

乳腺癌组织中 ER、PR、C-erbB-2、CD44V6、Ki67 表达的相关分析及临床意义*

冒学莲¹ 竺明晨¹ 耿尧² 徐建伟¹ 鞠焯先² 严枫^{1△}

(1 江苏省肿瘤医院检验科 江苏 南京 210009 2 南京大学生命分析化学教育部重点实验室 江苏 南京 210093)

摘要 目的 探讨乳腺癌组织中 ER、PR、C-erbB-2、CD44V6 和 Ki67 的表达与年龄、肿瘤大小、临床分期、淋巴结转移的关系以及它们相互之间的线性关系,同时分析其在乳腺癌的发生、发展中所表现出的临床作用和意义。方法 采用免疫组化 S-P 法检测 103 例乳腺癌标本中 ER、PR、C-erbB-2、CD44V6 和 Ki67 的表达,并与临床病理因素进行相关性分析。结果 103 例患者中 ER 阳性的有 57 例(55.34%),PR 阳性的有 49 例(47.57%),C-erbB-2 阳性的有 39 例(37.86%),CD44V6 阳性的有 68 例(66.02%),Ki67 阳性的有 90 例(90.29%),其中以 Ki67 的表达率最高,C-erbB-2 的表达率最低;不同年龄、淋巴结是否转移对 ER、PR、C-erbB-2、CD44V6 和 Ki67 表达量的差异,无统计学意义($P>0.05$)。PR 的表达与乳腺癌临床分期相关($P<0.05$),临床分期越高,PR 的表达量越低;C-erbB-2 的表达与肿瘤大小相关($P<0.05$),肿瘤组织越小,C-erbB-2 的表达量越低;ER 的表达量和 CD44V6 的表达量的差异,有统计学意义($P<0.05$)。结论 在乳腺癌发病率越来越高的中国以至世界,免疫组化检测 ER、PR、C-erbB-2、CD44V6 和 Ki67 的阴阳性表达,可以作为乳腺癌发生、发展的评价指标,联合检测更加有助于早期乳腺癌患者的临床治疗和预后判断,减轻乳腺癌患者的身体和心理的痛苦,为临床医生选择和评估乳腺癌患者的治疗方案提供一些参考,更为下一步的个体化治疗和基因治疗做了一些前序工作。

关键词 乳腺癌;ER;PR;C-erbB-2;CD44V6;Ki67

中图分类号:R737.31 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2013)35-6822-04

Correlation of ER, PR, C-erbB-2, CD44V6 and Ki67 Expression in Breast Cancer and their Clinical Significance*

MAO Xue-lian¹, ZHU Ming-chen¹, GENG Yao², XU Jian-wei¹, JU Huang-xian², YAN Feng^{1△}

(1 Department of clinical laboratory, Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing, Jiangsu, 210009, China;

2 Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science, Ministry of Education, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu, 210093, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the correlations between the age, tumor size, clinical stage and lymph node status of patients with breast cancer and the expressions of ER, PR, C-erbB-2, CD44V6 and Ki67 in cancer tissue, and to analysis clinical effect and significance occurring and developing of the breast cancer. **Methods:** Immunohistochemical method was used to detect the expression of ER, PR, C-erbB-2, CD44V6 and Ki67 in 103 breast cancer tissue and correlation with clinicopathological factors analysis. **Results:** The positivity rate of the expression of ER, PR, C-erbB-2, CD44V6 and Ki67 were 55.34%, 47.57%, 37.86%, 66.02%, 90.29%, respectively. The highest expression rate was Ki67, with C-erbB-2 expression in the lowest rate. There was no significant differences between the age and lymph node status($P>0.05$). The expression of PR was significant difference in clinical stage ($P<0.05$), The expression of C-erbB-2 was obviously correlated with tumor size ($P<0.05$), The expression of PR was obviously correlated with the expression of CD44V6($P<0.05$). **Conclusions:** The incidence of breast cancer in China and even the world was increasing. Examination of expressions of ER, PR, C-erbB-2, CD44V6 and Ki67 was benefit of therapy and prognosis in primary breast cancer. These could reduce breast cancer's physical and mental suffering and provide some reference for clinicians to select and evaluate treatment options for patients with breast cancer, and also did some work for individualized therapy and gene therapy in the next step.

