

GalNAcT 和 CK19 mRNA 表达与乳腺癌骨髓微转移的相关性

余明金, 秦凤展, 吴 穷, 郑荣生, 汪子书

[摘要] 目的: 研究乳腺癌患者骨髓中的 $\beta 1, 4$ -N-乙酰半乳糖胺转移酶(GalNAcT)mRNA 和细胞角蛋白-19(CK19)mRNA 表达情况。方法: 选取初治乳腺癌患者 40 例, 在化疗前抽取骨髓, 利用巢式逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测骨髓中 GalNAcT 和 CK19 的基因表达; 另选择血液系统良性疾病患者 10 例和 5 名正常人作为对照组。结果: 40 例乳腺癌患者 GalNAcT mRNA 和 CK19 mRNA 的阳性率分别为 42.5%(17/40) 和 27.5%(11/40); 10 例血液系统良性疾病患者和 5 名正常人骨髓 GalNAcT mRNA、CK19 mRNA 均不表达。两者表达与患者的 TNM 分期差异有显著性($P < 0.05$)。而与患者的年龄、肿瘤大小、腋窝淋巴结状态、病理类型以及激素状况等差异均无显著性($P > 0.05$)。结论: GalNAcT mRNA 和 CK19 mRNA 可作为标志物检测乳腺癌患者骨髓微转移, 联合检测可增加骨髓微转移检测的敏感性。

[关键词] 乳腺癌; 骨髓微转移; $\beta 1, 4$ -N-乙酰半乳糖胺转移酶; 细胞角蛋白; 逆转录-聚合酶链反应

[中国图书资料分类号] R 737.9 [文献标识码] A

The relationship between the expression of GalNAcT and CK19 mRNA and bone marrow micrometastases of breast cancer

SHE Ming-jin, QIN Feng-zhan, WU Qiong, ZHENG Rong-sheng, WANG Zi-shu

(Department of Oncology, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China)

[Abstract] **Objective** To study the relation of the expression of $\beta 1, 4$ -N-acetylgalactosaminyl-transferase(GalNAcT) and cytokeratin 19(CK19) mRNA and in breast cancer with micrometastases in bone marrow. **Methods** RT-PCR was used to detect the expressions of GalNAcT and CK19 mRNA in the bone marrow from 40 patients with breast cancer. The bone marrow from 10 patients with benign blood diseases and the blood from 5 normal healthy volunteers served as controls. **Results** The positive rates of GalNAcT and CK19 mRNA expressions in the bone marrow of the patients with breast cancer were 42.5%(17/40) and 27.5%(11/40) respectively. No expressions of GalNAcT mRNA and CK19 mRNA were found in the bone marrow of the 10 patients with benign diseases and the 5 healthy volunteers. The GalNAcT and CK19 mRNA expressions were correlated with TNM stages. There was no significant difference between the micrometastasis and other clinical parameters. **Conclusions** The GalNAcT and CK19 mRNA expressions may be potential tumor markers for the detection of micrometastasis in the bone marrow of patients with breast cancer.

[Key words] breast neoplasms; bone marrow micrometastases; $\beta 1, 4$ -N-acetylgalactosaminyl-transferase; cytokeratin; reverse transcriptase polymerase chain reaction

乳腺癌是否发生转移是影响预后的重要因素, 而骨髓是乳腺癌远处转移最常见的部位之一^[1]。因此, 监测骨髓微转移对判断预后和指导治疗十分重要。本研究利用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术, 检测 40 例乳腺癌患者骨髓中 $\beta 1, 4$ -N-乙酰半乳糖胺转移酶(GalNAcT)mRNA 和细胞角蛋白-19(CK19)mRNA 的表达, 分析其与常见的临床病理学特征的关系, 并探讨其临床意义。

