

文章编号:1005-6947(2010)07-0826-04

· 简要论著 ·

实时 PCR 检测 Her-2 扩增状态对乳腺癌新辅助化疗治疗机理的初探

海健¹, 田焕², 毛杰¹

(1. 中南大学湘雅医院 乳腺科, 湖南 长沙 410008; 2. 广东省中医院 乳腺科, 广东 广州 510120)

摘要:目的 检测 Her-2 基因拷贝量在新辅助化疗(NAC)前后的表达情况,初步探讨化疗药物对预后因子表达的调控。方法 采用实时 PCR 方法检测 28 例乳腺癌初治患者在接受新辅助化疗后,乳腺癌组织中 Her-2 基因拷贝量的变化情况。结果 新辅助化疗前 Her-2 基因拷贝量明显高于化疗后,但其 Her-2 基因拷贝量的改变与病例临床分期和化疗周期数目无关。结论 新辅助化疗能使乳腺癌 Her-2 基因拷贝量减少,下调 Her-2 基因的表达,提示新辅助化疗也可能通过下调 Her-2 基因的表达,而改善乳腺癌患者的预后。

[中国普通外科杂志,2010,19(07):826-829]

关键词: 乳腺肿瘤; 新辅助化疗; Real-time PCR; Her-2 基因

中图分类号: R 737.9 **文献标识码:** B

新辅助化疗(NAC)应用于乳腺癌的临床治疗已有 30 多年,取得了良好的疗效。Her-2 基因是目前公认的乳腺癌预后因子,直接参与了乳腺癌的发生、发展,并与辅助治疗方案的选择密切相关。新辅助化疗对 Her-2 基因表达状态的影响机制,目前仍不清楚,并且关于这方面的研究也多限于免疫组化的方法。笔者研究采用实时 PCR 方法,检测乳腺癌患者新辅助化疗前后 Her-2 基因拷贝量的变化情况,观察新辅助化疗对 Her-2 表达调控的影响,探讨新辅助化疗作用的可能机制。

1 资料与方法

1.1 研究入选对象

以 2008 年 3 月—2009 年 2 月于我科治疗的 28 例乳腺癌患者为研究对象,既往均未接受任何乳腺手术、未接受过放射治疗或化学治疗。行新辅助化疗前均以麦默通活检获取新鲜乳腺癌组织标本,经组织病理学证实为浸润性乳腺癌。

1.2 研究对象的一般资料

本组患者均为女性,年龄 35 ~ 63 岁(平均 46.3 岁)。就诊时肿块大小介于 2.5 cm × 3.0 cm ~ 9.0 cm × 10.0 cm 之间。根据 TMN 分期,其中 II 期 14 例,III 期 8 例,IV 期 6 例。病理类型均为浸润性导管癌。所有患者均接受了 TAC 方案(紫杉醇/多西紫杉醇 + 吡喃阿霉素/表阿霉素 + 环磷酰胺)化疗。其中有 12 名患者接受 2 周期新辅助化疗,16 例患者接受 3 ~ 4 周期新辅助化疗。经 2 ~ 4 周期新辅助化疗后,肿块最大径介于 0 ~ 5.0 cm 之间。其中,临床完全缓解 5 例,部分缓解 20 例,疾病稳定 3 例。所有患者接受新辅助化疗后均行乳腺癌改良根治术。上述 28 名患者新辅助化疗前的穿刺活检组织标本和新辅助化疗后的根治手术组织标本均用于实时 PCR 检测。

1.3 实时 PCR (RT-PCR) 检测 Her-2

对上述 28 名患者新辅助化疗前的穿刺活检组织标本和新辅助化疗后的根治手术组织标本均用于 RT-PCR 检测 Her-2。

组织 DNA 用 Promega 组织 DNA 提取试剂盒(美国 Promega 公司)提取,然后使用 LightCycler 荧光定量 PCR 扩增仪对目的基因 Her-2 和内参基因 β -globin 进行扩增检测。目的基因 Her-2 及内参基因 β -globin 的引物均由上海生工公司合成。Her-2 基因引物序列:上游 5'-CCTCTGACGTC-

