

# 乳腺癌患者术后腋窝引流液中 C-met mRNA 检测的意义

# Significance of C-met mRNA Detection in Axillary Drainage After Operations for Breast Cancer

杨卫军<sup>1</sup>/曹铭谦<sup>1</sup>,尹家俊<sup>1\*</sup>/严晓寒<sup>2</sup>/

张锦瑜<sup>1</sup>/张殿龙<sup>1</sup>/王亚东<sup>1</sup>/张维祥<sup>1</sup>

(1. 大连大学附属中山医院普外科, 辽宁 大连 116001; 2. 遵义医学院整形外科, 贵州 遵义 563003)

YANG Wei-jun<sup>1</sup>, CAO Ming-qian<sup>1</sup>, YIN Jia-jun<sup>1\*</sup>,  
YAN Xiao-han<sup>2</sup>, ZHANG Jin-yu<sup>1</sup>, ZHANG Dian-long<sup>1</sup>,  
WANG Ya-dong<sup>1</sup>, ZHANG Wei-xiang<sup>1</sup>

(1. Department of General Surgery, The affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian 116001, Liaoning, China;  
2. Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou, China)

**【摘要】**背景与目的: 研究原癌基因 *C-met* 在乳腺癌患者术后腋窝引流液中表达的临床意义。材料与方法: 用 RT-PCR 法检测 32 例乳腺癌患者行乳腺癌简化根治术后腋窝引流液中 *C-met* mRNA 表达, 并以三磷酸甘油醛脱氢酶基因 (human glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, *hGAPDH*) 为内参照。分析 *C-met* 阳性表达与肿瘤大小、腋窝淋巴结转移个数以及肿瘤雌激素受体 (Estrogen receptor, ER) 和孕激素受体 (Progesterone receptor, PR) 的相关性。结果: ①腋窝引流液中 *C-met* 的阳性表达率为 84.38%, 高于常规病理检查腋窝淋巴结转移癌的阳性率, *C-met* 的阳性表达率与腋窝淋巴结转移的个数呈正相关; ②腋窝引流液中 *C-met* 的阳性表达率与肿瘤的大小呈正相关; ③ER 和 PR 的阴性与 *C-met* 表达呈负相关趋势。结论: 应用 RT-PCR 检测乳腺癌患者常规术后腋窝引流液中的 *C-met* mRNA 表达阳性提示病人患侧胸壁淋巴管内存在肿瘤细胞微转移, 预示肿瘤有复发和远处转移可能以及病人的总生存期的缩短。其阳性表达率与肿瘤的大小及分期、淋巴结转移的个数呈正相关。与常规病理检查腋窝淋巴结肿瘤转移相比, 能更早地检测出肿瘤细胞在胸壁淋巴管中的转移, 而且具有更高的准确性。

**【关键词】** RT-PCR; 乳腺肿瘤; *C-met*

中图分类号: R730.43; Q354

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2005)04-0240-04

**【ABSTRACT】** BACKGROUND & AIM: To study the significance of C-met mRNA in axillary drainage after operations for breast cancer. MATERIAL AND METHODS: RT-PCR assay was used to examine the expression of C-met mRNA and human glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (*hGAPDH*) in axillary drainage after operations in 32 cases of breast cancer. The relationship between the expression of C-met and the tumor size and the numbers of lymph nodes metastasis and the Estrogen receptor (ER) and Progesterone receptor (PR) status was analyzed. RESULTS: ①The overall positive expression rate of C-met in axillary lymphatic drainage was 84.38%, which was higher than that in routine pathological method of the axillary lymph nodes to detect micrometastasis ( $P < 0.05$ ), and the positive cases of C-met expression were correlated with the numbers of metastatic lymph nodes. ②Positive cases for C-met expression were correlated with the tumor size ( $P < 0.01$ ). ③C-met negative cases showed the tendency of negative correlations with ER and PR negative cases. CONCLUSION: Detection of C-met mRNA in axillary drainage after operation for breast cancer using RT-PCR, the positive cases suggest existence of micrometastasis of cancer cells in the lymphatic of chest wall of breast cancer patients and there was a potential of recurrence and metastasis. The study suggests that it could be earlier and more accurate to detect micrometastasis using RT-PCR of the axillary lymphatic drainage for C-met expression in the axillary fluids than routine pathological method on the axillary lymph nodes.

