

# 新辅助化疗对乳腺癌细胞凋亡和增殖的影响

付晓艳<sup>1</sup>, 秦锡虎<sup>2</sup>, 陈同珏<sup>3</sup>, 谈敏<sup>3</sup>

[摘要]目的: 探讨新辅助化疗对乳腺癌肿瘤细胞的凋亡和增殖的影响。方法: 应用末端脱氧核苷酸转移酶介导 dUTP 缺口末端标记法 (TdT mediated dUTP biotin nick end labeling, TUNEL) 及免疫组化的 S-P 法, 分别检测新辅助化疗组和对照组乳腺癌组织中肿瘤细胞的凋亡指数 (AI) 和乳腺癌肿瘤组织的 Ki-67 抗原表达。结果: 新辅助化疗组肿瘤细胞 AI 均数为 9.26%, 比对照组肿瘤细胞 AI 均数 3.36% 明显增高 ( $P < 0.01$ )。新辅助化疗组肿瘤细胞 Ki-67 抗原过表达率为 15.63%, 比对照组 Ki-67 抗原过表达率 50.0% 低 ( $P < 0.05$ )。结论: 新辅助化疗能诱导人体乳腺癌肿瘤细胞发生凋亡, 并能抑制其增殖。

[关键词] 乳腺肿瘤; 肿瘤 药物疗法; 细胞凋亡; Ki-67 抗原

[中国图书资料分类法分类号] R 737.9 R 730.53 [文献标识码] A

## Influence of neoadjuvant chemotherapy on apoptosis and proliferation in patients with breast cancer

FU Xiaoyan<sup>1</sup>, QIN Xihu<sup>2</sup>, CHEN Tongjue<sup>3</sup>, TAN Min<sup>3</sup>

(1 Department of Breast Surgery, Changzhou Maternity and Children Health Hospital, Changzhou 213001;

2 Department of Hepatobiliary; 3 Department of Pathology, Changzhou First People's Hospital, Changzhou 213001, China)

[Abstract] **Objective** To study the influence of neoadjuvant chemotherapy on tumor cell apoptosis and proliferation in patients with breast cancer. **Methods** The apoptosis index (AI) of tumor cells in the neoadjuvant group and control group was assayed by TdT mediated dUTP biotin nick end labeling (TUNEL), and the Ki-67 antigen was examined by immunohistochemical method. **Results** The AI of tumor cells was 9.26% in the neoadjuvant group and 3.36% in the control group. The difference was significant ( $P < 0.01$ ). The overexpression rate of Ki-67 antigen in the neoadjuvant group was 15.63%, which was 50.0% lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Neoadjuvant chemotherapy can induce tumor cell apoptosis and inhibit tumor cell proliferation in patients with breast cancer.

[Key words] breast neoplasms; neoplasms drug therapy; apoptosis; Ki-67 antigen

目前, 新辅助化疗在乳腺癌的治疗中已得到应用, 特别是在局部进展期乳腺癌的应用中已取得良好的效果。新辅助化疗应用后能降低乳腺癌的临床分期, 增加保留乳房手术的机会。为探索新辅助化疗对乳腺癌细胞凋亡和增殖作用的影响, 本研究运用末端脱氧核苷酸转移酶介导 dUTP 缺口末端标记法 (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL) 及免疫组化的 S-P 法, 分别检测乳腺癌组织中肿瘤细胞的凋亡指数 (apoptotic index, AI) 和乳腺癌肿瘤组织的 Ki-67 抗原表达情况。

### 1 资料与方法

1.1 一般资料 2002~2004年, 我科收住可行手术治疗的女性乳腺癌患者 52 例, 年龄 28~80 岁。

术前、化疗前均经细针穿刺肿块活检, 细胞学确诊。其中, 浸润性导管癌 47 例, 硬癌 4 例, 黏液腺癌 1 例。分为新辅助化疗组 (32 例) 和对照组 (20 例), 两组临床分期、肿瘤大小、年龄、月经状态、淋巴结转移、雌激素受体等指标相似。新辅助化疗组患者接受 CEF 方案: 环磷酰胺  $500 \text{ mg m}^{-2}$ , 表阿霉素  $60 \text{ mg m}^{-2}$ , 氟尿嘧啶  $500 \text{ mg m}^{-2}$ , 21 天为 1 疗程, 化疗 2 个疗程, 化疗结束后 2~3 周行乳腺癌改良根治术。对照组常规术前准备后行乳腺癌改良根治术。手术后所有患者的乳腺癌标本都经 10% 甲醛溶液固定, 常规石蜡封存保留。