1 材料与方法

1.1 标本来源 40 例乳腺癌标本均为我科 2003 年 8 月~2004 年 6 月的初治患者, 有明确的病理组

织学诊断, 其中临床分期(UICC 恶性肿瘤 TNM 分类, 第 5 版, 1997): I 期 15 例, II 期 14 例, III 期 6 例, IV 期 5 例。另选 10 例良性血液系统疾病(缺铁性贫血 7 例, 特发性血小板减少性紫癜 3 例)和 5 名正常人骨髓作为对照组。以乳腺癌细胞株 MCF-7 为阳性对照(购自中科院上海细胞库)。

1.2 标本的采集和处理 对所有乳腺癌患者于化疗前取髂前或髂后为穿刺点, 取骨髓 5 ml, 加入肝素抗凝, 淋巴细胞分离液进行有核细胞的分离, 加入 Trizol 试剂 1 ml 于 -80°C 保存。

1.3 主要仪器和试剂 TGradient 型梯度 PCR 仪(Biometra 公司), GIS1000 型数字凝胶成像系统(上海天能公司)等。逆转录试剂盒和 PCR 试剂盒均购自上海 Sangon 公司, Trizol 细胞裂解液(GIBICO 公司), 淋巴细胞分离液(上海恒信化学试剂有限公司)。

1.4 引物 引物由上海 Sangon 公司合成。GalNAcT、CK19 根据 Genbank 提供的基因序列设

[收稿日期] 2005-04-20

[基金项目] 安徽省卫生厅科学研究资助项目(2002A038)

[作者单位] 蚌埠医学院附属医院 肿瘤内科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 余明金(1973-), 男, 安徽舒城人, 硕士, 住院医师(现工作于武警安徽总队医院 肿瘤内科, 安徽 合肥 230000)。

计,目的片段为 111 bp 和 221 bp。另设计看家基因 beta-actin 作为内参照。GalNAcT 引物序列: P1 5'-CCA ACT CAA CAG GCA ACT AC-3', P2 5'-GAT CAT AAC GGA GGA AGG TC-3' (230 bp), P3 5'-AGC CGA AGC TAC CAG ACC A-3', P4 5'-TGG GTA CAG CCG AGG GTT-3' (111 bp)。CK19 引物序列: P1 5'-AGG TGG ATT CCG CTC CGG GCA-3', P2 5'-ATC TTC CTG TCC CTC GAG CA-3' (461 bp), P3 5'-GAC ATG CGA AGC CAA TAT GAG G-3', P4 5'-AGT GTG TCT TCC AAG GCA GC-3' (221 bp)。beta-actin 引物序列: P1 5'-TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT-3', P2 5'-GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT-3' (315 bp)。

1.5 RT-PCR 检测方法

1.5.1 RNA 提取 取保存的骨髓加入 1 ml Trizol, 在室温下放 5 min, 再加入 0.2 ml 氯仿, 室温振荡 15 s, 静置 2~3 min, 在 2~8℃ 下 12 000 r/min 离心 15 min, 取上层无色液相加入异丙醇 0.5 ml, 室温下放置 10 min, 在 2~8℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入 75% 乙醇 1 ml, 混匀后在 2~8℃ 下 7 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用无 RNase 水溶解并混匀, 55~60℃ 10 min 使其充分溶解。在分光光度计上检测 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值以验证 RNA 的纯度。

1.5.2 逆转录 建立逆转录体系, 10× 逆转录缓冲液 4 μl, 10 mmol/L dNTPs 2 μl, RNasin 1 μl (20 u/μl), AMV 逆转录酶 1 μl (20 u), Oligo(dT)₆ 1 μl, 样本 RNA 4 μl (2 μg), 用补 DEPC 处理过的水至体积 20 μl。

