

· 临床研究 ·

基底细胞样乳腺癌临床病理学特点及其意义

高 雪, 关宏伟*, 王洪江, 刘焕然, 蔡 欣, 高鹤立

(大连医科大学附属第一医院病理科, 大连 16011)

【摘 要】目的 探讨基底细胞样乳腺癌的临床病理学特点及意义。方法 采用免疫组织化学 2 步法, 检测 E-钙黏素、基质金属蛋白酶 (MMP-7)、p53、增殖细胞核抗原 Ki-67 在 22 例腔上皮 A 型、23 例腔上皮 B 型、20 例基底细胞样型、23 例人表皮生长因子 2 (HER2) 高表达型、17 例正常乳腺表型乳腺癌组织中的表达情况, 同时对临床病理特征进行统计学分析, 随访 6~60 个月。结果 腔上皮 A 型、腔上皮 B 型、基底细胞样型、HER2 高表达型、正常乳腺表型乳腺癌平均发病年龄分别为 54.5, 51.1, 48.8, 52.0, 56.0 岁, 其中基底细胞样型中老年女性占 20.0% (5/20); 肿物平均大小分别为 3.4, 3.5, 2.1, 3.0, 3.5 cm; 5 年无瘤生存率分别为 78.3% (17/22), 73.9% (17/23), 40.0% (8/20), 65.2% (15/23), 70.6% (12/17), 基底细胞样型低于其余 4 型 ($P < 0.05$); 5 型乳腺癌中 p53 蛋白阳性率分别为 22.7%, 26.1%, 60.0%, 56.5%, 23.5%, 基底细胞样型和 HER2 高表达型 p53 蛋白阳性率高 ($P < 0.05$); E-钙黏素阳性率分别为 100.0%, 100.0%, 80.0%, 100.0%, 100.0%, 基底细胞样型低于其余四型 ($P < 0.05$); MMP-7 阳性率分别为 40.9%, 52.2%, 85.0%, 69.6%, 64.7%, 基底细胞样型高于腔上皮 A、腔上皮 B 型 ($P < 0.05$); Ki-67 $< 10\%$ 阳性率分别为 59.1%, 39.1%, 25.0%, 30.4%, 29.4%, Ki-67 $10\% \sim 30\%$ 阳性率分别为 36.4%, 52.2%, 40.0%, 52.2%, 58.8%, Ki-67 $\geq 30\%$ 阳性率分别为 4.5%, 8.7%, 35.0%, 17.4%, 11.8%, 说明基底细胞样型增殖指数显著增高 ($P < 0.01$)。多因素分析表明, 基因分型不是乳腺癌预后的独立因素 ($P > 0.05$)。结论 基因分型乳腺癌中, 基底细胞样型平均发病年龄较小, 通常为绝经前期; 基底细胞样型乳腺癌侵袭转移力高、细胞增殖更旺盛、易发生 p53 基因突变, 且 5 年生存率最低。

【关键词】乳腺肿瘤; 癌, 基底细胞; 病理学

【中图分类号】R737.9

【文献标识码】A

【DOI】10.3724/SP.J.1264.2011.00060

Clinicopathological features of basal-like breast carcinoma and its significance

GAO Xue, GUAN Hongwei*, WANG Hongjiang, LIU Huanran, CAI Xin, GAO Heli

(Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian 116011, China)

