

RT-PCR 测定乳癌及腋窝淋巴结微量组织 MUC1 及 GST- π 基因的表达

李继梅¹, 李春海², 王秦秦¹, 唐睿珠¹, 孙丽亚², 郝 萍¹, 姜 平¹

摘要: 目的 研究 MUC1 及 GST- π mRNA 在乳癌腋窝清扫淋巴结中表达与乳癌发生、发展、预后转归及临床耐药的相关性。方法 用 RT-PCR 技术检测 20 例乳腺癌病人的 108 个 HE 染色阴性淋巴结 MUC1 及 GST- π mRNA 的表达。结果 MUC1 及 GST- π mRNA 在 HE 染色阴性淋巴结中阳性检出率分别为 66% 及 39%, 在乳癌组织、HE 阳性淋巴结及正常乳腺组织中阳性率分别为 100%/88%、100%/71% 及 100%/0。结论 HE 阴性淋巴结中出现 MUC1 阳性表达表明存在肿瘤微转移灶, MUC1mRNA 检测可提高淋巴结微转移诊断率; GST- π 在肿瘤启动和促进阶段可表达, 是一种重要的乳腺癌生物学标志物; 乳癌组织中耐药性普遍存在; MUC1 及 GST- π mRNA 在腋窝淋巴结的表达可能是预后不良的标志, 二者联合检测对乳癌早期诊断及预后判断有重要意义。

关键词: MUC1 粘蛋白; 人胎盘型谷胱甘肽转移酶; RT-PCR; 乳腺肿瘤

中图分类号: R 737.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2001)05-0351-03

Detection of MUC1 and GST- π Gene by means of RT-PCR in Axillary Lymph Nodes Taken from Breast Cancer Patients

L I Jimei, L I Chun-hai, WANG Q in-qin, et al

Cancer Institute of the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650031, China

Abstract Objective To study MUC1 and GST- π mRNA expression in axillary lymph nodes and its clinical significance. **Methods** Expression of both MUC1 mRNA and GST- π mRNA was detected by RT-PCR in 108 histologically negative lymph nodes obtained from 20 breast cancer patients. **Results** Of 108 lymph nodes, 66%/39% were found to express MUC1 mRNA/GST- π mRNA. And the positive rates of MUC1 and GST- π mRNA in cancer tissues, HE positive lymph nodes and normal breast tissue are 100%/87%, 100%/80%, 100%/0, respectively. **Conclusion** Expression of MUC1 mRNA in histologically negative lymph nodes suggests the presence of breast cancer micrometastases; GST- π , whose expression is detected as cancer occurring and developing, can be used as a breast tumor marker; Drug-resistance exists in almost all the breast cancer, The expression of MUC1 mRNA and GST- π mRNA in lymph nodes may be a indication of poor prognosis. The detection of all these two genes together by RT-PCR has higher sensitivity and significance.

Key words: MUC1 mucin; GST- π ; RT-PCR; Breast carcinoma

MUC1 粘蛋白是一种高分子量膜糖蛋白, 其表达具有组织特异性, 主要存在于某些上皮性组织和器官中, 特别是在所有正常及癌变乳腺组织中均表达, 而在间叶组织来源的淋巴结中不表达, 因此 MUC1 可作为某些上皮性肿瘤发生淋巴结转移的

有效标志物^[1]。胎盘型谷胱甘肽 S-转移酶(GST- π) 为 GSTs 超基因家族中的一类亚基, 是参与人体解毒功能的重要同工酶^[2], 对肿瘤的发生和肿瘤耐药具有重要作用。在许多肿瘤细胞癌变过程中, GST- π 的表达会异常升高, 并在癌变早期就已发生了改变, 是一个典型的癌前病变标志酶^[3,4]。本研究在国外有关实验基础上应用 RT-PCR 技术, 从基因水平检测乳腺癌微量组织及其腋窝淋巴结组织 MUC1、GST- π mRNA 的表达。

1 材料和方法

收稿日期: 2000-05-30; 修回日期: 2001-04-25

基金项目: 云南省自然科学基金资助项目(96C077Q)

作者单位: 1. 650031 昆明医学院第一附属医院; 2. 军事医学科学院肿瘤分子生物学研究室

1.1 标本来源 乳腺癌组织及腋窝淋巴结手术切除标本取自昆医附一院 1997~ 1998 年胸科住院手术病人,所有标本在术后 1.5h 内置液氮中保存,并留切部分作相应常规病理学检查。

1.2 引物设计 MUC1、GST- π 基因引物在军科院肿瘤分子生物学实验室设计合成。MUC1 基因引物序列为 A1(5'-CGTCGTGGACA TTGATGGTACC-3'), A2(5'-GTACCTCCTCTCACCTCCTCCA A-3'), 扩增片段为 288bp, GST- π 基因引物序列为 B1(5'-ATGCCGCCCTACACCGTG-3'), B2(5'-ATCCTTGCCCGCCTCA TAG-3'), 扩增片段为 350bp, 内参照采用 β -微球蛋白及 β actin 基因。

