

文章编号:1005-6947(2005)04-0247-06

· 乳腺肿瘤专题研究 ·

联合检测多基因在乳腺癌组织中的表达及其临床意义

黄宝俊¹, 徐惠绵¹, 李凯¹, 王怀宇², 张昊¹, 田大彤³

(1 中国医科大学附属第一医院 肿瘤外科, 辽宁 沈阳, 110001; 2 沈阳市皇姑区中心医院, 辽宁 沈阳, 110036; 3 辽宁省妇婴医院 妇产科, 辽宁 沈阳, 110005)

摘要:目的 探讨 ER, PR, p53(突变型,下同), HER2, MDR1 基因在乳腺癌组织中表达,及其与临床病理因素的相关性和预后的关系。方法 采用免疫组化 SP 法检测上述基因在 215 例乳腺癌中的表达情况,分析其与临床病理因素的相关性;随访全组病例的无病生存率和总生存率,进行生存分析。结果 ER, PR, p53, HER2, MDR1 在全组病例中表达的阳性率分别为 40.9%, 27.0%, 40.5%, 37.2%, 37.7%; PR 和 p53 表达增高者多伴有腋淋巴结转移($P = 0.001, 0.037$); HER2 表达增高者 TNM 分期相对较晚(多为 III 期)、腋淋巴结转移程度相对较重(常在 5 个以上)($P = 0.012, 0.037$);上述基因表达与其他临床病理因素间无明显关系($P > 0.05$)。MDR1 与 p53, HER2 间具有显著的正相关关系($P = 0.020, r = 0.159; P = 0.014, r = 0.168$);而 ER, PR 与 HER2 间无明显相关性($P > 0.05$)。单因素生存分析发现:TNM 分期、腋淋巴结有无转移及程度、p53 和 HER2 表达与乳腺癌患者的无病和总生存率相关;而 MDR1 表达亦与总生存率相关。多因素生存分析发现:腋淋巴结转移情况、MDR1 和 HER2 表达是影响预后的独立危险因素。结论 p53, HER2, MDR1 对预后的影响可能是通过诱导乳腺癌细胞耐药及对内分泌治疗反应下降所致。联合检测上述基因在乳腺癌中的表达,有助于判断乳腺癌的恶性程度、转移表型和预后;p53, HER2, MDR1 过表达的乳腺癌(以 HER2 为主),增加蒽环类药物剂量可提高化疗的总有效率,可望延长患者的生存期。

关键词: 乳腺肿瘤/病理学; 癌基因表达; 淋巴转移

中图分类号: R737.9; R730.23

文献标识码: A

The expression and clinical significance of multi-genes in breast cancer

HUANG Bao-jun¹, XU Hui-mian¹, LI Kai¹, WANG Huai-yu², ZHANG Hao¹,
TIAN Da-tong³

(1. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang, 110001, China; 2. The Central Hospital of Huanggu Region, Shenyang, 110036, China; 3. Department of Obstetrics & Gynecology, Liaoning Provincial Fetomaternal Hospital, Shenyang, 110005, China)

Abstract: Objective To study the expressions of ER, PR, mutant p53, HER2, and MDR1 genes in breast cancer, and their correlation with clinicopathologic factors and prognosis. **Methods** Expressions of ER, PR, mutant p53, HER2, and MDR1 gene proteins were examined by immunohistochemistry (IHC) in breast cancer lesions from 215 patients, and their correlation with clinicopathologic features were analyzed. All of the patients were followed up for analysis of disease free survival (DFS) and overall survival (OS) rate, and survival analysis. **Results** Of the 215 breast carcinoma samples, the positive rates for ER, PR, mutant p53, HER2, MDR1 gene proteins expression were 40.9%, 29.0%, 40.5%, 37.2% and 37.7%, respectively. Over-expression of PR and mutant p53 was positively correlated with axillary lymph node ($P = 0.001, 0.037$, respectively), and over-expression of HER2 was positively correlated with TNM staging

