

## • 临床研究 •

## DNA 含量测定在乳腺癌预后判断中的意义

张敏 宁连胜 张瑾

**【摘要】 目的** 应用流式细胞仪(flow cytometry, FCM)回顾性分析预后差的早期乳腺癌及预后好的晚期乳腺癌患者的 DNA 含量特点,并探讨 FCM 对预后的应用价值,为临床选择治疗方法提供参考。**方法** 将手术后常规治疗且 10 年内出现复发、转移甚至死亡的 I 期乳腺癌 11 例以及术后 10 年内健在且淋巴结转移 10 枚以上的 III 期乳腺癌 16 例分别作为实验组,再从同期患者中选取术后无病生存的 I 期乳腺癌 14 例以及预后差且淋巴结转移 10 枚以上的 III 期乳腺癌 14 例分别作为对照组,应用 FCM 对各组患者进行 DNA 含量检测,包括 DNA 指数(DNA index, DI)、S 期分数(SPF)以及 DNA 倍体。分析比较 I 期及 III 期乳腺癌实验组与对照组 DNA 含量的特点,并对 III 期乳腺癌患者淋巴结及结外软组织转移水平进行亚组分析。成组设计的计量资料比较采用  $t$  检验,多组间的比较采用单因素方差分析,小样本率的比较采用 Fisher 精确概率法。**结果** (1) I 期乳腺癌实验组中异倍体出现率为 6/11,二倍体出现率为 5/11; I 期对照组异倍体出现率为 0,二倍体出现率为 14/14,两组间差异有统计学意义( $P=0.003$ )。(2)分别比较 I 期及 III 期乳腺癌实验组与对照组的 DI 和 SPF,差异均无统计学意义( $P>0.050$ )。(3) III 期乳腺癌实验组与对照组的 DNA 倍体间的差异也无统计学意义( $P>0.050$ )。(4) III 期乳腺癌患者第三水平淋巴结转移组二倍体含量高于第一、二水平组,第一、二水平组 SPF 值低于第三水平组,但组间差异均无统计学意义( $P>0.050$ )。(5) III 期乳腺癌患者软组织不同转移水平组间 DNA 倍体分布的差异无统计学意义( $P>0.050$ )。**结论** 应用 FCM 研究早期以及晚期乳腺癌肿瘤的生物学特性,进行 DNA 含量测定,对临床判断预后,选择治疗方法有一定的指导意义。

**【关键词】** 乳腺肿瘤; 流式细胞仪; DNA 含量

**【中图分类号】** R737.9

**【文献标识码】** A

**Predicting role of DNA content assay in prognosis of breast carcinoma** ZHANG Min, NING Lian-sheng, ZHANG Jin. Department of Breast Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China

**【Abstract】 Objective** To retrospectively analyze DNA contents in early breast cancer with bad prognosis and advanced breast cancer with good prognosis using flow cytometry (FCM) and to assess the value of FCM for prognosis of breast cancers, in order to provide a method for clinic choice of appropriate treatment. **Methods** Patients for this study were randomly selected from those who underwent surgery and conventional treatment in Tianjin Cancer Hospital from January 1990 to December 1992, including 11 patients with clinical stage I breast cancer who had recurrence, metastasis or even death in ten years after surgery and 16 patients with clinical stage