**【KEY WORDS】** RT-PCR; breast cancer; C-met

收稿日期: 2005-01-12; 修订日期: 2005-03-22

作者简介: 杨卫军 (1972- ), 男, 广东省珠海市人, 主治医师, 硕士, 研究方向: 普外肿瘤。

\* Correspondence to: YIN Jia-jun Tel: 86-411-82835011, E-mail: jiajunyin1106@yahoo.com.cn

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,乳腺癌的复发和远处转移是导致乳腺癌病人死亡的主要因素。而微转移病灶的存在预示肿瘤有远处转移和复发的可能,提示预后不良。研究表明,微转移的存在与病人术后无瘤生存期缩短和5年生存率下降之间具有明显的相关性<sup>[1,2]</sup>。故肿瘤微转移的研究能够进一步提高肿瘤微转移病灶的检出率,能更准确地判定肿瘤的分期和预后,以此更合理地制定治疗方案,对提高乳腺癌病人生存率有重要意义。由于常规病理检查检测腋窝淋巴结存在肿瘤转移有20%~33%的假阴性<sup>[1-4]</sup>,我们采用RT-PCR法检测原癌基因*C-met*在乳腺癌患者行改良根治术后腋窝引流液中的表达来检测肿瘤微转移情况,探讨*C-met*在腋窝引流液中表达的意义。

## 1 资料与方法

**1.1 试剂** RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司。

**1.2 病例及分组** 病例来自大连大学附属中山医院2004-01~2004-07的乳腺癌患者32例,术前未行放、化疗。其中女性31例,男性1例,年龄33~77周岁;浸润性导管癌29例,单纯癌2例,硬癌1例。收集32例乳腺癌患者行改良根治术后第二天的腋窝引流液为实验材料。实验阳性对照组为经病理诊断为腋窝淋巴结转移的18例乳腺癌患者的腋窝淋巴结22枚;实验阴性对照组为7例颈部良性病变患者的颈部淋巴结7枚。

**1.3 RNA的抽提** 按异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取引流液中的总RNA。

**1.4 引物设计与合成** 由TaKaRa公司设计并合成。

*C-met* 基因 PCR 引物:

F 5'-GTACACACTCCTCATTGGATAGGC-3'

R 5'-ATGATGATTCCCTCGGTCAGAA-3'

hGAPDH 基因 PCR 引物:

F 5'-TCCTCTAGCTTCAACAGCGACACC-3'

R 5'-TCTCTCTTCCTCTGTGCTCTTG-3'

**1.5 RT-PCR 反应** 严格按照试剂盒操作要求进行RT-PCR反应。

**1.6 扩增产物的鉴定** 产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳分析,所有标本三磷酸甘油醛脱氢酶基因(human glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, *hGAPDH*)均表达,为207 bp条带,*C-met*表达阳性为450 bp条带。*C-met*表达阳性条带经剪切后由大连TaKaRa公司测序证明。

**1.7 统计学处理** 采用Fisher精确概率法进行数据统计分析, $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

## 2 结果

**2.1 *C-met* mRNA在腋窝引流液、常规病理检查阳性淋巴结和正常淋巴结中的表达** 所有标本扩增后均获得207 bp *hGAPDH*条带。32例腋窝引流液标本中27例出现*C-met* mRNA 450 bp阳性表达条带,阳性率为84.38%。阳性对照组18例乳腺癌患者的22枚腋窝淋巴结全部*C-met* mRNA表达呈阳性,阳性表达率为100%。阴性对照组7例颈部良性病变患者的7枚颈部淋巴结全部*C-met* mRNA表达呈阴性,阳性表达率为0%。凝胶电泳如图1、图2所示。

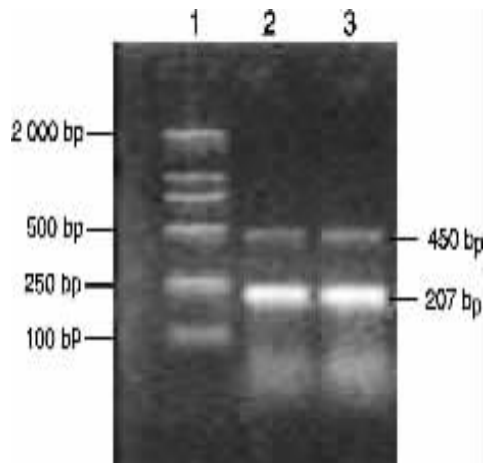


图1 *C-met*表达阳性电泳。1: DL2 000 marker; 2: 引流液*C-met*阳性; 3: 淋巴结转移癌*C-met*阳性

Figure 1 Analysis of positive *C-met* expression gene. 1: DNA marker DL2 000; 2: Positive *C-met* expression in axillary drainage after operations; 3: Positive *C-met* expression in axillary lymph nodes which involved tumor

