

反转录荧光定量聚合酶链反应联合检测 hMAM 和 BCL-2 在乳腺癌诊断中的应用

李春梅(四川省中西医结合医院检验科,成都 610041)

【摘要】 目的 研究反转录荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(BCL-2)和乳腺癌人乳腺珠蛋白(hMAM)基因在外周血循环肿瘤细胞(CTCs)中的表达水平,探讨 BCL-2 和 hMAM 2 种乳腺癌相关基因联合检测在乳腺癌诊断中的临床应用价值。**方法** 采用 RT-qPCR 法,并以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内对照检测健康对照组(55 例)、乳腺癌组(171 例)和良性乳腺疾病组(91 例)外周血 CTCs 中 BCL-2 和 hMAM 的表达水平。**结果** 外周血 CTCs 中 BCL-2 和 hMAM 在健康对照组和良性乳腺疾病组表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),乳腺癌组表达水平高于健康对照组、良性乳腺疾病组,差异有统计学意义($P<0.05$)。hMAM 和 BCL-2 联合检测灵敏度显著高于单一基因。**结论** 联合检测外周血 CTCs 中 hMAM 和 BCL-2 基因表达水平可提高乳腺癌诊断的灵敏度,有效辅助临床诊断乳腺癌。

【关键词】 反转录荧光定量聚合酶链反应; B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因; 人乳腺珠蛋白; 乳腺癌
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.10.019 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)10-1349-02

Application of combined detection of hMAM and BCL-2 by reverse transcription quantitative fluorescence polymerase chain reaction in diagnosis of breast cancer LI Chun-mei (Department of Clinical Laboratory, Sichuan Provincial Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Chengdu, Sichuan 610041, China)

【Abstract】 Objective To investigate the reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) for detecting the expression levels of B-cell lymphoma/leukemia-2(BCL-2) and human breast cancer mammary-globin(hMAM) gene in peripheral blood circulating tumor cells(CTCs) and their combined detection's clinical application value in diagnosing breast cancer. **Methods** The expression levels of BCL-2 and hMAM were detected in the health control group(55 cases), 171 cases of breast cancer and 91 cases of benign breast diseases by RT-qPCR. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene(GAPDH) was used as internal control. **Results** The levels of BCL-2 and hMAM had no statistically significant differences between the healthy control group and benign breast disease group($P>0.05$). The levels of BCL-2 and hMAM in the breast cancer group were found to be significantly higher than those in the healthy control group and benign breast diseases group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The sensitivity of combined detection of BCL-2 and hMAM genes was significantly higher than that of single gene detection. **Conclusion** The combined detection of BCL-2 and hMAM in peripheral blood by RT-qPCR could improve the sensitivity for diagnosing breast cancer and effectively assists the clinical diagnosis of breast cancer.

【Key words】 reverse transcription quantitative fluorescence PCR; BCL-2; hMAM; breast cancer

乳腺癌是女性常见恶性肿瘤之一,主要依靠病理学作为诊断依据。无论是发达国家还是发展中国家,乳腺癌发病率都在逐年上升。近年来,随着分子生物学的迅猛发展,乳腺癌相关基因成为人们的关注热点,及时准确地为乳腺癌提供早期诊断、治疗和判断预后的可靠试验依据^[1-2]。本试验采用反转录荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)法,检测 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(BCL-2)和乳腺癌人乳腺珠蛋白(hMAM)基因在健康对照组(55 例)、乳腺癌组(171 例)和良性乳腺疾病组(91 例)外周血循环肿瘤细胞(CTCs)中的表达水平,探讨 RT-qPCR 联合检测 BCL-2 和 hMAM 基因在乳腺癌诊断中的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 健康对照组 55 例,年龄 26~78 岁;良性乳腺疾病组 91 例,年龄 31~75 岁;乳腺癌组 171 例,年龄 33~81 岁。均来自本院住院和门诊,初诊者并经病理学证实。171 例