作者单位:300060 天津,天津医科大学附属肿瘤医院乳腺科

通信作者:张瑾, E-mail: Davidz9132002@yahoo.com

Ⅲ breast cancer whose positive axillary lymph nodes were more than ten and with ten year disease-free survival after surgery; patients as controls were selected respectively in the same period, including 14 patients with clinical stage I breast cancer and with disease-free survival and 14 patients of clinical stage Ⅲ breast cancer with positive axillary lymph nodes more than ten and with bad prognosis. Then the DNA contents of all samples were tested with FCM, including DNA index (DI), s-phase fraction (SPF) and DNA ploidy. The characteristics of the DNA contents in both groups of clinical stage I and Ⅲ breast cancers were analyzed. The levels of lymphatic and soft tissue metastasis of stage Ⅲ breast cancer patients in the subgroups were also analyzed. t test was used for the comparison of quantitation data, single element variance analysis was used for multiple group comparison, and Fisher precise probabilistic method was used for small sample comparison. **Results** (1) In the group of 11 clinical stage I breast cancer patients with bad prognosis, the DNA ploidy was aneuploid in 6 cases(6/11), and diploid in 5 (5/11); in the control group of 14 clinical stage I breast cancer patients with ten year disease free survival, the DNA ploidy was aneuploid in zero (0/14) and diploid in all(14/14), there was statistically significant difference between the two groups( $P=0.003$ ). (2) There was no statistical difference in DI between the group of stage I breast cancer with bad prognosis and the group of clinical stage I breast cancer with ten year disease free survival, and between the group of stage Ⅲ breast cancers with good prognosis and the group of stage Ⅲ breast cancers with bad prognosis ( $P>0.050$ ). (3) There was no statistical difference in DNA ploidy between the group of stage Ⅲ breast cancers with bad prognosis and the group of stage Ⅲ breast cancers with good prognosis. (4) According to the analysis of different metastasis level of lymph nodes in all cases of stage Ⅲ breast cancers, the diploid was greater in the third level of lymph nodes than in the first and second levels of lymph nodes, while SPF was lower in first and second levels of lymph nodes than in the third level of lymph nodes. But there was no statistical difference between them ( $P>0.050$ ). (5) According to the analysis of different metastasis level of soft tissue outside lymph nodes in all cases of stage Ⅲ breast cancers, there was no statistical difference among them ( $P>0.050$ ). **Conclusion** Using FCM to study the biological characteristics of early and advanced breast cancer and determine the DNA contents has guiding significance in clinical assessment of prognosis and clinical choice of therapy.

**【Key words】** Breast neoplasms; Flow cytometry; DNA contents

临床病理情况是评估原发女性乳腺癌预后的主要指标,如早期(Ⅰ、Ⅱ期)乳腺癌预后良好,5 年生存率为 84.6%~100%,10 年生存率为 77.00%~100%<sup>[1-6]</sup>,而晚期(Ⅲ、Ⅳ期)乳腺癌预后差,5 年生存率为 15%~56%,10 年生存率为 8.7%~26.7%<sup>[1-4,7-9]</sup>。然而,临床上也可见到腋窝淋巴结阴性的早期乳腺癌患者术后很快出现局部复发或远处转移,而腋窝淋巴结转移>10 枚的晚期乳腺癌患者却长期健在。本研究应用 FCM 进行 DNA 含量测

