

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2010. 09. 015

乳腺癌生物标志物表达状态的时间变异性

臧爱华¹, 冉凤鸣¹, 张 菁³, 陈琼荣², 胡 胜¹

Changes in Biological Marker Status During Breast Cancer Progression

ZANG Ai-hua¹, RAN Feng-ming¹, CHEN Qiong-rong², HU Sheng¹, ZHANG Jin³

1. Department of Oncology Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, China; 2. Department of Pathology; 3. Department of Internal Medicine, The people's Hospital of Yuan'an, Hubei Province
Corresponding Author: HU Sheng, E-mail: ehusmn@yahoo. com. cn

Abstract: Objective To evaluate the biological marker status during breast cancer progression for long-term survival patients with breast cancer in China. **Methods** One hundred and sixty-eight breast cancer patients with a long-term follow-up time (more than 5 years) were collected. The tissue samples from 27 patients with metachronous recurrence were obtained. HER-2, ER and PR status were detected by immunohistochemistry or Her-2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization. The relationships between HER-2 and HR expression and the relationships between the original treatments and the secondary chemotherapy for recurrence were evaluated. **Results** We obtained 27 samples from 36 recurrence patients. For metachronous recurrence metastases, the HER-2 status changed in 18. 5% (5/27). Three patients changed from positive to negative, while 2 patients converted from negative to positive. A change in ER status was observed in 7 cases (25. 9%): 5 cases from positive to negative and 2 cases from negative to positive. PR status changed in 2 cases from positive to negative and in 0 case from negative to positive. There was no significant correlations between the changes of HER-2 and the initial radiochemotherapy, anti-HR therapy. However, it was involved in down-regulation of HR expression(Fisher exact test = 0. 026). In Kaplan-Meier analysis, patients with changes of HER-2 or HR expression had a mildly poor response to chemotherapy and progress-free survival (33. 4 vs. 38. 6 months, Log-rank = 1. 96, P = 0. 16), compared with the patients without changes. **Conclusion** HER-2 and HR status had been changed during breast cancer progression in the metachronous recurrence patients. So it is necessary to re-evaluate those biomarkers should be neoplastic tissue from metastatic site, whenever possible, for the recurrence patients.

Key words: Breast cancer; HER-2; ER; PR; Variation

摘 要:目的 探讨乳腺癌患者复发前后 HER-2 和激素受体表达是否存在时间变异性。**方法** 收集 168 例长期随访(>5 年)的乳腺癌患者不同时间点的组织标本,并通过免疫组织化学进行 HER-2、ER 和 PR 检测,比较不同时间点上上述生物标志的差异,同时分析与患者原始治疗和复发后治疗的关系。**结果** 168 例乳腺癌患者中,36 例复发,对其中 27 例复发组织标本进行检测。发现 5 例患者出现 HER-2 表达状态的变化,其中 3 例 HER-2 下调,2 例上调;7 例出现 ER 变化:5 例 ER 表达下调,2 例 ER 表达上调。2 例出现 PR 下调。HER-2 的表达变化与复发前放化疗无明显联系,但抗激素治疗导致 HR 表达下调,激素受体变化对随后的化疗治疗效果稍差(76% vs. 88%, P = 0. 21),无疾病进展时间相似(33. 4 月 vs. 38. 60 月, Log-rank = 1. 96, P = 0. 16)。**结论** 乳腺癌患者 HER-2 和激素受体的表达可以随时间变异,复发患者需要再次检测上述生物标志。

关键词: 乳腺癌; HER-2; ER; PR; 变异

中图分类号:R737. 9 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2010)09-1031-04

收稿日期:2009-06-11;修回日期:2010-01-08
基金项目:湖北省卫生厅科研基金资助项目(2005AA304B06)
工作单位:1. 430079 武汉,湖北省肿瘤医院肿瘤内科, 2. 病理科;3. 湖北省远安县人民医院内科
通信作者:胡胜, E-mail: ehusmn@yahoo. com. cn
作者简介:臧爱华(1956-),女,本科,主任医师,主要从事肿瘤化疗、内分泌治疗、姑息治疗的研究。

0 引言

癌症是基因发生异常的疾病,包括癌基因的激活和肿瘤抑制基因功能的丢失,但这种改变不是一蹴而就的,而是随时间延长的逐步积累过程^[1]。激素受体(HR,包括雌激素和孕激素)和人表皮生长因子受体(HER-2)是乳腺癌治疗的两个重

