

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.21.008

文章编号: 1005-8982 (2019) 21-0041-04

乳腺癌患者外周血中循环肿瘤细胞 和外泌体的表达及其临床意义*

吴瑛¹, 谭鑫¹, 吴芳兰¹, 袁鲲¹, 贾晓敏²

(1. 长沙市第一医院 检验科, 湖南 长沙 410005; 2. 拉萨市人民医院 病理科,
西藏 拉萨 850000)

摘要: 目的 探讨循环肿瘤细胞 (CTCs) 和外泌体在乳腺癌患者外周血中的表达情况及其临床意义。
方法 收集 87 例乳腺癌患者、40 例乳腺良性肿瘤患者及 20 例健康体检者外周血, 采用 Cell search 系统检测外周血中 CTCs, 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 microRNA-1246 (miR-1246) 的表达。**结果** 乳腺癌患者外周血中 CTCs 为 (4.36 ± 1.08) 个/ml, 高于良性乳腺肿瘤患者和健康体检者 ($P < 0.05$); 乳腺癌患者外周血中 miR-1246 相对表达水平为 (102.94 ± 43.28) , 高于良性乳腺肿瘤患者与健康体检者外周血 miR-1246 ($P < 0.05$)。外周血中 CTCs 诊断乳腺癌的符合率为 68.9%, miR-1246 的诊断符合率为 63.2%; CTCs 联合 miR-1246 诊断乳腺癌的符合率为 81.6%, 3 组间诊断符合率比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。以病理活检为金标准, 外周血 CTCs 和 miR-1246 单独诊断乳腺癌的 κ 值均 < 0.4 (一致性较差); 两者联合诊断乳腺癌 κ 值为 0.46 (具有较好的一致性)。**结论** 外周血中 CTCs 与 miR-1246 联合检测有助于早期发现乳腺癌, 为乳腺癌的个性化检测和治疗提供方向。

关键词: 乳腺肿瘤; 活检; 循环肿瘤细胞; 外泌体

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

Detection of circulating tumor cells and exocrine bodies in peripheral blood of breast cancer and its clinical significance*

Ying Wu¹, Xin Tan¹, Fang-lan Wu¹, Kun Yuan¹, Xiao-min Jia²

(1. Department of Clinical Laboratory, The First Hospital of Changsha, Changsha, Hunan 410005, China;
2. Department of Pathology, Lhasa People's Hospital, Lhasa, Tibet 850000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and clinical significance of circulating tumor cells (CTCs) and exosomes in peripheral blood of patients with breast cancer. **Methods** Peripheral blood of 87 patients with breast cancer, 40 patients with benign breast tumor and 20 healthy controls were collected. CTCs in peripheral blood were detected by Cell search system. The expression of microRNA-1246 was detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** The number of CTCs in peripheral blood of breast cancer patients was (4.36 ± 1.08) /ml, which was higher than that of benign breast cancer patients and healthy control group ($P < 0.05$). The relative expression level of miR-1246 in peripheral blood of breast cancer patients (102.94 ± 43.28) was higher than that of benign breast cancer patients and healthy control group ($P < 0.05$). The coincidence rate of CTCs in diagnosis of breast cancer in peripheral blood (68.9%) was higher than that of microRNA-1246 (63.2%) ($P > 0.05$); the coincidence rate of CTCs combined with microRNA-1246 in diagnosis of breast cancer was 81.6%.

收稿日期: 2019-04-03

* 基金项目: 湖南省财政厅一般项目 (No: 长财教指 (2018) 063 号)

[通信作者] 贾晓敏, E-mail: 445399103@qq.com

There was significant difference among the three methods ($P < 0.05$). According to the gold standard of pathological biopsy, the consistency of blood CTCs and miR-1246 in diagnosis of breast cancer was evaluated by Kappa test. The κ values were < 0.4 , indicating poor consistency. The κ value of peripheral blood CTCs combined with miR-1246 in diagnosis of breast cancer was 0.46, indicating good consistency. **Conclusions** The combined detection of CTCs and microRNA-1246 in peripheral blood is helpful for early detection of breast cancer and provides a direction for individualized detection and treatment of breast cancer.