Key words: Breast cancer; ER; PR; C-erbB-2; CD44V6; Ki67

Chinese Library Classification(CLC): R737.31 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2013)35-6822-04

前言

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,每年全世界有 100 万以上的妇女被诊断为乳腺癌,约占女性恶性肿瘤的 30%,近

年来乳腺癌的发病率以 3% 的速度逐年递增^[1]。在我国的一些主要大城市如北京、上海,乳腺癌的发病率已经跃居到女性恶性肿瘤的首位^[2],乳腺癌患者要承受肉体上的痛苦还要承受心理上的折磨。手术带来的创伤是不可修复的,化疗放疗以及淋巴

* 基金项目 国家自然科学基金项目(20845005)

作者简介:冒学莲(1985-),女,本科,技师,主要研究方向:免疫组化,电话:13357703839, E-mail:xuelian27@163.com

△通讯作者:严枫, E-mail: yanfeng2007@sohu.com

(收稿日期:2013-03-21 接受日期:2013-04-18)

结的转移,全身转移的恶病质的临床表现更是折磨着患者。但是,无论国内还是国外,尽管乳腺癌的发病率居高不下,死亡率却不断下降,其原因不仅得益于女性乳腺癌筛查和早期诊断制度的建立,更得益于近年来不断发展的分子生物学技术和综合诊疗规范化水平的提高。本文采用免疫组织化学的方法,检测乳腺癌组织中雌激素受体(Estrogen Receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)、人类表皮生长因子受体 2(C-erbB-2)、细胞粘附分子(CD44V6)和增殖细胞核抗原(Ki67)的表达情况,探讨其与临床病理因素之间的相关性以及在肿瘤的发生、发展中的临床作用和意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 我院普外科 2004 年 1 月~2004 年 12 月,这一整年女性患者浸润性导管乳腺癌外科手术后保存的组织标本 103 例,所有年龄 30~77 岁,平均年龄为 54 岁,术后病理报告已经确诊。按照国际抗癌联盟(UICC),1997 年 TNM 分期标准分为 I 期 17 例, II 期 70 例, III 期 16 例。其中有淋巴结转移的为 26 例。

1.1.2 治疗方法 103 例患者住院后采取综合治疗,以手术为主,常规行血常规、肝肾功能检查及乳腺 B 超、X 线,活检确诊为乳腺癌后即行乳腺癌根治术或改良根治术以及腋窝淋巴结清扫。手术后立即将标本送做病理切片和免疫组化检测,临床医生结合患者年龄等因素,依据病理和免疫组化结果,确定辅助化疗方案。

1.1.3 标本处理 用 10%甲醛液固定手术组织标本 24h 并用石蜡包埋,制备 4~5 μm 的连续切片,铺展在用多聚赖氨酸处理过玻片上,进行 HE 和免疫组织化学染色,确认肿瘤标本病理类型、分期、有或无淋巴结转移,以及转移数目,并分析其免疫组化类型。

1.2 方法

1.2.1 检测试剂 SP 免疫组化试剂盒及一抗 ER(ZA0102)、PR(ZA0255)、Ki67(ZM0166)、C-erbB-2(ZM0065)、CD44V6 均为工作液,北京中杉金桥生物科技有限公司产品。

1.2.2 检测方法 免疫组化染色前先将切片在 60℃烤箱中烤两个小时,脱去石蜡,然后用蒸馏水冲洗干净后,加入 PBS 中

浸泡 5 min,取出后使用微波,进行抗原修复,内源性过氧化物酶用 3% H₂O₂ 进行阻断,温育 10 min,用蒸馏水冲洗干净后,加入 PBS 中浸泡 10 min;再分步分别滴加抗体:①一抗 ER、PR、C-erbB-2、CD44V6、Ki67,37℃ 孵育 2 h,然后 PBS 冲洗 5 分钟,3 次②二抗试剂,37℃ 孵育 20~30 min,然后 PBS 冲洗 5 分钟,3 次③二抗试剂,37℃ 孵育 20~30 min,然后 PBS 冲洗 5 分钟,3 次;最后滴加 DAB 显色,蒸馏水冲洗、复染、封片。每批的阴性对照为 PBS 缓冲液替代一抗的标本实验,阳性对照为已知阳性标本。