【Abstract】Objective To investigate the clinicopathological features of basal-like breast carcinoma and its significance. Methods A total of 105 patients with breast carcinoma were enrolled in this study, including 22 cases of luminal type A, 23 of luminal type B, 20 of basal-like, 23 of HER2-enriched and 17 of normal breast-like. The expressions of p53, E-cadherin, matrix metalloproteinase-7 (MMP-7), Ki-67 in tumour cells were examined immunohistochemically. The clinicopathological features were analyzed statistically. The follow-up period ranged from 6 to 60 months. Results For the five breast tumor subtypes, sequentially luminal A, luminal B, basal-like, HER2- over-expression, and normal breast-like, the mean age was 54.5, 51.1, 48.8, 52.0 and 56.0 years respectively, and the rate of elderly was 20.0% (5/20) in basal-like tumor; the mean tumor size was 3.4, 3.5, 2.1, 3.0 and 3.5 cm respectively; the 5-year tumor-free survival rate was 78.3% (17/22), 73.9% (17/23), 40.0% (8/20), 65.2% (15/23) and 70.6% (12/17) respectively, significantly lower in basal-like subtype ($P < 0.05$); p53 positive expression rate was 22.7%, 26.1%, 60.0%, 56.5% and 23.5% respectively, significantly higher in basal-like and HER2-over-expression subtypes ($P < 0.05$); E-cadherin positive expression rate was 100.0%, 100.0%, 80.0%, 100.0%, and 100.0% respectively, lower in basal-like subtype ($P < 0.05$); MMP-7 positive expression rate was 40.9%, 52.2%, 85.0%, 69.6% and 64.7% respectively, higher in basal-like subtype than in luminal A and B subtypes ($P < 0.05$). Ki-67 index was divided into three levels ($< 10\%$, $10\% \sim 30\%$, $\geq 30\%$). The positivity rate of Ki-67 $< 10\%$ was 59.1%, 39.1%, 25.0%, 30.4% and 29.4% respectively; that of Ki-67 $10\% \sim 30\%$ was 36.4%, 52.2%, 40.0%, 52.2% and 58.8% respectively; that of Ki-67 $\geq 30\%$ was 4.5%, 8.7%, 35.0%, 17.4% and 11.8% respectively. The basal-like subtype had higher proliferation index in all three levels ($P < 0.01$). Log-rank analysis suggested that the genotyping was not related to the prognosis of the breast carcinoma ($P > 0.05$). Conclusions Compared to other subtypes, basal-like breast carcinoma is usually found in younger patients before menopause. The basal-like breast carcinoma has a poor prognosis and high invasion ability and high mutation rate of p53.

【Key words】breast neoplasms; carcinoma, basal cell; pathology

收稿日期: 2011-09-07; 修回日期: 2011-10-05

通讯作者: 关宏伟, Tel: 0411-83635963-3191, E-mail: mudghw@yahoo.com.cn

近年按基因表达谱将乳腺癌分为 5 种亚型: 腔上皮 A 型、腔上皮 B 型、人表皮生长因子 2 (human epidermal growth factor receptor, HER2) 高表达型、基底细胞样型和正常乳腺表型。该分型提出伊始, 基底细胞样型就被认为预后差, 成为关注焦点。最近, 有学者提出相反意见^[1,2]。基于基因分型的预后研究结果不一致, 国内研究又甚少, 本研究对腔上皮 A 型、腔上皮 B 型、HER2 高表达型、基底细胞样型和正常乳腺表型的临床病理特征及预后进行了深入分析, 应用免疫组织化学法检测了 E-钙黏素、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP)-7、p53、增殖细胞核 Ki-67 在 5 型乳腺癌中的表达, 并探讨了其免疫表型特点及意义。

1 对象与方法

1.1 对象

收集大连医科大学附属第一医院病理科 2001~2005 年间有完整临床资料的女性浸润性乳腺癌 (均行改良根治术) 标本 501 例, 年龄 20~74 岁, 按 Nielsen 标准^[1]分型, 选取其中 105 例, 包括基底细胞样型 20 例、HER2 高表达型 23 例、腔上皮 A 型 22 例、腔上皮 B 型 23 例、正常乳腺表型 17 例, 随访 6~60 个月。所有组织均经 4% 中性甲醛固定, 24h 常规石蜡包埋、制片, 4 μ m 连续切片。入选病例术前未进行放疗、化疗及内分泌治疗, 术后除 1 例外均接受了内分泌治疗和 (或) 化疗。

