

# 实时定量 PCR 检测乳腺癌患者内皮素-1 的表达及其临床意义\*

潘小平<sup>1</sup>, 洪晓绿<sup>2</sup>, 蔡高涛<sup>1</sup> (广州市花都区人民医院: 1. 检验科; 2. 感染科 510800)

**【摘要】目的** 检测内皮素-1(EDN-1)基因在乳腺癌患者外周血中的表达情况,并探讨它在乳腺癌的发生、发展中的作用。**方法** 选取 2013 年 1 月 1 日至 2014 年 5 月 20 日在花都区人民医院接受乳腺手术且经病理学证实为乳腺癌的患者 54 例纳入试验组,另选取同期体检健康女性 60 例纳入对照组。采用实时定量聚合酶链反应(PCR)检测所有研究对象外周血 EDN-1 的表达情况,并分析其与各临床参数的关系。**结果** 乳腺癌患者外周血 EDN-1 表达水平高于体检健康女性,组间比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),其表达水平为健康女性人群的 5.877 倍;EDN-1 的表达水平与患者的年龄和肿瘤的组织类型均无关( $P > 0.05$ ),与患者的肿瘤大小、区域淋巴结转移情况、是否有远处转移密切相关( $P < 0.05$ )。**结论** EDN-1 基因与乳腺癌的发生、发展关系密切,实时定量 PCR 可以敏感、特异地检测乳腺癌患者外周血中 EDN-1 的表达,可以为乳腺癌的筛查与早期诊断提供帮助,宜在临床工作中开展。

**【关键词】** 内皮素-1 基因; 乳腺癌; 实时定量聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.05.005 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)05-0587-04

**Determination of endothelin-1 expression in breast carcinoma by using real-time quantitative PCR and its clinical significance\*** PAN Xiao-ping<sup>1</sup>, HONG Xiao-lu<sup>2</sup>, CAI Gao-tao<sup>1</sup> (1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Infection, Huadu District People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510800, China)

**【Abstract】Objective** To detect the expression of endothelin-1(EDN-1) gene in peripheral blood of the patients with breast carcinoma, and to investigate its role in the occurrence and development of breast carcinoma. **Methods** A total of 54 patients with pathologically confirmed breast carcinoma receiving operation in our hospital from 1st Jan. 2013 to 20th May 2014 were selected as the experimental group. Other 60 healthy women of physical examination were selected as the control group. The real-time quantitative PCR was adopted to detect the expression of EDN-1 gene in peripheral blood of all objects. The relationships between the EDN-1 gene expression and clinicopathological parameters were analyzed. **Results** The expression of peripheral blood EDN-1 gene in the patients with breast carcinoma was significantly higher than that in healthy women, the difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ), and the expression level of EDN-1 gene was 5.877 times higher than that of healthy women. The expression level of EDN-1 had no correlation with the age of patients and the pathological types of breast carcinoma ( $P > 0.05$ ), while had close correlation with the tumor size, regional lymph node metastasis and distant metastasis ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** EDN-1 gene might closely correlated with the occurrence and development of breast carcinoma. The real-time quantitative PCR could sensitively and specifically detect the peripheral blood expression of EDN-1 gene in breast carcinoma, which might be helpful for the screening and early diagnosis of breast carcinoma and could be carried out in clinical practice.

**【Key words】** endothelin-1 gene; breast carcinoma; real-time quantitative PCR

内皮素(EDN)是一种细胞因子,它包括 EDN-1、EDN-2 和 EDN-3,其传导系统在细胞的增殖、分化及转移过程中起重要作用<sup>[1]</sup>。大量研究表明,EDN 传导系统的改变可以调节细胞的存活率,增强细胞的侵袭力,最终导致肿瘤的发生<sup>[2]</sup>。本研究采用实时定量聚合酶链反应(实时定量 PCR)检测 EDN-1 在乳腺癌中的表达情况,研究其与乳腺癌的关系,为探索乳腺癌的发生、发展提供新的证据,从而为乳腺癌的诊断和治疗提供新的途径。

