

文章编号:1005-6947(2007)01-0047-04

· 乳腺外科专题研究 ·

乳腺癌患者 CK19mRNA 表达的意义及 辅助化疗对骨髓微转移的影响

张丽丽¹, 孙靖中², 顾禾¹, 时昌文¹, 曹莉莉¹

(1. 山东省千佛山医院 普通外科, 山东济南 250014; 2. 山东大学齐鲁医院 乳腺外科, 山东济南 250014)

摘要:目的 探讨乳腺癌患者外周血、淋巴结和骨髓的微转移情况,以及辅助化疗对骨髓微转移的影响。**方法** 采用 RT-PCR 技术同时检测可手术的 69 例乳腺癌患者的外周血、淋巴结和骨髓中 CK19mRNA 的表达,并观察辅助化疗对骨髓微转移的影响。**结果** 骨髓微转移 24 例(34.8%),外周血 CK19mRNA 阳性 11 例(15.9%)。淋巴结微转移阳性 40 例(58.0%),其中淋巴结病理学检查阳性的 35 例中,32 例(91.4%)淋巴结微转移阳性,在淋巴结病理学检查阴性的 34 例中,8 例(23.5%)淋巴结微转移阳性。淋巴结微转移阳性的 40 例中,18 例(45.0%)骨髓微转移阳性。24 例骨髓微转移阳性的患者在接受 6 个周期的 CAF 方案辅助化疗后,有 7 例骨髓微转移转阴(29.2%)。**结论** CK19mRNA 的表达可作为评价乳腺癌微转移的指标。外周血微转移的检测,其敏感性和特异性较骨髓差;骨髓微转移的检测可作为评价辅助化疗敏感性的指标之一。

[中国普通外科杂志,2007,16(1):47-50]

关键词: 乳腺肿瘤/病理学; 肿瘤转移; 骨髓; CK19mRNA; 逆转录聚合酶链反应; 预后; 辅助化疗
中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A

The significance of CK19mRNA expression in patients with breast cancer and the effect of adjuvant chemotherapy on bone marrow micrometastasis

ZHANG Li-li¹, SUN Jing-zhong², GU He¹, SHI Chang-wen¹, CAO Li-li¹

(1. Department of General Surgery, Shandong Qianfoshan Hospital, Jinan 250014, China; 2. Department of Breast Surgery, Jilu Hospital, Shandong University, Jinan 250014, China)

Abstract: Objective To study the micrometastasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow in patients with breast cancer and the effect of adjuvant chemotherapy on bone marrow micrometastasis. **Methods** RT-PCR technique was used to simultaneously detect the micrometastasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow in 69 patients with operable breast cancer, and the effect of adjuvant chemotherapy on bone marrow micrometastasis was also investigated. **Results** The positivity of bone marrow micrometastasis tested by RT-PCR in breast cancer patients was 34.8%. The circulating tumor cells were found in 11 patients (15.9%). Lymph node metastasis was positive in 35 cases, out of the 35 node-positive cases, 32 cases (91.4%) were lymph node micrometastasis, out of the 34 node-negative cases, eight cases (23.5%) were lymph node micrometastasis. Seven of 24 cases (29.2%) of bone marrow micrometastasis positive patients became negative after receiving six cycles of CAF adjuvant chemotherapy. **Conclusions** Detection of CK19mRNA by RT-PCR is a sensitive and specific method of assessing micrometastasis in patients with breast cancer. Compared with the detection of bone marrow micrometastasis, the technique to detect the micrometastasis in peripheral blood is less sensitive or specific. The detection of bone marrow micrometastasis is a sensitive index to assess the effect of adjuvant chemotherapy.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(1):47-50]

Key words: Breast Neoplasmas/Pathol; Neoplasm Metastasis, Bone Marrow; CK19mRNA; RT-PCR; Prognosis; Adjuvant Combined Chemotherapy