1.5.3 PCR 反应 取 5 μl 逆转录产物加入外引物反应体系 (50 μl): 双蒸水 24 μl, 10× 缓冲液 5 μl, dNTPs (2 mmol/L) 5 μl, MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μl, 外引物 (5 μmol/L) 各 2 μl, Taq 酶 4 μl (0.5 u/μl); GalNAcT 反应条件为变性 95℃ 2 min 预变性后, 94℃ 10 min, 65℃ 5 min, 72℃ 1 min, 循环 30 次, 72℃ 终止延伸 10 min。建立内引物反应体系 (25 μl): 双蒸水 12 μl, 10× 缓冲液 2.5 μl, dNTPs (2 mmol/L) 3 μl, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μl, 外引物 (5 μmol/L) 各 1 μl, 第一次 PCR 产物 3 μl 和 Taq 酶 2 μl (0.5 u/μl); GalNAcT 反应条件为 95℃ 2 min 预变性后, 94℃ 6 min, 65℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环 30 次, 72℃ 终止延伸 7 min。CK19 外内引物反应体系相同, 外内引物反应条件分别为 95℃ 2 min 预变性后, 94℃ 1 min, 57℃ 5 min, 72℃ 1 min, 以及 95℃ 2 min 预变性后, 94℃ 1 min, 57℃ 1 min, 72℃ 1 min, 均循环 30 次, 72℃ 终止延伸 7 min。

1.5.4 PCR 产物分析 取 10 μl 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 EB 0.5 μg/ml) 上电泳, 紫外线灯下观察结果, 并在 GIS 凝胶图像处理系统 (上海天能公司) 中拍摄记录。

1.6 统计学方法 采用 χ^2 检验和秩和检验。

2 结果

2.1 总 RNA 鉴定实验中所抽提的总 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8~2.0, 说明 RNA 提取物纯度较高, 完全可以满足 RT-PCR 需要。1% 甲醛变性琼脂糖 (含 EB 0.5 μg/ml) 电泳可见 28 s、18 s 两条亮带 (见图 1), 说明 RNA 无降解。

2.2 RT-PCR 检测结果 (1) GalNAcT mRNA 及 CK19 mRNA 在乳腺癌患者骨髓中的表达: 40 例中有 17 例骨髓中表达 GalNAcT mRNA 阳性, 阳性率 42.5%; 有 11 例 CK19 mRNA 阳性, 阳性率 27.5%; 其中 17 例 GalNAcT mRNA 阳性患者中有 8 例 CK19 mRNA 阳性, 23 例 GalNAcT 阴性患者中, CK19 mRNA 3 例阳性, GalNAcT、CK19 mRNA 任一阳性和两项均阳性 20 例。10 例血液系统良性疾病和 5 名健康人骨髓 GalNAcT mRNA 和 CK19 mRNA 表达均为阴性。两者在乳腺癌患者的表达与对照组 (包括血液系统良性疾病和健康人) 之间的差异有显著性 ($P < 0.05$)。RT-PCR 电泳结果见图 2。(2) 乳腺癌患者临床病理学特征与骨髓中 GalNAcT 及 CK19 的 mRNA 表达的关系: GalNAcT mRNA、CK19 mRNA 的表达与乳腺癌患者的 TNM 分期之间有明显相关性 ($P < 0.05$), 提示检测乳腺癌患者骨髓有助于肿瘤的分期和治疗方案的选择。而与患者的年龄、肿瘤大小、腋窝淋巴结状态、病理类型以及激素状况等均无明显关系 ($P > 0.05$) (见表 1)。



图 1 RNA 琼脂糖电泳, 清晰显示 28s、18s 两条带

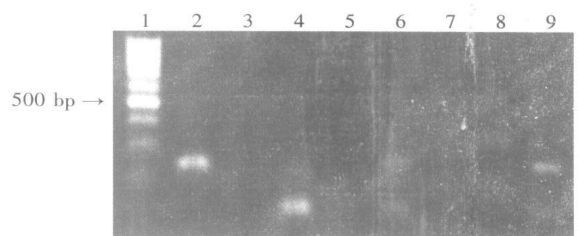


图 2 乳腺癌患者骨髓 GalNAcT mRNA、CK19 mRNA 检测结果 [1 为 DNA marker, 2、3 分别为 CK19 (221 bp) 和 GalNAcT (111 bp) 阳性表达, 4 为阴性对照, 5 为空白对照, 6 为双阳性患者, 7 为阴性表达, 8 为 β -actin (315 bp), 9 为乳腺癌细胞株 MCF-7 阳性对照]