乳腺癌中 96 例浸润性导管癌、28 例黏液癌、47 例乳腺单纯癌。91 例良性乳腺肿瘤中 40 例脂肪瘤、51 例纤维瘤。所有患者均在术前 1 周内清晨取血 5 mL(EDTA 抗凝)。

1.2 仪器与试剂 反转录反应体系、7500 Fast Sequence Detector 分析仪为美国 ABI 生物公司生产,FQ-PCR 反应体系来自美国 ABI 生物公司。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 的提取和 cDNA 合成 取静脉血 5 mL,弃去初始 1 mL,防上皮细胞污染,EDTA(1 mg/mL)抗凝,生理盐水稀释 2~3 倍,采用淋巴细胞分离液提取淋巴细胞,采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取细胞总 RNA。cDNA 合成(Takara,大连宝生生物工程公司):反转录反应体系 20 μ L;包括 M-MLV 反转录酶 1 μ L,细胞总 RNA 10 μ L,去 RNA 酶水 4 μ L,随机引物 1 μ L,5 $\times$ 反转录反应缓冲液 4 μ L。37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 6 s。

1.3.2 RT-qPCR 引物 PE 公司 Primer Express 软件设计甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、hMAM 和 BCL-2 引物序列,由上海基康生物有限公司合成。cDNA 合成:细胞总 RNA 1 μg, RNasin 20 U,随机引物 200 ng,m-mLV 反转录酶 20 U,5×反转录反应缓冲液 4 μL,42 ℃ 60 min。

1.3.3 RT-qPCR 反应 GAPDH 为内对照,2 μL 合成缓冲液,0.2 μL 的 dNTP(10 mmol/L),0.15 μL BSA(10 μg/μL),0.5 μL 引物(10 μmol/L),氯化镁 1 μL(25 mmol/L),0.1 μL DNA 聚合酶,1.0 μL 水解探针(3 μmol/L)和 DEPC-H₂O(加至 10 μL)。循环条件为:95 ℃ 3.5 min;95 ℃ 10 s,退火 55 ℃ 20 s,延伸 72 ℃ 30 s,45 个循环。联合检测中,以 BCL-2 和 hMAM 有 1 种为阳性,判断结果判断阳性。

1.4 统计学分析 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析,计量资料用方差分析,计数资料采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 BCL-2 和 hMAM 在外周血 CTCs 中的表达 BCL-2 和 hMAM 在健康对照组和良性乳腺疾病组的表达水平差异无统计学意义($P>0.05$);乳腺癌组显著高于健康对照组和良性乳腺疾病组,差异有统计学意义($P<0.05$);GAPDH 在 3 组间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1、2。

表 1 3 组间 BCL-2 基因表达水平的比较($\bar{x}\pm s$)				
组别	<i>n</i>	BCL-2 ($\times 10^2$ copy/mL)	GADPH ($\times 10^5$ copy/mL)	BCL-2/GADPH ($\times 10^{-3}$)
健康对照组	55	4.13±0.17*	3.05±0.11	1.35±0.04
良性乳腺疾病组	91	4.21±0.16*	3.07±0.12	1.37±0.05
乳腺癌组	171	20.19±4.42	3.03±0.11	6.66±1.72

注:与乳腺癌组比较,* $P<0.05$ 。

表 2 3 组间 hMAM 基因表达水平的比较($\bar{x}\pm s$)				
组别	<i>n</i>	hMAM ($\times 10^2$ copy/mL)	GADPH ($\times 10^5$ copy/mL)	hMAM/GADPH ($\times 10^{-3}$)
健康对照组	55	6.23±1.17*	3.05±0.12	2.04±0.11
良性乳腺疾病组	91	6.25±1.09*	3.06±0.11	2.04±0.10
乳腺癌组	171	31.74±5.67	3.04±0.10	10.44±2.31

