DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.23.010
第25卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 23
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)23-2083-03

论著

手术及术后化疗对乳腺癌血液微转移的影响

张 帆,姜 军,杨新华,张 毅,范林军 (第三军医大学附属西南医院乳腺疾病中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨乳腺癌血液微转移发生规律以及手术和术后化疗对血液微转移影响。方法 以40例乳腺癌患者为研究对象,根据临床分期分为3组(0~Ⅰ期、Ⅱ期、Ⅲ期),运用RT-PCR技术,以CK-19 mRNA为标志物,分别检测其术前、术后第2天、术后第1疗程化疗后血液微转移发生情况。结果 ①术前血液微转移阳性率为22.50%(9/40),其中0~Ⅰ期0%(0/6)、Ⅱ期16.00%(4/25)、Ⅲ期55.56%(5/9),3组之间有显著差异($P<0.05$)。浸润性导管癌和浸润性小叶癌阳性率分别为23.08%和33.33%,无显著差异($P>0.05$)。②术后第2天血液微转移阳性率为37.50%(15/40),手术前后血液阳性率无显著差异($P>0.05$)。③术后首次化疗结束血液微转移阳性率为2.50%(1/40),化疗前后血液阳性率差异非常显著($P<0.01$)。结论 临床分期越晚,出现微转移可能性越大。血液微转移与病理类型无关。术后化疗能降低血液中微转移阳性率,是减少术后转移改善预后的重要措施。

关键词:乳腺癌;微转移;外周血;细胞角蛋白19
中图法分类号:R737.9;R73-37;R730.53 文献标识码:A

Effects of operation and postoperative chemotherapy on micrometastasis in blood in breast cancer

ZHANG Fan, JIANG Jun, YANG Xin-hua, ZHANG Yi, FAN Lin-jun (Breast Disease Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effects of operation and postoperative chemotherapy on micrometastasis in blood in breast cancer. Methods A total of 40 cases of breast cancer were divided into three groups (0-Ⅰ, Ⅱ and Ⅲ stages). CK-19 mRNA as the marker of micrometastasis in peripheral blood samples was detected by RT-PCR before operation, on the 2 nd day after operation and the last day of the first course of postoperative chemotherapy, respectively. Results The positive rate of CK-19 mRNA expression in blood was 22.50% (9/40) preoperatively. The positive rates at 0-Ⅰ, Ⅱ and Ⅲ stages were 0% (0/6), 16.00% (4/25) and 55.56% (5/9), respectively. There was significant difference in positive rate between different stages ($P<0.05$). The positive rates of CK-19 mRNA expression in infiltrating ductal carcinoma and infiltrating lobular carcinoma were 23.08% and 33.33%, respectively. No significant difference in positive rate of CK-19 mRNA expression was found between infiltrating ductal carcinoma and infiltrating lobular carcinoma ($P>0.05$). The positive rate of CK-19 mRNA expression in blood on the second day after operation was 37.50% (15/40). There was no significant difference in positive rate of CK-19 mRNA expression in blood between preoperation and the second day after operation ($P<0.05$). The positive rate of CK-19 mRNA expression in blood on the last day of the first postoperative chemotherapy course was 2.50% (1/40). Postoperative chemotherapy showed a significant influence on the CK-19 mRNA expression. Conclusion Micrometastasis is in a stage-dependent manner, but is not related with pathological grading. Postoperative chemotherapy is a kind of routine treatment since it can decrease positive rate of micrometastasis significantly.

Key words: breast carcinoma; micrometastasis; peripheral blood; CK-19

乳腺癌发生远处转移是影响患者预后的重要因素,一旦出现有临床症状的远处转移已属晚期。如果能在发生远处转移的早期及时诊断出"微转移"并加以有效控制,可改善患者预后。本研究通过RT-PCR方法检测乳腺癌患者血液CK-19 mRNA表达,研究其手术前后及化疗前后血液中微转移变化,探讨手术和术后化疗对乳腺癌血液微转移的影响。

作者简介:张 帆(1977-),男,贵州省瓮安县人,硕士,医师,主要从事乳腺癌临床和基础方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68754160
通信作者:姜 军,电话:(023)68754160
收稿日期:2003-08-26;修回日期:2003-09-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 一般资料