表1 乳腺癌临床病理学特征与骨髓 GalNAcT mRNA、CK19 mRNA 的检测结果的关系

临床病理指标	n	GalNAcT mRNA		χ^2	P	CK19 mRNA		χ^2	P
		阳性	阴性			阳性	阴性		
年龄(岁)									
≤40	22	9	13	0.05	>0.05	7	15	0.10	>0.05
>40	18	8	10			4	14		
肿瘤大小(cm)									
≤2	8	2	6	2.23	>0.05	1	7	4.40	>0.05
>2~≤5	20	8	12			4	16		
>5	12	7	5			6	6		
淋巴结转移									
有	23	11	12	0.63	>0.05	7	16	0.02	>0.05
无	17	6	11			4	13		
TNM 分期									
I	4	1	3	8.58	* <0.05	0	4	11.03	≤0.05
II	13	2	11			1	12		
III	12	6	6			3	9		
IV	11	8	3			7	4		
病理类型									
浸润性导管癌	32	14	18	0.80	>0.05	9	23	1.50	>0.05
浸润性小叶癌	5	2	3			2	3		
单纯癌	2	1	1			0	2		
髓样癌	1	0	1			0	1		
ER									
阳性	23	8	15	1.32	>0.05	5	18	0.35	>0.05
阴性	17	9	8			6	11		
PR									
阳性	18	7	11	0.17	>0.05	4	14	0.10	>0.05
阴性	22	10	12			7	15		

*示 Hc

3 讨论

近年来,随着分子生物学技术的发展,RT-PCR 技术已用于检测乳腺癌骨髓微转移细胞中特异 mRNA 的表达,此方法灵敏度高,特异性强^[2]。但由于目前乳腺癌缺乏可供检测的特异性分子标志物,而组织特异性标志物常有假阳性。因此,筛选特异性高的乳腺癌标志物是提高乳腺癌微转移检测特异性和可靠性的关键。

神经节苷脂(ganglioside, Gg)是一类含唾液酸的鞘糖脂,在细胞分化、生长及恶性转化中有重要作用。GalNAcT 是 GM2/GD2 合成酶,它使 β 1,4-乙酰半乳糖胺转移酶转移到前体神经节苷脂 GM3/GD3,从而合成 GM2/GD2,它的表达水平与 GM2/GD2 表达正相关, β 1,4-N-乙酰半乳糖胺转移酶高表达于人神经外胚层来源肿瘤细胞,如神经母细胞瘤和恶性黑色素瘤等细胞株。在一些鼠黑色素瘤、淋巴瘤以及兔肝细胞瘤细胞株中也可见 GalNAcT 表达升高。最近发现在胃肠癌、前列腺癌、肝癌、胰腺癌、乳腺癌等恶性肿瘤组织中表达增加。Kuo 等^[3]

用 RT-PCR 方法研究了 GalNAcT 作为分子标志物识别恶性黑色素瘤患者外周血中肿瘤细胞,发现侵袭性和进展期的病人检测率高,健康人检测阴性。Bret 等^[4]研究表明, GalNAcT 作为乳腺癌外周血标志物具有很高的敏感性和特异性。目前国内尚未见以 GalNAcT 为靶基因检测乳腺癌患者骨髓微转移的报道。