1.3 方法 组织总 RNA 提取采用 A GPC 一步法提取。AMV 逆转录酶 42 作用 60min, 95 5min 合成 cDNA 第一链,再以此为模板进行 PCR 循环。阴性对照用未做 RT 的总 RNA 做模板,空白对照在扩增时不加 Taq DNA 聚合酶。

RT-PCR 结束后,取扩增产物 10 μ l,进行 2% 琼脂糖电泳。

2 结果

2.1 MUC1 基因的 RT-PCR 分析结果 临床样本的 MUC1 和 β -微球蛋白基因扩增分别得到 288bp 和 150bp 左右的扩增条带,与所设计的扩增片段大小相符。空白对照和阴性对照均未见扩增条带。(图 1)

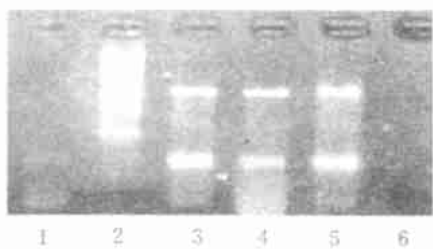


图 1 HE 染色阴性淋巴结中 MUC1 基因扩增结果

1. MUC1 (-); 2. PCR Markers: 1543bp, 994bp, 697bp, 515bp, 377bp, 237bp; 3~ 5. MUC1 (+), 288bp (536bp 为基因组 DNA 扩增产物, 150bp 为内对照 β -微球蛋白); 6. 阴性对照

来自 20 例乳癌病人的 108 个 HE 染色未见转移的淋巴结中 71 个经 RT-PCR 扩增后有 MUC1 mRNA 表达,阳性检出率为 66%。8 例乳癌组织,7 个 HE 阳性淋巴结及 6 例正常乳腺组织 MUC1 mRNA 阳性检出率也分别为 100%、100% 及 100%。

2.2 GST- π 基因的 RT-PCR 检测结果 临床样本的 GST- π 和内参照 β actin 基因扩增结果见图 2。GST- π 和 β actin 分别得到 350bp 和 254bp 左右的

条带,空白对照和阴性对照未见扩增条带。来自 20 例乳癌病人的 108 个 HE 染色未见转移的淋巴结中 42 个经 RT-PCR 方法后有 GST- π mRNA 表达,阳性检出率为 39%。8 例乳癌组织,7 个 HE 阳性淋巴结及 6 例正常乳腺组织 GST- π mRNA 阳性表达率分别为 88%、71% 及 0。

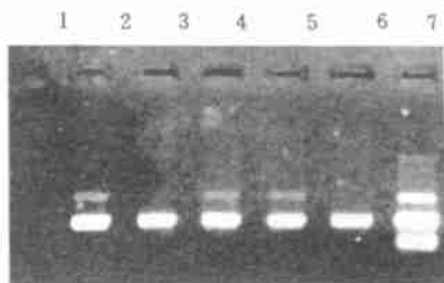


图 2 HE 染色阴性淋巴结中 GST- π mRNA 的扩增结果

1: 阴性对照; 2, 4, 5: GST- π (+); 3, 6: GST- π (-); 7: GST- π β actin 阳性对照; 350, 254bp。

3 讨论

乳腺癌目前以早期发现早期手术为主要原则,影响其术后预后的因素很多,其中腋窝淋巴结有无转移、淋巴结转移数量、水平和部位对临床选择治疗方案及预后评估至关重要。有统计表明淋巴结阴性的乳癌患者的十年发病率是 20%~ 30%,可以认为这些患者在诊断之初可能就存在隐蔽的淋巴结转移或全身转移^[5-7],用常规的组织病理方法甚至免疫组化方法都不易发现,需要寻找更为敏感有效的标志物或方法来解决这一问题。检测转移肿瘤细胞,需利用能区别于转移部位组织而肿瘤细胞特异性表达的生物学标志物。MUC1 粘蛋白由于其表达具有组织特异性,可作为乳腺癌患者淋巴结中转移肿瘤细胞的有效标志物用于微转移诊断。随着现代分子生物学实验技术的不断发展从血液、骨髓、淋巴结中更有效地发现微转移灶成为可能^[8-10]。我们在国外有关实验的基础上,建立了自己的 MUC1 mRNA RT-PCR 分析法用于乳癌腋窝淋巴结微转移灶的诊断,结果在 108 个常规病理学检查阴性的淋巴结中 71 个发现有 MUC1 mRNA 的表达,这种转移可能是一个或数个肿瘤细胞的隐蔽淋巴结转移。提示 RT-PCR 检测淋巴结中 MUC1 mRNA 的表达作为一种监测癌细胞隐性淋巴结转移的手段是敏感和可行的。