定,研究分析此类患者,探讨测定 DNA 含量对此类患者的辅助诊断价值及意义,为临床评价预后,选择治疗提供一定的参考。

## 1 资料和方法

### 1.1 临床资料

1990 年 1 月 1 日至 1992 年 12 月 30 日天津医科大学肿瘤医院共收治女性原发性乳腺癌患者 1179 例,所有患者均经病理证实。按 2002 年 AJCC 标准重新分期<sup>[1]</sup>:临床 I 期患者 179 例,其中术后 10 年复发、转移、死亡者 26 例,26 例的病理蜡块可供分析者 11 例,并从无病生存的剩余 153 例中抽取 14 例作为对照;临床 III 期患者 285 例,其中术后腋窝淋巴结转移  $\geq 10$  枚者 127 例,而术后 10 年无病生存者 36 例,病理蜡块可供分析者 16 例,同时从剩余的 91 例术后预后差的患者中抽取 14 例作为对照。I 期乳腺癌实验组 11 例,年龄 31~63 岁,平均年龄 45.0 岁。首次手术方式包括改良根治术 8 例(Auchincloss 术式 3 例、Patey 术式 5 例),根治术 3 例。病理类型包括:单纯癌 6 例,浸润性导管癌 2 例,髓样癌 2 例,黏液腺癌 1 例。查体扪及腋窝淋巴结数目:1 枚者 2 例,2 枚者 1 例,6 枚者 1 例。对照组 14 例,年龄 34~72 岁,平均年龄 48.6 岁。首次手术方式包括改良根治术 9 例(Auchincloss 术式 6 例、Patey 术式 3 例),根治术 2 例,行 1/4 乳腺切除+腋窝淋巴结清扫术 3 例。病理类型包括:单纯癌 6 例,浸润性导管癌 4 例,高分化腺癌 1 例,腺癌 1 例,髓样癌 1 例,大汗腺样癌 1 例。查体扪及腋窝淋巴结数目:1 枚者 2 例,2 枚者 2 例,3 枚者 1 例。III 期乳腺癌实验组 16 例,年龄 28~52 岁,平均年龄 41.0 岁。首次手术方式包括改良根治术 1 例(Patey 术式 1 例),根治术 15 例。病理类型包括:单纯癌 12 例,浸润性导管癌 3 例,浸润性小叶癌 1 例。腋窝淋巴结转移数目 10~52 枚,平均 24.36 枚。对照组 14 例,年龄 27~69 岁,平均年龄 44.8 岁。首次手术方式均行根治术。病理类型包括:单纯癌 9 例,浸润性导管癌 2 例,髓样癌 1 例,大汗腺样癌 1 例,黏液腺癌 1 例。腋窝淋巴结转移数目 10~42 枚,平均 21.88 枚。统计结果显示,I 期、III 期乳腺癌实验组分别与相应对照组各临床因素一致,两者之间具有可比性(表 1,2)。

表 1 I 期乳腺癌实验组与对照组的各项临床病理因素的统计学分析结果

组别	年龄(岁)	肿瘤大小(cm)	雌激素受体(例)			孕激素受体(例)			术后化疗(例)			
			无	阳性	阴性	无	阳性	阴性	无	CMF	CC	其他
实验组	45.0 $\pm$ 12.12	1.46 $\pm$ 0.49	7	3	1	7	1	3	0	4	7	0
对照组	48.6 $\pm$ 12.96	1.88 $\pm$ 0.50	2	7	5	4	6	4	2	4	8	0
P 值	0.881	0.051	0.045			0.138			0.681			

CMF:环磷酰胺+甲氨蝶呤+5-氟脲嘧啶;CC:秋水仙碱

表 2 Ⅲ期乳腺癌实验组与对照组的各项临床病理因素的统计学分析结果

组别	年龄(岁)	肿瘤大小(cm)	腋窝淋巴结	腋窝淋巴结转移(例)			软组织转移(例)				雌激素受体(例)		
			阳性数(枚)	L I	L II	L III	无	L I T	L II T	L III T	无	阳性	阴性
实验组	41.0±6.75	5.16±2.09	21.88±9.95	0	3	13	7	7	0	2	10	5	1
对照组	44.8±11.16	4.82±2.14	25.07±16.06	3	1	10	4	6	2	2	7	4	3
P 值	0.095	0.668	0.063	0.179			0.598				0.520		

  

组别	孕激素受体(例)			术后化疗(例)				术后放疗(例)				
	无	阳性	阴性	无	CMF	CC	其他	无	内乳区	内锁	内锁胸	根治性放疗 其他
实验组	8	5	3	0	8	8	0	3	0	3	9	0 1
对照组	7	2	5	0	6	7	1	0	0	3	9	0 2
P 值	0.501			0.848				0.521				

L I:第一水平淋巴结;L II:第二水平淋巴结;L III:第三水平淋巴结;L I T:第一水平淋巴结外软组织;L II T:第二水平淋巴结外软组织;L III T:第三水平淋巴结外软组织;CMF:环磷酰胺+甲氨蝶呤+5-氟脲嘧啶;CC:秋水仙碱