收稿日期:2004-10-19; 修订日期:2005-01-27。

作者简介:黄宝俊(1972-),男,辽宁沈阳人,中国医科大学附属第一医院主治医师,主要从事胃肠癌、乳腺癌转移早诊及综合治疗方面的研究。

通讯作者:徐惠绵 电话:024-25909581; E-mail:cmuxu@hotmail.com。

and extent of axillary lymph node metastasis ($P = 0.012, 0.037$, respectively). The genes expressions were not significantly correlated with other clinicopathologic factors ($P > 0.05$). Expression of MDR1 had a positive correlation with mutant p53 accumulation and HER2 expression ($P < 0.05$). ER and PR expressions were not significantly correlated with HER2 expression ($P > 0.05$). In univariate analyses, TNM staging, axillary lymph node metastasis, mutant p53 accumulation, and HER2 over-expression were negatively correlated with DFS and OS, and MDR1 over-expression significantly reduced OS but not DFS. In multivariate analysis, axillary lymph node metastasis, over-expression of MDR1 and HER2 were independent risk factors for prognosis. **Conclusions** Induction of multidrug resistance and poor response to chemotherapy and endocrinotherapy may be the chief reasons for poor prognosis of breast cancer with mutant p53 accumulation, and HER2 and MDR1 over-expression. Determination of the above genes' expression in breast cancer tissue can be of use in deciding the degree of malignancy, metastasis phenotype and prognosis of breast cancer. Increasing anthracycline dose may increase the overall response rate to chemotherapy and improve prognosis in patients with mutant p53 accumulation, HER2 and MDR1 over-expression, especially HER2 over-expression.

Key words: BREAST NEOPLASMS/pathol; ONCOGENES EXPRESSION; LYMPHATIC METASTASIS

CLC number: R737.9; R730.23

Document code: A

乳腺癌在我国的发生率有逐年上升趋势,随着对乳腺癌生物学特性认识的加深及综合治疗的不断发展,患者的生存率和生活质量有了显著提高。研究^[1~7]发现,人表皮生长因子受体2(HER2/c-erbB-2),p53,多药耐药基因(MDR1)等参与调节乳腺癌耐药的形成并影响其预后。笔者自1998年起,对乳腺癌患者术后常规检测ER,PR,MDR1,p53,HER2等蛋白表达,以此为参考指导术后内分泌治疗与化疗,取得较好效果。本文回顾分析上述基因表达与乳腺癌临床病理因素间的相关性及与预后的关系,旨在探讨上述基因在乳腺癌发生、发展以及耐药形成过程中的机制,以期进一步提高乳腺癌的整体治疗水平。

1 材料与方法

1.1 临床资料

以1998年1月~2003年9月中国医科大学附属第一医院肿瘤外科行手术治疗的乳腺癌病例中随访和临床病理资料完整者为研究对象,共215例。均为女性,年龄28~82(平均 49.79 ± 9.59)岁。绝经前118例,绝经后97例。TNM分期中0期4例,I期63例,II期129例,III期19例;腋淋巴结转移阴性者105例,阳性者110例。全组病例术前均未行放、化疗。其中行标准根治术53例,扩大根治术4例,改良根治术II式(保留胸大肌切除胸小肌)24例,改良根治术I式(保留胸大、小肌)129例,保乳手术3例,姑息手术2例。除4例0期外,术后均行辅助化疗,以CAF方案为主,患有心

脏病者予CMF方案,原发癌灶中HER2,MDR1,p53过表达者(以HER2为主)增加表阿霉素剂量($100\text{mg}/\text{m}^2$);腋淋巴结转移数大于4个者术后辅助放疗;ER和PR中有1个阳性者,术后均予三苯氧胺口服,连服5年。全部病例均获随访,随访的零点时间为手术当日,终止时间为2004年6月,最短1年,最长6.5年,随访主要通过电话、书信、门诊复查等形式。

