

文章编号:1005-6947(2008)05-0449-05

· 乳腺外科专题研究 ·

乳腺癌患者外周血 EMA 和 EGP-2 mRNA 的表达及其临床意义

臧益秀¹, 孙善平¹, 王晓¹, 陈连胜¹, 田斌¹, 李均²

(山东大学附属济南市中心医院 1. 普通外科 2. 肿瘤科, 山东 济南 250013)

摘要:目的 探讨上皮膜抗原(EMA)和表皮糖蛋白基因(EGP-2)在乳腺癌患者外周血中的表达及其与肿瘤微转移的关系。方法 采用 RT-PCR 方法检测 53 例乳腺癌患者(乳癌组)和 24 例乳腺良性疾病患者(良性病组)EMA 和 EGP-2 mRNA 在外周血中的表达,并分析其与临床指标之间的关系。结果 乳癌组外周血 EMA 和 EGP-2 mRNA 的表达率分别为 33.96% 和 28.30%,而在良性病组外周血表达率分别为 0 和 4.17%,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。EMA 和 EGP-2 mRNA 的检出率与腋窝淋巴结转移、TNM 分期等临床参数呈正相关;EMA 和 EGP-2 mRNA 联合检测敏感度和准确性在乳腺癌组分别为 52.83% 和 66.23%,相对于 EGP-2 mRNA 单项检测敏感度及准确性有明显升高,但与 EMA mRNA 无统计学差异。结论 EMA 和 EGP-2 联合检测时准确性明显升高,故两者可作为标志物检测乳腺癌患者外周血微转移,有可能对乳腺癌的疗效和预后判断有意义。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(5): 449-453]

关键词: 乳腺肿瘤; EMA/血液; EGP-2/血液; 逆转录聚合酶链式反应

中图分类号: R 737.9

文献标识码: A

Expression of EMA and EGP-2 mRNA in peripheral blood of patients with breast carcinoma and its clinical significance

ZANG Yixiu¹, SUN Shanping¹, WANG Xiao¹, CHEN Liansheng¹, TIAN Bin¹, LI Jun²

(1. Department of General Surgery 2. Department of Oncology, Affiliated Jinan Central Hospital, Shandong University, Jinan 250013, China)

Abstract: **Objective** To explore the correlation between the expression of EMA and EGP-2 mRNA with tumor micrometastases in peripheral blood of breast cancer (BC). **Methods** EMA and EGP-2 mRNA were detected by RT-PCR in 53 patients with breast carcinoma, and 24 patients with benign breast lesions. The relationship between EMA and EGP-2 mRNA expression and clinical indexes was analyzed. **Results** The positive rate of EMA and EGP-2 mRNA expression in the cancer group was 33.96% and 28.30% respectively, and no case of positive EMA mRNA expression and only one case of EGP-2 mRNA expression was found in peripheral blood in 24 patients with breast benign lesions (all $P < 0.05$). A significant correlation was found between expressions of EMA and EGP-2 mRNA with axillary lymph node metastasis and TNM stage in BC group. The sensitivity and accuracy rate of combined detection of EMA and EGP-2 mRNA was 52.83% and 66.23% respectively and was much higher than that of EGP-2 mRNA detection. **Conclusions** Combined detection of EMA and EGP-2 obviously can improve the accuracy rate in BC. Both of them can be used as tumor markers to detect micrometastases of breast cancer. This may have an impact upon therapeutic recommendations and prognostic judgment in breast cancer patients.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(5): 449-453]

