

• 临床检验研究论著 •

乳腺癌患者外周血中 SBEM mRNA 的表达及意义

陈忠¹, 陈聆¹, 孟凡祥¹, 杜鸿²

(1. 江苏省苏州永鼎医院检验科, 江苏苏州 215200; 2. 苏州大学附属第二医院检验科, 江苏苏州 215004)

摘要: 目的 探讨乳腺癌患者外周血 SBEM mRNA 表达情况及其与临床病理因素的相关性。方法 运用巢式逆转录-聚合酶链反应(nRT-PCR)检测 56 例乳腺癌患者外周血 SBEM mRNA 表达情况, 以乳腺良性肿瘤患者及健康者各 20 例作为对照。结果 乳腺癌患者外周血 SBEM mRNA 表达阳性率为 46.4% (26/56), 乳腺良性肿瘤患者及健康者表达阳性率均为 0.0% (0/20, $P < 0.05$)。乳腺癌患者外周血 SBEM mRNA 表达阳性率与患者有无淋巴结转移及 TNM 分期相关($P < 0.05$), 但与年龄、肿瘤大小无关($P > 0.05$)。结论 乳腺癌患者外周血 SBEM mRNA 可作为乳腺癌微转移的判断指标, 对乳腺癌临床分期、预后判断和治疗起重要作用。

关键词: 乳腺肿瘤; 黏蛋白类; 巢式逆转录聚合酶链反应; 微转移

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.19.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)19-2327-02

Expression and significance of SBEM mRNA in peripheral blood of patients with breast cancer

Chen Zhong¹, Chen Ling¹, Meng Fanxiang¹, Du Hong²

(1. Department of Clinical Laboratory, Suzhou Yongding Hospital, Suzhou, Jiangsu 215200, China;

2. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215004, China)

Abstract: Objective To explore the expression of SBEM mRNA in the peripheral blood from patients with breast cancer and its correlations with clinicopathological parameters. **Methods** Nested reverse transcription-polymerase chain reaction(nRT-PCR) was performed to investigate the expression status of SBEM mRNA in the peripheral blood from 60 cases of breast cancer, 20 cases of benign breast diseases and 20 healthy volunteers. **Results** The positive rate of SBEM mRNA expression in breast cancer group was 46.4% (26/56), whereas those in the other two groups were both 0.0% ($P < 0.05$). The positive rate of SBEM mRNA expression was correlated with lymph node metastasis and TNM stage, but was not associated with age and tumor size. **Conclusion** The positive expression of SBEM mRNA in the peripheral blood of patients with breast cancer might serve as a diagnostic marker of micro-metastasis and be helpful for the correct clinical staging, prognostic diagnosis and treatment for the patients.

Key words: breast neoplasms; mucins; nested RT-PCR; micro-metastasis

乳腺小黏蛋白(SBEM)是与乳腺癌发生相关的标志物^[1], 仅表达于乳腺和唾液腺, 正常外周血中因无上皮源性细胞而不表达^[2]。因此, 外周血 SBEM mRNA 检测有助于发现早期乳腺癌外周血中循环肿瘤细胞的微转移。本研究采用巢式逆转录聚合酶链反应(nRT-PCR)技术对乳腺癌患者进行外周血 SBEM mRNA 检测, 评估其在乳腺癌诊疗和预后评估中的意义, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 经病理细胞学证实的 56 例女性乳腺癌患者(乳腺癌组), 年龄 23~74 岁, 中位年龄 57 岁, 临床 I、II、III、IV 期分别为 7、22、18、9 例, 纳入本研究前均未经任何抗癌治疗。以乳腺良性肿瘤患者(良性组)及健康志愿者(健康组)各 20 例作对照。

1.2 仪器与试剂 Hhybaid 系列 PCR 扩增仪(美国 Thermo)、Biophotometer 核酸蛋白测定仪(德国 Eppendorf)、Ficoll 分离液(天津灏洋)、总 RNA 提取试剂 Trizol(美国 Invitrogen)、逆转录试剂盒(日本 Toyobo)。

1.3 方法 (1)总 RNA 提取和逆转录: 采集受检者外周血静脉血 5 mL(弃去开始的 1 mL, 避免上皮细胞污染), EDTA 抗凝, 生理盐水稀释 2~3 倍后, 用 Ficoll 分离液分离有核细胞, 按 Trizol 试剂说明书提取细胞总 RNA, 取部分总 RNA 按逆转

录试剂盒说明书的要求合成 cDNA, 剩余总 RNA 于-70℃保存备用。(2)引物设计: 参照 GeneBank 中 SBEM 和 β -actin mRNA 序列, 用 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计跨外显子上下游引物, 上海 Sangon 公司合成, 引物序列见表 1。(3)巢式 PCR(nPCR)扩增: SBEM mRNA 第 1 轮扩增反应体系: 10×缓冲液 (Mg^{2+} 浓度为 25 mmol/L) 2.5 μ L、10 mmol/L dNTP 0.5 μ L、10 pmol/ μ L 上下游外引物各 0.5 μ L, 5 U/ μ L Taq 酶 0.2 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 加 ddH₂O 至 25 μ L; 扩增条件为: 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s 循环 20 次; 取第 1 轮产物 2 μ L 加入 SBEM mRNA 第 2 轮扩增反应体系(采用 SBEM mRNA 上下游内引物、退火 58℃ 30 s, 扩增 35 个循环, 其余反应条件与第 1 轮相同), 72℃ 10 min 结束反应; 取产物 5 μ L 于 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 溴化乙啶染色后于凝胶成像仪观察结果。