## 1 资料与方法

**1.1 标本来源** 选取 2013 年 1 月 1 日至 2014 年 5 月 20 日

在本院接受乳腺手术且经病理学证实为乳腺癌的女性患者 54 例纳入试验组,患者年龄 33~74 岁,平均(50.1±10.4)岁,其中年龄不超过 50 岁者 32 例,>50 岁者 22 例。参照 2003 年版世界卫生组织(WHO)乳腺癌分类标准,其中 T<sub>1</sub> 期 40 例、T<sub>2</sub> 期 11 例、T<sub>3</sub> 期 1 例、T<sub>4</sub> 期 2 例;区域淋巴结转移 N<sub>0</sub> 期 36 例, N<sub>1-3</sub> 期 18 例;远处转移 M<sub>0</sub> 期 45 例, M<sub>1</sub> 期 9 例;组织类型中导管型 36 例,小叶型 18 例。另选取本院同期体检健康女性 60 例纳入对照组,年龄 23~74 岁,平均(40.9±12.3)岁。

**1.2 仪器及试剂** C1000 Thermal cycler 聚合酶链反应(PCR)仪(美国 Bio-RAD 公司),7300 荧光定量 PCR 仪(美国

\* 基金项目:广州市医药卫生科技项目(20131A011187)。

作者简介:潘小平,男,硕士,主管检验技师,主要从事临床生化与分子诊断学研究。

ABI公司), AF100 制冷机(意大利 Scotsman 公司), UV-1750 紫外分光光度仪(日本岛津公司), ABI 3900 台式高通量 DNA 合成仪(美国 Invitrogen 公司)。Trizol 购自美国 Invitrogen 公司(批号 9109); 焦碳酸二乙酯(DEPC)购自美国 Sigma 公司; 脱氧核糖核酸酶 I (DNase I) 购自美国 Promega 公司(批号 M610A); SYBR Premix EX Taq II Kit(批号 RR820A)和 PrimeScriptTMRT reagent Kit(批号 RR047A)均购自日本 TaKa-

Ra 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 引物设计与合成** 在美国国家生物信息中心(NCBI) 核酸序列数据库(Genebank)上查找目的基因和内参基因 mRNA 序列, 采用 Primer express 2.0 软件设计引物, 利用 ABI 3900 台式高通量 DNA 合成仪对引物序列进行合成, 引物序列见表 1。

表 1 试验引物序列

引物名称		引物序列 (5'↔3')	基因编号	位置	产物大小(bp)
β-actin	上游引物	GCA TGG GTC AGA AGG ATT CCT	NM001101.3	221-241	106
	下游引物	TCG TCC CAG TTG GTG ACG AT			
EDN-1	上游引物	TCA ACA CTC CCG AGC ACG T	NM001955.4	555-573	96
	下游引物	CAC GGT CTG TTG CCT TTG TG			

**1.3.2 外周血总 RNA 提取及 cDNA 合成** 使用 Trizol Reagent 试剂盒提取所有研究对象的外周血总 RNA, 随后采用 RNase-free 的 DNase I 试剂盒提纯总 RNA。取 1 μL RNA 样品稀释 50 倍, 在紫外分光光度仪上测定吸光度(A)比值( $A_{260}/A_{280}$ ), 检测 RNA 纯度; 取 1 μL RNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳 80 V, 20 min, 凝胶成像系统观察总 RNA 的 5s 核糖体 RNA (5s rRNA), 18s rRNA 和 28s rRNA 条带, 鉴定 RNA 抽提质量。取 4 μL RNA, 应用随机引物和 PrimeScript™ RT reagent Kit 反转录试剂盒合成 cDNA, 总体积 20 μL, 反应条件: 37 °C 15 min, 然后 85 °C 5 s, -80 °C 保存备用。