为我院2002年5月至2003年2月女性乳腺癌手术患者40例共40侧，年龄34～82岁，平均47.2岁，左侧26例，右侧14例。TNM分期：0期1例，Ⅰ期5例，Ⅱ期25例，Ⅲ期9例。根据临床分期分为3组(0～Ⅰ期、Ⅱ期、Ⅲ期)。病理组织学类型：浸润性导管癌26例，浸润性小叶癌9例，单纯癌2例，浸润性筛状癌、浸润性导管癌伴粘液腺癌、导管内癌均为1例。标本采集时机为：①术前；②术后第2天；③术后第1疗程化疗结束后当天(术后化疗均在术后第7～15天开始进行，方案为CEF：5-氟脲嘧啶500 $mg\cdot m^{-2}\cdot d^{-1}\times 7$；环磷酰胺200 mg/m^2，静脉滴注，隔日1次。表阿霉素50 mg/m^2，静脉滴注，分第1、8天2次给药)。取血部位为对侧上肢浅静脉，弃去注射器抽取的前5 ml血，以减少标本被皮肤细胞污染可能。以同期我院10例良性乳腺疾病患者为对照(取术前血液标本)。

1.2 CK-19 mRNA 检测

1.2.1 引物设计 CK-19 mRNA引物参考相关文献，由生工公司合成，上下游引物序列分别为：5′-GAGGTGGATTC-CGCTCCGGGCA-3′，5′-ATCTTCCTGTCCCTCGAGCAG-3′，预期产物DNA为462 bp。同时以β-actin为内参照，其引物来自鼎国公司RT-PCR试剂盒，其预期产物DNA为540 bp。

1.2.2 RNA提取 在标本获得后6 h内进行，对血液标本以密度梯度离心法进行单个核细胞分离，以Tripure提取得到的单个核细胞RNA，分光光度计检测获得RNA样本D值，确定样本$A_{260}/A_{280}>1.65$，排除RNA酶污染可能。行RN电泳，见清晰的18、28 S两条带，证实RNA无降解，可为RT-PCR反应模板。

1.2.3 RT-PCR反应 使用Promega Access RT-PCR System试剂盒，反应体系25 μl，参照试剂盒说明行一步法CK-19 mRNA RT-PCR扩增，同时每组体系均设立β-actin为内参照。反应条件如下：48 ℃ 45 min，94 ℃ 2 min，进入PCR循环，94 ℃ 30 s、60 ℃ 1 min、68 ℃ 2 min，共40个循环，68 ℃ 7 min终延长，4 ℃保存。

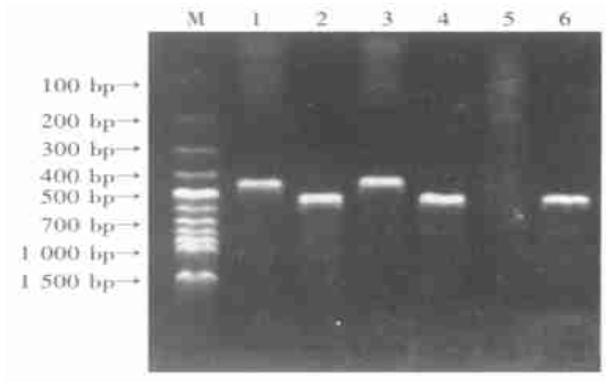
1.2.4 产物鉴定 取反应产物5 μl，行电泳。电泳条件：1×TBE缓冲液，2%琼脂糖凝胶，电压5 V/cm，时间30～40 min。凝胶成像系统观察，如在540 bp处出现清晰条带者可证实RNA无降解和反应体系适当。如反应产物在462 bp处出现清晰条带者为待测标本CK-19 mRNA阳性，无此条带者为阴性。

1.3 统计学处理

采用χ^2检验。

2 结果

RT-PCR检测乳腺癌患者血液中CK-19 mRNA表达结果见图1。



M：Marker；1：Preoperative blood CK-19；2：Preoperative blood β-actin；3：The second day after operative CK-19；4：The second day after operative β-actin；5：The end of postoperative chemotherapy CK-19；6：The end of postoperative chemotherapy β-actin

图1 RT-PCR测乳腺癌患者血液中CK-19 mRNA的表达

Fig 1 Detection of the expression of CK-19 mRNA in blood of patient with breast cancer by RT-PCR