1.2 免疫组织化学方法

p53、MMP7、E-钙黏素、雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、HER2 (c-erbB-2)、细胞角蛋白 (cytokeratin 5/6, CK5/6) 和表皮生长因子受体 (human epidermal growth factor receptor, EGFR) 抗体均为即用型抗体, 购自福州迈新生物技术开发有限公司。检测试剂盒 PBS 替代一抗作为阴性对照, 已知阳性反应片作为阳性对照。免疫组织化学染色判读标准如下: 阳性细胞数量和染色程度按 3 分制计分^[1], 0 分, 阴性或阳性细胞数 < 5%; 1 分, 阳性强度弱和 (或) 阳性细胞数 < 20%; 2 分, 强阳性或阳性细胞数 $\geq$ 20%, 其中 0 分视为阴性, 1 分和 2 分均视为阳性。E-钙黏素、EGFR、HER2 为细胞膜阳性, MMP-7 为细胞浆阳性, CK5/6 为细胞膜/浆阳性, p53、ER 为细胞核阳性。HER2 按乳腺癌 HER2 检测指南 (2009 版) 进行 HER2 判定。

1.3 荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH)

对免疫组织化学 HER2 (+ +) 样本进行 HER2 基因检测, 红色信号簇状分布或点状分布 (红信号/绿信号 > 2.2) 判定为 HER2 基因扩增。

1.4 统计学处理

应用 SPSS12.0 软件进行统计学处理。统计方法采用 χ^2 、成组设计的 t 检验和非参数秩和检验; 生存分析采用 Kaplan-Meier 法, 行 Log-rank 检验; Cox 模型用于多因素风险分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床及病理资料

腔上皮 A 型、腔上皮 B 型、基底细胞样型、HER2 高表达型和正常乳腺表型的平均发病年龄分别为 54.5, 51.1, 48.8, 56.0, 52.0 岁, 其中基底细胞老年女性占 25% (5/20); 肿瘤平均直径分别为 3.43, 3.49, 2.12, 2.97, 3.50 cm, 基底细胞样型小于腔上皮 A、B 型和正常乳腺表型 ($P < 0.05$)。5 型乳腺癌在发病年龄、临床分期、组织病理分级、淋巴结转移方面无差异, 但 5 年无瘤生存率分别为 78.3% (17/22), 73.9% (17/23), 40.0% (8/20), 65.2% (15/23), 70.6% (12/17), 基底细胞样型最低, 腔上皮 A 型最高 ($P < 0.05$; 表 1, 图 1)。

图 1 5 种基因分型乳腺癌的生存曲线图

2.2 FISH 方法检测 HER2 基因的扩增

FISH 方法检测 HER2 (+ +) 样本, 结果显示, 红色信号成簇, HER2 基因扩增阳性 (图 2)。

2.3 免疫组织化学染色结果

在腔上皮 A、腔上皮 B、基底细胞样型、HER2 高表达型、正常乳腺表型中, E-钙黏素定位于细胞膜上, 胞质有少量表达, 其阳性率分别为 100.0% (22/22), 100.0% (23/23), 80.0% (16/20), 100.0% (23/23), 100.0% (17/17), 基底细胞样型表达低于其他 4 型 ($P < 0.05$); MMP-7 表达于细胞质, 其阳性率分别为 40.9% (9/22), 52.2% (12/23), 85% (17/20), 69.6% (16/23), 64.7% (11/17), 基底

细胞样型明显高于腔上皮 A, 腔上皮 B 型 ($P < 0.05$) ; p53 在肿瘤细胞核表达, 其表达率分别为 22.7%(5/22), 26.1%(6/23), 60.0%(12/20), 56.5% (13/23) , 23.5% (4/17) , 基底细胞样型和 HER2 高表达型显著高于其他 3 种类型乳腺癌($P < 0.05$); Ki-67 在细胞核中表达, Ki-67 $< 10\%$ 阳性率分别为 59.1%, 39.1%, 25%, 30.4%, 29.4%, Ki-67 10%~30%阳性率分别为 36.4%, 52.2%, 40.0%, 52.2%, 58.8%, Ki-67 $\geq 30\%$ 阳性率分别为 4.5%, 8.7%, 35.0%, 17.4%, 11.8%, 说明基底细胞样型增殖指数显著增高 ($P < 0.01$; 表 1, 图 3)。