Keywords: breast neoplasms; biopsy; neoplastic cells, circulating; exosomes

乳腺癌是临床常见的疾病, 是女性死于癌症的第 2 大病因, 临床上一直在寻找更好的检测指标, 以便早期诊断乳腺癌, 达到实时监测的目的。外周血一直是临床可供实时检测的样本, 有助于进行实时的“液体活检”^[1]。乳腺癌传统的检测指标很多, 如癌胚抗原、糖类抗原 Ca 27.59 等, 但由于缺乏足够权威的证据支持, 并未被推荐应用于乳腺癌早期诊断及术后随访复查^[2]。循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTCs) 与外泌体近年来被认为是临床应用前景最好的液体活检指标^[3-4]。因此本研究选择 CTCs 和 microRNA-1246 (miR-1246) 作为检测指标, 探讨其在乳腺癌患者外周血中的表达及其临床意义, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2016 年 1 月—2018 年 10 月长沙市第一医院乳腺癌、乳腺良性肿瘤及健康体检者。乳腺癌患者 87 例 (乳腺癌组)。年龄 (37 ± 11) 岁, 均行病理检查确诊, 术前未接受放射及化学治疗, 常规体检并排除远处转移。收集同期乳腺良性肿瘤患者 40 例 (乳腺良性肿瘤组), 排除身体其他部位恶性肿瘤。年龄 (32 ± 6) 岁; 其中乳腺纤维腺瘤 29 例, 导管内乳头状瘤 11 例。收集同期健康体检者 20 例 (健康组)。均为单纯乳腺增生, 年龄 (31 ± 4) 岁。3 组患者年龄差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。研究经本院医学伦理委员会批准, 所有患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本取样 所有患者及健康体检者取清晨空腹静脉血 2 份, 1 份 5 ml 室温静置约 20 min, 取上清液于 1.5 ml EP 管内, 置入 -80°C 冰箱冷冻保存备用; 1 份 7.5 ml, 进行异常细胞分离。

1.2.2 检测外周血中 CTCs 取患者外周血 7.5 ml, 2 h 内采用美国强生公司 Cell Search 系统进行自动检测及结果分析, CTCs 判断标准为^[5]: ①细胞外形异常, 大小不一, 细胞长径 $> 10 \mu\text{m}$; ②细胞核大且异

形, 核质比 > 1 ; ③上皮细胞黏附分子、细胞角蛋白、DAPI 均为阳性, 且 CD45 阴性。CTCs ≥ 1 为阳性。CTCs ≥ 5 个提示乳腺癌可能。

1.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测各组外周血中 miR-1246 表达

取 400 μl 血清置入 1.5 ml EP 管, 加入 44 μl 10% 聚乙二醇, 于 4°C 冰箱静置 2 h, 4°C 5 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀物。用磷酸盐缓冲液冲洗 3 次, 4°C 5 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 往沉淀物中加入 20 μl 裂解液。按照试剂盒步骤合成 cDNA, 反应体系: RNA 模板 5 μl , 引物、内参 (U6) 各 2 μl , 混合酶 1 μl , $5 \times$ 缓冲液 4 μl , 焦炭酸二乙酯水 6 μl 。引物序列由大连宝生物技术有限公司合成。miRNA-1246: 正向 5'-ACACTCCAGCTGGGAATGGATTTTTGG-3', 反向 5'-ACTGACTGATGATGCAATCTCAACTGGTGTCGTGGA-3'; 内参引物序列: 正向 5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3', 反向 5'-GGAACGCTTCAGAATTG-3'; 逆转录体系 20 μl , 反应条件: 37°C 下逆转录 2 h, 95°C 下金属浴 5 min, 置入 -20°C 冰箱冷冻保存。采用美国 Applied Biosystemes 公司 ABI PRISM 7300 qRT-PCR 仪进行 PCR 反应, 反应体系 20 μl , 反应条件: 95°C 预变性 1 min, 95°C 变性 15 s, 60°C 退火延伸 60 s, 共 40 个循环。美国赛默飞科技公司连续光谱荧光酶标仪自动进行样本检测, 结果 $< 10^3$ copy/ml 为阴性, $\geq 10^3$ copy/ml 为阳性。根据样品 qRT-PCR 曲线得到 Ct 值, $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{miRNA}} - \text{Ct}_{\text{U6}}$; $\Delta\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{乳腺癌}} - \text{Ct}_{\text{对照}}$ 。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计数资料以例 (%) 表示, 比较采用 χ^2 检验; 方差齐性检验采用 F 检验, 比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。通过计算外周血中 CTCs 和 miR-1246 对乳腺癌诊断的敏感性、特异性、准确性、阳性似然比 (positive likelihood ratio,