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目(07JJ3040)。

收稿日期: 2010-04-18; **修订日期:** 2010-05-28。

作者简介: 海健,中南大学湘雅医院主治医师,主要从事乳腺癌防治方面的研究。

通讯作者: 毛杰 E-mail:maojie1166@sina.com

CATCGTCTC-3', 下游 5'-CGGATCTTCTGCTGC-CGTCG-3'; β -globin 引物序列: 上游 5'-ACA-CAACTGTGTTCACTAGC-3', 下游 5'-CAACTTCATC CACGTTACC-3'^[1]。建立 20 μ L 反应体系, 在 (LightCycler) 荧光定量 PCR 扩增仪(瑞士 Roche 公司)上完成, 反应条件如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 s, 95 $^{\circ}$ C 复性 10 s, 59 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 共 45 个循环, 40 $^{\circ}$ C 总延伸 10 min。在 LightCycler 3.0 数据分析系统中读出 CT 值结果。扩增反应结束后, 立即进行融解曲线分析, 判定是否有非特异性扩增产物的存在。分别计算 Her-2 及 β -globin 基因的 Ct 值, 两者之差即为 Δ Ct 值。新辅助化疗后组织 Δ Ct 值与新辅助化疗前组织 Δ Ct 值之差为 $\Delta\Delta$ Ct 值, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 即为 Her-2 基因在新辅助化疗后组织中和新辅助化疗前组织中表达水平之比

的倍数。阴性对照所用的是宝生物公司的试剂盒里面配有的标准 Her-2 阴性对照基因代替组织 DNA 提取的目标基因。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件包处理数据, 行 Cochran & Cox 近似 *t* 检验。

2 结果

2.1 RT-PCR 反应扩增和融解曲线

Her-2 基因与 β -globin 基因扩增效率基本相同, 融解曲线为单峰。阴性对照中, 没有出现起峰的扩增曲线, 且融解曲线无明显主峰。提示上述引物特异性较好, 扩增产物为目的片段, 没有非特异性扩增产物的存在(图 1-2)。

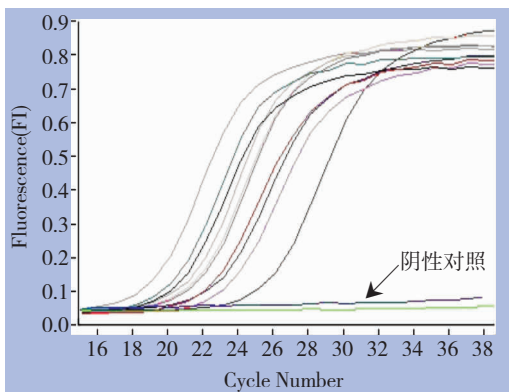


图 1 2 名患者在新辅助化疗前后各自的乳腺癌 Her-2 基因与 β -globin 基因扩增表现 蓝色和绿色 2 条无起峰的水平直线为阴性对照

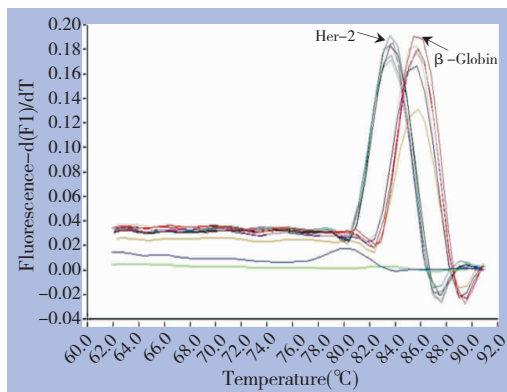


图 2 图 1 中 2 例患者扩增反应结束后立即进行的融解曲线分析图 蓝色和绿色无明显主峰的融解曲线为阴性对照, 提示无非特异性扩增产物的存在; 其余曲线分别为 Her-2 基因与 β -globin 基因的融解曲线。Her-2 基因扩增片段长度小于 β -globin 基因, 因此其主峰位置较 β -globin 基因的靠前