1.2 免疫组织化学检测

采用链菌素亲生物素蛋白-过氧化酶(SP)法(DAB显色),对乳腺癌术后石蜡标本进行ER,PR,MDR1,p53,HER2蛋白表达检测。所有试剂均购自福州迈新生物技术公司(抗体为即用型产品),严格按照说明书操作。

1.3 阳性结果判断

ER,PR,p53染色均定位于细胞核,MDR1,HER2定位细胞膜或细胞浆。阳性细胞染色均为明显的棕黄或棕褐色,按阳性细胞占同类病变细胞数百分比分类^[8,9]: $< 10\%$ 为(-), $10\% \sim 25\%$ 为(+), $26\% \sim 50\%$ 为(++), $> 50\%$ 为(+++);将 $> 25\%$ 者定为高表达, $\leq 25\%$ 者定义为低表达或不表达。

1.4 统计分析方法

利用SPSS 10.0软件。各基因表达与乳腺癌临床病理因素间的关系采用卡方检验(或精确概率法),各基因间表达的相关性采用Spearman等级相关分析,寿命表法计算全组病例5年累计无病生存率(disease free survival rate, DFS)和总生存率(overall

survival rate, OS)。预后的单因素分析采用 Kaplan-Meier 法,并进行 Log Rank 检验;多因素分析采用 Cox 回归,向后逐步法。

2 结果

2.1 各基因在原发乳腺癌中的表达情况

全组病例的乳腺癌组织中 ER, PR, p53, HER2, MDR1 的阳性率分别为 40.9% (88/215), 27.0% (58/215), 40.5% (87/215), 37.2% (80/215), 37.7% (81/215), 与文献报道基本一致^[1~3,7~9]。

2.2 各基因表达与乳腺癌临床病理因素间的关系

月经初潮时间、妊娠次数、家族史、肿瘤大小及部位、肿瘤局部情况(包括乳头受侵、酒窝征、橘皮样变)、乳头溢液、病理类型与上述基因表达均无明显相关性;各基因与年龄(青年与老年)、闭经与否、TNM 分期(因 0 期仅 4 例,故将其与 I 期合并分析)、有无腋淋巴结转移及转移程度的相关性分析结果显示,PR 和 p53 表达增高者多伴有腋淋巴结转移 ($P = 0.001, 0.037$);HER2 表达增高者 TNM 分期相对较晚(多为 III 期)、腋淋巴结转移程度相对较重(常在 5 个以上) ($P = 0.012, 0.037$);上述基因表达与其他临床病理因素间无明显关系 ($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 各基因表达与乳腺癌临床病理因素间的关系 (n, %)

相关因素	ER 表达		PR 表达		MDRI 表达		p53 表达		HER2 表达		
	低	高	低	高	低	高	低	高	低	高	
年龄(岁)	≤40	22(61)	14(39)	25(69)	11(31)	22(61)	14(39)	24(67)	12(33)	25(69)	11(31)
	≥60	15(46)	18(54)	25(76)	8(24)	19(58)	14(42)	19(58)	14(42)	19(58)	14(42)
闭经	否	76(64)	42(36)	88(75)	30(25)	74(63)	44(37)	74(63)	44(37)	71(60)	47(40)
	是	51(53)	46(47)	69(71)	28(29)	56(58)	41(42)	53(55)	44(45)	62(64)	35(36)
TNM 分期	0+I	43(64)	24(36)	52(78)	15(22)	44(66)	23(34)	41(61)	26(39)	49(73)	18(27) ²⁾
	II	73(57)	56(43)	94(73)	35(27)	79(61)	50(39)	79(61)	50(39)	77(60)	52(40)
	III	11(58)	8(42)	11(58)	8(42)	7(37)	12(63)	7(37)	12(63)	7(37)	12(63)
淋巴结转移	无	65(62)	40(38)	88(84)	17(16) ¹⁾	65(62)	40(38)	70(67)	35(33) ³⁾	67(64)	38(36)
	有	62(56)	48(44)	69(63)	41(37)	65(59)	45(41)	57(52)	53(48)	66(60)	44(40)
淋巴结转移程度(个)	≤4	105(58)	75(42)	132(73)	48(27)	108(60)	72(40)	108(60)	72(40)	117(65)	63(35) ⁴⁾
	≥5	22(63)	13(37)	25(71)	10(29)	22(63)	13(37)	19(54)	16(46)	16(46)	19(54)

