

应用 RT-PCR 检测 CK19 表达提高乳腺癌 前哨淋巴结微转移检出的研究

顾 林 冯玉梅^① 潘乐康 王立梅^① 方志沂

天津医科大学附属肿瘤医院乳腺癌防治中心 (天津市 300060)

摘要 目的:评价乳腺癌前哨淋巴结活检的临床意义,应用细胞角蛋白 cytokeratin19(CK19)RT-PCR 检测法提高其的敏感性及准确率。方法:随机选取 1999 年 10 月至 2003 年 3 月住院的乳腺癌患者 73 例,其中 2001 年 1 月至 2003 年 3 月的 29 例,对前哨淋巴结(SLN)进行了 CK19 RT-PCR 检测。采用专利兰进行 SLN 识别。RT-PCR 法检测 CK19 mRNA 表达。结果:SLN 识别成功 67 例,成功率为 91.8%(67/73)。对上述 67 例的 SLN 转移的常规病理诊断的敏感度 68.8%(22/32),准确率 85.1%(57/67)。在行 CK19 RT-PCR 的 29 例中,检测出常规病理未检出的微小转移病例 8 例。敏感度 90.0%(18/20),准确率 93.1%(27/29)。结论:前哨淋巴结活检可有效判断乳腺癌腋淋巴结转移状态,应用 CK19 RT-PCR 检测 SLN 的微转移,可提高敏感度及准确率。

关键词 乳腺癌 前哨淋巴结 cytokeratin19 RT-PCR

中图分类号 R737.9 文献标识码 A 文章编号:1000-8179(2004)03-0144-03

Detection of Micrometastasis in Sentinel Lymph Nodes of Breast Cancer Using CK19 RT-PCR

Gu Lin Feng Yumei Pan Lekang et al

Center for Breast Cancer, Cancer Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin

Abstract Objective: To evaluate the significance of sentinel lymph node biopsy (SLNB) in breast carcinoma and to improve the sensitivity and accuracy of SLNB by cytokeratin19(CK19) RT-PCR. **Methods:** Unselected 73 patients with breast carcinoma underwent SLNB using patent blue, and SLNs of 29 patients were detected with CK19 RT-PCR. **Results:** SLNs were identified in 67 patients (91.8%). The sensitivity and accuracy of routine examination of pathology for SLNs was 68.8%(22/32) and 85.1%(57/67) respectively. The sensitivity and accuracy of CK19 RT-PCR for SLNs was 90.0%(18/20) and 93.1%(27/29) respectively. **Conclusions:** SLNB is useful to determine the status of axillary lymph nodes of breast carcinoma. CK19 RT-PCR can improve the sensitivity and accuracy of SLNB.

Key words Breast carcinoma Sentinel lymph node Cytokeratin19 RT-PCR

腋淋巴结转移情况是判断可切除乳腺癌患者预后,制定治疗方案最重要的依据。通过前哨淋巴结活检(sentinel lymph node biopsy, SLNB)可推断腋淋巴结转移状态,避免不必要的腋淋巴结切除(axillary lymph node dissection, ALND),减少手术

并发症,提高生存质量^[1]。前哨淋巴结活检的敏感性是影响其临床应用的关键,假阴性将导致转移淋巴结的残留及错误治疗方案的实施。细胞角蛋白 cytokeratin19(CK19)是检测上皮性肿瘤微转移的良好标志^[2-4]。本研究旨在评价乳腺癌前哨淋巴结活检的

^① 天津市肿瘤研究所生化及分子生物学研究室

临床意义,应用 CK19 RT-PCR 检测法减少乳腺癌前哨淋巴结活检的假阴性,提高其敏感性。

1 材料与方法

1.1 临床资料

随机选取 1999 年 10 月至 2003 年 3 月,本中心住院的乳腺癌患者 73 例行 SLNB,识别成功 67 例;并对 2001 年 1 月至 2003 年 3 月的 29 例 SLN 进行了 CK19 RT-PCR 检测。67 例患者平均年龄 48.2 岁(27~88 岁)。肿瘤大小:T₁ 23 例,T₂ 41 例,T₃ 3 例。肿瘤所在象限:外上 30 例,外下 5 例,内上 12 例,内下 2 例,中央 18 例。病理类型:浸润性导管癌 17 例,单纯癌 32 例,其它类型 18 例。术式:保乳术 4 例,改良根治术 42 例,根治术 21 例,均未行术前化疗。SLNB 的实施:先行肿瘤切除术送冰冻病理检查,然后在癌灶的残腔四周分 4 点各注入 1%专利兰 1ml,常规游离皮瓣,在病灶与腋窝之间皮下组织中寻找兰染淋巴管及淋巴结。确定 SLN,单独切除,从中间剖开,一半用于常规病理检测,另一半-80℃冻存,进行 CK19 RT-PCR 检测。所有病例在实施 SLNB 后,进行常规腋淋巴结清扫。