图 2 FISH 检测 HER2 基因扩增 (×1000)

表 1 5 种基因分型乳腺癌的临床病理学特点及免疫组织化学分析

参 量		腔上皮 A 型(<i>n</i> =22)	腔上皮 B 型(<i>n</i> =23)	基底细胞样型(<i>n</i> =20)	HER2(<i>n</i> =23)	正常乳腺表型(<i>n</i> =17)
发病平均年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)		54.54 ± 2.13	51.10 ± 2.06	48.80 ± 3.25	56.04 ± 2.18	51.97 ± 1.09
肿瘤平均直径(cm, $\bar{x} \pm s$)		3.43 ± 1.45	3.49 ± 2.49	2.12 ± 0.97 ^{*#▲}	2.97 ± 1.37	3.50 ± 2.24
临床分期(<i>n</i>)		3	7	4	4	3
组织学分级(<i>n</i>)	I	16	11	7	9	10
		3	5	9	10	3
		0	0	0	0	1
		4	4	0	2	2
		12	12	10	11	10
淋巴结转移(<i>n</i>)	无	6	7	10	10	5
		10	12	13	10	11
		12	11	7	13	6
p53(<i>n</i>)	+	5	6	12 ^{*#▲}	13 ^{*#▲}	4
	-	17	17	8	10	13
E-钙黏素(<i>n</i>)	+	22	23	16 ^{*#▲}	23	17
	-	0	0	4	0	0
MMP-7(<i>n</i>)	+	9	12	17 ^{*#}	16	11
	-	13	11	3	7	6
Ki-67 表达百分比(<i>n</i>)	< 10%	13	9	5	7	5
	10%~30%	8	12	8	12	10
	> 30%	1	2	7 ^{**##▲▲}	4	2
5 年无瘤生存率[%(<i>n</i> / <i>n</i>)]		78.3(17/22)	73.9(17/23)	40.0(8/20) ^{*#▲}	65.2(15/23)	70.6(12/17)

注: 与腔上皮 A 型比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; 与腔上皮 B 型比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与 HER2 高表达型比较, $P < 0.05$, $P < 0.01$; 与正常乳腺表型比较, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$

图 3 免疫组织化学检测不同蛋白的阳性表达 (DAB ×400)

A: E-钙黏素; B: MMP-7; C: p53; D: Ki-67 阳性表达率 $\geq 30\%$; E: Ki-67 阳性表达率 10%~30%; F: Ki-67 阳性表达率 $< 30\%$

2.4 多变量分析

多变量分析显示, 基因分型不是 5 年无瘤生存期独立的预后因素 ($P > 0.05$; 表 2)。

表2 Cox回归进行乳腺癌5年无瘤生存率多因素分析

因素	<i>r</i>	RR	95% CI
基因分型	- 0.099	0.906	0.648~1.265
肿瘤直径	0.071	0.932	0.768~1.131
年龄	- 0.022	0.978	0.948~1.010
WHO分级	0.237	1.267	0.664~2.419
临床分期	0.818*	2.267	1.095~4.694
淋巴结转移	1.522*	4.583	1.470~14.286
p53	0.797*	2.218	1.059~4.647
E-钙黏素	- 0.990	0.371	0.122~1.135
MMP7	0.247	1.280	0.534~3.071
Ki-67	0.724*	2.063	1.146~3.713