要靶点。HER-2 和 HR 过度表达或扩增一般在原发肿瘤诊断时评估,即使对数年后发生转移癌的患者,治疗选择也是依据此^[2]。然而,多个研究已经发现,同时诊断的原发肿瘤和转移部位生物标志的表达缺乏一致性,HER-2 差异在 0%~34%之间;同样,ER(雌激素受体)和 PR(孕激素受体)的表达在原发肿瘤与复发肿瘤也存在明显的不一致^[3]。但是在大多数情况下,由于数据由相对较小的回顾性研究得出,因此各中心的结果不完全一致,也存在相反的结论。而且,对于不同时间点的表达结果进行比较的研究还很少^[4]。

我国乳腺癌患者是否存在上述变异现象,肿瘤细胞什么时间出现生物行为改变,受哪些因素的调节,对后续治疗的影响尚不清楚,因此复发患者的激素受体及 HER-2 变异以及与治疗的关系将是本研究的目的。

1 资料和方法

1.1 患者的选择

收集 2003 年 5 月—2009 年 3 月在湖北省肿瘤医院进行治疗的女性乳腺癌,其中随访达 5 年以上有完整资料的患者 287 例。因标本保存不全和标本检测技术难度影响,排除 119 例。最终进行资料分析的有 168 例(57 例 10 年,111 例 5 年),一般资料见表 1。

168 例乳腺癌患者中,36 例复发,其中 27 例能进行复发病灶的检测。对于复发性肿瘤,活检或手术切除的转移部位是:局部区域的软组织(13 例),淋巴结(14 例)。从初次诊断到转移出现的中位时间为 45.7 月(范围 8.2~141.7 月)。

在随访过程中,在开始的 2 年每 3 月进行临床、血液和生化指标的检测,在 3~5 年每 6 月进行检测,5 年后每 1 年进行信函或电话随访。在第 1 年,进行 2 次肝脏 B 超和胸部 X 线拍片,以后每年 1 次。

1.2 结果判定标准

乳腺癌的诊断依据 2003 年 WHO 乳腺癌病理分类标准,所有病理切片均由两名病理科医师进行独立阅片。ER、PR、HER-2 的检测采用 SP 法。HER-2 的结果判定依据美国 ASCO/CPA 评分方法,ER、PR 的结果判定依据欧洲评分方法。

1.3 免疫组织化学染色

肿瘤标本包埋前在 10%中性福尔马林缓冲液固定 24~48h。所用的抗体:HER-2 单克隆抗体(克隆号 CB11),雌激素受体(ER,克隆号 6F11),孕

激素受体(PR,克隆号 1E2)。所用抗体和 SP 法免疫组化试剂盒均购自 Dako 公司。

SP 法染色步骤按说明书操作,显微镜下进行评估。

表 1 168 例女性乳腺癌患者一般临床资料
Table 1 Clinical characteristics of all patients

Clinical parameter	Cases(n = 168)
Age(years)	52.3(32~67)
Histologic type	
Ductal	76
Lobular	49
Lobular + ductal	22
Other	21
Stages	
I	22
II	73
III	58
IV	15
Classification	
1	38
2	82
3	48
ER	
+	52
-	116
PR	
+	59
-	109
HER-2	
+	43
-	125
Treatment	
Postoperation chemotherapy	87
Postoperation radiotherapy	23
Postoperation radiochemotherapy	47
No treatment	11

Note:Chemotherapy including hormone therapy

免疫组织化学 ER 和 PR 阳性为≥10%的肿瘤细胞核着色。HER-2 评估采用美国 ASCO/CAP 乳腺癌 HER-2 检测指南推荐的半定量方法:HER-2 阴性为 IHC 0~+,<10%的肿瘤细胞弱的、不完整膜着色或无着色;HER-2 不确定为 IHC ++,≥10%~30%的肿瘤细胞较弱而有完整的膜着色;HER-2 阳性为 IHC +++,>30%的肿瘤细胞有完整而强的膜着色。

1.4 FISH 分析

使用 PathVysion HER-2 的 DNA 探针试剂盒 (Vysis 公司), 含两个标记的 DNA 探针组成。HER-2 的探针, 跨越整个 HER - 2 的基因 (17q 11. 2-q12), 被标记为的 Spectrum 橙色; CEP 17 探针, 可以与染色体 17p11. 1-q11. 1 的卫星 DNA 杂交, 被标记为绿色。选择 3 μ m 厚的石蜡包埋组织切片, 其中含有足够的癌细胞, 常规脱蜡水化。