Key words: Breast Neoplasms; EMA/blood; EGP-2/blood; RT-PCR

CLC number: R 737.9

Document code: A

基金项目: 济南市卫生局科技计划立项项目(2005-16)。

收稿日期: 2007-12-12; 修订日期: 2008-04-05。

作者简介: 臧益秀, 女, 山东大学附属济南市中心医院教授, 主要从事乳腺肿瘤诊治方面的研究。

通讯作者: 臧益秀 E-mail: 350080879@qq.com

肿瘤细胞在外周血中的微转移是肿瘤转移复发的重要起始步骤之一。研究表明,多种肿瘤细胞在肿瘤发生早期即开始脱落进入血液循环;外周血中存在肿瘤细胞亦预示肿瘤具有较高的转移倾向。因此寻找敏感的检测方法和指标检测外周血中肿瘤细胞转移是目前研究热点。EMA (Epithelial Membrane Antigen) 和 EGP-2 (Epithelial Glycoprotein Gene) 是 2 种上皮源性肿瘤标志物,笔者应用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 的方法检测乳腺癌和乳腺良性疾病患者外周血 EMA 和 EGP-2 mRNA 的表达,探讨其与微转移间的关系。

1 资料与方法

1.1 病例分组及临床一般资料

1.1.1 乳腺癌组 53 例,为本院 2006 年 7 月—2007 年 9 月手术治疗患者,所有患者按美国癌症联合委员会 (AJCC) 乳腺癌进行 TNM 分期,其中 I 期 20 例,II 期 16 例,III 期 12 例,IV 期 5 例。组织学类型:浸润性导管癌 45 例,浸润性小叶癌 5 例,鳞状细胞癌 1 例,髓样癌 1 例,黏液癌 1 例。腋窝淋巴结转移 32 例,无转移 21 例。患者均为女性,年龄 31~72 岁,中位年龄 47 岁。

1.1.2 乳腺良性疾病组 24 例中乳腺增生症 12 例,乳腺纤维腺瘤 8 例,导管内乳头状瘤 3 例,浆细胞性乳腺炎 1 例。患者均为女性,年龄 17~52 岁,中位年龄 34 岁。

上述 77 例乳腺疾病患者均经术后病理证实,排除患其他肿瘤的可能性。全组患者均了解本研究目的,并签署知情同意书。手术前采取静脉血。采血前均未接受化学治疗和放射治疗。

1.2 试剂和引物设计

1.2.1 主要试剂及仪器 Trizol 试剂和 RT-PCR 试剂盒购自 Invitrogen 公司;另备置离心机,PCR 扩增仪,超低温冰箱,电泳仪,凝胶成像系统。

1.2.2 特异性引物 参照相关文献及 NCBI 检索信息,由上海生物工程公司人工合成。引物序列见表 1。

表 1 相关引物的核苷酸序列及扩增片段长度

引物名称	序列	产物长度(bp)
EMA	正向: 5'-GTACCTCCTCTCACCTCTCCAA-3'	286
	反向: 5'-CGTCCTGGACATTGATGGTACC-3'	
EGP-2	正向: 5'-GAACAATGATGGGCTTTATG-3'	513
	反向: 5'-TGAGAATTCAGGTGCTTTTT-3'	
β-actin	正向: 5'-ATCTGGCACCACCTGTGACAATGAGCTG-3'	838
	反向: 5'-CGTCATACTCTGCTTGTGATCCACATCT-3'	

1.3 实验方法

1.3.1 样本采集 两组患者均采外周血各 5.0 mL,以枸橼酸钠抗凝。为避免因针头在穿刺中沾染上皮细胞而导致假阳性结果,在抽取样本血前弃血 1 mL。所有抗凝管、注射器、Tip 头、1.5 mL 离心管及 0.2 mL PCR 薄壁管均经焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水处理,去除 RNA 酶。用淋巴细胞分离液进行有核细胞的分离,再加入 Trizol 试剂后置 -80℃ 冰箱保存备用。

1.3.2 RNA 提取 在标本血的单个核细胞中加入 Trizol 1 mL,室温放置 5 min;加入 0.2 mL 氯仿,室温震荡 15 s,放置 5 min,4℃ 下 12 000 r/min 离心 15 min,吸取上清无色液相至另一管中,加入 0.5 mL 异丙醇,室温下放置 30 min,4℃ 10 000 r/min 离心。弃上清液,加入 75% 乙醇 1 mL,振荡器混匀,4℃ 下 7 500 r/min;离心 5 min,弃上清液,半干时用无 Rnase 水溶解,吸头冲吸混匀,置 55~60℃ 10 min 使其充分溶解。在分光光度计上检测 A260/A280 的值,计算所提总 RNA 的含量。