注: * $P < 0.05$

3 讨 论

自乳腺癌基因分型提出以来, 对各型的预后一直存在争论。Jumppanen 等^[2]采用免疫组织化学和基因芯片技术研究了 375 例乳腺癌, 发现基底细胞样乳腺癌在短期随访时间内 (3 年和 5 年) 具有较短的无瘤生存期, 但长期随访 (10 年) 无瘤生存率与非基底细胞样型无差异。Kim 等^[3]研究了 776 例乳腺癌, 认为 HER2 高表达型预后更差于基底细胞样型。Sotiriou 等^[4]和 Sørlie 等^[5]均发现基底细胞样型和 HER2 高表达型预后最差。中国人群基底细胞样型的预后分析仅见刘慧等^[6]报道。我们的结果显示, 基底细胞样型平均发病年龄较轻 (48.8 岁), 大部分为非绝经期女性。腔上皮 A 型, 腔上皮 B 型、HER2 高表达型和正常乳腺样型的平均发病年龄分别为 54.5, 51.1, 56.0, 52.0 岁, 大多数为绝经期女性, 虽然基底样型平均发病年龄较轻, 但老年女性也可发病, 本研究中老年患者占 25%。5 组病例中, 患者的发病年龄、临床分期、肿瘤的病理分级和淋巴结转移情况无明显差异, 但 5 年无瘤生存率以基底细胞样型最低 ($P < 0.05$)。

已知侵袭和转移是造成癌症患者预后不佳、致死的主要原因。基底细胞样乳腺癌预后差, 可能与其具有高侵袭、转移能力相关。目前公认黏附、降解、运动为侵袭转移的三步骤, 其中细胞黏附性的改变是癌症发生侵袭转移的始动或先决条件之一。上皮钙黏蛋白 (E-钙黏素) 是钙黏蛋白家族中的一个重要成员, 该蛋白是一种关键的跨膜黏附分子, 主要定位于上皮细胞膜, 通过其胞外区介导细胞与

细胞及细胞与细胞外基质间的黏附。在癌细胞中常有 E-钙黏素的表达异常, 由此导致细胞的黏附能力下降而呈现明显的侵袭和转移趋向。在乳腺癌的研究中, 通常认为 E-钙黏素在小叶癌中表达缺失, 但在浸润性导管癌中总有表达^[7]; 也有报道 E-钙黏素在部分浸润性导管癌中表达下调乃至缺失。我们的结果显示, 在基底细胞样型中 E-钙黏素表达下调甚至缺失 ($P < 0.05$), 提示基底细胞样型的癌细胞膜 E-钙黏素减少, 导致癌细胞间黏附性降低, 致使癌细胞易于脱离原发灶侵入周围组织。这与 Mahler-Araujo 等^[8]研究一致。

基底膜 (basement membrane, BM) 和细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 是癌细胞侵袭和转移的主要防御屏障, 癌细胞从病灶原位向周围组织间隙侵袭必须首先突破 BM 和 ECM, 因此 ECM 与癌组织的生物学行为及预后密切相关。MMP-7 是基质金属蛋白酶家族成员之一, 能降解 BM 和 ECM 的多种成分, 且是降解 BM 的酶中最重要的一种, 在肿瘤发展过程中起重要作用。MMP-7 通过降解 ECM, 破坏机体防御肿瘤浸润的自然屏障, 增加癌细胞的侵袭性, 而促进肿瘤浸润与转移。在乳腺癌的相关研究中, 多数表明, MMP-7 在浸润性癌中表达高于原位癌, 且随着浸润性导管癌的级别增高而表达递增^[9]。González 等^[10]研究 93 例乳腺癌, 发现 MMP-7 在基底细胞样型和浸润性导管癌 (I 级) —— 管腔 A 型 [ER (+), HER2 (-)] 中表达无统计学差异, 而 MMP-9, MMP-11 在基底细胞样型表达上调。我们研究发现, MMP-7 在基底细胞样型中表达高于腔上皮 A, B 型 ($P < 0.05$), 说明基底细胞样型较腔上皮 A, B 型易发生 BM 和 ECM 降解, 癌细胞的侵袭性增强, 从而更易发生浸润和转移。