GST- π 是参与人体解毒功能的重要同工酶,被认为是典型的癌前病变标志酶,与肿瘤的发生发展密切相关。本文 RT-PCR 研究结果表明乳癌组织 mRNA 阳性检出率为 88%,明显高于正常乳腺组织(0)。提示 GST- π 基因在乳癌组织中表达明显增高,

是一种重要的乳腺癌生物学标志物,可作为乳癌早期诊断的一项指标。我们用 RT-PCR 技术检测乳癌病人腋窝清扫淋巴结发现 HE 阳性淋巴结 71% 表达 GST- π mRNA, 而 HE 阴性淋巴结表达 GST- π mRNA 的有 39%, 提示 HE 阴性淋巴结出现 GST- π mRNA 表达可能是预后不良的标志, 要注意微转移及复发可能。GST- π 也是预测肿瘤耐药的重要标志^[11], 乳癌组织中 GST- π 的高表达, 提示乳腺癌的耐药性普遍存在, 临床上可选用与 GST- π 耐药无关的化疗药物或配合使用逆转剂来改善化疗效果。当细胞癌变处于启动阶段, 细胞形态还未发生变化时, 细胞的一些功能或代谢酶就已开始异常表达, 此时用一般常规方法难以检测到。我们采用灵敏特异的 RT-PCR 检测技术, 其敏感性远远优于传统免疫组化方法, 个别细胞的 mRNA 表达改变就可检测出, 上述二者联合检测对乳腺癌的早期诊断及预后判断具有潜在临床应用价值。当然, 高灵敏度方法检出的微转移灶其生理意义尚有争议, 有微转移的患者预后并非一定不良, 但可提示有形成转移倾向, 相信随着观察例数的增多, 随访时间延长, 微小转移灶的临床意义会更加明显。

参考文献

[1] Noguchi S, Aihara T, Nakamori S, et al The detection of breast carcinoma micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction[J]. Cancer, 1994, 74(5): 1595-1600

- [2] Armstrong RN. Structure, Catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases[J]. Chem Res Toxicol, 1997; 10(1): 2-4
- [3] 梁晓秋. 胎盘型谷胱甘肽 S 转移酶: 一种新的肿瘤标志物[J]. 国外医学 生理病理科学临床分册, 1997, 17(1): 41-43
- [4] 李春海, 郭亚军. 肿瘤分子生物学研究进展[M]. 北京: 军事医学科学出版社 1996 103-116
- [5] 沈镇宙. 乳腺癌的治疗[J]. 实用外科杂志, 1991, 11(8): 417-419
- [6] Fisher ER, Redmond C, Fisher B, et al Prognostic factors in NSABP studies of women with node-negative breast cancer[J]. Monogr Natl Cancer Inst, 1992, (11): 151-158
- [7] Nasser A, Lee AKC, Bosari S, et al Occult axillary lymph node metastases in "node-negative" breast carcinoma[J]. Human Pathol, 1993, 24(9): 950-957
- [8] Gusterson B. Are micrometastases clinically relevant? Br J Hosp, 1991, 47(4): 247-248
- [9] Wang X, Helier R, Vanvoorhis N, et al Detection of submicroscopic lymph node metastases with polymerase chain reaction in patients with malignant melanoma[J]. Ann Surg, 1994, 220(6): 768-774
- [10] Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, et al Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction[J]. J Clin Oncol, 1994, 12(4): 725-729
- [11] Chung HC, Rha SY, Kim JH, et al P-glycoprotein: the intermediate end point of drug response to induction chemotherapy in locally advanced breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 1997, 42(1): 65-68

(贺文校对)

中国煤炭工业医学杂志

欢迎订阅 欢迎投稿

《中国煤炭工业医学杂志》为中央级全国性技术类医学期刊, 中华预防医学会系列杂志, 国内外公开发行, 刊号: ISSN 1007-9564, CN 13-1221/R。本刊以各级临床医生为主要读者对象, 侧重报道医学临床科研成果、新技术和诊疗经验。报道的核心学科为神经内科、心血管内科、神经外科、骨科、心脏外科、妇产科、肿瘤科、急诊医学、影像医学和预防医学等。设专家评述、论著与经验、综述与讲座、临床用药、临床病例讨论、短篇与个例、预防医学、急诊急救等栏目。欢迎广大医务人员投稿和订阅。杂志为月刊; 定价: 8.00 元/期, 96.00 元/年; 邮发代号 18-284, 全国各地邮局订购。

通讯地址: 河北省唐山市建设南路 57 号《中国煤炭工业医学杂志》编辑部

电话: 0315-3725999

传真: 0315-2833941

邮编: 063000

E-mail: mtyx@heinfo.net

网址: WWW.OK120.COM