细胞角蛋白(cytokeratin, CK)是细胞骨架系统中间丝组成成分之一,CK 广泛存在于上皮组织细胞中,而在间叶组织(如血液、骨髓、淋巴结等)中缺乏表达,因此它已成为上皮细胞和上皮性肿瘤细胞较为敏感和特异的标志物^[5,6]。国外文献报道,在正常骨髓 PCR 扩增时发现了 CK19 假基因的干扰^[7]。本研究参照 CK19 及其 2 条假基因的 cDNA 序列,根据 Neumaier 最大错配原则,设计 CK19 的引物,最大程度地避免目前已发现的假基因的干扰,是相对可靠的。

本实验结果显示,10 例血液系统良性疾病患者骨髓和 5 名健康志愿者外周血中 GalNAcT mRNA 和 CK19 mRNA 表达均为阴性,在乳腺癌骨髓中 GalNAcT mRNA 表达阳性率为 42.5%,CK19 mRNA 表达阳性率为 27.5%,两者的阳性表达与对照组比较差异均有显著性。表明 GalNAcT mRNA 和 CK19 mRNA 作为标志物,检测乳腺癌骨髓微转移具有较高的特异性,提示 GalNAcT mRNA 有可能作为检测乳腺癌微转移的新的肿瘤标志物。同时我们在实验中发现单一肿瘤标志物阳性率为 47.5% 和 27.5%,而检出 GalNAcT mRNA 和(或)CK19 mRNA 阳性率可达 50.0%,提示两者联合应用可提高检出率。

实验结果表明 GalNAcT、CK19 mRNA 的表达与乳腺癌患者的 TNM 分期差异有显著性,提示检测乳腺癌患者骨髓有助于肿瘤的分期和治疗方案的选择。另外发现 GalNAcT 和 CK19 在骨髓中的表达随着肿瘤的增大,阳性率增加,这表明随着肿瘤负荷的增大,转移的可能性随之增加,但无统计学意义,需要增加病例继续研究。

巢式 RT-PCR 的检测敏感性,有报道可达 $1 \cdot 10^{[7,8]}$ 。由于 RT-PCR 方法灵敏度高,如何避免污染造成假阳性至关重要,本研究在标本采集过程中,首先将抽取的骨髓常规送涂片检查,然后抽取的骨髓用于实验。实验用品均为一次性使用,操作过程戴帽子、口罩,以最大限度保证实验的可靠性。

多数学者研究认为,骨髓微转移与不良预后有关,是一个独立的预后因素。但也有学者认为无论

(下转 495 页)

是临床医师对患者活动限制的主观解释,不是患者自己的主观反应。NYHA 分级仅仅评价了一般的的心脏功能,而不能对患者的其他相关生活质量作出评价。因而更应当重视对心衰患者的生活质量的研究,使临床医师在评价患者一般心脏功能的同时也了解患者的主观感受,以便于更全面的了解患者的情况,有利于患者的康复和预后。

本研究还发现 CHF 患者的生活质量与 EF 值无相关性,与文献报道的结果一致^[5,7],其可能原因:(1)收缩功能并不能反映舒张功能,而有些活动受限可能是舒张功能不全所致;(2)右心室在维持活动能力上可能也起着重要的作用;(3)心脏功能以外的因素如骨骼肌的血流和肺功能受影响,从而导致活动受限;(4)神经内分泌活性也可能影响了活动时的血液动力学,进而影响了活动能力^[8,9]。另有文献报道心理调节是决定患者的生活质量的主要因素,慢性疾病的日常生活的障碍可引起长期的压力应激,最终导致抑郁及生活质量的降低^[2]。CHF 降低了患者的生活质量,如活动受限、性功能障碍等,其也为心理障碍的高危因素^[10],故可认为是一种应激源影响患者的心理健康状况,引发抑郁、焦虑等心理障碍问题。患者的心理障碍又通过生理功能的下降和身体症状等影响患者的生活质量。

[参 考 文 献]

- [1] Davis RC, Hobbs FDR, Lip GYH. ABC of heart failure. History and epidemiology [J]. *BMJ*, 2000, 320(7 226): 39~42.
- [2] Juenger J, Schellberg D, Kraemer S, et al. Health related quality

of life in patients with congestive heart failure [J]. *Heart*, 2002, 87(3): 235~241.