自然干燥组织切片, 然后在乙醇(75%~100%)中脱水。将样本片放入 70%的甲酰胺 和 2 $\times$ SSC 74 $^{\circ}$ C 孵育 30min 变性 DNA。然后加 10 μ l 杂交探针到切片的目标区, 并立即 22mm $\times$ 22mm 的盖玻片立刻覆盖反应区, 使探针溶液弥漫整个覆盖区。将封好的片子放入 37 $^{\circ}$ C 预热的杂交盒中, 盖紧盖子, 37 $^{\circ}$ C 孵育 18~24 h。挪去树胶和盖玻片, 将片子立即放入 74 $^{\circ}$ C 装有 0. 4 $\times$ SSC/0. 3% NP-40 的溶液中, 漂洗 3s 左右。然后在 1 000ng/ml DAPI/ Anti-fade(4. 6 - diamidine - 2 -phenylindole, Vysis 公司)对目标区域复染。在 Zeiss Axioscope 荧光显微镜观测结果(橙, 绿, DAPI 滤镜), 计数 60 个非重叠的细胞核。使用照相机获得代表图像。

分析 HER-2 基因的橙色信号和 CEP17 绿色信号, 如果 HER-2/CEP17 比 >2 , 即定义为 HER-2 基因扩增阳性。

总体而言, 免疫组织化学中样本被认为是 + + 和 + + +, 则进行原位杂交。如果免疫组织化学和原位杂交的结果不一致, HER-2 的表达以 FISH 的结果为依据。

1.5 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料的比较采用 χ^2 检验和精确概率法, 均数的比较采用 t 检验和方差分析 (Avona), 以 $P<0. 05$ 为差异有统计学意义。随访的生存曲线进行 Kaplan-Meier 统计。数据处理采用 SPSS12. 0 统计软件。

2 结果

2.1 HER-2 和激素受体的变化

IHC 检测 HER-2 表达 + + + 见图 1a, FISH 检测 HER-2 阳性的表达见图 1b。在 27 例患者中, 发现 5 例 (18. 5%) 出现 HER-2 表达状态的变化, 3 例 HER-2 下调, 2 例上调。7 例 (25. 9%) 出现 ER 变化, 5 例 ER 表达下调, 2 例 ER 表达上调。2 例 (7. 4%) 出现 PR 变化, 2 例下调, 0 例上调, 见表 2。

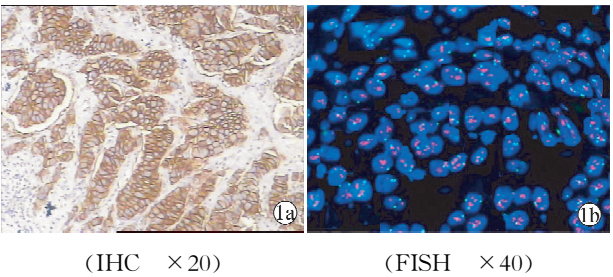


图 1 HER-2 在乳腺癌中的阳性表达
Figure 1 The positive expression of HER-2 in breast cancer

表 2 复发患者生物标志的变化 (n=27)

Table 2 Status of the biomarkers in the breast carcinomas from the pretreatment and relapse (n=27)		
	Pretreatment	Relapse
ER status		
+	9	4
		5
-	18	16
		2
PR		
+	10	8
		2
-	17	17
HER-2*		
+	9	6
		3
-	18	16
		2

Note: * :immunohistochemical analysis + ~ + + 为阴性, + + + 为阳性(or FISH 阳性)

2.2 复发前的治疗与 ER、PR 和 HER-2 表达改变的关系

5 例 HER-2 变化的患者中, 5 例进行化疗, 与未发生变化患者的化疗比例相似 (5/5 vs. 18/22, $\chi^2 = 2. 2, P = 0. 09$)。但对如激素受体, 比未抗激素治疗者 (0/5, Fisher 确切概率 = 0. 026), 进行内分泌治疗的患者 (10 例) 更容易从阳性转为阴性 (7/10)。

2.3 HR 和 HER-2 表达状态与复发后治疗的关系

出现 HER-2 和激素受体变化的患者化疗反应率低于无生物标志变化的患者 (85. 7% vs. 90%, $P = 0. 91, 4$ 周期后评估), 无疾病进展时间稍短 (33. 4 月 vs. 38. 6 月, Log-rank = 1. 96, $P = 0. 16$), 但差异无统计学意义, 见图 2。