1.3.3 RT-PCR 检测

1.3.3.1 逆转录反应体系 RT 的反应体积为 20 μL,10 缓冲液 2 μL,10 mmol/L dNTPs 2 μL,Rnasin 抑制剂 0.5 μL (20 U),AMV 逆转录酶 1 μL (5 U),25 mmol/L MgCl₂ 4 μL,Oligo d(T)₁₅ 1 μL,样本 RNA 3 μL (2 μg),补 DEPC 处理过的水至体积 20 μL。快速离心混匀,37℃ 60 min,95℃ 10 min 灭活 AMV 酶。

1.3.3.2 PCR 反应体系 逆转录产物 2.0 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μL,10 × 缓冲液 2.5 μL,Taq DNA 酶 0.3 μL (5 U),dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL,各 8.0 pmol 的上、下游引物,补 DEPC 处理过的水至体积 25 μL。3 对引物分别进行 PCR 反应。循环参数如下。EMA:预变性 95℃ 5 min 后变性 95℃,30 s,退火 60℃,30 s;延伸 72℃,20 s;共 35 个循环,72℃ 4 min 延伸。EGP-2:预变性 94℃ 10 min 后变性 95℃ 30 s,退火 56℃ 25 s,延伸 72℃ 35 s;35 个循环,72℃ 4 min 延伸。β-actin:预变性 94℃ 5 min 后变性 94℃,45 s,退火 55℃ 30 s,延伸 72℃ 60 s;25 个循环,72℃ 7 min 延伸。不含 mRNA 的样本作为 RT-PCR 的阴性对照。

1.3.4 PCR 产物测定 PCR 产物 9 μL 上样于 2% 琼脂糖凝胶 (0.5 μg/mL 溴化乙锭),5 V/cm 电泳,电泳缓冲液 1 TBE。紫外透析灯下对凝胶进行摄影并保存图像。在 DNA Marker 的指示下,

凝胶上 286 bp 处条带为 EMA,513 bp 处条带为 EGP-2,838 bp 处条带为 β -actin(图1)。

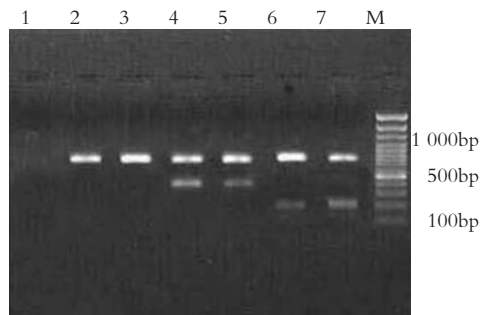


图1 RT-PCR 产物在琼脂糖凝胶电泳中的结果 1:阴性对照;2,3:内参照阳性,4,5:EGP-2 mRNA 阳性;6,7:EMA mRNA 阳性;M: Marker

1.4 统计学处理

采用 χ^2 检验 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有统计均由 SPSS10.0 软件完成。

2 结果

2.1 EMA 和 EGP-2 mRNA 在两组患者外周血中的表达

乳腺癌组两指标的值均显著高于良性病组,差异有统计学意义($P < 0.05$)(表2)。

2.2 EMA 及 EGP-2 mRNA 的表达与临床病理学指标之间的关系

EMA 及 EGP-2 mRNA 表达与腋窝淋巴结转移、TNM 分期有关,淋巴结转移阳性组的表达阳性率高于阴性组;III + IV 期 EMA 及 EGP-2 mRNA 的表达阳性率高于 I + II 期,差异有统计学意义。其他因素的分组间差异无统计学意义(表3)。

表2 两组外周血 EMA 和 EGP-2mRNA 的表达

检测指标	组别	(n)	阳性	阴性	阳性率(%)	P 值
EMA mRNA	乳腺癌组	53	18	35	33.96	<0.05
	良性病组	24	0	24	0	
EGP-2 mRNA	乳腺癌组	53	15	38	28.30	<0.05
	良性病组	24	1	23	4.17	