1.2 RT-PCR 法检测 CK19 mRNA 表达

RNA 提取、cDNA 合成、PCR 试剂均采用 GibcoBRL 产品,实验方法参考试剂说明。CK19 的上游引物为 5'-CTGAGTGACATGCGAAGCCAATA-3',下游引物为 5'-ATCTTCCTGTCCCTCGAGCA-3'。cDNA 模板对照:β₂ 微球蛋白的 cDNA;阳性对照:乳腺癌细胞系 MCF-7 的 cDNA;阴性对照:人纤维肉瘤细胞系 HT1080 的 cDNA;假基因扩增对照:乳腺癌细胞系 MCF-7 的基因组 DNA。通过优化筛选实验确定最佳反应条件^[5]。

1.3 统计学处理

采用 χ² 检验,P<0.05 为有统计学意义。

2 结果

SLN 识别成功 67 例,成功率为 91.8%(67/73)。共识别 117 个 SLN,平均每例为 1.7 个(1~6 个)。67 例 SLN 转移的常规病理诊断敏感度 68.8%(22/32),假阴性率 22.2%(10/45),准确率 85.1%(57/67),见表 1。在行 CK19 RT-PCR 的 29 例中,检测出常规病理未检出的微小转移病例 8 例。敏感度 90.0%(18/20),假阴性率 18.2%(2/11),准确率 93.1%(27/29),见表 2。假阴性的发生率与肿瘤的部位、大小、组织学类型、病理学分级无明显相关,见表 3。

表 1 SLN 的 HE 病理诊断

项目	ALN		总例数
	+	-	
SLN			
+	16 ^a	6 ^b	22
-	10 ^c	35 ^d	45
总例数	26	41	67 ^e

敏感性 (a+b)/(a+b+c) = 68.8%,正确率 (a+b+d)/e = 85.1%

表 2 SLN 的 CK19 RT-PCR 诊断

SLN CK19/SLN HE/ALN HE	例数	诊断意义
+ / + / + a	5	真阳性
+ / + / - b	5	真阳性
+ / - / - c	4	真阳性(提高敏感性)
+ / - / + d	4	真阳性(提高敏感性)
- / - / - e	9	真阴性
- / + / - f	1	假阴性
- / - / + g	1	假阴性
合计 h	29	—

敏感性 (a+b+c+d)/(a+b+c+d+f+g) = 90.0%

正确率 (a+b+c+d+e)/h = 93.1%

表 3 SLN 假阴性病例与临床相关性

相关因素	SLN 假阴性例数/总例数	比率(%)	χ^2	P 值
肿瘤部位(象限)				
外上	7/30	23.3	3.52	0.475 6
外下	0/5	0		
内下	0/2	0		
内上	1/12	8.3		
中央	2/18	1.1		
肿瘤大小				
T ₁	3/23	13.0	0.74	0.690 9
T ₂	7/41	7.0		
T ₃	0/3	0		
病理类型				
单纯癌	8/32	25.0	4.90	0.086 4
浸润性导管癌	1/17	5.9		
其它	1/18	0.6		
病理分级				
I	1/6	16.7	0.50	0.778 5
II	1/49	16.3		
III	1/12	8.3		

3 讨论

腋淋巴结的转移状态是乳腺癌分期、制定辅助治疗方案的重要指标。但腋淋巴结清扫可导致积液、上肢水肿、感觉麻木等常见手术并发症。前哨淋巴结活检(SLNB)是一种安全、有效的推测乳腺癌腋淋巴结状态的手段,使免除不必要的腋淋巴结清扫成为可能。染料法因其安全、经济、简便、易行,最为

药还是中药复方常被选为中药增敏剂应用于临床。其主要成分之一补骨脂素为呋喃香豆素类化合物^[9],对多种小鼠肉瘤、艾氏腹水瘤、肝癌等有生长抑制和体外细胞毒作用^[10];临床观察表明以补骨脂素为主要成分的藥物有明确逆转白血病多药耐药作用^[1]。

本研究发现补骨脂素能增强 ADM 对耐药株 K562/ADM 的杀伤作用,能显著降低 ADM 对 K562 的 IC₅₀,表明补骨脂素对 MDR 具有逆转作用。

测定细胞内 ADM 积累情况能反映出药物对 P-gp 功能泵的影响状况,补骨脂素能否抑制 P-gp 功能而减少药物的外排,从而提高 K562/ADM 细胞内 ADM 的浓度,提高化疗药物效果,有待进一步研究。

参考文献

- 1 蔡宇,曹克俭,殷忠东.补骨脂素胶囊对急性白血病多药耐药逆转作用的临床观察[J].中国中医药科技,2002,9(1):53
- 2 胡凯文,左明焕.中药逆转肿瘤细胞多药耐药研究述评[J].北京中医药大学学报,2000,23(3):33~36