2.1 乳腺癌术前血液CK-19 mRNA检测结果

对照组10例血液中均未检出CK-19 mRNA。乳腺癌组血液CK-19 mRNA阳性率为22.50%(9/40)。其中0～Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期的阳性率分别为0%(0/6)、16.00%(4/25)、55.56%(5/9)。0～Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期3组之间有显著差异($P<0.05$)。

2.2 乳腺癌术后第2天和术后化疗结束后血液CK-19 mRNA检测结果

乳腺癌术后第2天血液CK-19 mRNA阳性率为37.50%(15/40)。其中0～Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期的阳性率分别为0%(0/6)、36.00%(9/25)、66.67%(6/9)。0～Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期3组之间有显著差异($P<0.05$)。乳腺癌术后短程化疗结束当天血液CK-19 mRNA阳性率为2.50%(1/40)，仅在Ⅲ期中检出1例阳性。

2.3 病理类型与CK-19 mRNA表达的关系

浸润性导管癌和浸润性小叶癌术前血液CK-19 mRNA阳性率分别为23.08%(6/26)和33.33%(3/9)，无显著性差异($P>0.05$)。

2.4 手术对CK-19 mRNA表达的影响

术后第2天血液CK-19 mRNA阳性率为37.50%(15/40)，较术前为高，提示手术操作有促使肿瘤细胞进入血液系统的可能。但经统计学分析，手术前后血液CK-19 mRNA阳性率无显著性差异($P>0.05$)。

2.5 术后化疗对乳腺癌血液CK-19 mRNA表达的影响

术后短程化疗结束后血液CK-19 mRNA阳性率为2.50%(1/40)，提示术后化疗能够降低血液CK-19 mRNA阳性率。统计学分析显示：术后化疗前后血液CK-19 mRNA阳性率差异非常显著($P<0.01$)；与术前相比，术后化疗结束后血液CK-19 mRNA阳性率降低亦非常显著($P<0.01$)。

3 讨论

微转移是指常规检查方法不能发现的单个肿瘤细胞或直径小于2 mm的微小转移。由于分子生物和免疫技术的发展，IHC、RT-PCR及流式细胞术在微转移检测中得到广泛应用[1～4]。RT-PCR检测微转移是目前敏感性最高的方法，可检测出$10^6\sim10^7$个细胞中一

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

个肿瘤细胞, 其敏感性分别是 I HC 和流式细胞术的 10 倍和 100 倍以上。应用 RT-PCR 检测微转移的前提是检测能够证实癌存在的标志物。作为上皮来源肿瘤, 表达上皮来源性细胞生物学特征的细胞角蛋白(CK)在间叶组织来源的血液中无表达。基于这一特性, 利用 RT-PCR 技术检测骨髓、血液中 CKmRNA 情况, 可以判断是否存在微转移。CK-19 是具有高度组织特异性和在乳腺癌细胞中广泛表达的细胞角蛋白, 是检测乳腺癌微转移检测最有价值的标志物[5,6]。

3.1　乳腺癌血液微转移与病理分期的关系

本研究中乳腺癌最常见的两种病理类型浸润性导管癌和浸润性小叶癌术前血液微转移阳性率分别为 23.08%和 33.33%, 统计学分析显示该两种病理类型患者血液微转移阳性率无显著差异($P>0.05$), 提示乳腺癌血液微转移与病理类型无关。本组病例检测结果显示在临床分期为 0～Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期的乳腺癌病例中, 术前血液中检出微转移阳性率分别为 0%(0/6)、16.00%(4/25)、55.56%(5/9), 经统计学分析 0～Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期之间有显著差异($P<0.05$), 显示血液微转移与肿瘤分期密切相关, 与临床观察到的中晚期乳腺癌远处转移发生率较高和转移部位较多吻合。

3.2　根治性手术对血液微转移的影响

已有多项研究证实手术刺激增加恶性肿瘤细胞转移。赵增顺等[7]发现: 胃癌根治术中早期结扎肿瘤引流血管者与不结扎引流血管者相比较, 后者术中门静脉血中检出肿瘤细胞可能性更大。陈静等[8]在对恶性肿瘤术中用品进行脱落细胞检测后发现: 60 例恶性肿瘤术中使用的手套、纱布等都不同程度的存在肿瘤细胞附着。Carter 等[9]在一项研究中亦提出: 在根治术前 2 周曾行活检的乳腺癌患者腋窝淋巴结出现的单个肿瘤细胞可能为活检刺激导致。以上表明: 在对恶性肿瘤行手术治疗过程中, 由于机械刺激和沾染等原因可能增加肿瘤转移或术野肿瘤细胞残留。在本组研究中, 术前乳腺癌外周血微转移阳性率为 22.50%(9/40), 术后第 2 天为 37.50%(15/40), 但两者之间无统计学差异, 可能是由于病例数较少所致。