表3 血清 EMA 和 EGP-2mRNA 与临床病理指标的关系

临床参数	例数	EMA mRNA (阳性) (%)	P 值	EGP-2 mRNA (阳性) (%)	P 值
年龄(岁)					
≤50	36	13(36.11)	0.6307	10(27.78)	0.9019
>50	17	5(29.41)		5(29.41)	
绝经					
是	14	4(28.57)	0.6195	4(28.57)	0.9792
否	39	14(35.90)		11(28.21)	
ER(雌激素受体)					
阳性	26	8(30.77)	0.7350	8(30.77)	0.6956
阴性	27	10(37.03)		7(25.93)	
PR(孕激素受体)					
阳性	27	9(33.33)	0.9215	7(25.93)	0.6956
阴性	26	9(34.62)		8(30.77)	
肿瘤直径(cm)					
≤3	42	14(33.33)	0.8502	11(26.19)	0.5049
>3	11	4(36.36)		4(36.36)	
腋窝淋巴结					
阳性	32	15(46.88)	0.0143	13(40.63)	0.0140
阴性	21	3(14.29)		2(9.52)	
TNM 分期					
I + II	36	9(25.00)	0.0450	7(19.44)	0.0372
I	20	4(20.00)		3(15.00)	
II	16	5(31.25)		4(25.00)	
III + IV	17	9(52.94)		8(47.06)	
III	12	6(50.00)		5(38.46)	
IV	5	3(60.00)		3(60.00)	

2.3 EMA 及 EGP-2 mRNA 单项与联合检测的比较

乳腺癌组中 EMA 及 EGP-2 mRNA 联合检测的敏感度(阳性率)、特异性和准确性与单项相比,其敏感度和准确性均明显升高(表4)。

表4 EMA 和 EGP-2 mRNA 单项与联合检测的比较

检测项目	敏感度(%)	特异性(%)	准确性(%)
EMA mRNA	33.96(18/53)	100(24/24)	54.55(42/77)
EGP-2 mRNA	28.30(15/53) ¹⁾	95.83(23/24)	42.86(38/77) ¹⁾
EMAmRNA + EGP-2 mRNA	52.83(28/53)	95.83(23/24)	66.23(51/77)

注:1)与联合检测比较, $P < 0.05$

3 讨论

肿瘤标志物是肿瘤组织产生并可以反映肿瘤细胞存在于宿主体内的化学分子。一种标志物可在多种肿瘤中表达,一种肿瘤也可表达多种标志物。为提高检出的敏感度和准确性,常需联合几种不同的标志物进行检测以提高对肿瘤的诊断价值。由于乳腺癌绝大多数发源于上皮组织,故上皮组织的某些特异性标志物可用于肿瘤转移的标记。

EMA 是一种高分子质量 I 型跨膜糖蛋白,具有大量可变数量的末端重复氨基酸序列及 0-糖基化位点,在正常腺细胞中表达率很低;但在癌组织中由于存在畸形糖基化和糖基化不完全,使其核心蛋白暴露出新的蛋白表位或新的糖抗原,从而成为上皮组织来源肿瘤特异的抗原之一^[1-2],可作为乳腺癌患者微转移肿瘤细胞的有效标志物。约有 90% 以上的乳腺癌组织有 EMA 的过度表达。EMA 的表达与肿瘤特征及临床预后密切相关并可作为独立的危险预测因子而用于评估无瘤生存期(RFS)和完全生存期(OS)^[3]。

EGP-2 是上皮细胞的标志基因之一,它广泛表达于上皮来源的组织中。在恶性增生的上皮来源性肿瘤中,其表达强度远远超过正常组织的水平。Philip 等^[4]对 3 912 份各种人类肿瘤组织样本运用多肿瘤组织微列免疫组织化学分析,发现在绝大部分的上皮来源性肿瘤组织中都有 EGP-2 的表达。97% 乳腺癌组织中可检测到 EGP-2,其在原发和转移癌组织中表达率较外周血中高 10 倍^[5],较正常组织高 100 ~ 1 000 倍^[6]。DeGraaf 等^[7]研究显示 4 种乳腺癌细胞系均有