## 1.2 FCM 分析

**1.2.1 DNA 含量检测:**本研究所用 FCM 为美国 Coulter 公司生产,型号为 EPICS XL-MCL。检测之前,先用来自同一个体的正常淋巴结组织细胞为外标,并以鸡红细胞为内标,控制变异系数(CV)在 2% 以下,每份样品约测 5000~10 000 个细胞。

**1.2.2 DNA 含量分析方法:**以 DI 作为判定 DNA 倍体水平的定量标准,计算公式:DI=(被测肿瘤细胞  $G_0/G_1$  峰道数)/(正常乳腺细胞  $G_0/G_1$  峰道数)。DNA 倍体分类及计算 S 期细胞百分率(S-phase fraction, SPF)均由随机分析软件分析处理。

## 1.3 研究方法

对实验和对照组患者的年龄、肿块大小、腋窝淋巴结状况、病理类型的临床病理情况进行统计学分析,证明两组患者具有可比性。

亚组分析中的结外软组织转移是指乳腺癌转移癌细胞侵犯到淋巴结外软组织,亦为预后不良指征的独立因素。

## 1.4 统计学方法

将全部数据输入计算机,采用 Excel 2000 和 SPSS10.0 软件包,进行数据处理。成组设计的计量资料比较采用  $t$  检验,多组间的比较采用单因素方差分析,小样本率的比较采用 Fisher 精确概率法,  $P<0.050$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 FCM 检测 I 期及Ⅲ期乳腺癌实验组与对照组的 DNA 含量

I 期乳腺癌实验组与对照组间异倍体及二倍体出现率的差异有统计学意

义( $P=0.003$ ,表 3)。Ⅲ期乳腺癌实验组与对照组间 DNA 倍体的差异无统计学意义( $P>0.050$ ,表 4)。

表 3 I 期乳腺癌实验组与对照组的 DNA 含量

组别	含 DNA 倍体的例数		DI	SPF
	异倍体	二倍体		
实验组	6	5	$1.098 \pm 0.24$	$0.129 \pm 0.14$
对照组	0	14	$1.211 \pm 0.38$	$0.247 \pm 0.22$
<i>P</i> 值	0.003		0.399	0.127

DI:DNA 指数;SPF:S 期细胞比例

表 4 Ⅲ期乳腺癌实验组与对照组的 DNA 含量比较

组别	含 DNA 倍体的例数		DI	SPF
	异倍体	二倍体		
实验组	4	12	$1.201 \pm 0.45$	$0.240 \pm 0.16$
对照组	2	12	$1.145 \pm 0.36$	$0.197 \pm 0.12$
<i>P</i> 值	0.657		0.712	0.412

DI:DNA 指数;SPF:S 期细胞比例

## 2.2 FCM 检测淋巴结不同转移水平患者的 DNA 含量

因病理学分期为 I 期的患者均无淋巴结转移,故只将所有Ⅲ期患者按腋窝淋巴结不同转移水平分组后进行分析,结果显示第三水平转移组二倍体含量高于第一、二水平组含量,第一、二水平组 SPF 值低于第三水平组值,但组间差异均无统计学意义( $P>0.050$ ,表 5)。

表 5 Ⅲ期乳腺癌患者腋窝淋巴结不同转移水平间  
DNA 含量的分析

组别	<i>n</i>	含 DNA 倍体例数		DI	SPF
		异倍体	二倍体		
L I	3	1	2	$1.244 \pm 0.53$	$0.164 \pm 0.06$
L II	4	1	3	$1.224 \pm 0.47$	$0.090 \pm 0.08$
L III	23	4	19	$1.157 \pm 0.39$	$0.250 \pm 0.14$
<i>P</i> 值		0.657		0.712	0.412

L I:第一水平淋巴结组;L II:第二水平淋巴结组;L III:第三水平淋巴结组;