1.2 方法 每例石蜡标本制备 3~5  $\mu\text{m}$  原组织切片 3 张, 1 张行苏木精-伊红 (HE) 染色, 2 张分别行 TUNEL 及 S-P 法染色。采用 TUNEL 行细胞凋亡检测, 凋亡检测试剂盒由 Roche Applied Science 公司生产。具体操作步骤为: 石蜡切片经二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 微波修复抗原, TUNEL 反应液  $37^\circ\text{C}$  作用 60 min。PBS 液中中止反应和冲洗后用二抗抗地高辛复合物  $37^\circ\text{C}$  作用 30 min。DAB 显色, 流水终止反

[收稿日期] 2006-02-28

[作者单位] 1 江苏省常州市妇幼保健院 乳腺科, 213001; 江苏省常州市第一人民医院 2 肝胆外科, 3 病理科 213001

[作者简介] 付晓艳 (1973-), 女, 主治医师。

应,苏木素复染,脱水,封片。设定阳性及阴性对照,细胞核内出现棕褐色沉淀为阳性,阴性对照中无上述沉淀物出现。

$$AI = \frac{\text{凋亡细胞数}}{\text{计数细胞总数}} \times 100\%$$

采用SP法免疫组化染色检测乳腺癌肿瘤组织中Ki67抗原表达。SP试剂为福州迈新生物技术公司产品。具体操作按试剂盒说明书进行,设定阳性及阴性对照,高倍视野下随意计数1000个肿瘤细胞中Ki67阳性的细胞,Ki67阳性标记位于细胞核内,呈棕色颗粒,胞质阴性,Ki67表达按阳性细胞数分为-( $<20\%$ )(见图1)、+( $20\% \sim 40\%$ )(见图2)、++( $41\% \sim 60\%$ )(见图3)、+++( $>60\%$ )(见图4)。++、+++视为过表达。

1.3 临床疗效判定 化疗疗效以原发灶的变化衡量。乳腺肿块大小以触诊用卡尺测量,同时也参考B超和乳腺钼靶检查结果。均由经主管医师于化疗前、每周期结束及手术前各测1次。根据WHO统一标准分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、无变化(NC)和进展(PD),CR+PR为总有效率。

1.4 统计学方法 采用t检验和两样本比较的秩和检验及等级相关分析。

## 2 结果

2.1 新辅助化疗疗效 新辅助化疗组32例中,5例达到完全缓解(CR),15例部分缓解(PR),总有效率为62.5%。

2.2 乳腺癌肿瘤细胞凋亡指数 新辅助化疗组乳腺癌肿瘤细胞AI为( $9.26 \pm 1.86$ )%,对照组AI为( $3.36 \pm 0.89$ )%,两组乳腺癌肿瘤细胞AI间差异有统计学意义( $t=13.23 P<0.01$ )。

2.3 乳腺癌组织中Ki67抗原表达 新辅助化疗组乳腺癌组织Ki67抗原过表达率为15.63%,明显低于对照组的50.00%( $P<0.05$ )(见表1)。

表1 乳腺癌新辅助化疗组与对照组Ki67表达结果比较(n)

分组	n	Ki67表达				过表达率 (%)	$u_c$	P
		-	+	++	+++			
化疗组	32	14	13	4	1	15.63		
对照组	20	4	6	7	3	50.00	2.54	$<0.05$
合计	52	18	19	11	4	28.85		

2.4 乳腺癌组织AI与Ki67抗原表达的关系 新辅助化疗组AI与Ki67抗原表达之间的等级相关系数( $r_s$ )= $-0.204$ 对照组AI与Ki67抗原表达之间的 $r_s$ = $-0.363$ 两组乳腺癌组织的AI与Ki67抗原表达之间均无明显相关性( $P>0.05$ )。

