

曲妥珠单抗对 HER-2 阳性早期乳腺癌骨髓微转移的影响

张聚良, 姚青, 陈江浩, 王廷, 王辉, 樊菁, 凌瑞, 易军, 王岭

Effects of Trastuzumab on bone marrow micrometastases in HER-2 positive early breast cancer

ZHANG Juliang, YAO Qing, CHEN Jianghao, WANG Ting, WANG Hui, FAN Jing, LING Rui, YI Jun, WANG Ling

Department of Vascular and Endocrine Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Shaanxi Xi'an 710032, China.

[Abstract] Objective: To explore the variation of bone marrow micrometastases in HER-2 positive early breast cancer before and after Trastuzumab therapy and the effects of Trastuzumab on bone marrow micrometastases. **Methods:** CK19 mRNA in bone marrow was detected by qRT-PCR as an index of micrometastases in 15 cases of HER-2 positive breast cancer and 18 HER-2 negative breast cancer preoperation and post-chemotherapy. 10 cases of HER-2 positive breast cancer continued Trastuzumab therapy and then were detected again for CK19 mRNA 3 months later. **Results:** CK19 mRNA was found in bone marrow of 14 cases of HER-2 positive and 8 cases of HER-2 negative breast cancer preoperation. There was a significant difference between the two groups ($P=0.000$). After 6 cycles adjuvant chemotherapy, CK19 positive rates in HER-2 positive and HER-2 negative breast cancer were 80.0% and 16.7%, respectively. Significant difference between the two groups was found ($P=0.000$). After 3 months Trastuzumab therapy, expression of CK19 mRNA declined significantly in 10 cases of HER-2 positive breast cancer (102.78 ± 98.24 vs 66.92 ± 49.18 , $P=0.036$). **Conclusion:** Bone marrow micrometastases correlate with HER-2 gene expression. Trastuzumab, a monoclonal antibody for HER-2, can reduce the bone marrow micrometastases in breast cancer. Thus bone marrow micrometastases may be a predictive factor for early effects of Trastuzumab therapy.

[Key words] Trastuzumab; breast cancer; bone marrow micrometastases

Modern Oncology 2012, 20(05):0953-0955

【摘要】 目的: 检测 HER-2 阳性的早期乳腺癌患者应用曲妥珠单抗(Trastuzumab)治疗前后骨髓微转移的改变,探讨 HER-2 基因及 Herceptin 对骨髓微转移的影响。**方法:** 应用实时定量逆转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)方法检测 15 例 HER-2 阳性乳腺癌及 18 例 HER-2 阴性乳腺癌患者术前及化疗后骨髓 CK19 的表达水平,其中 10 例 HER-2 阳性乳腺癌患者在化疗结束后,继续应用 Herceptin 治疗,3 月后再次抽取骨髓标本,qRT-PCR 检测 CK19 的表达水平。**结果:** 手术前,14 例 HER-2 阳性乳腺癌患者骨髓 CK19 表达阳性(93.3%),而 HER-2 阴性患者 8 例 CK19 表达阳性(44.4%),二者差异显著($P=0.000$)。化疗后,12 例 HER-2 阳性乳腺癌患者 CK19 表达阳性(80.0%),而 HER-2 阴性患者 3 例表达阳性(16.7%),二者差异显著($P=0.000$)。10 例 HER-2 阳性乳腺癌患者化疗后继续应用 Herceptin 治疗 3 月后,骨髓 CK19 的表达明显下降(102.78 ± 98.24 vs 66.92 ± 49.18 , $P=0.036$)。**结论:** HER-2 基因的表达与早期乳腺癌患者骨髓微转移密切相关,而 Herceptin 可以降低骨髓微转移病灶,提示骨髓微转移情况可以作为 Herceptin 治疗疗效的早期预测指标。

