

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.08.021

CD44⁺/CD24^{-/low}在乳腺癌中的表达及其与含蒽环类药物化疗方案敏感度的关系

周鑫¹, 吴诚义²

Relationship of CD44⁺/CD24^{-/low} with Responsiveness of Breast Cancer to Anthracycline-based Chemotherapy

Zhou Xin¹, Wu Chengyi²

1. Department of Breast Surgery, Chongqing Cancer Institute, Chongqing 400030, China; 2. Department of Endocrine and Breast Surgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University
Corresponding Author: Wu Chengyi, E-mail: 24277759@qq.com

Abstract: Objective To evaluate the expression of CD44⁺/CD24^{-/low} and the relationship between CD44⁺/CD24^{-/low} and the response to anthracyclines-based chemotherapy in patients with breast cancer. **Methods** A total of 91 patients with breast cancer were treated with anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy, and the clinical response to the chemotherapy was obtained after 2 to 4 cycles. Double-staining immunohistochemistry was used to detect the expression of CD44⁺/CD24^{-/low} in paraffin-embedded tissues of pre-chemotherapy and post-chemotherapy. Data was analyzed via t test and Chi-square test. **Results** The expression rate of CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype was 39.6% (36/91). The proportions of CD44⁺/CD24^{-/low} cells were significantly increased after anthracyclines-based chemotherapy ($P = 0.028$). The positive rate of ER in CD44⁺/CD24^{-/low} positive group was lower than that in CD44⁺/CD24^{-/low} negative group (25.0% vs. 47.3%, $P = 0.033$). And the expression rate of CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype in triple negative breast cancer was higher than that in non-triple negative breast cancer (61.9% vs. 32.9%, $P = 0.017$). There was no significant correlation between CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype and the other clinicopathological parameters, such as age, tumor size, TNM classification, pathological type, histological grade and so on ($P > 0.05$). The overall response of CD44⁺/CD24^{-/low} positive group was higher but had no difference compared with CD44⁺/CD24^{-/low} negative group (75% vs. 69.1%, $P = 0.542$), and the rate of pathological complete remission (pCR) in CD44⁺/CD24^{-/low} positive group was higher than that in CD44⁺/CD24^{-/low} negative group (38.9% vs. 18.2%, $P = 0.028$). **Conclusion** CD44⁺/CD24^{-/low} cells are demonstrated in certain breast cancer, CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype is associated with triple negative breast cancer and the responsiveness of breast cancer to anthracycline-based chemotherapy. CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype may be used as one of the indicators to evaluate the clinical chemotherapeutic response of the patients with breast cancer.

Key words: Breast cancer; CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype; Triple negative; Chemosensitivity

摘要: 目的 研究乳腺癌中 CD44⁺/CD24^{-/low} 的表达及其与含蒽环类药物化疗方案敏感度的关系。**方法** 91 例乳腺癌接受含蒽环类药物的术前新辅助化疗, 2~4 个疗程后进行效果评价; 采用双染免疫组织化学方法检测化疗前后 CD44⁺/CD24^{-/low} 的表达, t 检验分析化疗前后 CD44⁺/CD24^{-/low} 细胞比例的变化, χ^2 检验分析乳腺癌 CD44⁺/CD24^{-/low} 表型与乳腺癌临床病理参数及化疗疗效的关系。**结果** 乳腺癌中 CD44⁺/CD24^{-/low} 阳性表达率为 39.6% (36/91), 在接受含蒽环类药物的新辅助化疗后乳腺癌中 CD44⁺/CD24^{-/low} 细胞比例较化疗前明显增加 ($P = 0.028$)。CD44⁺/CD24^{-/low} 阳性组 ER 阳性率明显低于 CD44⁺/CD24^{-/low} 阴性组 (25.0% vs. 47.3%, $P = 0.033$)。三阴性乳腺癌中 CD44⁺/CD24^{-/low} 阳性率明显高于非三阴性乳腺癌 (61.9% vs. 32.9%, $P = 0.017$)。CD44⁺/CD24^{-/low} 表型与年龄、肿瘤大小、临床分期、病理类型、组织学分级等乳腺癌临床病理参数无明显关系 ($P > 0.05$)。CD44⁺/CD24^{-/low} 阳性组的总有效率高于 CD44⁺/CD24^{-/low} 阴性组, 但两组之间差异无统计学意义 (75% vs. 69.1%, $P = 0.542$); CD44⁺/CD24^{-/low} 阳性组的病理完全缓解率明显高于 CD44⁺/CD24^{-/low} 阴性组 (38.9% vs. 18.2%, $P = 0.028$)。**结论** CD44⁺/CD24^{-/low} 细胞仅存在于部分乳腺癌, CD44⁺/CD24^{-/low} 表型与 ER (-)、三阴性乳腺癌相关, CD44⁺/CD24^{-/low} 表型与乳腺癌对含蒽环类药物化疗方案的敏感度相关,