癌症患者预后不佳、致死的原因还与肿瘤细胞的增殖能力有关。增殖细胞核抗原 Ki-67 是一种与细胞周期相关的蛋白质, 是目前多种恶性肿瘤, 尤其是乳腺癌研究中的热门生物指标, 可通过 Ki-67 抗原的检测, 了解恶性肿瘤的细胞增殖活性。Ki-67 表达范围覆盖除 G0 期以外的各增殖周期细胞。相关研究表明, Ki-67 在低分化腺癌组织中的表达较在中高分化腺癌组织的表达明显升高, 表明 Ki-67 染色阳性程度与组织学分级具有相关性。本实验结果显示, 基底细胞样型中 Ki-67 $\geq 30\%$ 的病例明显增多, 表明基底细胞样型细胞增殖活性高, 是导致预后不良的一个因素。

P53 基因突变是乳腺癌进程中的早期事件, 是乳腺癌发生和发展的重要原因之一, 约 20%~60% 的乳腺癌有 P53 突变。突变型 P53 蛋白是突变型 P53 基因的产物, 是一种肿瘤促进因子, 它可以消除正常 P53 的功能, 在正常人体组织中往往检测不到 P53 蛋白的存在, 而在某些肿瘤组织中突变型 P53 蛋白高表达。有研究显示, 随着肿瘤的进展, P53 蛋白表达阳性率明显升高, 肿瘤组织分化更差, P53 蛋白是判断预后的一个重要的独立指标。本实验结果显示, P53 蛋白在基底细胞样型和 HER2 高表达型中过表达 ($P < 0.05$), 证实基底细胞样型和 HER2 高表达型乳腺癌的发生发展中 P53 基因突变率较高, 且它们的组织学分级也多数为 2, 3 级, 肿瘤组织分化差。

单因素分析结果显示, 基因分型乳腺癌中基底细胞样型 5 年无瘤生存期最短, 但多变量分析表明, 基因分型不是 5 年无瘤生存期独立的预后因素。

【参考文献】

- [1] Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, *et al.* Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(16): 5367-5374.
- [2] Junttanen M, Gruvberger-Saal S, Kauraniemi P, *et al.* Basal-like phenotype is not associated with patient survival in estrogen-receptor-negative breast cancers[J]. Breast Cancer Res, 2007, 9(1): R16.
- [3] Kim MJ, Ro JY, Ahn SH, *et al.* Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-over-expressing phenotypes[J]. Hum Pathol, 2006, 37(9): 1217-1226.
- [4] Sotiriou C, Neo SY, Mcshane LM, *et al.* Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study[J]. PNAS, 2003, 100(18): 10393-10398.
- [5] Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(19): 10869-10874.
- [6] 刘 慧, 范钦和, 张智弘, 等. 免疫组织化学诊断标准对基底细胞样型乳腺癌预后分析的影响[J]. 中华病理学杂志, 2009, 38(1): 23-28.
- [7] Nurismah MI, Noriah O, Suryati MY, *et al.* E-cadherin expression correlates with histologic type but not tumour grade in invasive breast cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2008, 9(4): 699-702.
- [8] Mahler-Araujo B, Savage K, Parry S, *et al.* Reduction of E-cadherin expression is associated with non-lobular breast carcinomas of basal-like and triple negative phenotype[J]. J Clin Pathol, 2008, 61(5): 615-620.
- [9] Gonzalez LO, Corte MD, Vazquez J, *et al.* Study of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in ductal in situ carcinomas of the breast[J]. Histopathology, 2008, 53(4): 403-415.
- [10] González LO, Corte MD, Junquera S, *et al.* Expression and prognostic significance of metalloproteases and their inhibitors in luminal A and basal-like phenotypes of breast carcinoma[J]. Hum Pathol, 2009, 40(9): 1224-1233.

(编辑: 任开环)