【关键词】 曲妥珠单抗; 乳腺癌; 骨髓微转移

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2012.05.24

【文章编号】 1672-4992-(2012)05-0953-03

【收稿日期】 2011-07-23

【修回日期】 2011-08-07

【作者单位】 第四军医大学西京医院血管内分泌外科,陕西 西安 710032

【作者简介】 张聚良(1975-),男,河北赵县人,博士,主治医师,讲师,主要从事乳腺癌临床研究。E-mail: vascularzhang@163.com

【通讯作者】 姚青(1967-),男,甘肃兰州人,副主任医师,副教授,主要从事乳腺癌的诊疗研究。E-mail: yangtz@tom.com

HER-2 基因的表达是早期乳腺癌最重要的预后影响因素。研究表明,HER-2 阳性的早期乳腺癌患者,无病生存率及总生存率均明显低于 HER-2 阴性患者。近年的一些研究显示,早期乳腺癌骨髓微转移的存在,是患者出现转移的重要因素,在可手术乳腺癌及转移性乳腺癌中,骨髓微转移都是一个独立的预后指标^[1]。在早期乳腺癌中,骨髓微转移是否和 HER-2 基因的表达相关,尚缺乏进一步的实验证据。为此,我们以上皮源性细胞特异性标志基因细胞角蛋白 19(CK19)为标志物,研究 HER-2 阳性早期乳腺癌与骨髓微转移的关系,并进一步探讨了探讨曲妥珠单抗(Herceptin)对骨髓微转移的影响,为 Herceptin 治疗疗效的判断提供参考。

1 材料和方法

1.1 病例资料

早期乳腺癌骨髓标本取自我院 2007-2010 年的患者,均经术前穿刺、组织病理证实,HER-2 基因阳性表达为免疫组织化学(3+)或 FISH 检测确认。根据 HER-2 基因的表达分为 HER-2 阳性组及 HER-2 阴性组,两组间患者的一般情况及病理特点见表 1。统计分析表明两组间分布无差异。两组患者分别于手术前、化疗结束后 1 月抽取骨髓血标本(化疗方案:多西他赛 75mg/m²,d₁;表柔比星 90mg/m²,d₁,q21d,共 6cycles),-80℃保存备提取 RNA。10 例 HER-2 阳性乳腺癌患者在化疗结束 1 月后继续接受 Herceptin 治疗(110mg/w,iv),3 月后同法采集标本,标本采集前均征得患者知情同意。

1.2 Real time RT-PCR

Trizol RNA 提取试剂盒购自 Promega 公司,按操作说明书,提取总 RNA,用逆转录试剂盒按操作说明将 mRNA 逆转录成 cDNA。设计并合成 CK19 引物:上游:5'-ATGCCGAAGCCAATATGAGGT-3',下游:5'-AGTAACCTCGGACCTGTCTCA-3';内参照 β-actin 引物:上游:5'-CCTTCCTGGGTATGCAATCCT-3',下游:5'-GGAGCAATGATCTTGATCTT-3';引物由上海生工公司合成。PCR 反应体系 25μl,包括反转录产物 0.5μl,SYBR Green PCR Mastermix 12.5μl,10mmol/L 的上下游引物各 0.5μl,补无菌 DEPC 水至 25μl。反应条件:95℃预变性 10s 后,95℃变性 5s,60℃退火延伸 34s,共 40 个循环。加样时,按照 ABI7500 real time PCR 仪操作说明书,每一样本和基因同时做一个相同的复孔。根据仪器给出的 ΔCt 值计算相对浓度。

1.3 统计分析

采用 SPSS10.0 统计软件,各组间比较采用秩和检验或 χ²检验,P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 手术前及化疗后骨髓标本中 CK19 的表达

手术前,14 例 HER-2 阳性乳腺癌患者骨髓标本中 CK19 表达阳性,而 HER-2 阴性患者 8 例 CK19 表达阳性(93.3% vs 44.4%),二者差异显著(P=0.000)。6 周期化疗结束后,12 例 HER-2 阳性乳腺癌患者 CK19 表达阳性,而 HER-2 阴性患者 3 例表达阳性,二者差异显著(80.0% vs 16.7%,P=0.000)(表 2)。不同病理类型、不同淋巴结转移情况及激素受体状态的乳腺癌,骨髓中 CK19 的表达无明显差异。

2.2 Herceptin 对 HER-2 阳性乳腺癌骨髓中 CK19 表达

的影响

在 HER-2 阳性患者,手术前及化疗后骨髓 CK19 的表达量未见明显变化(100.80±70.35 vs 89.66±72.05,P=0.322),10 例 HER-2 阳性乳腺癌患者接受 Herceptin 治疗 3 月后,CK19 表达明显下降(102.78±98.24 vs 66.92±49.18,P=0.03)(图 1)。

表 1 两组乳腺癌的组织病理特点 n(%)

Tab. 1 Patient and Tumor Characteristics n(%)

