

· 论著 ·

S 期细胞比率对乳腺癌新辅助化疗敏感性的预测价值

张景臣 毛大华

【摘要】 目的 探讨乳腺癌细胞 S 期细胞比率(SPF)能否作为乳腺癌新辅助化疗敏感性的预测因子。**方法** 通过流式细胞仪检测 2006 年 1 月至 2010 年 11 月贵阳医学院第一附属医院乳腺外科收治的 66 例乳腺癌患者新辅助化疗前后乳腺癌组织中细胞 SPF 的变化,并比较 SPF 与临床病理特征之间的关系,统计分析采用配对资料的 t 检验及秩和检验。**结果** 在 66 例患者中,新辅助化疗疗效评价为 6 例病理完全缓解(pCR),41 例部分缓解(PR),17 例病情稳定(SD),2 例疾病进展(PD)。41 例 PR 患者的 SPF 新辅助化疗前为 $(7.69 \pm 4.67)\%$,新辅助化疗后为 $(5.58 \pm 4.61)\%$,差异有统计学意义($t=2.314$, $P=0.026$)。19 例化疗无效的患者(包括 SD、PD)新辅助化疗前 SPF 为 $(4.52 \pm 3.30)\%$,新辅助化疗后 SPF 为 $(4.19 \pm 3.01)\%$,差异无统计学意义($t=0.50$, $P=0.623$)。47 例客观缓解的患者(包括 pCR、CR、PR)新辅助化疗前的 SPF 为 $(7.26 \pm 4.53)\%$,与 19 例化疗无效的患者新辅助化疗前的 SPF [$(4.52 \pm 3.30)\%$] 比较,差异有统计学意义($t=2.394$, $P=0.020$)。新辅助化疗前癌灶的 SPF 与患者年龄、月经状况无明显关系($Z=-1.461$, -1.097 ; $P>0.05$),而与肿瘤直径、临床分期、淋巴结转移有关($\chi^2=8.258$, 11.920 ; $Z=-2.194$; $P<0.05$)。**结论** 新辅助化疗对乳腺癌细胞 S 期的影响是明显的,可以降低乳腺癌细胞的增殖,SPF 值较大者对化疗敏感。

【关键词】 乳腺肿瘤; 流式细胞术; 化学疗法,辅助; 细胞周期

【中图分类号】 R737.9

【文献标志码】 A

Predictive value of S-phase fraction on the sensitivity of breast cancer patients to neoadjuvant chemotherapy ZHANG Jing-cheng, MAO Da-hua. Department of Breast Disease, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450000, China

Corresponding author: MAO Da-hua, Email: guipuyiyan@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate whether S-phase fraction(SPF) can be used as a sensitive predictor for neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. **Methods** The SPF change of breast cancer tissues from 66 breast cancer patients treated in Department of Breast Surgery, the First Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, between January 2006 and November 2010 was detected by flow cytometry before and after neoadjuvant chemotherapy. Paired t test was used to analyze the change of SPF, and rank sum test was used to determine the relationship between SPF and clinical pathological characteristics. **Results** In all 66 cases, after neoadjuvant chemotherapy, there were 6 cases evaluated with complete pathologic response (pCR), 41 with partial response (PR), 17 with stable disease (SD) and 2 with progressive disease (PD). In 41 patients with PR, SPF was $(7.69 \pm 4.67)\%$ before chemotherapy, $(5.58 \pm 4.61)\%$ after chemotherapy, respectively, and the difference was statistically significant ($t=2.314$, $P=0.026$). In 19 patients with PD plus SD, SPF was $(4.52 \pm 3.30)\%$ before chemotherapy, $(4.19 \pm 3.01)\%$ after chemotherapy, respectively, which indicated no statistically significant difference ($t=2.314$, $P=0.026$). SPF in the 47 patients with remission (including pCR, CR, PR) was $(7.26 \pm 4.53)\%$ before chemotherapy, which was statistically different from that in the 19 patients with PD plus SD before chemotherapy [$(4.52 \pm 3.30)\%$] ($t=2.314$, $P=0.026$). SPF of breast cancer tissue before neoadjuvant chemotherapy was related with tumor diameter, clinical stage and lymph node metastasis ($F=8.258$, 11.920 ; $Z=-2.194$; $P<0.05$), but with no correlation with patients' age and menstruation status ($Z=-1.461$, -1.097 ; $P>0.05$). **Conclusion** The neoadjuvant chemotherapy has a remarkable influence on S phase of breast cancer cells and it can decrease cell proliferation, implicating that the patients with higher SPF may be more sensitive to chemotherapy.