1.3 结果判定

ER、PR、Ki67 的阳性结果为细胞核呈浅棕色,C-erbB-2、CD44V6 的阳性结果为细胞膜或细胞质呈浅棕色或深棕色颗粒。本实验在切片中任意选取 5 个高倍镜视野,计数每个视野中的阳性细胞,其数所占总细胞数比例的平均值,定义为阳性细胞百分比,以此作为评定依据^[3]。其可分为四个级别:阴性(-)为阳性细胞数 <5%或者不着色或者着色细胞数 <10%;弱阳性(+)为阳性细胞数 6%~25%或者着色弱且不连续;阳性(++)为阳性细胞数 26%~50%或者着色中等部分不连续;强阳性(+++)为阳性细胞数 >50%或者着色强且连续。

1.4 统计学方法

应用 SPSS11.0 统计软件,运行 X² 检验,相关性分析用 Spearman。差异具有统计学意义时 P≤0.05。

2 结果

2.1 ER、PR、C-erbB-2、CD44V6 和 Ki67 在乳腺癌中的表达

ER、PR、C-erbB-2、CD44V6 和 Ki67 的表达在 103 例患者中的阳性率分别为:55.34%、47.57%、37.86%、66.02% 和 90.29%,以 Ki67 的表达率最高,C-erbB-2 的表达率最低。

2.2 ER、PR、C-erbB-2、CD44V6 和 Ki67 表达与乳腺癌临床病理因素的关系

不同年龄、淋巴结转移对 ER、PR、C-erbB-2、CD44V6 和 Ki67 的表达差异,无统计学意义(P>0.05)。PR 的表达与乳腺癌临床分期相关(P<0.05),C-erbB-2 的表达与肿瘤大小相关(P<0.05)(见表 1)。乳腺癌组织中 ER 的表达和 CD44V6 相关,有统计学意义(P<0.05)。(见表 2)。

表 1 103 例乳腺癌组织中 ER、PR、C-erbB-2、CD44V6、Ki67 表达与临床病理指标的关系(例)

Table 1 The expressions of ER, PR, C-erbB-2, CD44V6 and Ki67 and correlation with clinicopathological factors analysis in 103 cancer tissue(example)

Indicators	ER				PR				C-erbB-2				CD44V6				Ki67			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Age																				
≤ 50 Years	19	10	3	9	18	10	4	9	28	4	5	4	9	20	5	7	4	25	6	6
> 50 Years	27	13	6	16	36	11	10	5	36	10	8	8	26	15	10	11	6	38	8	10
Tumor size																				
≤ 2cm	19	8	8	8	19	15	8	1	35	3	3	2	15	10	9	9	7	29	5	2
> 2cm	31	11	4	14	36	8	10	6	33	9	8	10	16	17	9	18	3	36	10	11
Clinical stage																				
I	7	4	1	5	7	7	3	0	14	2	0	1	9	5	2	1	4	11	1	1

	34	17	4	15	39	9	4	18	42	11	7	10	26	26	5	13	7	48	14	1
III	8	3	0	5	9	5	1	1	10	1	0	5	4	2	4	6	3	12	0	1
Lymph node metastasis																				
Yes	13	7	1	5	17	3	2	4	17	2	2	5	12	7	3	4	6	17	2	1
No	35	15	4	23	38	18	6	15	48	11	6	12	32	26	7	12	10	52	13	2

表 2 103 例乳腺癌组织中 ER 与 C-erbB-2、CD44V6、Ki67 的关系(例)

Table 2 The relationship between ER and C-erbB-2, CD44V6, Ki67 in 103 cancer tissue (example)

The expression of ER	The expression of C-erbB-2				The expression of CD44V6				The expression of Ki67			
-	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
+	23	7	5	10	19	11	6	9	7	30	6	2
++	16	2	2	4	10	8	3	2	2	15	6	0
+++	4	1	0	0	0	5	0	0	0	3	1	1
+++	20	3	2	3	4	12	4	8	2	23	2	1
Total	63	13	9	17	33	36	13	19	11	50	15	4

3 讨论

乳腺癌的发生和发展是一个多种基因、多个步骤、多步阶段的过程,其中环境和遗传因素对其的发病率和预后有着极大的影响^[4],单纯依靠年龄、月经状况、肿瘤大小、淋巴结转移、临床分期、组织分类分级这些传统判断乳腺癌预后的指标已经不能满足临床的需要,所以本文将结合传统预测指标与分子预测指标,来预测乳腺癌患者的生存时间,给临床的治疗提供一些新的方向。