PLR) 和阴性似然比 (negative likelihood ratio, NLR) 等评估诊断结果。诊断符合率 = CTCs 或 miR-1246 或 CTCs+miR-1246 阳性例数 / 病理阳性例数。应用 Kappa 检验评估诊断一致性, 若 $0.75 < \kappa \leq 1.00$, 说明一致性极好; $0.40 < \kappa \leq 0.75$, 一致性好; $0.00 \leq \kappa \leq 0.40$, 则一致性差。

2 结果

2.1 3 组外周血中 CTCs 和 miR-1246 表达情况

3 组外周血中 CTCs 和 miR-1246 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 血清 miR-1246 界值为 98.32。见表 1。

表 1 3 组外周血中 CTCs 和 miR-1246 表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CTCs (个/ml)	miR-1246
乳腺癌组	87	4.36 ± 1.08	102.94 ± 43.28
良性乳腺肿瘤组	40	1.22 ± 0.94	70.33 ± 16.52
健康组	20	0.63 ± 0.09	47.61 ± 10.85
F 值		1.287	6.385
P 值		0.000	0.000

2.2 乳腺癌患者外周血中 CTCs 和 miR-1246 诊断符合率比较

外周血中 CTCs 与 miR-1246 诊断乳腺癌的符合率比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.458, P = 0.499$); CTCs、miR-1246 及 CTCs 联合 miR-1246 三者诊断乳腺癌

的符合率比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 6.378, P = 0.041$)。miR-1246 与 CTCs 联合 miR-1246 诊断乳腺癌的符合率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.365, P = 0.007$); CTCs 与 CTCs 联合 miR-1246 诊断乳腺癌的符合率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 3.738, P = 0.053$)。见表 2。

表 2 乳腺癌患者外周血中 CTCs 和 miR-1246 诊断符合率 例 (%)

病理诊断结果	n	CTCs	miR-1246	CTCs+ miR-1246
乳腺癌	87	60 (68.9)	55 (63.2)	71 (81.6)
良性乳腺肿瘤	24	6 (25.0)	5 (20.8)	7 (33.3)
合计	111	66 (59.5)	60 (54.5)	78 (70.2)

2.3 乳腺癌患者外周血中 CTCs 和 miR-1246 诊断乳腺癌结果比较

以病理活检为金标准, 外周血中 CTCs 诊断敏感性为 69.0%, 特异性为 75.0%。外周血中 CTCs 诊断乳腺癌的 κ 值为 $0.34 < 0.40$, 表示一致性较差; 外周血中 miR-1246 诊断乳腺癌敏感性为 63.2%, 特异性为 79.2%。经 Kappa 检验评估血 miR-1246 诊断乳腺癌 κ 值为 $0.29 < 0.40$, 表示一致性较差。外周血中 CTCs 联合 miR-1246 诊断乳腺癌敏感性为 81.6%, 特异性为 70.8%。经 Kappa 检验评估血 CTCs 联合 miR-1246 诊断乳腺癌 κ 值为 $0.46 > 0.40$, 表示具有较好的一致性。见表 3。