CD44⁺/CD24^{-/low} 表型可能成为乳腺癌临床化疗疗效的预测指标之一。

关键词: 乳腺癌; CD44⁺/CD24^{-/low} 表型; 三阴性; 化疗敏感度

中图分类号: R737.9 文献标识码: A

文章编号: 1000-8578(2012)08-0966-04

收稿日期: 2010-08-26; **修回日期:** 2011-04-27
作者单位: 1. 400030 重庆, 重庆市肿瘤研究所乳腺中心; 2. 重庆医科大学附属第一医院内分泌乳腺外科
通信作者: 吴诚义, E-mail: 24277759@qq.com
作者简介: 周鑫 (1975-), 男, 博士在读, 副主任医师, 主要从事乳腺肿瘤的研究

0 引言

2003 年 Al-Hajj 等^[1] 从人原发性乳腺癌及其转移性胸水中分离并鉴定分离出 CD44⁺/CD24^{-/low}/Lin⁻ 的乳腺癌细胞群,这群细胞只需 200 个就可以在 NOD/SCID 鼠中形成肿瘤,而分选出该细胞群后剩余的其他细胞无致瘤性,证实了乳腺癌干细胞的存在。随后的研究发现早期乳腺癌患者的骨髓标本存在表达 CD44⁺/CD24^{-/low} 的乳腺癌干细胞,其比例为 33%~100%,而乳腺癌原发肿瘤中 CD44⁺/CD24^{-/low} 细胞的比例不超过 10%,提示乳腺癌患者转移灶可能来自乳腺癌干细胞^[2]。于是有学者提出肿瘤干细胞的存在是化疗耐药、肿瘤复发、转移及预后差的重要根源^[3-4]。我们采用双染免疫组织化学的方法检测 CD44⁺/CD24^{-/low} 在人乳腺癌标本中的表达,分析化疗前后 CD44⁺/CD24^{-/low} 细胞比例的变化情况,分析 CD44⁺/CD24^{-/low} 表型与乳腺癌临床病理参数及化疗敏感度的关系。

1 材料和方法

1.1 一般资料

91 例乳腺癌患者均为重庆医科大学附属第一医院内分泌乳腺外科和重庆市肿瘤研究所乳腺中心 2010 年 1 月—2010 年 12 月间收治的患者,所有患者均为新发肿瘤。入组前均未接受任何抗癌治疗,化疗前均经粗针穿刺病理证实。年龄 36~68 岁,平均年龄 48.5 岁;绝经前 47 例,绝经后 44 例;肿瘤原发灶直径 2.5 cm~12 cm,平均 5.4 cm。肿瘤的分期根据 AJCC 分期所定:Ⅱ期 57 例(62.6%),Ⅲ期 34 例(37.4%)。病理类型包括浸润性导管癌 56 例,其他类型 35 例;组织学分级包括Ⅰ级 22 例,Ⅱ级 51 例,Ⅲ级 18 例。91 例乳腺癌病例均采用含蒽环类药物的 TEC 方案(多西他赛 75 mg/m²,表阿霉素 80 mg/m²,环磷酰胺 500 mg/m²)予以术前新辅助化疗;全部药物均经静脉滴注,化疗方案每 3 周重复,2~4 周期后评价疗效。

1.2 试剂

CD44 兔抗人单克隆抗体(克隆号:EP44)、CD24 鼠抗人单克隆抗体(克隆号:SN3b)及 Polymer 双染检测试剂盒(DS0001)均购自北京中杉生物技术有限公司。

1.3 双染免疫组织化学及阳性结果判断

石蜡标本 5 μm 连续切片,常规脱蜡水化后,用微波炉进行抗原修复;CD44、CD24 的工作浓度分别为 1:50 和 1:100;按 Polymer 双染检测试剂盒说明书检测 CD44、CD24 的表达,分别用 DAB 和 AP-Red 显色,苏木精复染,封片剂封固;为了证明 CD44/CD24 双染的可靠性,用已知 CD44 和 CD24 阳性的扁桃体组织作阳性对照,用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。