## 3 讨论

新辅助化疗可杀灭微小转移灶,降低肿瘤临床分期,提高保乳率,判断化疗敏感性以及改善生存率,作为一种新的治疗战略,目前已经较广泛地应用于临床。许多实验室研究也已证实,多种化疗药物尽管对肿瘤细胞的作用环节不同,但都可引起肿瘤细胞的凋亡,细胞凋亡在肿瘤的化疗过程中很可能是一个重要的作用点<sup>[1,2]</sup>。邵志敏等<sup>[3]</sup>曾报道对51例乳腺癌随机分为术前化疗组和对照组,化疗组术前予2个疗程的CMF化疗,术后应用原位杂交法检测两组AI的差别,该文结果表明术前化疗组的AI明显高于对照组,提示在乳腺癌,特别是在淋巴结阳性的乳腺癌,术前化疗能诱导肿瘤细胞凋亡。Chang等<sup>[4]</sup>对28例乳腺癌患者应用4个周期的2M(mitoxantone  $11 \text{ mg m}^{-2}$ , methotrexate  $35 \text{ mg m}^{-2}$ , 21天为1周期)方案术前化疗,并分别于治疗前、第1疗程化疗结束24h、72h、7天及21天检测乳腺癌组织中AI的表达,结果为对化疗有效的患者中AI增高12%,而对化疗无效者则下降0.1%。Davis等<sup>[5]</sup>也对30例乳腺癌行AT或FAC方案术前化疗、化疗前及化疗后24h、48h分别行AI检测,结果同样显示化疗后AI增高。本组资料显示,新辅助化疗组乳腺癌肿瘤细胞AI均数为9.26%,而对照组乳腺癌肿瘤细胞的AI均数为3.36%,两者差异有统计学意义( $P<0.01$ ),表明新辅助化疗能诱导人体的乳腺癌肿瘤细胞的凋亡,与国内外报道一致。

Ki67抗原是一种细胞核抗原,由分子量为345kDa和395kDa的两条多肽链组成的核蛋白,基因定位于第10号染色体上,是由1095个碱基对的基因所编码,其表达因细胞周期的不同时期而异。Ki67单克隆抗体标记G<sub>1</sub>后期、S期和G<sub>2</sub>期、M期细胞核抗原,而G<sub>0</sub>期、G<sub>1</sub>早期的细胞核不被标记,被认为是较理想的检测细胞增殖活性的抗体<sup>[6]</sup>,且由于Ki67抗原半衰期短,细胞脱离增殖周期后迅速降解,Ki67抗原明显优于增殖细胞核抗原

(PCNA)。在过去的研究中证实, Ki67表达可反映细胞的增殖情况<sup>[7]</sup>。Molino等<sup>[8]</sup>亦报道乳腺癌中 Ki67抗原表达与腋淋巴结转移情况、ER 状态、PR 状态及组织学分级相关。Koda等<sup>[9]</sup>发现乳腺癌中 T<sub>2</sub> 期肿瘤及组织学分级 III 级者 Ki67 阳性表达率增高; Trhvia 等<sup>[10]</sup>认为 Ki67 过表达者总生存率和无病生存率低于低表达者。笔者曾就我院 1999 ~ 2002 年 108 例乳腺癌标本进行分析, 结果显示组织学分级 II 级的乳腺癌 Ki67 过表达率明显高于组织学分级 I 级者, 在腋淋巴结转移的患者中 Ki67 过表达率明显高于腋淋巴结阴性者, 可以提示 Ki67 过表达是预后不良的指标<sup>[11]</sup>。Billgren 等<sup>[12]</sup>对 51 例原发性乳腺癌给予 3 ~ 4 个周期 CEF 方案术前化疗后发现, Ki67 表达于化疗后明显下降且第 1 周期化疗后 Ki67 下降 > 25% 者疾病复发危险明显降低 ( $P=0.033$ ); Faneyte 等<sup>[13]</sup>研究了 97 例乳腺癌患者接受含蒽环类方案化疗前后 Bcl2、ER、p53、HER-2、Ki67 的表达, 结果发现, 只有 Ki67 表达于化疗后明显降低。本组资料中, 新辅助化疗组乳腺癌组织中 Ki67 过表达率为 15.63%, 对照组乳腺癌组织中 Ki67 过表达率为 50.00%, 两者差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 与国外报道相符, 表明新辅助化疗能够抑制乳腺癌肿瘤细胞的增殖。