EGP-2 的高表达,其表达下调可以降低肿瘤细胞的致癌潜能^[8];临床检测其表达水平可用于肿瘤免疫治疗^[9]。

本研究结果发现,乳癌组外周血 EMA mRNA 阳性(33.96%)和 EGP-2 mRNA 阳性率(28.30%)显著高于良性病组,表明乳腺癌外周血中存在着微转移的肿瘤细胞。本实验也表明 RT-PCR 对于检测 EMA 和 EGP-2 mRNA 的表达具有较高的特异性。

本组 I + II 期乳腺癌患者 EMA 和 EGP-2 mRNA 的阳性率分别为 25.00% 和 19.44%,提示实体瘤可能早期即存在肿瘤细胞的播散;III 期患者 EMA 和 EGP-2 mRNA 阳性率分别增加到 50.00% 和 38.46%,IV 期可达 60.00%,提示微转移与 TNM 分期有关,疾病分期越高,发生血行转移的几率越大。III + IV 期与 I + II 期 EMA mRNA 和 EGP-2 mRNA 表达差异有显著性意义(均 $P < 0.05$)。腋窝淋巴结阴性组 EMA mRNA 和 EGP-2 mRNA 的表达率分别为 14.29% (3/21) 和 9.52% (2/21),而阳性组表达率则为 46.88% (15/32) 和 40.63% (13/32),两组间差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。本研究还显示外周血 EMA 和 EGP-2 mRNA 表达阳性率与患者年龄、绝经状态、ER 和 PR 表达状态、肿瘤直径等临床指标无关($P > 0.05$)。

联合检测 EMA 和 EGP-2 mRNA, 52.83% (28/53) 的乳腺癌患者为阳性,明显高于单个标志物检测的仅 EMA mRNA 33.96% 和 EGP-2 mRNA 28.30% 的检出率。联合检测与单项检测相比,敏感度和准确性均明显提高。由于目前尚缺乏敏感度和特异性都比较理想的肿瘤标志物,故认为联合检测不失为解决这一问题的途径之一^[10]。

RT-PCR 技术检测外周血敏感度和特异性较高,对判断乳腺癌微转移具有一定的临床意义。尽管循环血中检出 EMA 和 EGP-2 mRNA 不能完全作为确诊远处转移的依据,但其对提示肿瘤的远处转移或存在潜伏病灶,以及治疗方案的制定和判断预后等方面均可提供重要的参考依据。

参考文献:

- [1] Yang E, Hu XF, Advances of MUC1 as a target for breast cancer immunotherapy [J]. *Histol Histopathol*, 2007, 22 (8):905 - 922.
- [2] Musselli C, Ragupathi G, Gilewski T, et al. Reevaluation of the cellular immune response in breast cancer patients vaccinated with MUC1 [J]. *Int J Cancer*, 2002, 97 (5):660 - 667.