CD44 阳性细胞为细胞膜红色,CD24 阳性细胞为细胞质棕黄色。细胞膜红色,细胞质无或少棕黄色染色的细胞鉴定为 CD44⁺/CD24^{-/low}。采用盲法,由两位病理科医师独立计数,每张片随机选取 15 个高倍视野,计算 CD44⁺/CD24^{-/low} 细胞的比例。参考 Honeth 等^[5] 的评分方法:0 分(无阳性细胞);1 分(阳性细胞 1%~10%);2 分(阳性细胞 11%~50%);3 分(阳性细胞 51%~75%);4 分(阳性细胞 76%~100%);0 分为阴性,≥1 分为阳性。

1.4 疗效评价标准

根据实体瘤疗效反应评价标准(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors,RECIST)^[6] 进行疗效评价,分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、稳定(SD)和疾病进展(PD),CR+PR 为总有效率。手术标本中原发病灶和淋巴结均无肿瘤病灶残留或仅有导管原位癌残留则判定为病理完全缓解(pCR)。

1.5 统计学方法

应用 SPSS18.0 统计软件对数据进行统计学处理。计量资料采用 *t* 检验进行统计学分析,计数资料采用 χ^2 检验进行统计学分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD44⁺/CD24^{-/low} 在乳腺癌化疗前后的表达

CD44⁺/CD24^{-/low} 细胞的比例在不同的病例差异较大,有的病理切片上可见到 CD44⁺/CD24^{-/low}, CD44⁺/CD24⁺, CD44⁻/CD24⁺ 细胞和 CD44⁻/CD24⁻ 多种细胞类型,有的切片上则以一种细胞类型为主。91 例乳腺癌中发现 CD44⁺/CD24^{-/low} 细胞的有 36 例,总阳性率 39.6%。CD44⁺/CD24^{-/low} 阳性组中未达 pCR 的 22 例乳腺癌,化疗后 CD44⁺/CD24^{-/low} 细胞比例较化疗前明显增加,差异有统计学意义(*t* = -2.271, *P* < 0.05),见表 1。

表 1 乳腺癌化疗前、后 CD44⁺/CD24^{-/low} 的表达情况($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Expression of CD44⁺/CD24^{-/low} pre-chemotherapy and post-chemotherapy in patients with breast cancer($\bar{x} \pm s$)

Groups	Cell number of CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low} (%)	<i>t</i>	<i>P</i>
Pre-chemotherapy	20.23 ± 15.11		
Post-chemotherapy	31.41 ± 17.47	-2.271	0.028

2.2 CD44⁺/CD24^{-/low} 表型与乳腺癌临床病理参数的关系

CD44⁺/CD24^{-/low} 阳性组 ER 阳性率为 25.0%, CD44⁺/CD24^{-/low} 阴性组 ER 阳性率为 47.3%,两者差异有统计学意义(χ^2 = 4.560, *P* < 0.05),见表 2;三阴性乳腺癌中 CD44⁺/CD24^{-/low} 阳性率为 61.9%(13/21),非三阴性乳腺癌中 CD44⁺/CD24^{-/low} 阳性率为 32.9%(23/70),两者差异有统计学意义(χ^2 =

5.701, $P < 0.05$)。CD44⁺/CD24^{-/low} 表型与年龄、肿瘤大小、临床分期、病理类型、组织学分级 PR、HER2、p53 及 p-gp 无明显关系 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 CD44⁺/CD24^{-/low} 表型与乳腺癌临床病理参数的关系 (n, %)

Table 2 The relationship between CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype and clinicopathologic characteristics in breast cancer (n, %)