ER、PR 是性激素受体,他们存在正常乳腺上皮细胞中,ER、PR 调控着乳腺细胞增殖,以及乳腺的生长和发育。当细胞发生癌变时,ER、PR 可以存在或消失,因此可以将乳腺癌分为两种类型:一种为非激素依赖性乳腺癌,阐述为 ER、PR 在乳腺癌细胞中不表达,ER、PR 消失,那么内分泌激素就不再调控肿瘤的生长和增殖,此类型的肿瘤分化程度较低,其预后较差^[5]。还有一种为激素依赖性乳腺癌,阐述为 ER、PR 在乳腺癌细胞中正常表达,ER、PR 存在所以内分泌激素就影响着肿瘤的生长和增殖,肿瘤即受内分泌激素调控,此类型肿瘤分化程度较高,其预后较好。本研究 ER、PR 阳性表达率分别为 55.34%、47.57%,与文献报道^[6]相近,ER、PR 表达与淋巴结转移无显著相关,与杨君等^[7]结果一致。本研究还显示 PR 与临床分期有一定的关系,分期越早,表达量越高,预后好。

C-erbB-2 是细胞原癌基因,是目前学者研究比较多的一种,C-erbB-2 在细胞中调节着细胞生长和分化,这种调节一直是以非激活的状态存在于细胞中。但是他的激活状态往往是在被体内外某些因素刺激的时候而发生,其激活状态与肿瘤细胞生长、增殖和分化,以及它的发生和发展有着密切的关系^[8],具有肿瘤转化活性。其产物 C-erbB-2 的表达与肿瘤的恶性程度呈正相关关系,多数学者认为,患者的 C-erbB-2 过度的表达,临床预后差^[9]。本文的研究结果,C-erbB-2 阳性率为 37.86%,稍低于国内的一些报道^[11-13],而与国外的一些相关文献 20%~40%的报道结论相近^[10]。C-erbB-2 与肿瘤大小有相关性,肿瘤越

小,表达量越低,与其作用相一致。

CD44V6 又称归巢受体^[14],是细胞表面黏附分子的一种,参与细胞与细胞、细胞与细胞外基质的特异性黏接,其在免疫表达中的作用是介导淋巴细胞与血管内皮细胞的结合,有利于淋巴细胞穿过血管壁返回淋巴组织,进行免疫调节。近年研究表明,乳腺癌中 CD44V6 高表达,而正常乳腺导管和腺泡的上皮细胞 CD44V6 不表达,仅在部分肌上皮细胞表达^[15],CD44V6 的高表达影响瘤细胞骨架蛋白的聚集和分布,促进瘤细胞向基质浸润,从而影响瘤细胞的迁徙和运动能力,对肿瘤的扩散和转移起到一定的作用。本研究结合 ER 结果分析,乳腺癌组织的 CD44V6 阳性表达率与 ER 的表达密切相关,在乳腺癌的发生、发展中共同发挥作用,临床上可以用来指导乳腺癌的内分泌治疗。

Ki67 是一种与细胞周期相关的蛋白质,仅在增殖细胞的 G1、S、G2、M 期表达,但在 G0 期无此抗原表达^[16]。最近越来越多的研究学者认为其更能有效的评估肿瘤细胞增殖活性,在乳腺癌预后判断上 Ki67 有着重要的意义^[17],某些学者认同 Ki67 可以当成是一个重要的标记物^[18]。本研究结果显示乳腺癌组织中 Ki67 阳性率为 90.29%,比张继涛李惠兰等^[19,20]报道高,本批研究样本肿瘤细胞增殖高,预后差。

综上所述,乳腺癌 ER、PR、C-erbB-2、CD44V6 和 Ki67 与患者年龄,有无淋巴结转移没有显著差别,但是 C-erbB-2 的表达与肿瘤大小相关,PR 的表达与乳腺癌临床分期相关,而且 ER 的表达和 CD44V6 的表达还密切相关,ER、PR、C-erbB-2、CD44V6 和 Ki67 的检测结果是个体化治疗和基因治疗的前提门槛。我们针对于不同的检测结果选择不同的治疗方案,为治疗乳腺癌取得最好的治疗效果,减轻患者的身体上和心里的痛苦。因此乳腺癌的联合检测,有助于判断乳腺癌的预后,为临床医生选择和评估乳腺癌患者的治疗方案提供一些参考。立足目前、面向未来。我们要探索新型的更有效、更安全的治疗方法如基因靶向治疗需要这些已经成熟的实验分子学技术作为支撑点,其治疗的高特异性和相对较低的毒副反应,大幅度的减

