科,陈鹏,等. 乳腺癌中 MTA1、MMP-9 表达与临床病理研究[J]. 重庆医学, 2010, 39(22): 1552-1554.
- [9] 承冰生,王长利. 肿瘤骨桥蛋白相关信号通路研究进展[J]. 国际肿瘤学杂志, 2009, 36(8): 569-571.
- [10] 马春雷,刘静蕾,刘晓娟. RNA 干扰乳腺癌细胞骨桥蛋白基因表达抑制的研究[J]. 中国医药, 2009, 4(9): 645-647.
- [11] 周龙,雷建平,李瑶. 粘蛋白 (MUC1) 与肿瘤的关系[J]. 江西医药, 2008, 43(4): 364-367.
- [12] 庄亚强,莫军扬,朱其一,等. 应用 RJ-PCR 检测 CK19 在乳腺癌前哨淋巴结表达的临床研究[J]. 华夏医学, 2007, 20(1): 43-44.

(收稿日期:2010-05-10)