Clinicopathologic characteristics	n	CD44 ⁺ /CD24 ^{- /low}		χ^2	P
		Negative group	Positive group		
Age(years)					
≤45	27	16(29.1)	11(30.6)	0.022	0.881
>45	64	39(70.9)	25(69.4)		
Tumor size(cm)					
≤5	65	42(76.4)	23(63.9)	1.659	0.198
>5	26	13(23.6)	13(36.1)		
TNM classification					
II	57	37(67.3)	20(55.6)	1.276	0.259
III	34	18(32.7)	16(44.4)		
Menstruation status					
Premenopause	47	30(54.5)	17(47.2)	0.467	0.494
Postmenopause	44	25(45.5)	19(52.8)		
Histological type					
Infiltrating ductal carcinoma	56	38(69.1)	18(50.0)	3.350	0.067
Others	35	17(30.9)	18(50.0)		
Axillary nodes metastasis					
Yes	33	23(41.8)	10(27.8)	1.856	0.173
No	58	32(58.2)	26(72.2)		
Histologic classification					
I	22	12(20.0)	10(30.6)	0.887	0.642
II	51	33(60.0)	18(50)		
III	18	10(20.0)	8(19.4)		
ER					
Positive	35	26(47.3)	9(25.0)	4.560	0.033
Negative	56	29(52.7)	27(75.0)		
PR					
Positive	32	16(29.1)	16(44.4)	2.250	0.134
Negative	59	39(70.9)	20(55.6)		
HER2					
Positive	29	15(27.3)	14(38.9)	1.352	0.245
Negative	62	40(72.7)	22(61.1)		
p53					
Positive	30	16(29.1)	14(38.9)	0.945	0.331
Negative	61	39(70.9)	22(61.1)		
p-gp					
Positive	28	17(30.9)	11(30.6)	0.001	0.971
Negative	63	38(69.1)	25(69.4)		
Triple negative breast cancer					
Yes	21	8(14.5)	13(36.1)	5.701	0.017
No	70	47(85.5)	23(63.9)		

2.3 CD44⁺/CD24^{-/low} 表型与乳腺癌对含蒽环类药物化疗方案敏感度的关系

CD44⁺/CD24^{-/low} 阳性乳腺癌的总有效率为 75%, CD44⁺/CD24^{-/low} 阴性乳腺癌的总有效率为 69.1%, 两组之间差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.372$, $P > 0.05$), 见表 2; 但 CD44⁺/CD24^{-/low} 阳性组 pCR 有 14 例, CD44⁺/CD24^{-/low} 阴性组有 10 例, 两组比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.805$, $P < 0.05$), 见表 3。

表 3 CD44⁺/CD24^{-/low} 表型与乳腺癌对含蒽环类药物化疗方案敏感度的关系 (n, %)

Table 3 The relationship between CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype and the responsiveness of breast cancer to anthracycline-based chemotherapy (n, %)

Chemotherapeutic response	n	CD44 ⁺ / CD24 ^{- / low}		χ^2	P
		Negative	Positive		
Clinical evaluation					
CR + PR	65	38(69.1)	27(75.0)	0.372	0.542
SD + PD	26	17(30.9)	9(25.0)		
Pathological complete remission					
Yes	24	10(18.2)	14(38.9)	4.805	0.028
No	67	45(81.8)	22(61.1)		

3 讨论

自从 2003 年 Al-Hajj 等^[1]分离出 CD44⁺/CD24^{-/low}/Lin⁻ 的乳腺癌细胞群, 进一步研究表明 CD44⁺/CD24^{-/low} 表型的细胞具有自我更新、分化潜能等肿瘤干细胞特性。目前 CD44⁺/CD24^{-/low} 表型细胞在乳腺癌方面的研究结果不尽相同^[7-10]。本组资料显示 CD44⁺/CD24^{-/low} 的乳腺癌阳性率为 39.6%, CD44⁺/CD24^{-/low} 阳性组 ER 阳性率为明显低于 CD44⁺/CD24^{-/low} 阴性组, 三阴性乳腺癌中 CD44⁺/CD24^{-/low} 阳性率明显高于非三阴性乳腺癌, 与 Lee 等^[8-9]的研究结果一致。本研究提示 CD44⁺/CD24^{-/low} 表型仅存在于部分乳腺癌, 乳腺癌干细胞可能有其他标志物的存在; CD44⁺/CD24^{-/low} 表型与三阴性乳腺癌相关; 本研究中 CD44⁺/CD24^{-/low} 表型与乳腺癌预后的关系尚须进一步随访。

肿瘤干细胞假说 (cancer stem cell hypothesis) 认为瘤体内存在一类特殊的肿瘤干细胞, 这部分细胞对化疗药物先天耐药, 并且与其他类型干细胞类似, 具有自我更新 (self-renew) 的能力, 产生新的、对化疗药物耐药的肿瘤细胞。李治等^[11]研究发现与乳腺癌分化细胞相比, 乳腺癌干细胞 MDR1 和