CLC number: R737.9 **Document code:** A

收稿日期:2006-03-05; 修订日期:2006-11-13。

作者简介:张丽丽,女,山东济南人,山东省千佛山医院普外中心乳腺外科副主任医师,主要从事乳腺癌的诊断及治疗方面的研究。

通讯作者:张丽丽 E-mail:zhanglili666@hotmail.com。

目前认为乳腺癌为一全身性疾病,尽管在诊断时未发现肉眼可见的转移,但在许多患者已经发生了微小转移,对这部分病例进行早期诊断、早期治疗,对提高乳腺癌患者的整体疗效具有重要意义。本研究采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术对69例可手术的原发性乳腺癌患者的外周血、淋巴结和骨髓中的CK19mRNA(微转移指标)进行了检测,并观察辅助化疗对骨髓微转移的影响,以评价化疗在乳腺癌治疗中的价值。

1 材料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 乳腺癌组 69例均为2003年12月~2004年8月就诊并明确诊断的可手术的乳腺癌女性患者。年龄25~71岁,中位年龄47.5岁。临床I期患者24例(34.8%),II期36例(52.2%),III期9例(13.0%)。26例患者腋窝可触及肿大淋巴结。每例术前常规检查血清钙、碱性磷酸酶、肝功能、腹部B超、胸部X线及全身同位素骨扫描,均未发现远处临床转移灶。全部患者均行乳腺癌根治性切除术,术后由病理科对肿瘤大小、性质及淋巴结状态行常规病理检查。病理类型主要为浸润性导管癌55例(79.7%),其他类型为髓样癌(无大量淋巴细胞浸润)6例(8.69%),浸润性小叶癌3例(4.35%),单纯癌3例(4.35%),乳头状癌2例(2.89%)。35例(50.7%)患者淋巴结病理检查阳性。

1.1.2 良性乳腺病组 20例。均为女性,年龄22~69岁,中位年龄44.6岁。乳腺增生16例,乳腺纤维腺瘤4例。

1.2 标本的采集

1.2.1 外周血 为避免静脉穿刺造成的上皮细胞污染,晨起留取第二管空腹血,约5mL。肝素抗凝,用Ficoll-Hypaque淋巴细胞分离液分离有核细胞,经洗涤后低温保存。

1.2.2 淋巴结 手术中取腋窝第一站淋巴结(尽量取近乳腺尾叶者),并由中间切成两半。一半送常规病理检查,另一半剪碎研磨用不锈钢网过滤后制成单细胞悬液,冻存于-70℃备提RNA。为避免相互污染,每次切开淋巴结之前,均用生理盐水冲洗刀片。

1.2.3 骨髓 乳腺癌组患者麻醉后手术前常规消毒,取胸骨角下方1cm处为穿刺点。将骨髓穿

刺针长度固定在1.5cm以内,稍微倾斜角度进针;待穿刺针固定后,用10mL注射器抽出骨髓标本5~10mL,肝素抗凝后,用生理盐水作1:1稀释,然后用淋巴细胞分离液常规分层;用吸管吸出单个核细胞层;用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后,加入Trizol试剂1mL于-70℃保存备用。骨髓检测阳性的患者在接受6个周期的辅助化疗(一般6个月)后,再抽取5mL骨髓按上述方法分离检测其单个核细胞。

1.3 实验方法

1.3.1 RT-PCR扩增(两步法) CK19mRNA引物序列如下:上游为5'-AGGTGGATTCCGCTCCGGGCA-3';下游为5'-ATCTTCCTGTCCCTCGAGCA-3';扩增产物片段长度为460bp。内参引物(β -actin):上游为5'-CGCTGTGTTGGCGTACAGGT-3';下游为5'-TCATCACCATTGGCAATGAG-3';扩增产物长度为154bp。逆转录和PCR扩增按常规进行。采用的PCR仪为Biometra T1型。

1.3.2 电泳 PCR产物15 μ L上样于2%琼脂糖凝胶(0.5 μ g/mL溴化乙锭),90V电泳,电泳缓冲液为1 \times TBE。紫外透析灯下对凝胶进行摄影。