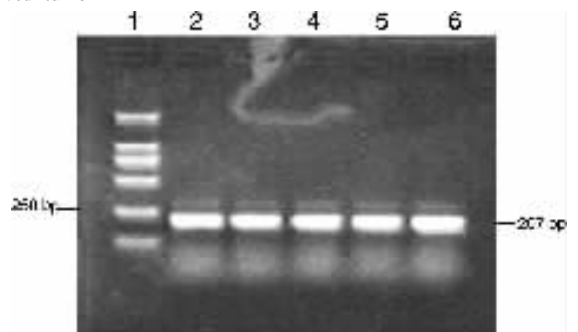


图2 *C-met*表达阴性电泳。1: DL2 000 marker; 2,3,4: 引流液*C-met*阴性; 5,6: 正常淋巴结*C-met*阴性

Figure 2 Analysis of negative *C-met* expression. 1: DNA marker DL2 000; 2, 3, 4: Negative *C-met* expression in axillary drainage after operations; 5,6: Negative *C-met* expression in normal lymph nodes

**2.2 腋窝淋巴结转移个数与*C-met* mRNA表达的关系** 常规病理检查未发现腋窝淋巴结转移者13例,其中*C-met*阳性8例;有1~3个淋巴结转移者15例,*C-met*阳性15例;有4个以上淋巴结转移者4例,*C-met*阳性4例。腋窝有1~3个淋巴结转移者*C-met*表达高于与无转移者( $P = 0.04$ ),有淋巴结转移的患者*C-met*阳性表达明显高于无淋巴结转移者( $P = 0.007$ )。常规病理检查证实腋窝淋巴结转移癌者19例,淋巴结转移癌

的阳性检出率为 59.38%，而 RT-PCR 检测腋窝引流液中 C-met mRNA 阳性表达 27 例，阳性检出率为 84.38%，明显高于常规病理检查在腋窝淋巴结转移癌的检出率 ( $P < 0.03$ )。C-met mRNA 阳性表达与腋窝淋巴结转移个数呈正相关(表 1)。

表 1 腋窝淋巴结转移状态与 C-met mRNA 表达的关系

Table 1 Correlation between C-met expression and axillary lymph node involvement

Numbers of metastatic lymph nodes	C-met Positive cases	C-met negative cases	C-met Positive rate( $\times 10^{-2}$ )
0	8	5	61.54
1~3	15	0	100
>4	4	0	100

### 2.3 乳腺肿瘤的大小与 C-met mRNA 表达的关系

32 例患者经 RT-PCR 检测 C-met 阳性 27 例，阳性率为 84.38%。其中，肿瘤直径在 0~1 cm 之间的 2 例呈 C-met 阴性；肿瘤直径在 1~2 cm 之间的 8 例，C-met 阳性 4 例；肿瘤直径在 2~5 cm 之间(T2 期) 17 例全部呈 C-met 阳性；肿瘤直径大于 5 cm(T3 期)的 6 例全部呈 C-met 阳性。乳腺癌 T2 期以上的患者 C-met 阳性率为 100%。T2 期乳腺癌的 C-met 阳性率显著高于 T1 期 ( $P = 0.002$ )；T2 期 + T3 期的 C-met 阳性率为 100%，与 T1 期相比较 C-met 阳性率显著性增高 ( $P = 0.04$ )。乳腺肿瘤的大小与 C-met mRNA 表达阳性率呈正相关(表 2)。

表 2 乳腺肿瘤的大小与 C-met mRNA 表达的关系

Table 2 Correlation between C-met status and tumor size

Tumor size (cm)	C-met		C-met Positive rate( $\times 10^{-2}$ )
	Positive cases	negative cases	
0~1	0	1	0
1~2	4	4	50
2~5	17	0	100
>5	6	0	100

### 2.4 乳腺肿瘤 ER、PR 情况与 C-met mRNA 表达的关系

32 例患者中肿瘤雌激素受体 (Estrogen receptor, ER) 阳性 18 例，其中 C-met 阳性表达 13 例，C-met 阴性表达 5 例；ER 阴性 14 例，其中 C-met 阳性表达 14 例，C-met 阴性表达 0 例。孕激素受体 (PR) 阳性 17 例，其中 C-met 阳性表达 13 例，C-met 阴性表达 4 例。PR 阴性 15 例，其中 C-met 阳性表达 14 例，C-met 阴性表达 1 例。在 5 例 C-met 阴性患者中，ER 阳性者 5 例，占 100%，而 PR 阳性者 4 例，占 80%。ER 和 PR 阴性与 C-met 表达呈负相关倾向(表 3)。