注:1)与有淋巴结转移比较, $P < 0.01$; 2)与 III 期比较, $P < 0.05$; 3)与有淋巴结转移比较, $P < 0.05$; 4)与 ≥5 组比较, $P < 0.05$

2.3 各基因表达的相关性

ER 与 PR、MDR1 表达具有显著的正相关关系 ($r_s = 0.517, P = 0.000$; $r_s = 0.217, P = 0.001$); PR 与 MDR1 表达具有显著的正相关关系 ($r_s = 0.344, P = 0.000$); MDR1 与 p53, HER2 表达具有正相关关系 ($r_s = 0.159, P = 0.020$; $r = 0.168, P = 0.014$), 而 ER 和 PR 与 HER2 表达具有一定的负相关性, 但无统计学差异 ($r_s = -0.108, P = 0.113$; $r_s = -0.089, P = 0.194$)。

2.4 全组病例的生存分析

全组病例中, 随访时间癌源性死亡者 12 例, 非癌源性死亡者 1 例, 带瘤生存者 3 例, 余下 199 例全部无癌生存。全组病例累计 5 年无病生存率

(DFS) 为 79.63%, 其中 0 期 100%, I 期 92.88%, II 期 79.56%, III 期 27.78%; 累计 5 年总生存率 (OS) 为 81.93%, 其中 0 期 100%, I 期 97.65%, II 期 81.09%, III 期 27.78%。

2.4.1 影响预后的单因素分析 单因素生存分析发现: 年龄、闭经与否、肿瘤大小、病理类型、ER 和 PR 表达对乳腺癌患者的无病生存率和总生存率无明显影响 ($P > 0.05$); 而 TNM 分期 ($\chi^2 = 8.05, P = 0.0046$; $\chi^2 = 10.64, P = 0.0011$)、腋淋巴结有无转移 ($\chi^2 = 5.95, P = 0.0147$; $\chi^2 = 5.89, P = 0.0152$)、腋淋巴结转移程度 ($\chi^2 = 7.30, P = 0.0069$; $\chi^2 = 11.73, P = 0.0006$)、p53 表达 ($\chi^2 = 4.7, P = 0.0302, \chi^2 = 6.69, P = 0.0097$)、HER2

表达 ($\chi^2 = 13.41, P = 0.0003; \chi^2 = 12.59, P = 0.0004$) 对乳腺癌患者的无病生存率和总生存率均有显著影响; MDR1 表达对乳腺癌患者的无病生

存率无明显影响 ($\chi^2 = 3.43, P = 0.0641$), 而对总生存率影响显著 ($\chi^2 = 7.86, P = 0.0051$)。不同因素总生存率的生存曲线见图 1~6。

图 1 TNM 分期对总生存率的影响

图 2 淋巴结有无转移对总生存率的影响

图 3 淋巴结转移程度对总生存率的影响

图 4 MDR1 表达对总生存率的影响

图 5 p53 表达对总生存率的影响

图 6 HER2 表达对总生存率的影响

2.4.2 影响预后的多因素分析 腋淋巴结转移情况、MDR1 和 HER2 表达是影响预后的独立危险因素。腋淋巴结转移直接影响患者的无病生存率, 而

腋淋巴结转移的严重程度直接影响患者的总生存率(表 2)。

表2 影响乳腺癌无病和总生存率多因素回归分析

	相关因素	回归系数	标准误	统计量	P	相对危险度	95%可信区间	
无病生存率	有无淋巴结转移	1.268	0.650	3.8	0.051	3.553	0.993	12.711
	HER2	1.745	0.57	9.389	0.002	5.726	1.875	17.483
总生存率	淋巴结转移程度	1.684	0.599	7.906	0.005	5.389	1.666	17.437
	MDR1	1.543	0.664	5.737	0.017	4.68	1.324	16.545
	HER2	1.692	0.648	6.806	0.009	5.428	1.523	19.346