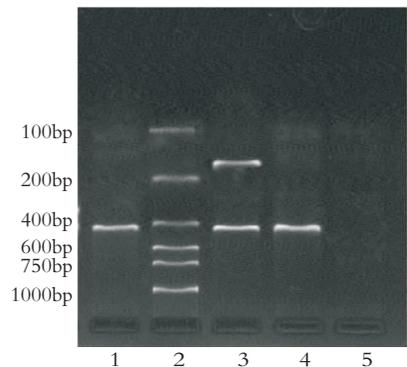
1.4 统计学处理

采用SPSS统计软件对数据进行卡方检验和四格表确切概率法检验。

2 结果

2.1 外周血和骨髓中CK19mRNA的表达

乳腺癌组患者骨髓CK19mRNA(微转移指标)阳性24例,占34.8%(附图)。外周血CK19mRNA阳性例数为11例,占15.9%,两者差异有统计学意义($P < 0.05$)。骨髓、外周血同时阳性者8例;骨髓阳性、外周血阴性13例,骨髓阴性、外周血阳性3例。



附图 RT-PCR分析骨髓微转移的结果 1,4:骨髓CK19mRNA阳性;2:Marker;3: β -actin与CK19mRNA阳性;5:阴性对照

2.2 淋巴结微转移情况

乳腺癌组在淋巴结病理学检查阳性的 35 例中,有 32 例(91.4%)淋巴结微转移阳性,而 34 例淋巴结病理学检查阴性者中 8 例(23.5%)骨髓微转移阳性。

2.3 骨髓微转移阳性者接受辅助化疗 6 个月后骨髓 CK19mRNA 的改变

骨髓 CK19mRNA 阳性的病例,术后给予环磷酰胺、阿霉素、5-氟尿嘧啶(CAF)方案化疗,4 周为 1 周期,6 个月后重新抽取骨髓,评价微转移情况。24 例原有骨髓微转移阳性的患者中,有 17 例仍为阳性,但有 7 例(29.2%)骨髓微转移转为阴性。随访 17~24 月,平均 18.6 个月,17 例阳性者中有 5 例(29.4%)发生远处转移,其中骨转移 4 例,肺转移 1 例;7 例转阴者均未发生远处转移,现存活良好。

3 讨论

近年来,由于分子生物学技术的发展和乳腺癌标志物的研究进展,使得乳腺癌患者的骨髓、外周血和淋巴结可以成为检测微转移的部位。采用 RT-PCR 技术检测 CK19mRNA 为乳腺癌患者微转移的指标。由于骨髓中含有较多的巨噬细胞容易捕获循环中的肿瘤细胞,故检测骨髓微转移较检测外周血中的肿瘤细胞更容易成功。外周血尽管取材方便,但容易受到静脉穿刺时上皮细胞的污染^[1],且缺乏骨髓特殊的解剖结构,因此就理论而言,循环血中肿瘤细胞检测的阳性率应低于骨髓,而且容易造成假阳性。本组病例中,骨髓微转移检测的阳性率为 34.8%,明显高于外周血中循环肿瘤细胞 15.9% 的阳性率($P < 0.05$)。骨髓阳性、外周血阴性的病例有 13 例。3 例患者骨髓微转移阴性而外周血 CK19mRNA 却阳性,可能是循环中存在着上皮细胞的缘故。故认为骨髓微转移的检测较外周血更为可靠。骨髓和外周血中肿瘤细胞的存在,为临床治疗和判断患者预后提供了参考指标。

对乳腺癌患者转移范围的评价是对腋窝淋巴结的病理组织学检查。乳腺癌患者是否有淋巴结转移是当前判断预后和制定治疗方案的主要参考指标。然而,单靠淋巴结转移来评估患者的预后有其局限性。有资料表明,约有 40% 腋窝淋巴结阳性的患者生存期在 10 年以上;与此相反,有 25%~30% 腋窝淋巴结阴性的患者却发生了全身转移^[2]。说明仅靠腋窝淋巴结的病理学检查势必影响相当数量患者的正确判断及治疗。

近年来,随着检测技术的不断进步,应用单克隆抗体免疫组化法和分子生物学方法检测腋窝淋巴结中播散的乳腺癌细胞,从而评价淋巴结的微转移状态,明显提高了检测的灵敏性和特异性^[3]。