2.2 新辅助化疗对 Her-2 基因表达的影响

28 例患者新辅助化疗后, 19 例(67.9%) 患者新辅助化疗后 Her-2 基因相对量下降, 9 例(32.1%) 患者新辅助化疗后 Her-2 基因相对量上升。28 例患者新辅助化疗后平均 Her-2 基因表达的下调($P < 0.05$)(表 1)。

2.3 新辅助化疗周期数对 Her-2 表达的影响

根据这些患者接受新辅助化疗周期数不同, 将这 28 名患者分为新辅助化疗 2 周期组和 3 ~ 4 周期组, 结果显示 Her-2 基因拷贝相对量的变

化与患者所接受的新辅助化疗周期数目无关(表 2)。

表 1 新辅助化疗对 Her-2 基因相对量的影响

项目	新辅助化疗前 Her-2 基因相对 Δ Ct 值	新辅助化疗后 Her-2 基因相对 Δ Ct 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
19 例下调	-0.3300 \pm 1.9366	2.0495 \pm 2.4284	-3.339	0.002
9 例上调	1.4278 \pm 1.6914	19.8289 \pm 3.8968	-12.995	0.000
28 例总计	0.2350 \pm 2.0116	1.5343 \pm 2.2842	2.2589	<0.05

表2 不同新辅助化疗周期数对 Her-2 基因相对量的影响

项目	新辅助化疗 2 周期组 ($n = 12$)	新辅助化疗 3~4 周期组 ($n = 16$)	t 值	P 值
化疗前 Her-2 基因拷贝相对量	2.7241 \pm 6.1101	1.7504 \pm 2.5817	0.518	0.612
化疗后 Her-2 基因拷贝相对量	0.7830 \pm 1.0145	0.8038 \pm 1.2299	-0.049	0.961
化疗前后 Her-2 基因拷贝相对量的变化	0.7508 \pm 1.01787	0.9722 \pm 0.9096	0.8204	> 0.05

2.4 新辅助化疗对不同临床分期患者 Her-2 表达的影响

根据乳腺癌 TNM 分期不同,将这 28 名患者

分为 II, III, IV 期病例组,发现 Her-2 基因拷贝相对量的变化与患者 TNM 分期无关(表 3)。

表3 不同病例分期之间新辅助化疗前后 Her-2 基因相对量的变化情况

项目	II 期病例组 ($n = 14$)	III、IV 期病例组 ($n = 14$)	t 值	P 值
化疗前 Her-2 基因拷贝相对量	3.0400 \pm 6.0303	1.4865 \pm 1.4207	0.938	0.364
化疗后 Her-2 基因拷贝相对量	0.5033 \pm 0.5704	1.1023 \pm 1.4425	-1.445	0.167
化疗前后 Her-2 基因拷贝相对量的变化	0.7522 \pm 1.0981	1.0025 \pm 0.7858	1.4250	> 0.05

3 讨论

新辅助化疗(NAC)不仅极大的增加了乳腺癌患者的保乳手术治疗率和局部晚期乳腺癌患者的根治性手术率,并可提供体内肿瘤化疗敏感性的信息。因此其在乳腺癌的治疗中应用越来越广泛。与手术后辅助化疗相比,虽然 NAC 的化疗周期数量、化疗药物的选择和强度以及手术、术后的其它综合治疗手段和方式都是一样的,但新辅助化疗后达到完全缓解的患者的生存率得到了明显改善。NSABP B-18^[2] 和 NSABP B-27^[3] 试验已经证实:新辅助化疗后,获得 pCR(病理完全缓解)的乳腺癌患者无病生存率(DFS)和总生存率(OS)显著提高($P < 0.0001$)。