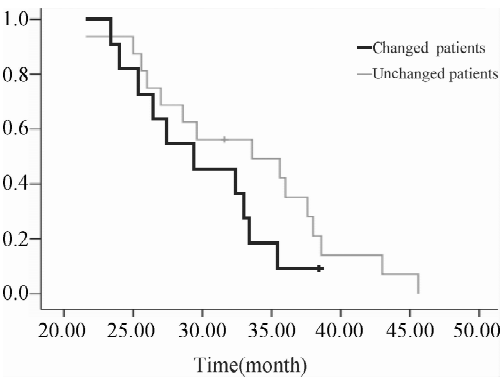


图 2 HER-2 和激素受体变化与无变化患者的无疾病进展时间比较

Figure 2 Comparison of progress-free disease between changed and unchanged HER-2 and hormone receptor patients

3 讨论

HER-2/NEU 过表达与乳腺癌患者的预后较差有关,编码的酪氨酸激酶受体也是重要的治疗靶点。高达 25% 的乳腺癌患者存在 HER-2 过表达,人源性单克隆抗体 trastuzumab 单独或与化疗药物联合可以有效治疗这类患者^[5]。然而,HER-2 表达的检测通常使用的是原发肿瘤的组织样本,若开始检测为阴性,则不再考虑进行 trastuzumab 治疗,而且也不进行另外的组织学检测,以评估是否发生的 HER-2 表达变化^[6]。

在肿瘤形成以后的发展过程中,经过治疗干预,肿瘤的生物学区行也会出现或丢失,即某些原来没有的生物学区性状突然出现,或者已经有的癌基因通路活性丢失^[7]。1993 年,Niehans 等回顾性评估 30 例死于乳腺癌患者的尸检样本,发现 1 例转移灶与原发灶的 HER-2 染色(3%)不一致。随后有多个研究比较 HER-2 在乳腺癌中的原发性肿瘤和远处转移,发现原发性乳腺癌和相应的局部复发、淋巴结转移和远处转移的 HER-2 表达不一致,约为 25%^[8-9]。但 2000 年,Shimizu 等以免疫组织化学评估 21 例患者 HER-2 的蛋白水平,发现 HER-2 在原发性肿瘤和转移之间的表达无显著差异。然而,随后 382 例患者的大样本报告中,发现变异率为 33.2%(127 例)。最近,Meng 等^[10]发现,来源于原发肿瘤的循环癌症细胞(circulating tumour cells, CTC)中 HER-2 表达状态随着时间改变。在 HER-2 阴性的复发患者中,24 个患者的 CTC 被检测,发现 9 个(38%)患者出现了 HER-2 的重新扩增,此发现与传统的观点不一致(HER-2 阴性的原发肿瘤不会改变其生物学行为)。更重要的是,这些患者进行 trastuzumab 治疗后,3 个出现反应。

目前,HER-2 和激素受体的表达是乳腺癌的内分泌治疗和靶向治疗的唯一选择依据,但以原发肿瘤诊断时的参数进行评估。即使国家综合癌症网(NCCN)也建议尽可能进行转移灶的活检^[11],但很少得到关注,尤其是当转移部位难以活检时。因此,对大多数患者的临床治疗仍然是根据初始评估。但 HER-2 的表达状态随着疾病的进展会发生改变,提示对于乳腺癌患者,开始的抗 HER-2 治疗无效,并不能说明在疾病进展后也无效。

本研究发现,乳腺癌复发患者 18.5% 的会出现 HER-2 表达的变化,比国外报道的稍低(25% 左右),可能原因是本研究的病例数较少。但是,也不能排除人种的差异,因为从原发肿瘤 HER-2 的阳性率看,也低于国外。而且由于复发转移的样本难以取得,使研究难以随机化。HR 的变异率(33.3%)与国外^[12]的报导相似(21%~37%)。

HER-2 扩增变化的机制尚未完全理解。可能的解释包括了肿瘤的发展过程中遗传变异,异质性,也有治疗选择的作用。但是,本研究并未发现 HER-2 扩增变化与放化疗存在明显的联系,有可能病例数太少不能显示差异,也有可能是进行抗 HER-2 治疗较少,常规细胞毒化疗不能影响具体的细胞信号通路。但是,ER 和 PR 的表达,可能反映了获得性抗激素治疗的抵抗。驱动机制不太清楚,因为也存在向相反的方向变化。所以,对观察到的现象,在治疗中的作用不能被排除在外。不过,我们的免疫组织化学资料显示,原发性肿瘤 HER-2 阴性而复发转移灶阳性超过相反的变化(阳性→阴性),符合 HER-2 肿瘤的侵袭性增强的事实^[13]。