本组原淋巴结病理学检查阳性的 35 例患者中,有 91.4% 淋巴结微转移阳性,而 34 例淋巴结病理学检查阴性者有 23.5% 淋巴结微转移阳性。对于病理学检查阴性而 RT-PCR 检测阳性的病例,临床上应引起高度重视。如仅凭病理学检查,势必遗漏部分已有淋巴结转移的病例。进一步采用敏感、特异的检测方法以正确评估癌细胞转移的范围和进行临床精确分期应是今后乳腺癌诊断的目标。这对于改善淋巴结阴性病例的预后具有重要意义。

作为乳腺癌综合治疗的一部分,化学治疗已在临床上广泛应用。Fisher 等^[4]报道在接受根治性乳房切除术的病例中,淋巴结累及患者的 10 年生存率只有 25%。造成此情况的原因是外科治疗时已有微转移存在。研究^[5]证明外科手术后加用全身化疗可减低远处转移的危险性和提高治愈的可能性。Cote 等^[6]报道在有微转移的病例中,估计的 2 年复发率为 33%;而无微转移者 2 年复发率只有 3%。因此在治疗过程中,及时检测骨髓微转移可能对乳腺癌患者的治疗起到指导作用。对确定具有早期复发、转移危险的高危人群,在其发展为临床转移之前,给予积极辅助治疗,可以降低患者的复发率和转移率^[7]。

本组对 24 例原来骨髓微转移阳性的患者进行了 CAF 方案辅助化疗,6 个月后 17 例仍然阳性,7 例(29.2%)转为阴性,表明化疗可清除乳腺癌患者的微转移,因此对淋巴结以及骨髓微转移进行评价是有意义的。定期监测骨髓微转移对患者的治疗有指导意义。

总之,RT-PCR 技术是评价乳腺癌患者微转移状态的一项灵敏、特异的方法;同时检测外周血、骨髓及淋巴结的微转移,对患者的微转移情况有可能全面了解。应用 RT-PCR 技术在淋巴结病理学检查阴性的病例中可能发现微转移阳性的病例;骨髓微转移的检测可作为评价辅助化疗是否敏感的一个指标,从而可正确地指导临床治疗和判断预后。

参考文献:

- [1] Aerts J, Wynendaele W, Paridaens R, et al. A real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect breast carcinoma cells in peripheral blood [J]. *Ann Oncol*, 2001, 12 (1): 39-46.
- [2] Wiedswang G, Naess AB, Naume B, et al. Micrometastasis to axillary lymph nodes and bone marrow in breast cancer patients [J]. *The Breast*, 2001, 10 (3): 237-242.
- [3] Varangot M, Barrios E, Sonora C, et al. Clinical evaluation of a panel of mRNA markers in the detection of disseminated tumor cells in patients with operable breast cancer [J]. *Oncol Rep*, 2005, 14 (2): 537-545.
- [4] Fisher B, Slack N, Katcher D, et al. Ten year follow-up results of patients with carcinoma of the breast in a co-operative clinical trial evaluating surgical adjuvant chemotherapy

- [J]. Surg Gynecol Obstet, 1975, 140 (4):528-534.
- [5] Levine MN, Whelan T. Adjuvant chemotherapy for breast cancer-30 years later [J]. N Engl J Med, 2006, 355 (18):1920-1922.
- [6] 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.
- [7] Schlimok G, Pantel K, Loibner H, et al. Reduction of metastatic carcinoma cells in bone marrow by intravenously administered monoclonal antibody: towards a novel surrogate test to monitor adjuvant therapies of solid tumors [J]. Eur J Cancer, 1995, 31A (11): 1799-1803.

文章编号:1005-6947(2007)01-0050-04

· 病案报告 ·

乳腺癌术后对侧转移性炎性乳腺癌 1 例

张东岩¹, 李刚², 白广生³

(黑龙江省大庆市第四医院 1. 普通外科 2. 病理科 3. 放射科, 黑龙江 大庆 163712)