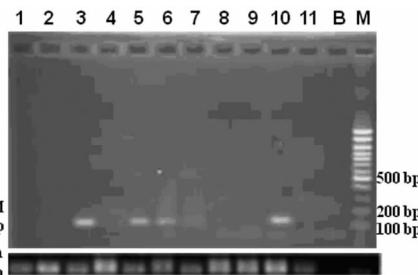
1.4 统计学处理 SBEM mRNA 阳性表达与临床病理参数的关系分析采用 SPSS13.0 软件进行 χ^2 检验, 显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 SBEM mRNA 表达检测 乳腺癌组外周血 SBEM mRNA 表达阳性率为 46.4% (26/56), 良性组及健康组未检出 SBEM mRNA, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 见图 1。

表 1 SBEM、 β -actin 基因 PCR 扩增引物序列

基因		引物序列	退火温度(℃)	产物长度(bp)
SBEM	外引物	For: 5'-TAG CAG TCC TGG TAC TCT TGG G-3' Rev: 5'-AAG CTG ATT CCA TCT CAG GGA C-3'	55	278
	内引物	For: 5'-CTG CCC AGA ATC CGA CAA CAG-3' Rev: 5'-AGC AGT GGT CGC AGT GGT TGC-3'	58	116
β -actin		For: 5'-CAC GAA ACT ACC TTC AAC TCC-3' Rev: 5'-CAT ACT CCT GCT TGC TGA TC-3'	56	265



3,5,6,7,10:表达 SBEM;1,2,4,8,9,11:不表达 SBEM;B:空白对照;M:DNA 分子标记物。

图 1 nRT-PCR 检测乳腺癌患者外周血 SBEM mRNA

2.2 SBEM mRNA 表达阳性与临床病理参数的关系 乳腺癌组外周血 SBEM mRNA 表达阳性率与临床病理参数的关系分析见表 2。

表 2 乳腺癌组外周血 SBEM mRNA 表达阳性率与临床病理参数的关系

临床病理参数	n	SBEM mRNA 阳性[n(%)]	χ^2	P
年龄(岁)				
≤60	18	8(44.4)	0.006 7	1.000 0
>60	38	18(47.3)		
肿瘤大小(cm)				
≤5	16	6(37.5)	0.303 3	0.554 5
>5	40	20(50.0)		
TNM 分期				
I + II	22	6(27.3)	4.152 6	0.029 0
III + IV	34	20(58.8)		
淋巴结转移				
有	38	22(57.9)	4.897 2	0.020 8
无	18	4(22.2)		

3 讨 论

肿瘤微转移的早期发现不仅有助于对恶性肿瘤患者的复发和预后进行评估,对指导临床诊疗也有重要意义^[3-4]。SBEM 首次发现于 2002 年^[2],是一种可用于判断乳腺癌复发、预测乳腺癌转移及辅助化疗的潜在标志物^[5]。nRT-PCR 在普通 PCR 基础上用外、内引物进行两轮扩增,提高了 PCR 敏感性和特异性。杨华伟等^[6]采用 nRT-PCR 检测乳腺癌患者 SBEM mRNA 表达阳性率为 50.7%(34/67),稍高于本研究结果,可能因抽样误差所致。本研究分析了乳腺癌患者外周血

SBEM mRNA 表达阳性率与临床病理因素的关系,结果表明其阳性率与患者年龄、肿瘤大小无关,但与有无淋巴结转移和 TNM 分期相关。尤小兰和范健^[7]采用与本研究相同的方法,结果表明乳腺癌患者 SBEM mRNA 表达阳性率为 46.7%(43/92),与本研究结果基本一致,但发现 SBEM mRNA 阳性率与患者年龄相关,这可能与地域差异有关,值得深入研究。本研究结果表明乳腺癌患者外周血中存在肿瘤细胞,且与淋巴结转移和 TNM 分期有关,提示 TNM 分期越晚,肿瘤更易侵袭血管,导致乳腺癌细胞进入血液循环的机会增大;当乳腺癌患者发生淋巴结转移时,外周血中肿瘤细胞微转移概率增高,外周血中 SBEM mRNA 阳性率越高。此外,乳腺癌 I、II 期患者也检出 SBEM mRNA 表达,提示部分早期乳腺癌患者也可能存在肿瘤细胞经血循环的微转移,有待进一步研究。

总之,乳腺癌患者外周血 SBEM mRNA 检测对评估是否存在乳腺癌微转移具有重要意义,可作为乳腺癌患者诊疗和术后评估的分子标志物。

参考文献

- [1] Carcoforo P, Bergossi L, Basaglia E, et al. Prognostic and therapeutic impact of sentinel node micrometastasis in patients with invasive breast cancer[J]. Tumori, 2002, 88(3): S4-5.
- [2] 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.
- [3] Weigelt B, Verduijn P, Bosma AJ, et al. Detection of metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients by multiple mRNA markers[J]. Br J Cancer, 2004, 90(8): 1531-1537.
- [4] Skliris GP, Hubé F, Gheorghiu I, et al. Expression of small breast epithelial mucin(SBEM) protein in tissue microarrays(TMAs) of primary invasive breast cancers[J]. Histopathology, 2008, 52(3): 355-369.
- [5] Liu ZZ, Xie XD, Qu SX, et al. Small breast epithelial mucin(SBEM) has the potential to be a marker for predicting hematogenous micrometastasis and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer[J]. Clin Exp Metastasis, 2010, 27(4): 251-259.
- [6] 杨华伟,刘剑仑,曹骥,等.乳腺癌患者外周血 SBEM mRNA 和 CD44V6 的检测及其临床意义[J].中国肿瘤临床,2005,32(7): 382-385.
- [7] 尤小兰,范健.外周血 SBEM 的表达与乳腺癌微转移关系的研究[J].中国普通外科杂志,2009,18(11): 1122-1125.