表 3 乳腺癌患者外周血中 CTCs 和 miR-1246 诊断乳腺癌的结果

检查方法	敏感性 / %	特异性 / %	准确性 / %	阳性预测值 / %	阴性预测值 / %	Youden 指数	PLR	NLR	κ
CTCs	69.0	75.0	70.3	90.9	40.0	0.440	2.76	0.41	0.34
miR-1246	63.2	79.2	66.7	91.7	37.3	0.424	3.04	0.46	0.29
CTCs+ miR-124	81.6	70.8	79.3	91.0	51.5	0.524	2.79	0.26	0.46

3 讨论

早期乳腺癌的 5 年生存期远远高于晚期浸润性乳腺癌, 早期发现是改善乳腺癌预后的关键因素。液体活检是指采用无创方法提取患者的体液 (血液、尿液、唾液和乳汁等), 并分析其中的肿瘤组织衍生的生物学标志物: 如 CTCs、循环肿瘤 DNA 和外泌体等^[6]。因为外周血可以作为重复采集且随时提取, 相对无法多次重复取材的肿瘤组织, 可以做到实时液体活检, 用来识别早期乳腺癌。相当多的证据表明转移扩散是由

原发肿瘤中具有侵袭血流能力的细胞介导, 血液中的 CTCs 是其中具有重要意义的细胞成分, 可以在骨、肺、肝或脑中形成远处转移之前, 传播到较远的部位, 是疾病扩散的主要载体之一。CTCs 有望成为所有疾病阶段的一种强大的非侵入性实时可测量生物标志物^[7-8]。但 CTCs 比较少见, 且不易被发现, 在很长一段时间内处于静止状态, 加上其表达一些分子和细胞特征, 严重妨碍研究和开发^[9]。外周血中收集到的 CTCs 数量少, 且不可避免地会受到循环白细胞的污染^[10-11]。JANNI

等^[12]发现在原发性乳腺癌患者中, CTCs 是疾病缓解不佳、无病生存不良等的预测因素, 虽然亦有明确的证据显示转移性乳腺癌患者外周血 CTCs 与预后相关, 但在初次诊断时 CTCs 与预后相关性研究较少。

外泌体是一种小的分泌囊泡, 是内质体来源的纳米 (50 ~ 150 nm) 大小囊泡, 由多种细胞类型分泌, 含有细胞蛋白、脂质和 miRNA, 被认为在细胞通讯中发挥重要作用。在乳腺癌中, 通过蛋白质和 mRNA 等多种生物活性分子的水平转移, 而逐渐成为局部或系统细胞间肿瘤信息传导媒介并在肿瘤进展中发挥重要作用^[13-14]。外泌体选择性地包裹着表明其细胞来源的 miRNA^[15]。miRNA 因其肿瘤特异性表达谱而成为癌症发生和发展中有前途的生物标志物, 浸润前和浸润期乳腺癌组织和晚期乳腺癌患者血清中均有常见的 miRNA 表达, 且培养的乳腺癌细胞或导管灌洗标本外泌体中含有的某些 miRNA 与正常乳腺上皮细胞分泌的不同。有研究^[16]发现, 乳腺癌外泌体中 miRNA 具有独特的恶性特征, 可作为乳腺癌的循环生物标志物, 事实上, 很多研究均对这种可能性进行评估, 现在的研究理论认为循环 miRNA, 无论是在膜结合的囊泡内, 还是与蛋白复合物相关, miRNA 均有不同的群体, 这些群体可能来源于不同的细胞类型, 反映不同的释放机制。但由于血液中 miRNA 存在种群内在异质性, 因而尚未确定乳腺癌组织和血清/血浆中异常表达的循环 miRNA, 亦无法确定其生物标志物。因而选择合适的外泌体 miRNA 极为重要。有研究^[17]发现, miR-21 和 miR-1246 等微小 RNA 在人乳腺癌外泌体中选择性富集, 在乳腺癌血浆中显著升高。且发现携带 miRNA 的外泌体可以通过直接摄取在不同细胞系之间转移。miR-1246 在转移性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中较非转移性乳腺癌细胞或非恶性乳腺癌细胞高表达, 本研究中证实 miR-1246 和 CTCs 在外周血中表达高于良性乳腺肿瘤和健康组, miR-1246 联合 CTCs 检测与病理检测符合率较好。