表 3 乳腺肿瘤 ER、PR 状态与 C-met mRNA 表达的关系

Table 3 Correlation between C-met expression and ER, PR receptor status

Receptor	C-met		C-met Positive rate( $\times 10^{-2}$ )
	Positive cases	negative cases	
ER(+)	13	5	72
ER(-)	14	0	100
PR(+)	13	4	76.47
PR(-)	14	1	93.33

## 3 讨 论

原癌基因 C-met 是肝细胞生长因子 (Hepatocyte growth factor, HGF) 或扩散因子 (Scatter factor, SF) 的受体基因。HGF/SF 具有强大的促分裂、组织形成、诱导上皮迁移、浸润以及血管生成的作用，在癌肿转移的发生和生长中具有重要地位<sup>[5-7]</sup>，能缩短病人的无病生存期和总生存期<sup>[8]</sup>。HGF/SF 复杂的生物学作用是通过其受体基因 C-met 完成。C-met 在多种组织和细胞中表达，但在上皮细胞中浓度最高<sup>[9]</sup>。在正常组织中，C-met 的 mRNA 浓度很低甚或测不出，但其相对应组织的癌细胞则有很高的表达值。研究表明，C-met 表达参与了多种肿瘤<sup>[8, 10-12]</sup>的发生和发展，其高表达能缩短患者的总生存期，预示着综合生存率和无病生存率的降低<sup>[14]</sup>。

近年认为微转移的存在直接影响病人的预后，微小转移灶的检出与乳腺癌病人的无病生存期及总生存期呈负相关<sup>[2]</sup>。常规病理检查仍然是乳腺癌微转移的金标准，但是存在 20%~33% 的假阴性<sup>[1, 4]</sup>。Noguchi<sup>[15]</sup>的研究结果表明乳腺癌前哨淋巴结检测阴性者存在淋巴结以外的肿瘤细胞转移。

乳腺癌的转移在早期以淋巴道转移为主，癌细胞的淋巴转移是沿淋巴管回流至腋窝淋巴结，即癌细胞出现在淋巴管的转移先于淋巴结。乳腺癌改良根治术致使大量的毛细淋巴管和小淋巴管断裂，淋巴液溢出，转移或滞留于胸壁或腋窝淋巴管中的肿瘤细胞将随着淋巴液一并渗出。故在乳腺癌术后腋窝引流液中检测癌细胞转移比在淋巴结中检测更早并更为准确，能避免因腋窝淋巴结出现跳跃转移等原因导致的假阴性和淋巴结病理检查切片过少以及切片存在随机性导致的假阴性。

本研究表明 C-met 基因能在乳腺癌病人行改良根治术后的腋窝引流液中检测出，C-met 为滞留在胸壁或腋窝淋巴管中的肿瘤细胞所表达。C-met 阳性表达与肿瘤的大小密切相关，还与腋窝淋巴结转移的个数密切相关，实验结果显示在病理检查证实存在腋窝淋巴结转移的患者中，其腋窝引流液中 C-met 表达全为阳性。在病理检查未发现腋窝淋巴结转移的 13 例病人中，RT-PCR 检测 C-met 表达阳性 8 例，而此例 C-met 表达阳性者的腋窝淋巴结重新连续切片均未查到微小转移癌灶，RT-PCR 法检测乳腺癌病人术后腋窝淋巴引流液中 C-met 表达的阳性检出率明显高于常规病理在腋窝淋巴结转移癌中的检出率 ( $P < 0.03$ )。结果证明在乳腺癌病人行乳腺癌改良根治术后腋窝引流液中检测肿瘤细胞是否存在转移比常规病理检查更早且更准确。阳性对照组的淋巴结病理检查证实为淋巴结转移癌，用 RT-PCR 法检测淋巴结中 C-met 均呈阳性。在阴性对照组颈部良