另一个可能的解释是 HER-2 蛋白表达在原发肿瘤的 HercepTest™ 低估,这可能是由于大多数样本是多年之前的,因此蛋白质有可能发生降解,从而大大影响检测结果^[14]。

对于发生变异的患者,治疗效果稍差,原因也可能是肿瘤在进展中,恶性程度增加。如 1 例 HER-2 变为阳性的患者进行了赫赛汀治疗,通过随访,生存时间 36 月,1 例变为阴性的患者,出现化疗抵抗。

由于本研究的患者人数相对有限(复发标本难以取得),不允许我们得出十分肯定的结论。然而,分子亚型有可能随着时间的推移而变化,因此在复发患者考虑进行靶向治疗时,尽可能的再次对转移病灶活检^[15]。而且对于其他癌症靶向治疗过程中,复发患者治疗的选择,甚至疗程的选择也有借鉴意义。

related genes in the progression of superficial bladder cancer [J]. *Ann Oncol*,2003,14(1):85-90.

[8] Chai J, Du C, Wu JW, et al. Structure and Biochemical Basis of Apoptotic Activation by Smac/DIABLO[J]. *Nature*,2000, 406(6798):855-862.

[9] Yoichi M, Hiroyuki N, Kosuke Y, et al. Downregulation of Smac/DIABLO expression in renal cell carcinoma and its prognostic significance[J]. *Am J Clin Oncol*,2005,23(3):448-454.

[10] Ma L, Huang Y, Song Z, et al. Livin promotes Smac/DIAB-

LO degradation by ubiquitin-proteasome pathway [J]. *Cell Death Differ*,2006,13(12):2079-2088.

[11] 陈晓,杨春鹿,赵君,等. 非小细胞肺癌组织 Livin 和 Smac 蛋白表达及其临床意义的研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*,2008,15 (12):905-909.

[12] 王慧敏,顾康生,孟刚. Livin 和 Smac 在 T 细胞淋巴瘤中的表达及意义[J]. *临床肿瘤学杂志*,2008,13(7):603-606.

[编辑:安 凤;校对:周永红]

(上接第 1034 页)

参考文献:

[1] Ulrich CM, Robien K, McLeod HL. Cancer pharmacogenetics: polymorphisms, pathways and beyond[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(12): 912-920.

[2] Chung CH, Bernard PS, Perou CM, et al. Molecular portraits and the family tree of cancer [J]. *Nat Genet*, 2002, 32 (Suppl): 533-540.

[3] Michor F, Iwasa Y, Nowak MA. Dynamics of cancer progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004,4(3):197-205.

[4] Simon R, Nocito A, Hübscher T, et al. Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001,93(15):1141-1146.

[5] Guarneri V, Giovannelli S, Ficarra G, et al. Comparison of HER-2 and hormone receptor expression in primary breast cancers and asynchronous paired metastases: impact on patient management [J]. *Oncologist*, 2008,13(8):838-844.

[6] Hermeking H. The MYC oncogene as a cancer drug target [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2003,3(3):163-175.

[7] Dawood S, Resetkova E, Gonzalez-Angulo AM. Trastuzumab administration associated with change in HER2 status [J]. *Clin Breast Cancer*, 2008,8(4):366-369.

[8] Gong Y, Booser DJ, Sneige N. Comparison of HER-2 status determined by fluorescence in situ hybridization in primary and metastatic breast carcinoma [J]. *Cancer*, 2005,103(9):1763-1769.

[9] Neubauer H, Gall C, Vogel U,et al. Changes in tumour biological markers during primary systemic chemotherapy (PST) [J]. *Anticancer Res*, 2008,28(3B):1797-1804.

[10] Meng S, Tripathy D, Shete S, et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004,101(25):9393-9398.

[11] V. 2. 2008. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Breast Cancer[S].

[12] Arens N, Bleyl U, Hildenbrand R. HER2/neu, p53, Ki67, and hormone receptors do not change during neoadjuvant chemotherapy in breast cancer [J]. *Virchows Arch*, 2005,446 (5):489-496.

[13] Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, et al. Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase [J]. *J Clin Oncol*, 2005,23(11):2469-2476.

[14] Regitnig P, Schippinger W, Lindbauer M, et al. Change of HER-2/neu status in a subset of distant metastases from breast carcinomas[J]. *J Pathol*, 2004,203(4):918-926.

[15] Santinelli A, Pisa E, Stramazotti D,et al. HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy [J]. *Int J Cancer*, 2008,122(5):999-1004.

[编辑:杨 卉;校对:周永红]