- 3 梁蓉,杨平地,陈协群.川芎嗪和异博定联合逆转 HL60/HT 细胞的多药耐药[J].第四军医大学学报,1998,19(4):385~387
- 4 叶祖光,王金华,孙爱续,等.粉防己碱、甲基莲心碱和蝙蝠葛碱增强长春新碱诱导人乳腺癌 MCF-7 多药耐药细胞凋亡[J].药学报,2001,36(2):96~99
- 5 龚玉萍,刘震,贾永前,等.环孢霉素 A 逆转 Pgp 多药耐药机理的研究[J].华西医科大学学报,2002,33(3):394~396
- 6 戴辉,罗绍凯,尹爱华,等.环孢霉素 D 衍生物 PSC833 逆转 K562/A02 细胞多药耐药的研究[J].中华血液学杂志,2002,23(1):23~26
- 7 王婷,陈宝安,林果为.耐药调节剂治疗恶性肿瘤的临床应用进展[J].国外医学输血及血液学分册,2000,23(2):85~87
- 8 李向中,主编.中医药学基础[M].北京:中国医药科技出版社,2002.182~185
- 9 吉力,徐植灵.补骨脂化学成分的综述[J].中国中药杂志,1995,20(2):120~122
- 10 吴少华,张仲海,赵建斌.补骨脂素体内外抗癌活性的实验研究[J].中国中药杂志,1998,23(5):303~305

(2003-03-10 收稿)(2003-05-07 修回)

(柏敏霜校对)

(上接第 145 页)

广泛使用。本研究采用专利兰,取得了 91.8% 的识别成功率,与文献报道的高水平相当^[6-8]。

文献报道,常规病理检测阴性的淋巴结微转移可达 39%~40%^[2-5],是制约 SLNB 临床应用的重要原因。本组结果显示:常规病理对 SLN 转移诊断的敏感度为 68.8%,准确率 85.1%。细胞角蛋白 cytokeratin19(CK19)是检测上皮性肿瘤微转移的良好标志,近年来被用于检测微小转移灶取得良好的效果^[2-5]。本研究应用 CK19 RT-PCR 检测淋巴结微转移,检出常规病理阴性的微小转移病例 8 例,使 SLN 检测敏感度升至 90.0%,准确率升至 93.1%,假阴性率降至 18.2%。本组尚有 2 例假阴性,可能与淋巴结一分二取的取材方法有关,转移灶未能包括在行 CK19 RT-PCR 检测的部分或存在跳跃式转移造成^[9,10]。本研究结果表明:前哨淋巴结活检可有效判断乳腺癌腋淋巴结转移状态,应用 CK19 RT-PCR 检测 SLN 的微转移,可提高敏感度及准确率,降低假阴性的发生率,使 SLNB 临床广泛应用成为可能。

参考文献

- 1 Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, et al. Sentinel node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph nodes[J]. Lancet, 1997, 349(9069): 1864~1867
- 2 Ishida M, Kitamura K, Kinoshita J, et al. Detection of micrometastasis in the sentinel lymph nodes in breast cancer [J].

Surgery, 2002, 131(1 suppl):S211~216

- 3 Matsumoto M, Natsugoe S, Ishigami S, et al. Lymph node micrometastasis and lymphatic mapping determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in pN0 gastric carcinoma[J]. Surgery, 2002, 131(6):630~635
- 4 Yoshioka S, Fujiwara Y, Sugita Y, et al. Real-time rapid reverse transcriptase-polymerase chain reaction for intraoperative diagnosis of lymph node micrometastasis: Clinical application for cervical lymph node dissection in esophageal cancers [J]. Surgery, 2002, 132(1):34~40
- 5 冯玉梅,郝希山,于泳,等. CK19 作为微转移癌检测基因标志的假基因干扰及解决方法 [J]. 中华肿瘤杂志,2001,23(4):330~331
- 6 Albertini JJ, Lyman GH, Cox C, et al. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in the patients with breast cancer [J]. JAMA, 1996, 276(22):1818~1822
- 7 Giuliano AE, Jones RC, Brennan M, et al. Sentinel lymphadenectomy in breast cancer [J]. J Clin Oncol, 1997, 15(6): 2345~2350
- 8 Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, et al. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer [J]. Ann Surg, 1994, 220(3):391~401
- 9 Rosen PP, Lesser ML, Kinne DM, et al. Discontinuous or skip metastasis in breast carcinoma: analysis of 1228 axillary dissections [J]. Ann Surg, 1983, 197(3):276~283
- 10 Van Lancker M, Goor C, Sacre R, et al. Patterns of axillary lymph node metastasis in breast cancer [J]. Am J Clin Oncol, 1995, 18(3):267~272

(2003-08-20 收稿)(2003-11-28 修回)

(柏敏霜校对)