性病变的淋巴结 C-met 检测全部呈阴性表达,说明在正常的淋巴结中 C-met 并不表达,在淋巴结转移癌中 C-met 呈阳性表达。ER 和 PR 通常作为乳腺癌病人的预测因子和不利的预后因子,本次病例大多数受体阴性的肿瘤的腋窝引流液中检测 C-met 呈阳性表达,ER 和 PR 阴性与 C-met 表达呈负相关倾向。研究结果表明,C-met 是乳腺癌转移研究的理想的特异性标志物,与常规病理检测腋窝淋巴结肿瘤转移相比,应用 RT-PCR 方法检测乳腺癌术后腋窝引流液中 C-met 的表达能更早地检测出胸壁淋巴管是否存在肿瘤细胞的微转移,并且具有更高的准确性和灵敏性,值得临床推广应用。

本项研究对乳腺癌病人有指导手术后的治疗意义,能以此进一步明确肿瘤的分期,判定预后,并以此制定合理化、个体化的术后治疗综合方案。对于早期乳腺癌病人行腋窝淋巴结病理检查阴性而腋窝引流液中 C-met 检测阴性者,从理论上可以当作原位癌治疗,病人可以避免手术后不必要的放疗和化疗,从而免于避免不必要的放疗和化疗带来的不良反应和经济负担。对于 C-met 检测阳性者,应结合病人全身及腋窝淋巴结转移情况给予更合理、个体化的辅助性治疗,能进一步降低术后肿瘤复发和远处转移,延长生存期。但是本项研究还处于初始阶段,尚须要大宗的病例来加以研究和长期的随访来进一步证明其临床意义和可行性。

### 参考文献:

[1] 陈朝伦,卢晓梅,黄 绒,等. I 期癌症患者切除淋巴结内隐匿性微小转移灶的检查及临床意义 [J]. 中华肿瘤杂志, 1997, 19(1): 69 - 71.

[2] 傅西林,张立华,张国珩. 常规检查淋巴结转移阴性之乳腺癌腋窝组织再连续切片检查的研究 [J]. 肿瘤临床, 1985, 12(1): 20 - 23.

[3] Ghossoub RA, Dillon DA, D'Aquila T, et al. Expression of C-met is a strong independent prognostic factor in breast carcinoma[J]. *Cancer*, 1998, 82(8): 1 513 - 1 520.

[4] Gardner B, Feldman J. Are positive axillary nodes in breast cancer markers for incurable disease[J]? *Ann Surg*, 1993, 218: 270 - 278.

[5] Tomioka D, Maharani N, Kuba K, et al. Inhibition of growth, invasion, and metastasis of human pancreatic carcinoma cells by NK4 in an orthotopic mouse model[J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 7 518 - 7 524.

[6] Kermorgant S, Aparicio T, Dessirier V, et al. Hepatocyte growth factor induces colonic cancer cell invasiveness via enhanced motility and protease overproduction. Evidence for P13 kinase and PKC involvement[J]. *Carcinogenesis*, 2001, 22: 1 035 - 1 042.

[7] Wang Y, Selden AC, Morgan N, et al. Hepatocyte growth factor/ scatter factor expression in human mammary epithelium [J]. *Am J Pathol*, 1994, 144: 675 - 681.

[8] Yamashita JI, Ogawa M, Yamashita SI, et al. Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer[J]. *Cancer Res*, 1994, 54: 1 630 - 1 633.

[9] Di Renzo MF, Narsimhan RP, Olivero M, et al. Expression of the MET/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues [J]. *Oncogene*, 1997, 189: 227 - 232.

[10] Kuniyasu H, Yasui W, Kitadai Y, et al. Frequent amplification of the C-met gene in scirrhous type stomach cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 189: 227 - 232.

[11] Di Renzo MF, Olivero M, Ferro S, et al. Overexpression of the C-met/ HGF receptor gene in human thyroid carcinomas [J]. *Oncogene*, 1992, 7: 2 549 - 2 553.

[12] Lui C, Park M, Tsao MS, et al. Overexpression of the C-met protooncogene but not epidermal growth factor receptor or c-erbB-2 in primary human colorectal carcinomas[J]. *Oncogene*, 1992, 7: 181 - 185.

[13] Tolgay OI, Dolled-Filhart M, D'Aquila TG, et al. Tissue microarray-based studies of patients with lymph node negative breast carcinoma show that met expression is associated with worse outcome but is not correlated with epidermal growth factor family receptors[J]. *Cancer*, 2003, 97(8): 1 841 - 1 848.

[14] Tsarfaty I, Alvord WG, Resau JH, et al. Alteration of Met Protooncogene product expression and prognosis in breast carcinomas[J]. *Anal Quant Cytol Histol*, 1999, 21(5): 397.

[15] Noguchi M. Sentinel lymph node biopsy and breast cancer [J]. *Br J Surg*, 2002, 89(1): 21 - 34.