3 讨论

随着人们对乳腺癌生物学特性的深入了解,乳腺癌的现代治疗已从以外科解剖学概念为主导进展到以生物学概念为主导的阶段,涌现出大量与乳腺癌治疗和预后相关的分子生物学标志物的研究报道,然而结论并不尽一致^[1~10]。

本研究发现,突变型 p53 表达与腋淋巴结转移成正相关关系,提示可能在乳腺癌腋淋巴结转移早期起一定的作用;而 HER2 过表达者 TNM 分期相对较晚,腋淋巴结转移程度亦较重,往往多于 5 个,提示可能在乳腺癌晚期起更重要的作用。因此术后检测 p53, HER2 表达有助于判断乳腺癌的恶性程度和转移表型。研究发现 MDR1 的氨基酸序列与 HER2 可能有部分同源^[10]; p53 基因突变有可能激活 MDR1 基因表达的启动子,使细胞 MDR1 基因产物过表达^[11]。本研究发现,MDR1 与 p53, HER2 之间存在显著的正相关关系,由此可见, p53, MDR1, HER2 之间能够相互调节、协同作用,其内在详尽机制尚需进一步深入研究探讨。

多因素分析发现:腋淋巴结转移、HER2 表达是影响乳腺癌无病生存率的独立危险因素,相对危险度分别为 3.553 和 5.726;而腋淋巴结转移程度、MDR1 和 HER2 表达是影响乳腺癌总生存率的独立危险因素,相对危险度分别为 5.389, 4.68 和 5.428。因此笔者认为,HER2 蛋白在乳腺癌演进全过程中影响其预后,而 MDR1 蛋白可能在中、晚期乳腺癌中对预后的影响更为显著。有研究显示,HER-2 可以促进蛋白水解酶的分泌,增强细胞的运动能力,从而促进肿瘤侵袭、转移^[12]。HER2 过表达使乳腺癌对三苯氧胺治疗反应性降低^[13],并且对某些化疗药物反应性下降^[10],这可能是其

影响乳腺癌预后的主要原因。因此术后检测乳腺癌中 p53, HER2, MDR1 表达有助于判断预后。

在本研究的多因素分析中, TNM 分期对预后的影响被排除,术前判断腋淋巴结转移(N)与术后病理证实腋淋巴结转移(pN)情况差距很大,而腋淋巴结转移对预后影响又极为显著,因此 pTNM 分期在预后判断中更有价值。

MDR1 基因编码的蛋白(P-gp)能诱发多药物抗性表型,在化疗前乳腺癌 MDR1 呈低表达,而在化疗后表达明显增高,可产生获得性耐药^[2,4]。本研究发现 MDR1 与乳腺癌的临床病理因素间无明显的相关性,对无病生存率无明显影响,而对总生存率影响显著,由此推测 MDR1 对预后的影响可能是由于其中、晚期乳腺癌诱发获得性耐药所致。p53, HER2 与 MDR1 之间存在显著的正相关关系,因此推测 p53, HER2 对乳腺癌预后的影响可能是由于诱发耐药所致。Petit 等^[5]研究发现,HER2 阴性的乳腺癌对表阿霉素敏感,总有效率(OR)为 73.9%;而阳性总有效率为 12.5%(FEC50 方案)。当表阿霉素剂量从 50 mg/m² 增加到 100 mg/m² 时(FEC100 方案),HER2 阳性的乳腺癌 OR 达到 100%,而 HER2 阴性组仅为 69.5%。考虑上述基因间的内在耐药联系,笔者在术后辅助化疗过程中,对 HER2, MDR1, p53 阳性表达者(以 HER2 为主)增加表阿霉素的剂量(100 mg/m²),取得了一定的疗效,但还需大样本前瞻性随机对照研究证实。总之,联合检测上述基因在乳腺癌的表达,不仅有助于判断乳腺癌的恶性程度、转移表型和预后,还有助于临床选取合适的治疗方案,指导术后综合治疗,提高乳腺癌的整体治疗水平。