Tumor characteristics	HER-2 positive	HER-2 negative
Menopausal status		
Premenopausal	10(66.7)	11(61.1)
Postmenopausal	5(33.3)	7(38.9)
Histology		
Ductal	12(80.0)	14(77.8)
Lobular	3(20.0)	3(16.7)
Other	0	1(5.5)
Stage		
I	7(46.7)	9(50.0)
II _a	8(53.3)	9(50.0)
Lymph node status		
0	12(80.0)	13(72.2)
1-3	3(20.0)	5(27.8)
Estrogen receptor status		
ER(+)	8(53.3)	11(61.1)
ER(-)	7(46.7)	7(38.9)

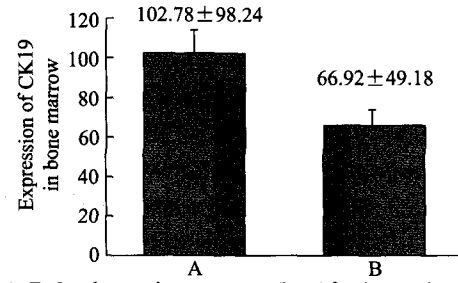
表 2 手术前及化疗后骨髓标本中 CK19 的表达 n(%)

Tab. 2 Expression of CK19 in bone marrow preoperation and post-chemotherapy n(%)

	CK19 positive expression	
	Preoperation	Post-chemotherapy
HER-2 positive patients	14(93.3)*	12(80.0)*
HER-2 negative patients	8(44.4)	3(16.7)

注: * 与 HER-2 阴性患者相比,差异有统计学意义

Note: Significant difference can be found; * with Her-2 negative patients



A: Before herceptin treatment; B: After herceptin treatment

图 1 HER-2 阳性乳腺癌接受 Herceptin 治疗后骨髓 CK19 表达的变化

注: A: Herceptin 治疗前; B: Herceptin 治疗后

Fig. 1 Variation of CK19 expression in HER-2 positive patients accepted Herceptin therapy

Note: A: Before Herceptin treatment; B: After Herceptin treatment

3 讨论

早期乳腺癌由于肿瘤较小,一般无淋巴结转移,因此,常见的预后因素包括激素受体状态及 HER-2 基因的表达,特别是 HER-2 基因是最重要的独立预后因素。大量研究证实,多种恶性肿瘤包括乳腺癌,肿瘤细胞的早期即可由原发

病灶分离播散,进入淋巴血管系统,增殖形成新的转移灶,我们以往的研究也显示,乳腺癌细胞黏附分子 E-cadherin 的表达缺失会导致肿瘤细胞的播散入血,因此,早期播散的肿瘤细胞是转移的重要途径^[2-3]。细胞角蛋白 19(CK19)是一种严格的上皮特异性分布蛋白质,非上皮来源组织或细胞如正常血液、骨髓和淋巴结不表达,因此,CK19 可作为肿瘤患者骨髓中是否存在播散肿瘤细胞即微转移的标志^[4]。Braun 等在一项大规模临床试验中证实,骨髓微转移的发生与肿瘤的大小、分化程度、激素受体状态等均相关^[1]。但由于研究中入选的病人包括 T₁、T₂ 及 T₃ 的各个分期,对于早期乳腺癌(T₁₋₂),骨髓微转移的发生是否与临床病理特征相关尚没有定论,Krishnamurthy 等研究表明,在早期乳腺癌,未发现骨髓微转移的发生与淋巴结状态及肿瘤的临床病理特征相关^[5]。我们的结果表明,HER-2 阳性的乳腺癌骨髓微转移发生率显著高于 HER-2 阴性患者,而与肿瘤的激素受体状态、淋巴结转移情况无关,特别是在辅助化疗结束后,HER-2 阳性患者骨髓标本中播散肿瘤细胞仍保持较高的表达率,而 HER-2 阴性患者则明显降低,提示癌细胞的播散可能不同于淋巴转移途径,而受 HER-2 基因调控。已有研究证实,在淋巴结阳性的乳腺癌中,伴有骨髓微转移的患者无病生存率及总生存率均显著低于无骨髓微转移者^[6],在早期乳腺癌中,随访表明骨髓播散肿瘤细胞数量较多时,提示更容易出现复发或转移^[7],证实骨髓微转移可作为预后判断指标。