DI:DNA 指数;SPF:S 期细胞比例

## 2.3 FCM 检测结外软组织不同转移水平患者的 DNA 含量

因病理学分期为 I 期的患者均无结外软组织转移,故只将所有Ⅲ期患者按软组织不同转移水平分组后进行分析,结果显示各组间 DNA 倍体分布的



差异无统计学意义( $P>0.050$ ,表 6)。

表 6 Ⅲ期乳腺癌患者淋巴结外软组织不同转移水平  
患者间 DNA 含量的分析

组别	例数	含 DNA 倍体的例数		DI	SPF
		异倍体	二倍体		
无转移组	11	4	7	$1.244\pm0.53$	$0.164\pm0.06$
L I T	13	1	12	$1.244\pm0.53$	$0.164\pm0.06$
L II T	2	1	1	$1.224\pm0.47$	$0.090\pm0.08$
L III T	4	0	4	$1.157\pm0.39$	$0.250\pm0.14$
P 值		0.657		0.712	0.412

L I T:第一水平淋巴结外软组织;L II T:第二水平淋巴结外软组织;L III T:第三水平淋巴结外软组织;

DI:DNA 指数;SPF:S 期细胞比例

### 3 讨论

乳腺癌患者一般以其综合参数作为预后估计,如病期、淋巴结转移情况、组织学分级、甾体激素受体以及治疗方法等<sup>[10]</sup>。由于疾病本身就包含着多因素,它所反映的是疾病进展到一定程度的现状,并不直接反映肿瘤内在的生物学特征。临床上常见相同的病期和组织学类型所出现的预后截然不同,不能用传统的一般因素进行解释。为此,国内外的一些研究者应用 FCM 对肿瘤 DNA 含量进行检测,并进行了相关问题的探讨。Muss 等<sup>[11]</sup>研究了 101 例腋窝淋巴结阴性的女性原发乳腺癌 DNA 含量与临床、生化等指标的关系,结果显示 SPF 与预后相关。Winchester 等<sup>[12]</sup>研究了 257 例腋窝淋巴结阴性的乳腺癌患者的 FCM 检测结果,发现当肿瘤为二倍体时,只有 SPF 较高时才与复发有相关性。王娴等<sup>[13]</sup>报道了 25 例腋窝淋巴结阴性术后复发、转移的女性原发性乳腺癌患者,并与 50 例无瘤生存患者配对应用 FCM 检测其 DNA 含量,结果显示高 SPF 患者术后 5 年生存率明显低于低 SPF 患者。类似报道还有很多<sup>[14-15]</sup>,但对晚期乳腺癌的相关研究甚少。

本研究选取 I 期以及Ⅲ期乳腺癌中的一些特殊患者,即术后 10 年出现复发、转移、死亡的 I 期乳腺癌以及术后 10 年无病生存且淋巴结转移数目 $\geq 10$ 枚的Ⅲ期乳腺癌患者。应用 FCM 回顾性检测其瘤组织的 DNA 含量,分析其 DNA 含量特点,由此可反映肿瘤内在的一些生物学特性,为临床选择治疗方法提供参考。

文献报道,正常细胞核 DNA 含量呈二倍体分布,而以二倍体瘤细胞为主的肿瘤恶性程度相对较低,以异倍体占优势者恶性程度则较高,预后差<sup>[16]</sup>。本研究结果显示, I 期对照组瘤体 DNA 倍体以二倍体为主,而乳腺癌实验组则以异倍体细胞占优势,说明在早期乳腺癌中,FCM 检测的 DNA 含量对判定预后有一定的指导意义。

DI、SPF 都是从 DNA 分子水平反映细胞增殖状况的客观指标,而实验肿瘤遗传学研究表明,细胞核 DNA 是细胞的遗传物质,是决定细胞生长、分化、分裂和各种改变的重要因素。在恶性肿瘤中细胞染色体的数量明显改变,结构也发生畸变,这些必然反映在其分子基础的 DNA 含量的变化上<sup>[17]</sup>。故本研究中 I 期乳腺癌实验组 DI、SPF 比对照组高;Ⅲ期乳腺癌实验组 DI、SPF 比对照组低。本研究结果与文献报道的情况基本一致,但仅显示出趋势,这可能是由于样本数量少,蜡块组织的细胞碎片多,造成 CV 值增大而影响 FCM 检测结果的准确性<sup>[18]</sup>。增加样本例数,完善实验技术可能会出现有意义的结果。