AI 和 Ki67 分别从细胞凋亡和增殖的角度反映肿瘤组织的生物学行为, 本研究资料显示, 无论是新辅助化疗组还是对照组, 乳腺癌组织的凋亡指数与 Ki67 抗原表达之间均无明显相关性, 不能反映出在肿瘤发展的过程中, 乳腺癌肿瘤细胞的凋亡与增殖之间相互影响、相互制约的关系, 这可能与本组实验样本量较小有关。

本研究结果显示, 新辅助化疗能够有效地诱导肿瘤细胞发生凋亡, 降低肿瘤细胞的增殖速率, 从而可能使肿瘤缩小, 减少或延缓肿瘤的转移, 这为乳腺癌的新辅助化疗提供了分子生物学理论依据。另外, 目前化疗疗效评价仍以触诊或 B 超显示原发灶大小变化来衡量, 而对于化疗后肿块缩小不明显者, 是否的确对化疗不敏感, 临床工作中是否能通过检测新辅助化疗前后肿瘤组织中细胞凋亡及 Ki67 抗原表达的变化, 来进一步补充判断化疗方案是否有效, 帮助临床医师指导、制定个体化治疗方案。本研究术前诊断均采用细针穿刺肿块活检, 而此方法很

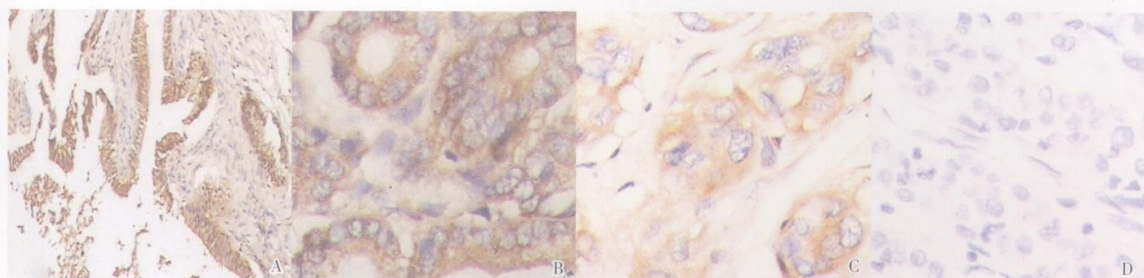
难得到足够的组织进行细胞凋亡及 Ki67 抗原表达的检测。若能粗针穿刺肿块活检标本, 检测新辅助化疗前后肿瘤组织中细胞凋亡及 Ki67 抗原表达的动态变化, 结果是否将更有意义, 有待进一步观察。

(本文图 1~4 见封三)