【Key words】 Breast neoplasms; Flow cytometry; Chemotherapy, adjuvant; Cell cycle

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2013.04.005

作者单位:450000 郑州,郑州人民医院乳腺科(张景臣);550004 贵阳,贵州省贵阳医学院第一附属医院乳腺外科(毛大华)

通信作者:毛大华, Email: guipuyiyan@163.com

乳腺疾病是女性最常见的疾病,是女性发病率和病死率最高的、严重威胁健康和生命的恶性肿瘤^[1]。2011 年国际统计报告显示,乳腺癌的发病率和病死率高居女性恶性肿瘤的第一位^[2]。乳腺癌新辅助化疗指对未发现远处转移的乳腺癌患者,在局部治疗前进行的全身性、系统性的细胞毒性药物治疗。关于新辅助化疗反应性的预测因子及技术的研究成为热点,如 ER、PR、HER-2、Ki-67、p53 等免疫组织化学指标以及基因芯片技术。找到能够预测新辅助化疗疗效的标记物,有助于了解患者从新辅助化疗获益的可能性,有助于制定个体化治疗计划,针对化疗效果差的肿瘤开发新药提高疗效,将会给乳腺癌新辅助化疗带来革命性的进步^[3]。乳腺肿瘤增殖期 S 期细胞百分含量的多少(S-phase fraction, SPF)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、分裂及其他改变的重要因素,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 含量变化上^[4]。本研究以流式细胞学检查结果报告中 SPF 为观察目标,探讨 SPF 是否能作为乳腺癌新辅助化疗敏感性的预测因子。

1 对象和方法

1.1 研究对象

回顾性分析 2006 年 1 月至 2010 年 11 月贵阳医学院第一附属医院乳腺外科收治的 66 例乳腺癌病例,均为女性,年龄 32~75 岁,中位年龄 46 岁,平均年龄 47.2 岁。临床分期:I 期 6 例,II 期 49 例,III 期 11 例。肿瘤直径 ≤ 2 cm 8 例, > 2 cm 58 例。新辅助化疗方案主要为 EC、EC-T (E:表阿霉素,C:环磷酰胺,T:紫杉醇),1 例患者接受 CMF 方案(C:环磷酰胺,M:甲胺喋呤,F:氟尿嘧啶)。均为密集化疗 2 周重复,14 d 为 1 周期,66 例患者接受了 4~6 个疗程新辅助化疗。

1.2 标本采集

66 例患者均经超声引导下麦默通 11G 粗针穿刺,结果证实为乳腺癌。穿刺前先超声定位,用 1% 利多卡因局部浸润麻醉,超声引导下从每个肿块获取约 3~5 根组织条,大小约(2~4) mm \times (15~20) mm。取其中一组织条标本用湿润生理盐水的纱布包裹留存,其余送病理科行快速冰冻切片病理诊断确诊为乳腺癌后,留存标本送流式细胞学

检测。新辅助化疗后,参照 WHO 的癌症疗效评估标准^[5]进行化疗评价。完成化疗评价后行乳腺癌改良根治术,病灶切除后从病灶处切取约 5 mm \times 5 mm 大小的组织,立即送流式细胞学检测,大标本送病理科做病理和免疫组织化学检查。新辅助化疗后,病理性完全缓解(pathological remission rate, pCR)者无流式细胞学检测结果。

为了确保取材精确,行改良根治术前化疗评价时彩色超声引导下体表标记肿块部位,术后剖开标本一般都可以看到粗针穿刺时的针道痕迹,取材一般取垂直皮肤标记处与针道交界处。新辅助化疗疗效 pCR 的最终确定以改良根治标本的病理诊断为准,没有癌细胞则确定为 pCR。

参照 WHO 的癌症疗效评估标准^[5],分别在新辅助化疗前后由超声医师根据超声测量肿瘤大小来评定疗效。目标病灶的评价分为 5 级:(1) pCR:病灶内无癌细胞;(2) 完全缓解(complete remission, CR):所有目标病灶消失,维持 4 周;(3) 部分缓解(partial remission, PR):肿瘤病灶最大径及其垂直径乘积缩小 50%,维持 4 周;(4) 病情稳定(stable disease, SD):肿瘤病灶最大径及其垂直径乘积缩小 $< 50\%$,增大不超过 25%;(5) 疾病进展(progressive disease, PD):一个或多个肿瘤病灶最大径及其垂直径乘积增大 25% 或出现新的病变。pCR、CR、PR 均视作客观缓解,SD、PD 视作化疗无效。

1.3 主要试剂

购自美国 BD 公司的 Cycle TESTTMPLVS DNA Rent Kit 试剂盒、PBS、胰蛋白酶缓冲液(trypsin buffer, A 液)、胰蛋白酶抑制剂及核糖核酸酶缓冲液(trypsin inhibitor and RNase buffer, B 液)、碘化丙啶染色液(propidium iodide stain solution, C 液)。

1.4 检测方法

1.4.1 单细胞悬液样品的制备:将新鲜病灶组织 50~100 mg 剪碎,同时用 pH 值为 7.4 的 PBS 缓滴,用 300 目滤膜过滤,得到的单细胞悬液倒入试管内离心(1000 r/min, 5 min,离心半径为 13 cm),弃去上清液后待检。

1.4.2 DNA 含量及倍体检测的样品制备:用 Cycle TESTTMPLVS DNA Rent Kit 试剂盒,碘化丙啶(PI)染色法制备样本:(1)在每个单细胞悬液试管中加入 250 μ l A 液,手轻叩试管(流式细胞检测专用试管)使充分混合,放置 10 min;(2)在每个加入 A 液试管中再加入 200 μ l B 液,手轻叩