- [3] 戴闰柱. 慢性收缩性心力衰竭治疗建议 [J]. *中华心血管病杂志*, 2002, 30(1): 7~23.
- [4] Bennett SJ, Pressler ML, Hays L, et al. Psychosocial variables and hospitalization in persons with chronic heart failure [J]. *Prog Cardiovasc Nurs*, 1997, 12(4): 4~11.
- [5] Smith RF, Johnson G, Ziesche S, et al. Functional capacity in heart failure. Comparison of methods for assessment and their relation to other indexes of heart failure. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group [J]. *Circulation*, 1993, 87(6 Suppl): VI 88~VI 93.
- [6] Alla F, Briancon S, Guillemin F, et al. Self-rating of quality of life provides additional prognostic information in heart failure. Insights into the EPICAL study [J]. *Eur J Heart Fail*, 2002, 4(3): 337~343.
- [7] Gorkin L, Norvell NK, Rosen RC, et al. Assessment of quality of life as observed from the baseline data of the studies of left ventricular dysfunction (SOLVD) trial quality-of-life substudy [J]. *Am J Cardiol*, 1993, 71(12): 1 069~1 073.
- [8] Paul S, Sneed N. Patient perceptions of quality of life and treatment in an outpatient congestive heart failure clinic [J]. *Congest Heart Fail*, 2002, 8(2): 74~79.
- [9] Francis GS, Benedict C, Johnstone DE, et al. Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure [J]. *Circulation*, 1990, 82(5): 1 724~1 729.
- [10] Talbot F, Nouwen A, Gingras J, et al. Relations of diabetes intrusiveness and personal control to symptoms of depression among adults with diabetes [J]. *Health Psychol*, 1999, 18(5): 537~542.

(上接 492 页)

是淋巴结还是骨髓,均为正常或肿瘤性上皮细胞的清理部位,阳性信号可能仅代表免疫系统清除和过滤循环中肿瘤细胞的一种功能反应^[9]。我们认为,乳腺癌骨髓微转移的检测不仅可以正确划分肿瘤的临床分期,判断预后,而且对于监测化疗疗效具有重要的临床意义。RT-PCR 方法是目前检测骨髓微转移灵敏、特异手段之一,阳性结果至少提示具有形成转移的倾向。由于病例数较少,有待于临床进一步研究和随访。

[参 考 文 献]

- [1] Cote RJ, Rosen PP, Hakes TB, et al. Monoclonal antibodies detect occult breast carcinoma metastases in the bone marrow of patients with early stage disease [J]. *Am J Surg Pathol*, 1988, 12(5): 333~340.
- [2] Schoenfeld A, Kruger KH, Gomm J, et al. The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19 [J]. *Eur J Cancer*, 1997, 33(6): 854~861.
- [3] Kuo CT, Bostick PJ, Irie RF, et al. Assessment of messenger

RNA of $\beta 1$, 4-N-acetylgalactosaminyltransferase as a molecular marker for metastatic melanoma [J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(2): 411~418.

- [4] Taback B, Chan AD, Kuo CT, et al. Detection of occult metastatic breast cancer cells in blood by a multimolecular marker assay: Correlation with clinical stage of disease [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(24): 8 845~8 850.
- [5] Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer [J]. *Chest*, 1997, 111(6): 1 710~1 717.
- [6] 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): 4 033~4 036.
- [7] Ruud P, Fodstad O, Hovig E, et al. Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells [J]. *Int J Cancer*, 1999, 80(1): 119~125.
- [8] Racila E, Euhus D, Weiss AJ, et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(8): 4 589~4 594.
- [9] Raj GV, Moreno JG, Gomella LG. Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors [J]. *Cancer*, 1998, 82(8): 1 419~1 442.