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drugs[ J ]. *Cancer Metastasis Rev* 1992 11( 2 ): 121 - 139
- [ 2 ] Meyn RE, Stephens LG, Hunter NR, *et al* Induction of apoptosis in murine tumors by cyclophosphamide[ J ]. *Cancer Chemother Pharmacol* 1994 33( 5 ): 410 - 414
- [ 3 ] 邵志敏, 李俊, 吴灵, 等. 术前化疗诱导乳腺癌细胞凋亡的临床意义[ J ]. *中华肿瘤杂志*, 2000 22( 4 ): 295 - 297
- [ 4 ] Chang J, Omenon M, Powles TJ, *et al* Apoptosis and proliferation as predictors of chemotherapy response in patients with breast carcinoma[ J ]. *Cancer* 2000 89( 11 ): 2145 - 2152
- [ 5 ] Davis DW, Buchholz TA, Hess KR, *et al* Automated quantification of apoptosis after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer[ J ]. *Clin Cancer Res* 2003 9( 3 ): 955 - 960.
- [ 6 ] 徐卫, 盛瑞兰, 郑肇巽, 等. 增殖相关抗原 Ki67 与非霍奇金淋巴瘤组织学恶性程度及预后关系的研究[ J ]. *江苏医药*, 2001 27( 4 ): 261 - 262
- [ 7 ] Dehant B, Bethwaite PB, Thomson A, *et al* Proliferation of renal cell carcinoma assessed by fixation resistant polyclonal Ki67 antibody labeling: Correlation with clinical outcome[ J ]. *Cancer* 1995 75( 11 ): 2714 - 2719
- [ 8 ] Molino A, Pedersini R, Micciob R, *et al* Relationship between the thymidine labeling and Ki67 proliferative indices in 126 breast cancer patients[ J ]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002 10( 4 ): 304 - 309
- [ 9 ] Koda M, Jarzabek K, Kanczuga K, *et al* Comparative studies of Ki67 expression between the primary tumor and breast cancer metastases to regional lymph nodes[ J ]. *Ginek Pol* 2003 74( 9 ): 754 - 760.
- [ 10 ] Trhvia H, Mumay S, Price K, *et al* Ki67 expression in breast carcinoma: Its association with grading systems, clinical parameters and other prognostic factors — a surrogate marker[ J ]? *Cancer* 2003 97( 5 ): 1321 - 1331.
- [ 11 ] 傅晓艳. 乳腺癌 Ki67 抗原表达与腋淋巴结转移和组织学分级的关系[ J ]. *蚌埠医学院学报*, 2005 30( 1 ): 17 - 19
- [ 12 ] Billgren AM, Rutqvist LE, Tani E, *et al* Proliferating fraction during neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer in relation to objective local response and relapse free survival[ J ]. *Acta Oncol* 1999 38( 5 ): 597 - 601
- [ 13 ] Faneyte IF, Schrama J, Peterse JL, *et al* Breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: Predictive markers and relation with outcome[ J ]. *Br J Cancer* 2003 88( 3 ): 406 - 412

脆性组氨酸三联体基因在胆囊癌的表达(正文见 579 页)



A 慢性胆囊炎, FHIT 强阳性表达  $\times 100$  B 胆囊腺瘤, FHIT 强阳性表达  $\times 400$   
C 胆囊腺癌 II 级, FHIT 阳性表达  $\times 400$  D 胆囊腺癌 III 级, FHIT 阴性表达  $\times 400$

图 1 FHIT 在胆囊良恶性病变组织中的表达

盐酸丁咯地尔对 SD 大鼠坐骨神经损伤后神经元的保护作用(正文见 582 页)