术前新辅助化疗是如何获得与术后辅助化疗不同结果的干预机制,目前普遍认可 Fisher 和 Goldie-Coldman 假说。Fisher^[4] 通过对乳腺癌动物模型观察发现,原发癌灶切除 24 小时后,体内残余肿瘤细胞的增殖动力学性质发生改变,生长曲线由手术前的平坦转为陡直上升,提示手术前处于静息期的细胞此时进入了增殖期,导致动物生存期缩短。而术前化疗可以防止这种残存灶的动力学改变。Goldie-Coldman^[5] 认为,肿瘤细胞耐药性源于其自发的基因突变,随着肿瘤细胞总体数量的增多,耐药细胞数量也相应增多。而化疗

耐药又是乳腺癌治疗后复发的主要根源。因此,尽早应用无交叉耐药的联合化疗方案,可使肿瘤细胞发生耐药的概率降到最低。乳腺癌 Her-2 高表达与肿瘤细胞的高转移活性密切相关,Her-2 高表达的乳腺癌多为雌激素受体阴性,有淋巴结转移的低分化癌,这种患者的无瘤生存率和总生存率都很低,预后不佳。作为乳腺癌的基因标志物之一,Her-2 高表达在乳腺癌化疗方案的选择和预后的评估中都占据着相当重要的地位。目前已有学者就 Her-2 与新辅助化疗的相互作用关系做了研究,但罕见有对 Her-2 表达的影响及对患者预后影响的报道。Lee^[6] 和 Neubauer 等^[7] 分别在研究中观察到新辅助化疗可以使 Her-2 的表达下降,但认为与化疗的疗效无关。但他们在判断 Her-2 的表达状态时,使用的是免疫组化法,检测的是 Her-2 蛋白而非 Her-2 基因^[8]。Quddus^[9] 和俞洋等^[10] 认为新辅助化疗后 Her-2 的表达下降是肿瘤细胞对化疗药物耐受性不同而产生选择性克隆的结果,并认为新辅助化疗可能更易杀灭 Her-2 阳性表达的细胞。

为更好的了解 Her-2 在新辅助化疗前后的变化规律,探讨新辅助化疗对乳腺癌患者化疗前后肿瘤细胞 Her2 基因的干预机制。本研究选用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)技术,这是一种可靠的检测方法,具有快速方便、灵敏度高、重复性和

可信度高等优点。Gjerdrum^[11]将 RT-PCR, FISH 法和免疫组化法检测 Her-2 基因扩增状态做了比较,证实 RT-PCR 法检测 Her-2 基因扩增状态方便快捷准确可靠的,不论是在大样本的实验研究或是临床实践中,都有广阔的应用价值。

本研究发现,新辅助化疗可以减少 Her-2 基因的拷贝量($P < 0.05$)。可能的原因是化疗药物杀灭了 Her-2 高表达的肿瘤细胞。这在含蒽环类药物新辅助化疗方案的临床研究中,得出的 Her-2 高表达肿瘤细胞与化疗敏感性相关的结论^[12]。本研究患者的术前化疗中,蒽环类药物通过对拓扑异构酶 II 的含蒽环化作用,稳定拓扑异构酶 II a 与 DNA 形成的易裂复合物阻止拓扑异构酶 II a 的 DNA 断裂-再连接反应并致双链 DNA 断裂,从而抑制细胞增殖。而紫杉醇类药物通过加强微管系统的稳定及形成,促进微管双聚体装配成微管,防止去多聚化过程而使微管稳定化,抑制有丝分裂来杀灭肿瘤细胞。乳腺癌 Her-2 高表达的肿瘤细胞属于那些转移活性高、多伴有雌激素受体阴性、有淋巴结转移、局部微管浸润的低分化癌,通常对化疗敏感,新辅助化疗在杀灭乳腺癌 Her-2 高表达的肿瘤细胞的同时,导致了 Her-2 基因表达下调。推测乳腺癌新辅助化疗使肿瘤细胞 Her-2 基因表达下调,其对下游基因和信号传导通路的干预作用减少,因而化疗后原发肿瘤病灶和体内其他残存灶内肿瘤细胞增殖活性和耐药性降低,进而减少耐药肿瘤细胞的残存及抑制手术后残存灶内肿瘤细胞的快速生长,从而延缓复发转移灶的出现,可能使患者获得了更长的无病生存期和总生存期。但本实验没有观察到 Her-2 基因拷贝量的变化与患者临床分期和新辅助化疗周期数有关。在实验结果分析时,发现 9 病例新辅助化疗后 Her-2 基因拷贝量反而上升,这些患者中 3 例为 SD, 6 例为 cPR, 属于那些 2 周期 NAC 后,对化疗不敏感,局部肿块缩小不明显,估计继续化疗也难达到 pCR 患者,然而也不能忽视实验中其他原因所引起的 Her-2 基因拷贝量的变化,包括由于肿瘤组织的异质性而导致标本取样差异和提取肿瘤细胞 DNA 时可能会受到肿瘤组织中其它非肿瘤细胞(如炎症细胞等)DNA 的污染,从而“稀释”了肿瘤细胞 DNA 的浓度。