参考文献:

- [1] Yamashita H, Nishio M, Toyama T, *et al.* Coexistence of HER2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2004, 6(1):R24-30.
- [2] Trock BJ, Leonessa F, Clarke R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/pg170 expression and its possible functional significance [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1997, 89(13):917-931.
- [3] Nakopoulou LL, Alexiadou A, Gorge E, *et al.* Prognostic significance of the co-expression of p53 and c-erbB-2 proteins in breast cancer [J]. *J Pathol*, 1996, 179(1), 31-38.
- [4] Mechetner E, Kyshtoobayeva A, Zonis S, *et al.* Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin [J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(2):389-398.
- [5] Petit T, Borel C, Ghnassia JP, *et al.* Chemotherapy response of breast cancer depends on HER-2 status and anthracycline dose intensity in the neoadjuvant setting [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(6):1577-1581.
- [6] 王夫景, 李刚, 杨维良. 乳癌 p53 与雌、孕激素受体的表达及临床意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 11(6):373-374.
- [7] 罗智勇, 吴亚群, 张林, 等. C-erbB-2 和 cox-2 在乳腺癌中的表达及其意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(5):372-375.
- [8] Sjostrom J, Collan J, von Boguslawski K, *et al.* C-erbB-2 expression does not predict response to docetaxel or sequential methotrexate and 5-fluorouracil in advanced breast cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2002, 38(4):535-542.
- [9] 陈亦欣, 陈伟, 王秀清, 等. 乳腺癌组织中 MDRI, TOPO II 和 c-erbB-2 的表达及其相互关系 [J]. *中国现代医学杂志*, 2003, 13(16):31-34.
- [10] Kim R, Tanabe K, Uchida Y, *et al.* The role of HER-2 oncoprotein in drug-sensitivity in breast cancer (review) [J]. *Oncol Rep*, 2002, 9(1):3-9.
- [11] Linn SC, Honkoop AH, Hoekman K, *et al.* p53 and P-glycoprotein are often co-expressed and are associated with poor prognosis in breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 1996, 74(1):63-68.
- [12] Konecny G, Untch M, Arboleda J, *et al.* Her-2/neu and Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor in breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(8), 2448-2457.
- [13] Chung YL, Sheu ML, Yang SC, *et al.* Resistance to tamoxifen-induced apoptosis is associated with direct interaction between Her2/neu and cell membrane estrogen receptor in breast cancer [J]. *Int J Cancer*. 2002, 97(3):306-312.

关于征求论文获奖证书的启示

刊出论文获奖情况是检验期刊质量的一项重要指标,也是对作者及编者工作的肯定。《中国普通外科杂志》在广大作者、读者的支持下,近年来得到了长足的发展和进步,据有关权威机构统计分析其影响因子已居同类期刊前列。为了进一步提高办刊质量,收集各方面反馈信息,编辑部敬请在本刊已发表论文并获得各种奖励者将获奖证书及相关资料复印件寄本刊编辑部。凡寄回获奖证明者可优先发表论文,谢谢合作。

关于优先处理、录用课题论文的启示

为及时反映全国各地临床医学的新成果、新技术,本刊将对获得国家、省、市等各类科研基金资助、立项课题的来稿,尽快审稿,对可用稿件尽快刊登。敬请全国各地医药科研临床工作者踊跃投稿。投稿时请附相关证明材料、资助项目文件的复印件、单位介绍信,并在稿件左下方脚注中注明基金资助项目名称、编号。