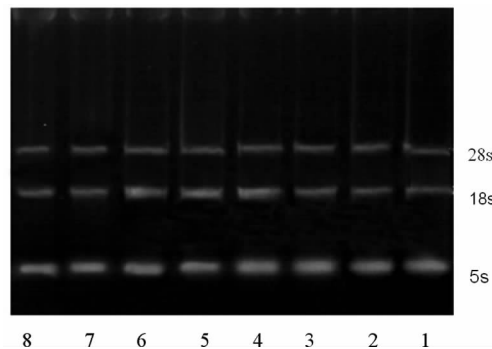
**1.3.3 实时定量 PCR** 配制 25 μL 实时定量 PCR 反应体系, 其中 cDNA 2 μL, 脱氧核糖核苷三磷酸(dNTPS)0.5 μL, Taq 酶 0.5 μL, 10×PCR 反应缓冲液 2.5 μL, 10 pmol/μL 上、下游引物各 0.5 μL, 蒸馏水 18.5 μL。反应条件: 93 °C 2 min, 然后 93 °C 15 s, 55 °C 25 s, 72 °C 25 s, 共 40 个循环。设定溶解曲线程序: 93 °C 1 min, 60 °C 15 s, 60 °C 10 s, 从 60 °C 缓慢升温至 93 °C, 每升高 0.5 °C 检测 1 次荧光信号值, 反应结束仪器自动生成循环阈值(Ct 值)及溶解曲线图。将 cDNA 以 10 倍倍比稀释, 以  $1, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$  cDNA 作为模板, 同时对 EDN-1、β-actin 进行实时定量-PCR, 检测其扩增效率是否一致。

**1.4 统计学处理** 本实验定量计算采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[3]</sup>, 其中,  $\Delta Ct =$  目的基因平均 Ct 值 - 内参基因平均 Ct 值,  $-\Delta\Delta Ct =$  (待测组目的基因平均 Ct 值 - 待测组内参基因平均 Ct 值) - (对照组目的基因平均 Ct 值 - 对照组内参基因平均 Ct 值)。采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据处理与统计学分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 均经过正态性检验和方差齐性检验; 对于正态分布的计量资料两组间比较采用 *t* 检验, 组间的两两比较采用 S-N-K 法; 对于非正态分布的计量资料两组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验; 相关性分析采用 Pearson 相关性分析; 以  $\alpha = 0.05$  为检验水准,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 RNA 纯度及抽提质量** 将提纯的 RNA 在紫外分光光度仪上测定  $A_{260}/A_{280}$  比值均在 1.8~2.0, 证明制备的 RNA 较纯, 无蛋白质污染。凝胶成像系统观察总 RNA 的 5s rRNA、18s rRNA 和 28s rRNA 条带清晰可见, 证明总 RNA 抽提比较

完整。见图 1。



注: 1~8 号孔为不同样本的总 RNA。

图 1 总 RNA 的 5s rRNA、18s rRNA 和 28s rRNA 电泳图

**2.2 溶解曲线图** EDN-1 和 β-actin 各自的溶解曲线只有一条主峰, 无其他杂峰干扰, 溶解温度均在 82 °C 左右, 证明实时定量 PCR 产物并非引物二聚体或其他杂带, 特异性较好。见图 2~3。

**2.3 扩增效率检测** 倍比稀释的 cDNA, 经实时定量 PCR 后, 以拷贝数的对数为横坐标, 以 Ct 值为纵坐标, 拟合作图, 得到 EDN-1 与 β-actin 的标准曲线, 斜率分别为 -3.395 231 及 -3.399 973, 相关系数分别为 0.999 259 及 0.999 408, 说明定量结果准确可靠; 根据斜率分别计算出基因扩增效率:  $E_{EDN-1} = 0.97$ ,  $E_{\beta-actin} = 0.97$  (扩增效率  $E = 10^{-1/\text{斜率}} - 1$ ), 证明 EDN-1 与 β-actin 的扩增效率相同, 可采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析本试验结果。

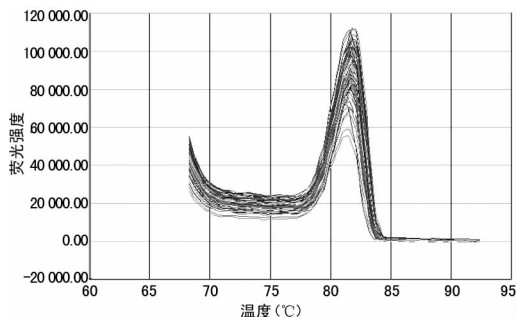


图 2 EDN-1 产物溶解曲线图

## 2.4 实时定量 PCR 结果

**2.4.1 两组 EDN-1 的表达水平比较** 乳腺癌患者 EDN-1 的

表达水平较对照组明显增加,其表达水平为对照组的 5.877 倍,组间 EDN-1 表达水平比较差异有统计学意义( $r=8.246, P=0.000$ )。见表 2。