综上所述, 外周血中 CTCs 与 miR-1246 联合检测有助于早期发现乳腺癌。miR-1246 和 CTCs 可能作为乳腺癌标志物的候选分子, 是乳腺癌中有前途的生物标志物。

参 考 文 献:

- [1] 谭国强, 林绍强. 液体活检在乳腺癌中的研究进展 [J]. 暨南大学学报 (自然科学与医学版), 2017, 38(5): 411-416.
- [2] 徐君南, 孙涛. 液体活检在乳腺癌精准诊断和治疗中的研究进展 [J]. 辽宁医学杂志, 2018, 32(1): 14-17.
- [3] PANTEL K, ALIX-PANABIÈRES C. Functional studies on viable circulating tumor cells [J]. Clin Chem, 2016, 62(2): 328-334.
- [4] LOWRY M C, GALLAGHER W M, O'DRISCOLL L. The role of exosomes in breast cancer [J]. Clin Chem, 2015, 61(12): 1457-1465.
- [5] SHIOMI-MOURI Y, KOUSAKA J, ANDO T, et al. Clinical significance of circulating tumor cells (CTCs) with respect to optimal cut-off value and tumor markers in advanced/metastatic breast cancer [J]. Breast Cancer, 2016, 23(1): 120-127.
- [6] 周金妹, 史方浩, 马艳, 等. 液体活检技术在乳腺癌诊治中的应用进展 [J]. 实用肿瘤杂志, 2016, 31(5): 414-418.
- [7] APPIERTO V, di COSIMOS, REDUZZI C, et al. How to study and overcome tumor heterogeneity with circulating biomarkers: the breast cancer case [J]. Semin Cancer Biol, 2017, 44: 106-116.
- [8] HALL C, VALAD L, LUCCIA. Circulating tumor cells in breast cancer patients [J]. Crit Rev Oncog, 2016, 21(1/2): 125-139.
- [9] BANY S P, ALUCHOWSKI M, KRAWCZYK N, et al. Circulating tumor cells in breast cancer--current status and perspectives [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2016, 97: 22-29.
- [10] MALTONI R, GALLERANI G, FICI P, et al. CTCs in early breast cancer: A path worth taking [J]. Cancer Lett, 2016, 376(2): 205-210.
- [11] KARAGIANNIS G S, GOSWAMIS, JONES J G, et al. Signatures of breast cancer metastasis at a glance [J]. J Cell Sci, 2016, 129(9): 1751-1758.
- [12] JANNI W J, RACK B, TERSTAPPEN L W, et al. Pooled analysis of the prognostic relevance of circulating tumor cells in primary breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(10): 2583-2593.
- [13] JIA Y, CHEN Y, WANG Q, et al. Exosome: emerging biomarker in breast cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(25): 41717-41733.
- [14] PHILLEY J V, KANNAN A, GRIFFITH D E, et al. Exosome secretome and mediated signaling in breast cancer patients with nontuberculous mycobacterial disease [J]. Oncotarget, 2017, 8(11): 18070-18081.
- [15] WU C Y, DU S L, ZHANG J, et al. Exosomes and breast cancer: a comprehensive review of novel therapeutic strategies from diagnosis to treatment [J]. Cancer Gene Ther, 2017, 24(1): 6-12.
- [16] HANNAFON B N, TRIGOSO Y D, CALLOWAY C L, et al. Plasma exosome microRNAs are indicative of breast cancer [J]. Breast Cancer Res, 2016, 18(1): 90-104.
- [17] LI X J, REN Z J, TANG J H, et al. Exosomal microRNA MiR-1246 promotes cell proliferation, invasion and drug resistance by targeting CCNG2 in breast cancer [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(5): 1741-1748.

(王荣兵 编辑)