化疗药物导致的细胞分子水平变化非常复杂,涉及多途径、多基因,不能简单的用几个基因

变化情况来概括。本实验只比较了同一批患者新辅助化疗前后 Her-2 基因的拷贝量,若能在临床进行大宗样本分析,建立长时间的随访;从不同层面对新辅助化疗与 Her-2 基因的变化进行观察分析,总结出新辅助化疗前后 Her-2 基因拷贝量变化与预后之间的关系,其结果将更有意义。

参考文献:

- [1] Millson A, Suli A, Hartung L, *et al.* Comparison of Two Quantitative Polymerase Chain Reaction Methods for Detecting HER2/neu amplification [J]. *J Mol Diagn*, 2003, 5(3): 184 - 190.
- [2] Wolmark N, Wang J, Mamounas E, *et al.* Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18 [J]. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2001, 30: 96 - 102.
- [3] Shimizu C, Ando M, Kouno T, *et al.* Current trends and controversies over pre-operative chemotherapy for women with operable breast cancer [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2007, 37(1): 1 - 8.
- [4] Fisher B, Bryant J, Wolmark N, *et al.* Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 1998, 16(8): 672 - 674.
- [5] Goldie JH, Coldman AJ. A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate [J]. *Cancer Treat Rep*, 1979, 63(11 - 12): 1727 - 1733.
- [6] Lee SH, Chung MA, Qudus MR, *et al.* The effect of neo-adjuvant chemotherapy on estrogen and progesterone receptor expression and hormone receptor status in breast cancer [J]. *Am J Surg*, 2003, 186(4): 345 - 348.
- [7] Neubauer H, Gall C, Vogel U, *et al.* Changes in tumor biological markers during primary systemic chemotherapy (PST) [J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(3B): 1797 - 1804.
- [8] Adams AL, Eltoum I, Krontiras H, *et al.* The effect of neo-adjuvant chemotherapy on histologic grade, hormone receptor status, and Her2/neu status in breast carcinoma [J]. *The Breast Journal*, 2008, 14(2): 141 - 146.
- [9] Qudus MR, Sung CJ, Zhang C, *et al.* Her-2 expression in locally advanced breast carcinomas: pre- and post-neoadjuvant chemotherapy [J]. *Breast Cancer*, 2005, 12(4): 294 - 299.
- [10] 俞洋, 杨红健, 邹德宏. 新辅助化疗后乳腺癌中 CerbB-2 的表达及意义 [J]. *浙江临床医学*, 2006, 8(1): 3 - 5.
- [11] Gjerdrum LM, Sorensen BS, Kjeldsen E, *et al.* Real-time quantitative PCR of microdissected paraffin-embedded breast carcinoma [J]. *Molecular Diagnostics*, 2004, 6(1): 42 - 51.
- [12] Hayes DF, Thor AD, Dressler LG, *et al.* HER-2 and response to paclitaxel in node-positive breast cancer [J]. *N Engl Med*, 2007, 357(15): 1496 - 1506.