**2.4.2 乳腺癌患者 EDN-1 的表达与各临床参数的关系** 各年龄段及各肿瘤组织类型的患者 EDN-1 表达水平比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ );而不同肿瘤大小,不同区域淋巴结转移情况,以及有、无远处转移的患者 EDN-1 表达水平比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。

**2.4.3 乳腺癌患者  $\Delta$ Ct 均值与各临床参数的相关性分析**  $\Delta$ Ct 均值同样与患者的年龄和肿瘤的组织类型无明显相关性( $P>0.05$ );与是否有远处转移密切相关( $r=-0.290, P<0.05$ ),与肿瘤的大小和区域淋巴结转移情况显著性相关( $r=-0.622, -0.427, P<0.01$ ),见表 3。

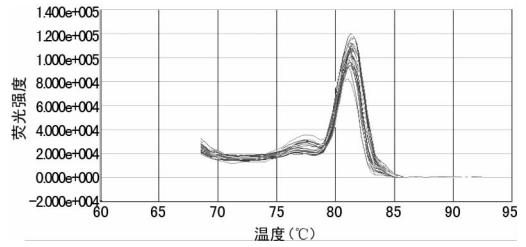


图 3  $\beta$ -actin 产物溶解曲线图

表 2 两组 EDN-1 的表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	$\Delta$ Ct	$-\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct
试验组	54	$-3.114\pm 1.483$	$2.555\pm 1.324$	$5.877(2.347\sim 14.713)$
对照组	60	$-0.559\pm 1.790$		

表 3 乳腺癌患者 EDN-1 的表达水平与各临床参数的关系( $\bar{x}\pm s$ )

临床参数	n	$\Delta$ Ct 均值	$-\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct	t	P
年龄(岁)						
≤50	32	$-2.936\pm 1.351$	$2.377\pm 0.439$	$5.195(3.832\sim 7.042)$	1.131	0.292
>50	22	$-3.372\pm 1.655$	$2.813\pm 0.135$	$7.027(6.400\sim 7.717)$		
肿瘤大小						
T <sub>1</sub>	40	$-2.573\pm 1.114$	$2.014\pm 0.676$	$4.039(2.528\sim 6.453)$	32.755	0.000
T <sub>2~4</sub>	14	$-4.658\pm 1.333$	$4.099\pm 0.457$	$17.136(12.484\sim 23.523)$		
区域淋巴结						
N <sub>0</sub>	36	$-2.670\pm 1.344$	$2.111\pm 0.446$	$4.320(3.171\sim 5.885)$	11.578	0.001
N <sub>1~3</sub>	18	$-4.001\pm 1.375$	$3.442\pm 0.415$	$10.868(8.151\sim 14.491)$		
远处转移						
M <sub>0</sub>	45	$-2.923\pm 1.450$	$2.364\pm 0.340$	$5.148(4.067\sim 6.516)$	4.788	0.033
M <sub>1</sub>	9	$-4.068\pm 1.333$	$3.509\pm 0.457$	$11.385(8.294\sim 15.627)$		
组织类型						
导管型	36	$-2.922\pm 1.370$	$2.363\pm 0.420$	$5.144(3.845\sim 6.883)$	1.839	0.181
小叶型	18	$-3.498\pm 1.662$	$2.939\pm 0.128$	$7.669(7.018\sim 8.381)$		