- [3] de Roos MA, van der Vegt B, Peterse JL, *et al.* The expression pattern of MUC1 (EMA) is related to tumor characteristics and clinical outcome of invasive ductal breast carcinoma [J]. *Histopathology*, 2007, 5151(2):227-238.
- [4] Went PT, Lugli A, Meier S, *et al.* Frequent EPCAM protein expression in human carcinomas [J]. *Hum Pathol*, 2004, 35(1):122-128.
- [5] Rao CG, Chianese D, Doyle GV, *et al.* Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors [J]. *Int J Oncol*, 2005, 27(1):49-57.
- [6] Osta WA, Chen Y. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(16):5818-5824.
- [7] De Graaf, H, Melandsmo GM, Ruud P, *et al.* Ectopic expression of target genes may represent an inherent limitation of reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used for micrometastases detection: Studies on the epithelial glycoprotein gene EGP-2 [J]. *Int J Cancer*, 1997, 72(1):191-196.
- [8] Gommans WM, McLaughlin PM. Engineering zinc finger protein transcription factors to downregulate the epithelial glycoprotein-2 promoter as a novel anti-cancer treatment [J]. *Mol Carcinog*, 2007, 46(5):391-401.
- [9] McLaughlin PM, Harmsen MC. The epithelial glycoprotein 2 (EGP-2) promoter-driven epithelial-specific expression of EGP-2 in transgenic mice: a new model to study carcinoma-directed immunotherapy [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(10):4105-4111.
- [10] Huang PL, Wang J, Guo Y, *et al.* Molecular detection of disseminated tumor cells in the peripheral blood in patients with gastrointestinal cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003, 129(3):192-198.

本刊启用远程稿件处理系统

为了提高办公效率,《中国普通外科杂志》编辑部将于2008年1月1日起正式启用“网络编辑管理系统”。请作者登陆网站 <http://www.zpwz.net> 按照以下步骤进行在线投稿。

投稿步骤

1. 选择“作者投稿”一栏,进入“作者投稿”界面。

如果是第一次投稿,需要先注册本系统:点“注册”进入注册流程,按照系统提示进行注册,请注意,“*”选项为用户必填项!

2. 点“作者投稿”,选择左边的“我要投稿”一栏,按照投稿向导的提示进行。

(1) 输入稿件中文文题和英文文题。

(2) 输入作者。若所投稿件为多人撰写,在作者信息下添加该文的合作作者,合作作者可以只添加姓名即可。此处需注意,如该文为n位作者撰写,需在填写完n位作者后,再点一下“继续添加作者”后方可点“下一步”,否则最后一个作者本系统将不会显示。

(3) 第三步“学科类型”、“专业类型”、“创作类型”、“投稿栏目”、“文章分类号/PACS码”可以不选。

如果该文有基金支持,请在“基金类型”下的长条框中输入(包括基金号);如果有多个,请用分号分开。输完以后点“下一步”。

(4) 输入关键词。请注意各词之间一定要用分号隔开。然后点击“添加”。再点“下一步”。

(5) 输入中英文摘要后再单击“下一步”

(6) 根据系统提示在相应的栏目中输入你要回避或推荐的专家,也可以不写。单击“下一步”,检查稿件的基本信息,如有需要修改的地方,点击“修改”;再确认无误后,单击“下一步”进入稿件上传步骤。

(7) 在“稿件上传操作区”点“浏览”,选中要上传的稿件后,点击右边的“上传稿件”。待弹出“稿件上传完毕,请继续下一步”的对话框时,点“确定”,再点“下一步”继续投稿。请注意,这一步可能因您的网速和稿件的大小,所需时间略有不同,请耐心等待,如果长时间仍没有弹出“稿件上传完毕,请继续下一步”的对话框,可重新尝试,确保稿件上传方可进行下一步。

(8) 核对完所投稿件的信息后请点“下一步”。如果您对编辑部有什么特别的要求或说明,请在“给编辑部留言”框中留下您的意见,点“立即提交”,系统会提示“***同志:非常感谢您对本刊物的支持!您的来稿《***》我们已经收到,请等待编辑部通知。查询请登录编辑部网站 <http://www.zpwz.net> 或咨询编辑部邮箱:pw4327400@126.com”。

友情提示

网上投稿后,请邮寄1份纸质稿(题名页与正文页均需用A4纸4号字隔行打印)、单位介绍信(注明材料真实可靠,无一稿多投和无科研机密资料泄密)及60元稿件处理费至本编辑部。

为防作者上传稿件不成功,请作者E-mail致本编辑部,信中请注明投稿时间、文题、作者姓名,并将稿件以附件形式发过来。

编辑部地址:湖南省长沙市湘雅路87号中国普通外科杂志编辑部

E-mail: pw4327400@126.com; jcgxxych@126.com。联系电话 0731-4327400。