少复发率、降低死亡率和提高生存率,让乳腺癌患者获得完全康复这个梦想成真。但也因时间有限,本研究仅对5个免疫组化指标进行表面分析,我们在下一步研究工作中将对CD44V6和Ki67的早期诊断、基因治疗和预后方面进行下一步的探索。

参考文献(References)

- [1] Lapensee EW, Ben-Jonathan N. Novel roles of prolactin and estrogens in breast cancer resistance to chemotherapy [J]. *Endocrine-Related Cancer*, 2010, 17: R91-R107
- [2] Shen Zhen-zhou, Shao Zhi-min. *Modern mammary gland oncology progress* [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technological Documentation Publishing House, 2002: 128-129
- [3] Wang Lei, Yang Lan, Wang Xu-fen. Ki-67, C-erbB-2 expression and clinical significance in breast cancer [J]. *Medical Theory and Practice*, 2011, 24(21): 2544-2545
- [4] Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho JS, et al. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer [J]. *Histopathology*, 2008, 52(1): 67-81
- [5] Zhang Xi-feng, Zhao Hong-bing, Li Hui-xiang. C-erbB-2, ER, PR expression in infiltrating ductal breast cancer and significance [J]. *Maternal and Child Health*, 2010, 25(7): 972-973
- [6] LI Wei-quan, Song Mao-min. Expression of HER-2, P53, Ki-67, Nm23, ER and PR proteins in breast cancer and their clinical significance [J]. *Labeled Immunoassays & ClinMed*, 2011, 18(1): 18-22
- [7] Yang Jun, Zhang Xue. Breast cancer estrogen and progesterone receptors and axillary lymph node metastasis relations [J]. *Shanxi Medical Oncology*, 2001, 9(4): 238-240
- [8] Lal P, Tan LK, Chen B. Correlation of HER-2 status with estrogen and progesterone receptors and histologic features in 3,655 invasive breast carcinomas[J]. *American Journal of Clinical Pathology*, 2005, 123(4): 541
- [9] Qiu Li-hong, Zhao Mei-xiang, Huang Fa, et al. Progress in study on the biological characteristics of C-erbB-2 gene [J]. *Modern Tumor Medicine*, 2007, 15(1): 102-105
- [10] Morales L, Reigosa A, Caleiras E, et al. HER-2 expression in Venezuelan patients with locally advanced breast cancer [J]. *Invest Clin*, 2008, 49(1): 69-78
- [11] Ma Liqiong, Yang Zhihua. Expression of C-erbB-2, PCNA, ER and PR proteins in breast cancer and their clinical significance [J]. *Ningxia Medical Journal*, 2009, 31(2): 104-105
- [12] Gong Shaoxin, Zhao Qiang, Zeng Qingbiao, et al. ER, PR and C-erbB-2 expression and its resistance in invasive ductal carcinoma of the breast[J]. *SOUTH Journal of Medical Sciences*, 2011, 39(3): 314-316
- [13] Chai Xiaolan, Han Yuan. C-erbB-2, nm23, ER and PR expression and clinical significance in breast cancer [J]. *Hainan Medical*, 2009, 20(7): 7-10
- [14] Morris SF, Hanlon DMO, McLaughlin R, et al. Given CD44V6 expression in infiltrating ductal carcinomas of the breast is associated with hormone dependence, our experience with 168 cases [J]. *Eur J SurgOncol*, 2004, 6(3): 527-531
- [15] Heider KH, Kuthan H, Stehle G, et al. CD44v6: a target for antibody based cancer therapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(7): 567-579
- [16] Martinez Arribas F, Nunez MJ, Piqreras V, et al. Flow cytometry Ki67 labelling index in breast cancer: apmspective evaluation of 181 cases[J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(1): 295-298
- [17] Tan PH, Bay BH, Yip G, et al. Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death[J]. *Mod Pat hol*, 2005, 18(3): 374-381
- [18] Papanitiou VJ, Souvatzoglou MA, Valotassiou VJ, et al. Relationship of cell proliferation (Ki67) to 99mTc-(v) DMSA up take in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2004, 6(2): 56-62
- [19] Zhang Jitao, Zhou Wen-xue. Survivin and Ki67 expression and its relationship with C-erbB-2 in breast cancer [J]. *Qiqihar Medical College*, 2008, 29(4): 407-408
- [20] Li Hui-lan. Ki-67 and C-erbB-2 expression and its clinical significance in breast cancer [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2012, 32(19): 4307-4308