### 3 讨 论

EDN 广泛表达于脑、骨骼肌、胰腺、小肠、睾丸等组织中<sup>[4]</sup>。EDN 经前体蛋白翻译后,裂解出一种含有 21 个氨基酸的生物活性物质<sup>[5]</sup>,它们通过自分泌和旁分泌的方式与细胞表面的 EDN-A 和 EDN-B 受体(EDNRA 和 EDNRB)相互作用<sup>[6]</sup>,参与细胞的生物功能,如细胞的增殖、分化及诱导细胞转移等<sup>[7]</sup>。有研究证实,EDN 与许多肿瘤有关,如卵巢癌、前列腺癌、成骨细胞瘤等<sup>[8-10]</sup>。然而,EDN 能否导致乳腺癌的发生,以及它与乳腺癌的发展、转移等过程是否有关联却少见报道。

因此,本研究采用本实验室建立的实时定量 PCR 反应体系及条件,检测了 54 例乳腺癌患者及 60 例体检健康女性全血 EDN-1 水平,结果发现,乳腺癌患者全血 EDN-1 表达水平较对照组明显增加,其表达水平为对照组的 5.877 倍,组间比较差异有统计学意义( $P<0.01$ ),说明 EDN-1 与乳腺癌的发生有明显的相关性,该结论与 Wulfing 等<sup>[11]</sup>报道相同。进一步在乳腺癌各临床变量之间比较 EDN-1 表达水平发现,EDN-1 的表达水平与患者的年龄和肿瘤组织类型无关( $P>0.05$ ),说明

无论乳腺癌患者的年龄处在什么阶段,EDN-1 都会高度表达,并且在小叶型和导管型乳腺癌中 EDN-1 均会大量表达。但在不同肿瘤大小、区域淋巴结转移情况,以及有、无远处转移的患者间比较中,EDN-1 的表达存在差异,肿瘤越大,其表达水平越高;乳腺癌伴随有淋巴结转移,且淋巴结转移的数目越多,EDN-1 的表达水平也越高;乳腺肿瘤若转移至其他器官,EDN-1 的表达水平也会增加,这说明 EDN-1 与乳腺癌的发展有明显的相关性。而苗瑞政等<sup>[12]</sup>采用放射免疫分析法检测 EDN-1 水平,不同肿瘤大小间比较并无差异,这与本研究结果有所不同,可能与采用不同的乳腺癌分类方法和不同的检测方法有关。

本实验只研究了 EDN-1 在乳腺癌患者中的表达情况,缺乏两者之间因果关系的研究,即未能说明是乳腺癌的发生导致了 EDN-1 水平的增加,还是因为 EDN-1 的改变导致乳腺癌的发生。同时也缺乏 EDN 的其他两个成员(EDN-2 与 EDN-3)在乳腺癌中的表达情况的研究,缺乏三者之间的比较。但有研究表明,大鼠和狗体内 EDN-3 能负性调节 EDN-1 的生物活性<sup>[13]</sup>,提示在人体组织或癌性组织中,EDN-1 的高表达可能也

受到 EDN-3 的调节,但有待进一步的研究证实。另外,EDN-1 在乳腺癌组织中的表达是否与外周血中的表达情况一致,也是本课题需要进一步研究的内容。

综上所述,乳腺癌患者 EDN-1 的表达水平较健康女性有明显增加,与患者的年龄和肿瘤的组织类型无关,而与肿瘤的大小、区域淋巴结转移情况、是否有远处转移有明显的关联性,证明 EDN-1 的增加与乳腺癌的发生、发展关系密切。而实时定量 PCR 可以敏感、特异地检测乳腺癌患者外周血中 EDN-1 的表达,能为乳腺癌的筛查与早期诊断提供帮助。临床工作中,将 EDN-1 作为乳腺癌的辅助检查之一,可以为临床诊治提供及时、准确的参考,宜在临床工作中开展。

#### 参考文献

- [1] Levin ER. Endothelins[J]. *N Engl J Med*, 1995, 333(6): 356-363.
- [2] Grimshaw MJ, Hagemann T, Ayhan A, et al. A role for endothelin-2 and its receptors in breast tumor cell invasion[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(7): 2461-2468.
- [3] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [4] Grimshaw MJ. Endothelins and hypoxia-inducible factor in cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2007, 14(2): 233-244.
- [5] Grimshaw MJ, Hagemann T, Ayhan A, et al. A role for endothelin-2 and its receptors in breast tumor cell invasion[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(7): 2461-2468.
- [6] Bagnato A, Catt KJ. Endothelin as autocrine regulators of tumor cell growth[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 1998, 9

(9): 378-383.