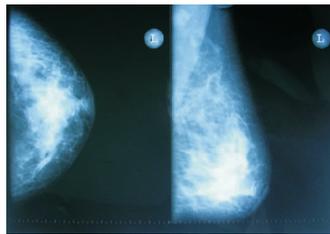
关键词: 乳腺肿瘤; 肿瘤转移; 乳腺癌, 炎性/继发性; 病例报告

中图分类号: R737.9

文献标识码: D

患者 女, 42岁。2年前在外院行右侧乳腺癌简化根治术, 术后病理为浸润性导管癌, ER(-), PR(-), 行CAF方案化疗4次。2个月前发现左侧乳腺由内侧开始出现红肿, 并逐渐遍布整个左乳, 有疼痛感, 不伴乳头溢液。体查: 体温36.6°C。右胸壁见纵形长22cm切口瘢痕, 未触及异常包块; 右腋下触及肿大融合淋巴结, 活动度差。左侧乳腺明显增大, 呈弥漫性、紫红色伴水肿, 未见乳头破溃及溢液; 扪诊乳腺坚实、皮温高、有触痛。左腋下触及一活动度差、质硬淋巴结, 2cm大小, 左右锁骨上各触及一活动度差、较固定、质硬淋巴结, 1cm大小。白细胞 $9.3 \times 10^9/L$ 、血红蛋白: 122g/L、胸片: 双肺及膈未见异常。B超: 肝、胆、脾及子宫、附件未见异常改变。左乳腺钼靶片示(附图): 皮肤厚度增加, 皮下“网格样”改变, 乳腺组织密度增加。诊断: (1) 右侧乳腺癌简化根治术后。(2) 双侧锁骨上、右腋

下淋巴结转移癌。(3) 左侧炎性乳腺癌? 为进一步明确诊断, 切取左乳腺皮肤组织一块病检, 镜下见皮肤的真皮浅层毛细血管扩张充血, 皮下淋巴管及血管内有成簇癌栓堵塞, 病理诊断: 左侧浸润性乳腺癌。ER(-), PR(-), C-erbB-2(+++)



附图 左乳腺钼靶照片

讨论: 炎性乳腺癌因生长速度及外观与乳腺急性炎症相似而得名。炎性乳腺癌发病率占全部乳腺癌的1%~4%, 平均发病年龄为52岁, 有报道多见于左侧乳腺。约61%的患者具有典型的临床表现和病理所见, 即可触及的浸润性肿块, 皮肤红肿超过整个乳腺的1/3, 外观呈桔皮样改变, 乳头炎症反应, 腋下可触及肿大淋巴结。病理组织学研究认为, 这种乳腺癌的继发性炎症病变是由于癌细胞浸润到真皮下淋巴管, 引发淋巴管阻塞和继发炎症。病理组织类型无特殊性。

两侧胸壁皮肤间有广泛的微细淋巴管形成的淋巴网, 一侧乳腺癌可以

沿皮肤表浅淋巴网转移至对侧乳腺和对侧腋窝, 故一侧乳腺癌术后可以出现对侧的乳腺转移癌。临床资料报道多见的是双侧原发性乳腺癌, 而一侧乳腺癌术后对侧乳房转移癌临床少见。临床上鉴别是原发还是转移是很困难的。

阙秀报道25例双侧乳腺癌, 病理研究证实转移癌2例, FuKam报道104例, 其中仅10例转移。临床上区分第二侧癌是原发还是转移, Robbing和Berg在1964年提出4条鉴别诊断, Leis和阙秀(1)等后来加以补充, 即根据病理类型、细胞核分化程度、病灶部位附近组织的改变及临床表现来进行鉴别。若两侧乳腺癌病理类型不同, 或一侧为侵袭性而另一侧为非侵袭性时, 均可认为双侧均为原发癌。

而黄焰等认为, 第二侧癌出现下列情况应考虑乳腺癌术后对侧乳房转移性癌: (1) 病理类型与原发癌一致。(2) 病理显示脂肪结缔组织、皮肤浸润为主。(3) 第二侧癌生长快, 肿瘤大, 位于乳房中部或内侧。(4) 同时伴有第一侧癌复发或远处转移。(5) 除外其他部位恶性肿瘤的乳房转移。

故根据上述观点, 结合本病例最后可以诊断为左侧转移性炎性乳腺癌。

收稿日期: 2006-12-15。

作者简介: 张东岩, 男, 黑龙江大庆人, 黑龙江省大庆市第四医院普外科, 主要从事胃肠及乳腺肿瘤方面的研究。

通讯作者: 张东岩 E-mail: 211ZDY@