BCRP 的表达明显增强,并且在化疗后干细胞比例也明显增加;认为乳腺癌干细胞能通过高表达多药耐药基因具有更强的化疗耐药能力,是乳腺癌化疗失败和复发的关键因素之一;Lee 等^[8]的研究显示接受含蒽环类药物的新辅助化疗后 CD44⁺/CD24⁻和 ALDH1⁺细胞的比例明显增加,ALDH1⁺与化疗后高的病理完全缓解率有关。本组资料显示在接受含蒽环类药物的新辅助化疗后乳腺癌中 CD44⁺/CD24^{-/low}细胞的比例明显增加,CD44⁺/CD24^{-/low}阳性乳腺癌的病理完全缓解率明显高于 CD44⁺/CD24^{-/low}阴性乳腺癌,与 Lee 等^[8]的研究结果一致;提示 CD44⁺/CD24^{-/low}表型与乳腺癌对含蒽环类药物的化疗方案的敏感度相关;本研究未发现 CD44⁺/CD24^{-/low}表型与 p-gp 的相关性,这可能与乳腺癌存在多种耐药机制有关。

综上所述,本研究结果显示,CD44⁺/CD24^{-/low}细胞仅存在于部分乳腺癌,CD44⁺/CD24^{-/low}表型与 ER(-)、三阴性乳腺癌相关,接受含蒽环类药物的新辅助化疗后乳腺癌中 CD44⁺/CD24^{-/low}细胞比例明显增加;CD44⁺/CD24^{-/low}乳腺癌具有更高的病理完全缓解率。研究已经证实三阴性乳腺癌虽具有较高的化疗后病理完全缓解率,但复发转移率较高,预后较差,目前尚无针对性的治疗方案^[12]。而 CD44⁺/CD24^{-/low}表型与三阴性乳腺癌相关,并且 CD44⁺/CD24^{-/low}阳性乳腺癌具有更高的病理完全缓解率,提示 CD44⁺/CD24^{-/low}乳腺癌可能预后不良,此结论须进一步扩大样本量进行研究和随访。

参考文献:

[1] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7): 3983-8.

[2] Balic M, Lin H, Young L, et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(19): 5615-21.

[3] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(4): 275-84.

[4] Donnenberg VS, Donnenberg AD. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis[J]. J Clin Pharmacol, 2005, 45(8): 872-7.

[5] Honeth G, Bendahl PO, Ringnér M, et al. The CD44⁺/CD24⁻ phenotype is enriched in basal-like breast tumors[J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(3): R53.

[6] Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada[J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(3): 205-16.

[7] Ye ZQ, Hu XQ, Huang KT, et al. The clinical significance of CD44⁺/CD24^{-/low} in breast cancer[J]. Zhonghua Shi Yan Wai Ke Za Zhi, 2009, 26(4): 436-8. [叶志强, 胡孝渠, 黄卡特, 等. CD44⁺/CD24^{-/low}在乳腺癌中表达及其临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2009, 26(4): 436-8.]

[8] Lee HE, Kim JH, Kim YJ, et al. An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer[J]. Br J Cancer, 2011, 104(11): 1730-8.

[9] Lv XQ, Suo ZH, Ma CL, et al. Quantity and distribution of CD44⁺/CD24⁻ cells in breast cancer tissue and the cell lines[J]. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi, 2009, 38(7): 441-4. [吕新全, Zhenhe Suo, 马长路, 等. CD44⁺/CD24⁻细胞在乳腺癌组织及细胞系中的数量与分布[J]. 中华病理学杂志, 2009, 38(7): 441-4.]

[10] Mylona E, Giannopoulou I, Fasomytakos E, et al. The clinicopathologic and prognostic significance of CD44⁺(+)/CD24⁻(-/low) and CD44⁺(-)/CD24⁺(+) tumor cells in invasive breast carcinomas[J]. Hum Pathol, 2008, 39(7): 1096-102.

[11] Li Z, Liu CP, He YL, et al. The expression of multi-drug resistance gene in breast cancer stem cells and its significance[J]. Tumor, 2008, 28(2): 129-31. [李治, 刘春萍, 贺艳丽, 等. 乳腺癌干细胞多药耐药基因的表达及意义[J]. 肿瘤, 2008, 28(2): 129-31.]

[12] Rakha EA, Chan S. Metastatic triple-negative breast cancer[J]. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2011, 23(9): 587-600.

[编辑:安 凤;校对:邱颖慧]