- [7] Smollich M, Wulfig P. The endothelin axis: a novel target for pharmacotherapy of female malignancies[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2007, 5(3): 239-248.
- [8] Rosano L, Spinella F, Salani D, et al. Therapeutic targeting of the endothelin A receptor in human ovarian carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(10): 2447-2453.
- [9] Carducci MA, Padley RJ, Breul J, et al. Effect of endothelin-A receptor blockade with atrasentan on tumor progression in men with hormone-refractory prostate cancer: a randomized, phase II, placebo-controlled trial[J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(4): 679-689.
- [10] Yin JJ, Mohammed KS, Kakonen SM, et al. A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(19): 10954-10959.
- [11] Wulfig P, Diallo R, Kersting C, et al. Expression of endothelin-1, endothelin-A, and endothelin-B receptor in human breast cancer and correlation with long-term follow-up[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(11): 4125-4131.
- [12] 苗瑞政, 吴泰璜, 刘乃青, 等. 乳腺癌手术前后血浆内皮素-1 的变化和临床意义[J]. *中国现代普通外科进展*, 2005, 8(6): 375.
- [13] Mitaka C, Hirata Y, Ichikawa K, et al. Effects of TNF-α on hemodynamic changes and circulating endothelin-derived vasoactive factors in dogs[J]. *Am J Physiol*, 1994, 267(4 Pt 2): H1530-H1536.

(收稿日期: 2014-10-16 修回日期: 2014-12-10)

(上接第 586 页)

时可能会面临各方面的压力,因此要求医师提供及时、合理的术前诊断与治疗、严格把握手术适应证、提高术中操作技术、加强围术期管理,最终使广大患者受益。

#### 参考文献

- [1] 庄俊锋, 林锡汉, 庄丹, 等. 结肠损伤 I 期手术治疗 48 例分析[J]. *中国医药科学*, 2012, 2(6): 180-182.
- [2] 牙韩年. 探讨结肠损伤一期手术治疗的安全性和有效性[J]. *中国中医药咨讯*, 2012, 4(3): 191.
- [3] Morris CR, Harvey IM, Stebbings WS, et al. Epidemiology of perforated colonic diverticular disease[J]. *Postgrad Med J*, 2002, 78(925): 654-658.
- [4] 姚希贤, 蒋树林. 结肠憩室病[J]. *中国实用内科杂志*, 2000, 20(2): 83-85.
- [5] 王玉梅. 老年性结肠穿孔 103 例临床分析[J]. *中国医药指南*, 2013, 11(22): 41-42.
- [6] Falidas E, Mathioulakis S, Vlachos K, et al. Stercoral per-

foration of the sigmoid colon. A case report and brief review of the literature[J]. *G Chir*, 2011, 32(8/9): 368-371.

- [7] Makarawo TP, Damadi A, Mittal VK, et al. Colonoscopic perforation management by laparoendoscopy: an algorithm[J]. *JSLs*, 2014, 18(1): 20-27.
- [8] Alfonso-Ballester R, Lo Pez-Mozos F, Mart-Obiol R, et al. Laparoscopic treatment of endoscopic sigmoid colon perforation: a case report and literature review[J]. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*, 2006, 16(1): 44-46.
- [9] 汪建平. 大肠癌并急性肠梗阻的处理[J]. *中国实用外科杂志*, 2000, 20(8): 459-461.
- [10] 李廷坚, 吴佩雁, 郭于涛. 急诊一期切除吻合治疗结肠癌急性梗阻[J]. *中国基层医药*, 2004, 11(4): 422-423.
- [11] 汪建平, 唐远志, 董文广. 结直肠癌并急性肠梗阻的外科处理: 附 225 例临床分析[J]. *中国胃肠外科杂志*, 1999, 2(2): 79-81.

(收稿日期: 2014-11-15 修回日期: 2014-12-28)