在乳腺癌的治疗中,对于新辅助化疗、辅助化疗及靶向治疗等,主要依靠影像学指标进行疗效判定,缺乏有效地生物学指标,而影像学检查对于亚临床病灶敏感性不高,常常导致治疗延误或过度。有学者研究发现,Herceptin 可显著降低外周血循环肿瘤细胞的数量,而 Rack 等在最新的一项研究中发现,HER-2 阳性乳腺癌患者应用 Herceptin 治疗 12 月后,可显著降低骨髓中 HER-2 阳性的播散肿瘤细胞数量,而 2 例治疗后播散肿瘤细胞无变化者,则出现了转移^[8-9]。我们的结果也显示,HER-2 阳性乳腺癌患者在辅助化疗后骨髓微转移未见明显变化,而继续接受 Herceptin 治疗 3 月后,骨髓播散肿瘤细胞的数量显著下降,提示骨髓播散肿瘤细胞在 Herceptin 治疗的疗效判定方面具有参考价

值,有助于指导治疗。选择骨髓微转移作指标,也具有取材容易,检测方便,便于重复等优点。当然,由于病例数较少,缺乏随访资料,能否以骨髓播散肿瘤细胞的变化来选择 Herceptin 的疗程、准确判断 Herceptin 的疗效仍有待更详尽的循证医学证据。

【参考文献】

- [1] Braun S, Pantel K, Muller P, et al. Cytokeratin - positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer[J]. N Engl J Med, 2000, 342: 525 - 533.
- [2] Husemann Y, Creigi BJ, Schubert, et al. Systemic spread is an early step in breast cancer[J]. Cancer Cell, 2008, 13: 58 - 68.
- [3] 张聚良,王岭,凌瑞,等. 乳腺癌组织中 E-cadherin 的表达与外周血微转移的相关性及临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2005, 3(6): 43 - 45.
- [4] Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, et al. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse - transcriptase polymerase chain reaction[J]. J Clin Oncol, 1994, 12(3): 475 - 482.
- [5] Krishnamurthy S, Cristofanilli M, Singh B, et al. Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer[J]. Cancer, 2010, 116(14): 3330 - 3337.
- [6] Gilje B, Nordgård O, Tjensvoll K, et al. Mitotic activity and bone marrow micrometastases have independent prognostic value in node positive breast cancer patients. Breast [J]. Cancer Res Treat, 2011, 128(1): 137 - 146.
- [7] Solá M, Margelf M, Castelló E, et al. Prognostic value of hematogenous dissemination and biological profile of the tumor in early breast cancer patients: A prospective observational study[J]. BMC Cancer, 2011, 11: 252.
- [8] Bozionellou V, Mavroudis D, Perraki M, et al. Trastuzumab administration can effectively target chemotherapy - resistant cytokeratin - 19 messenger RNA - positive tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(24): 8185 - 8194.
- [9] Rack B, Jückstock J, Günthner - Biller M, et al. Trastuzumab clears HER2/neu - positive isolated tumor cells from bone marrow in primary breast cancer patients[J]. Arch Gynecol Obstet, 2011, 6: 30.

(编校:张西敏)

化学元素和核素符号规范书写的要求

根据 GB3102.8-93《物理化学和分子物理学的量和单位》的规定,现将化学元素和核素符号书写的规范要求介绍如下:

①元素或核素的单字母符号均用正体大写,双字母符号首字母正体大写,第二个字母用正体小写。②核素的核子数(质子数)应标注在元素符号的左上角,例如:⁶⁰Co、³²P、^{99m}Tc、¹²⁵I 等;把核子数标注在元素符号右上角的写法是错误的,例如:N¹⁴、Co⁶⁰等。③离子价态的字符应标注在元素符号的右上角,例如:H⁺, Cl⁻, O²⁻, Mg²⁺, Al³⁺, PO₄³⁻等,不应写成 O⁻², O^{- -}, Mg⁺², Mg^{+ +}, Al^{+ + +}, PO₄⁻³等。④激发态的字符(电子激发态用 *;核子激发态用正体 m,也可用 *) 标注在元素或核素符号的右上角,例如:¹¹⁰Ag^m, ¹¹⁰Ag*, He*, NO* 等。⑤分子中核素的原子数标注在核素符号右下角,例如:H₂, FeSO₄ 等。⑥质子数(原子序数)标注在元素符号左下角,例如:₈₂Pb, ₂₆Fe 等。⑦对于形状相似的元素符号、化合物的化学式符号,书写时应注意区分,如:Co(钴) - CO(一氧化碳);No(锘) - NO(一氧化氮);Ba(钡) - Ra(镭);Nb(铌) - Nd(钕) - Np(镎);HF(氟化氢) - Hf(铪)等。

《现代肿瘤医学》编辑部