3.3　术后化疗对血液微转移的影响

Engel 等[10]曾经对 1 例乳腺癌患者血液微转移情况用流式细胞术进行动态监测, 发现术中、术后 4 个月、术后 8 个月血液中的肿瘤细胞量分别是 23、1、2 个/μl, 术后 14 个月血液中肿瘤细胞消失。骆成玉等[11]在一项大肠癌术后血液微转移变化研究中显示: 行肿瘤根治术的患者, 术前存在的血液微转移术后很快消失; 如果血液微转移在术后并不消失, 提示有残瘤存在; 微转移在术后一度转阴后再次出现, 提示肿瘤复发; 术后血液微转移反复出现, 提示有隐匿病灶。本研究发现: 乳腺癌患者血液微转移发生率在术前、术后第 2 天、术后第 1 疗程化疗结束当日分别为 22.5%、37.5%、2.5%, 微转移发生随不同治疗阶段而变化。尤其是术后第 1 疗程化疗结束后血液微转移发生率显著降低($P<0.01$), 显示术后辅助化疗对微转移细胞存在杀灭作用。术后辅助化疗的目的包括: 预防复发和控制远处微转移以及对复发转移灶的治疗等。本组用 CEF 方案进行术后化疗, 结果表明术后第 1 疗程化疗结束后微转移检出率显著降低, 证实该化疗方案对乳腺癌术后微转移的治疗有明显疗效。综上结果, 术后化疗能显著降低血液中微转移从而检出率, 应作为减少术后转移, 从而改善预后的重要措施。

参考文献:

[1] Ⅰshida M, Kaoru K, Kinoshita J, *et al*. Detection of micrometastasis in the sentinel lymph nodes in breast cancer[J]. Surgery, 2002, 131(1 Suppl): S211－216.

[2] Weihrauch M R, Skibowski F, Draube A, *et al*. Immunomagnetic enrichment and detection of isolated tumor cells in bone marrow of patients with epithelial malignancies[J]. Clin Exp Metastasis, 2002, 19(7): 617－621.

[3] Leers M, Schoffelen R, Hoop J, *et al*. Multiparameter flow cytometry as a tool for the detection of micrometastatic tumour cells in the sentinel lymph node procedure of patients with breast cancer[J]. J Clin Pathol, 2002, 55(5): 359－366.

[4] Zoli W, Barzanti F, Dal-Susino M, *et al*. Flow-cytometric determination of tumor cells in lymph nodes[J]. Oncology, 2002, 62(2): 128－135.

[5] Schoenfeld A, Kruger K, Gomm J, *et al*. The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19[J]. Eur J Cancer, 1997, 33(6): 854－861.

[6] Zhang J, Shen K W, Liu G, *et al*. Antigenic profiles of disseminated breast tumour cells and microenvironment in bone marrow[J]. Eur J Surg Oncol, 2003, 29(2): 121－126.

[7] 赵增顺, 王少文, 焦喜林, 等. 胃癌根治术对单细胞入血转移的影响[J]. 华人消化杂志, 1998, 6(7): 610－611.

[8] 陈　静, 周金陵, 马红兰. 恶性肿瘤患者手术使用物品脱落细胞阳性率的观察及管理[J]. 解放军护理杂志, 2000, 17(5): 9－10.

[9] Carter B A, Jensen R A, Simpson J F, *et al*. Benign transport of breast epithelium into axillary lymph nodes after biopsy[J]. Am J Clin Pathol, 2000, 113(2): 259－265.

[10] Engel H, Kleespies C, Friedrich M, *et al*. Detection of circulating tumour cells in patients with breast or ovarian cancer by molecular cytogenetics[J]. Br J Cancer, 1999, 81(7): 1165－1173.

[11] 骆成玉, 李世拥. 大肠癌患者门静脉血癌细胞的检测及临床意义[J]. 中华外科杂志, 1999, 37(4): 214－215.

(编辑　刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net