当前,随着乳房普查的广泛开展以及女性防癌意识的增强,早期乳腺癌检出率越来越高。但 I 期乳腺癌患者复发、转移甚至死亡者仍达 10% 左右。因此,更有必要对早期乳腺癌患者肿瘤恶性程度和生物学特性进行判定。乳腺癌 DNA 含量的检测为指导治疗提供一定的依据,有利于进一步提高生存率。

### 参考文献

- [1] 李树玲. 乳腺肿瘤学. 北京: 科学技术文献出版社, 2000: 6.
- [2] 李祥, 李红兵. 234 例乳腺癌临床分析. 肿瘤防治研究. 1999, 26: 146—147.
- [3] 刘珊珊, 王喜春, 黄颖, 等. 558 例乳腺癌临床疗效分析. 实用肿瘤学杂志, 1997, 11: 126—127.
- [4] 江勃年, 曾福华. 青年与中老年 I ~ III 乳腺癌预后因素对比分析. 医学临床研究, 2003, 20: 189—191.
- [5] Largillier R, Namer M, Ramaioli A, *et al.* Prognostic value of S-phase fraction in 920 breast cancer patients: focus on T1N0 status. *Int J Biol Marker*, 2003, 18: 273—279.
- [6] Sundquist M, Thorstenson S, Klintenberg C, *et al.* Incidence and prognosis in early onset breast cancer. *Breast*, 2002, 11: 30—35.
- [7] 张月琴, 李爱筠, 蔺素琴, 等. 综合治疗晚期乳腺癌生存因素探讨. 实用医学杂志, 2003, 19: 632—633.
- [8] Sharon H, Giordano. Update on locally advanced breast cancer. *Oncologist*, 2003, 8: 521—530.
- [9] 沈镇宙, 张亚伟. Ⅲ期乳腺癌治疗进展. 实用肿瘤杂志, 1995, 10: 133—135.
- [10] Dressler L G, Seamer L C, Owens M A, *et al.* DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens. *Cancer*, 1988, 61: 420—427.
- [11] Muss H B, Kute T E, Douglas Case L, *et al.* The relation of flow cytometry to clinical and biologic characteristics in women with node negative primary breast cancer. *Cancer*, 1989, 64: 1894—1900.
- [12] Winchester D J, Duda R B, August C Z, *et al.* The importance of DNA flow cytometry in node-negative breast cancer. *Arch Surg*, 1990, 125: 886—889.
- [13] 王娴, 张苏展, 袁瑛, 等. DNA 合成时相细胞百分率在腋淋巴结阴性乳腺癌患者的预后意义. 实用肿瘤杂志, 1998, 13: 283—285.
- [14] O'Reilly S M, Camplejohn R S, Barnes D M, *et al.* Node-negative breast cancer: prognostic subgroups defined by tumor size and flow cytometry. *J Clin Oncol*, 1990, 18: 2040—2046.
- [15] Ottesen G L, Christensen I J, Larsen J K, *et al.* DNA aneuploidy in early breast cancer. *Br J Cancer*, 1995, 72: 832—839.
- [16] 吴祥德, 耿翠芝, 王桂兰, 等. 乳腺癌细胞 DNA 含量分析. 中国肿瘤临床, 1989, 16: 69—72.
- [17] 顾海峰, 张杏梅. 乳腺不同类型病变与乳腺癌细胞 DNA 含量分析. 临床肿瘤学杂志, 2000, 5: 95—96.
- [18] 张祥宏. 石蜡包埋组织 FCM DNA 检测技术方法的进展. 中华物理医学与康复杂志, 1995, 17: 182—184.

(收稿日期: 2008-01-19)

(本文编辑: 罗承丽)

张敏, 宁连胜, 张瑾. DNA 含量测定在乳腺癌预后判断中的意义[J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2009, 3(3): 294—300.