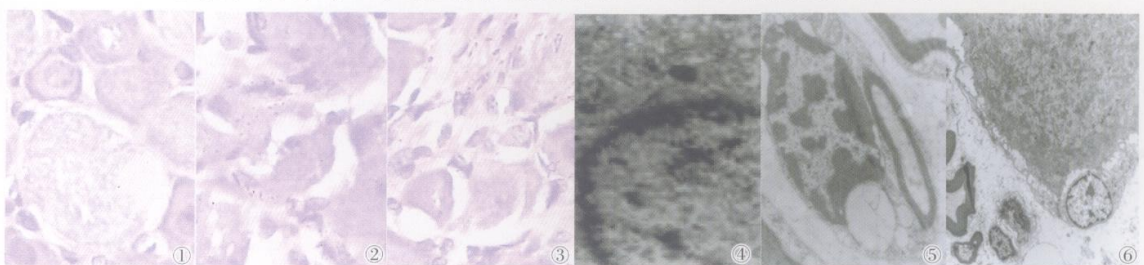


图 1 正常组 光镜下见大小二类神经元细胞, 胞膜、核膜完整, 核仁界清, 染色质分布均匀, 细胞质密度均匀, 虎斑清晰, 间质中无明显胶质增生  $\times 400$   
图 2 模型组 光镜下见大量坏死神经元细胞, 核仁深染呈固缩状, 染色质分布不均, 细胞质中大量空泡  $\times 400$   
图 3 盐酸丁咯地尔组 光镜下见神经元虎斑清晰, 染色质分布均匀, 细胞膜、核膜完整, 核仁界清  $\times 400$   
图 4 正常组 电镜下见胞膜、核膜完整, 染色质、细胞器分布均匀, 粗面内质网无肿胀  $\times 15k$   
图 5 模型组 电镜下见染色质分布不均, 聚集成块, 核仁模糊, 并可见凋亡小体  $\times 15k$   
图 6 盐酸丁咯地尔组 电镜下见核膜基本完整, 染色质、细胞器分布均匀, 内质网无明显肿胀, 沿胞膜、核见少量空泡, 基本与正常组接近  $\times 15k$

子宫平滑肌和胎膜内皮素受体-1 表达与分娩发动的关系(正文见 612 页)

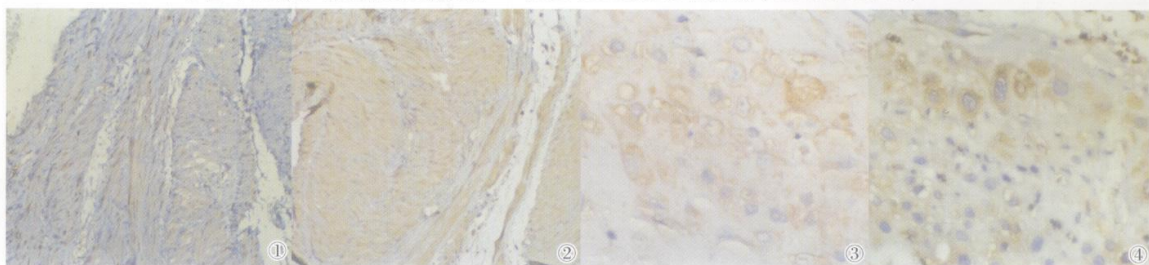


图 1 临产前子宫平滑肌 ETA-R 的表达, 胞膜、胞质中可见棕色颗粒 IIF $\times 200$   
图 2 临产后子宫平滑肌 ETA-R 仍表达于子宫平滑肌的胞膜、胞质中, 可见棕褐色颗粒 IIF $\times 200$   
图 3 临产前胎膜 ETA-R 的表达, 合体滋养细胞和细胞滋养细胞胞膜、胞质中可见棕色颗粒, 间质细胞仅有少量表达, IIF $\times 400$   
图 4 临产后胎膜 ETA-R 的表达, 合体滋养细胞和细胞滋养细胞胞膜, 表达范围广, 胞质中偶见棕褐色颗粒 IIF $\times 200$

新辅助化疗对乳腺癌细胞凋亡和增殖的影响(正文见 624 页)

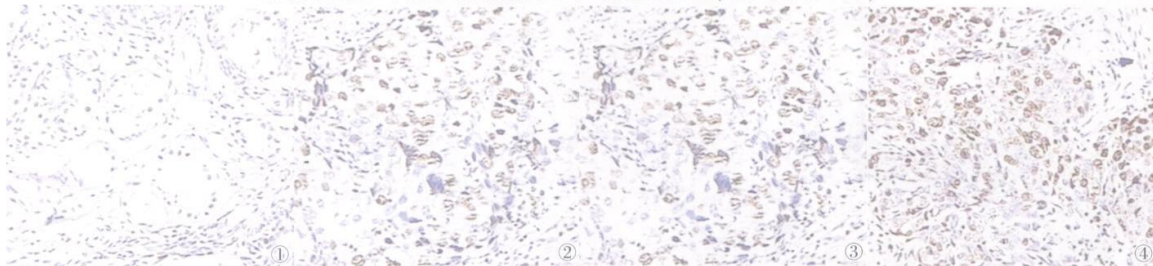


图 1 乳腺癌 Ki-67(-)  $\times 100$  图 2 乳腺癌 Ki-67(+)  $\times 400$  图 3 乳腺癌 Ki-67(++)  $\times 400$  图 4 乳腺癌 Ki-67(+++)  $\times 400$