注:与乳腺癌组比较,* $P<0.05$ 。

2.2 BCL-2 和 hMAM mRNA 联合检测对乳腺癌诊断灵敏度和特异度的比较 结果显示,联合检测 BCL-2 和 hMAM mRNA 的灵敏度显著高于单一基因检测灵敏度。见表 3。

表 3 BCL-2 和 hMAM 对乳腺癌诊断灵敏度和特异度的比较(%)		
基因	灵敏度	特异度
BCL-2	48.0	80.1
hMAM	44.4	82.2
BCL-2+hMAM	59.6	76.0

3 讨 论

hMAM 和 BCL-2 基因是目前研究较多的乳腺癌相关基因,在 30%~45%的乳腺癌中有 BCL-2 或 hMAM 基因扩增或

过度表达。hMAM 基因是由相关学者于 1996 年报道乳腺癌相关基因,为子宫珠蛋白家族成员之一,定位于人染色体 11q13 区域。由于 hMAM 仅限于成人乳腺组织表达,在乳腺癌细胞株和乳腺肿瘤中有过度表达,使其成为潜在乳腺癌诊断标志物^[3]。BCL-2 基因位于 18q21,是 1 种可阻止 caspase-9 活化,抑制凋亡的原癌基因,若该基因表达异常,会对乳腺癌、胃癌、肺癌等的形成、进展和预后造成很大影响^[4]。迄今为止,国内对 2 种基因的联合检测报道甚少。

目前,有报道用免疫组织化学法检测乳腺组织中 BCL-2 和 hMAM 基因^[5-8],但存在操作复杂、标本来源不易等问题。本研究采用 RT-qPCR 法检测外周血 CTCs 中乳腺癌相关基因 BCL-2 和 hMAM 的表达水平,从基因水平进行分析探讨,且标本易获取,方法灵敏度和特异度较强,试验结果发现在健康对照组和良性乳腺疾病组中 BCL-2 和 hMAM 差异无统计学意义,而乳腺癌组显著高于健康对照组和良性乳腺疾病组。进一步分析发现,2 种相关基因联合检测灵敏度显著高于单一基因,提示联合检测可提高对乳腺癌诊断的灵敏度。

RT-qPCR 法能快速检测外周血中 BCL-2 和 hMAM 基因表达水平,联合检测有利于提高乳腺癌诊断灵敏度,操作方便简单,标本来源容易,可作为乳腺癌辅助诊断和治疗的实验室依据。

参考文献

[1] 汪付兵,涂建成. 核酸技术在乳腺癌实验诊断中的进展[J]. 中华检验医学杂志,2013,36(11):978-982.

[2] Lianidou ES,Markou A,Strati A. Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer:challenges and promises for individualized cancer treatment[J]. Cancer Metastasis Rev,2012,31(3/4):663-671.

[3] 陈月凤,杨华伟,莫钦国,等. CK19 和 hMAM 及 SBEM 检测乳腺癌微转移价值分析[J]. 中华肿瘤防治杂志,2014,21(3):198-202.

[4] 犹东,高平. BCL-2、p53、CD44V6、nm23-H1 基因在食道鳞癌中的表达及其与预后的关系[J]. 宁夏医学杂志,2010,32(3):206-209.

[5] 张丙信,赵霞,郭兵,等. p53、bcl-2 和 bax 在基底细胞样乳腺癌中的表达及其临床意义[J]. 现代医学,2015,43(3):307-311.

[6] 贺广珍,李金运,张敬川. 乳腺癌组织中 BP1 与 Bcl-2 表达相关性的临床意义[J]. 现代肿瘤医学,2013,21(9):2002-2006.

[7] Yeniduny SB,Ayrak RH,Altas H. Predictive value of pathological and immunohistochemical parameters for axillary lymphodeme-tastasis inbreast carcinoma[J]. Diagn Pathol,2011,20(3):618-619.

[8] 李文仿,张华,王明华,等. 检测乳腺癌组织中乳腺珠蛋白 mRNA 的表达及临床意义[J]. 现代肿瘤医学,2014,22(6):1312-1314.