试管使充分混合,放置 10 min;(3)在每个已经加入 A、B 液的试管中再加入 200 μ l 冷的(2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C)C 液手轻叩试管使充分混合,在 2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C 冰箱内避光放置 30 min,即可上机检测。

1.4.3 主要仪器及校正:采用美国 BD 公司流式细胞仪 FACSCalibur, 激发光源为 2W 氩离子激光器,输出功率 300 W,激发波长 488 nm,分别进行单参数检测。上机前先以标准微球调整仪器,使变异系数(coefficient of variation, CV) < 2%, DNA 含量检测前先按照说明书做 DNA 质控,下载质控条件检测样品 DNA。DNA 含量检测以线性方式采集数据。

1.5 化疗前 SPF 与患者临床病理特征的关系

将新辅助化疗后癌灶组织中的 SPF 与本组患者的临床病理特征包括年龄、月经状况、肿瘤直径、腋窝淋巴结转移、临床分期等进行统计分析,比较 SPF 与上述临床病理特征之间的关系。

1.6 统计分析

DNA 数据采用 ModfiLTL 软件分析。用 SPSS 11.5 软件包进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用配对资料的比较 t 检验,采用秩和检验分析 SPF 与临床病理特征的关系,设定 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 新辅助化疗前后 SPF 的变化

在 66 例患者中,新辅助化疗疗效评价为 6 例 pCR, 41 例 PR, 2 例 PD, 17 例 SD, 客观缓解率(objective remission rate, ORR)为 71.21% (47/66)。41 例 PR 患者新辅助化疗前的 SPF 为 (7.69 \pm 4.67)%, 新辅助化疗后为 (5.58 \pm 4.61)%, 差异有统计学意义 ($t = 2.314$, $P = 0.026$)。19 例化疗无效的患者(包括 SD、PD)新辅助化疗前 SPF 为 (4.52 \pm 3.30)%, 新辅助化疗后 SPF 为 (4.19 \pm 3.01)%, 差异无统计学意义 ($t = 0.50$, $P = 0.623$)。47 例客观缓解的患者(包括 pCR、CR、PR)新辅助化疗前的 SPF 为 (7.26 \pm 4.53)%, 与 19 例化疗无效的患者新辅助化疗前的 SPF [(4.52 \pm 3.30)%] 比较,差异有统计学意义 ($t = 2.394$, $P = 0.020$), 这提示新辅助化疗前 SPF 较高者对化疗较敏感。6 例 pCR 的患者新辅助化疗前 SPF 为 (4.35 \pm 1.59)%, 与 41 例 PR 患者 (7.69 \pm 4.67)%, 19 例化疗无效 (SD+PD) 患者 (4.52 \pm 3.30)% 比较,差异均无统计学意义 ($t = 1.723$, $P = 0.092$; $t = 0.118$, $P = 0.907$)

2.2 SPF 与临床病理特征的关系

表 1 显示新辅助化疗前癌灶组织的 SPF 与患者年龄、月经状况无明显关系 ($Z = -1.461$, -1.097 ; $P > 0.05$), 而与肿瘤直径、临床分期、淋巴结转移有关 ($F = 8.258, 11.920$; $Z = -2.194$; $P < 0.05$)。

表 1 新辅助化疗前癌灶的 SPF 与临床病理特征之间的关系

临床病理特征	例数	SPF(%, $\bar{x} \pm s$)	检验值	P 值
年龄			-1.461 ^a	0.144
<50 岁	39	6.15 \pm 3.98		
≥ 50 岁	27	7.71 \pm 4.76		
月经状况			-1.097 ^a	0.273
绝经前	41	6.32 \pm 3.99		
绝经后	25	7.56 \pm 4.93		
肿瘤直径			8.258 ^b	0.016
≤ 2 cm	8	3.15 \pm 3.81		
>2 cm ~ 5 cm	39	7.33 \pm 4.59		
>5 cm	19	7.20 \pm 3.39		
淋巴结转移			-2.194 ^a	0.028
有	34	7.86 \pm 4.41		
无	32	5.66 \pm 4.06		
临床分期			11.920 ^b	0.003
I	6	1.76 \pm 1.12		
II	49	7.16 \pm 4.35		
III	11	7.90 \pm 3.82		

a: Z 值,应用两样本比较的秩和检验;b: χ^2 值,多个样本比较的秩和检验

3 讨论

3.1 新辅助化疗前 SPF 值较大者对化疗敏感

Chavillard 等^[6]发现对新辅助化疗敏感的患者其 SPF 值要高于对新辅助化疗反应不敏感的患者。在本研究中,新辅助化疗疗效评价为客观缓解的 47 例患者在新辅助化疗前的 SPF 与 19 例化疗无效的患者比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 这与 Chavillard 等的研究结果相一致。卫燕等^[7]认为随着肿瘤细胞增殖能力的增强,其对于化疗的敏感性也会随之增加。本研究结果显示,新辅助化疗对 PR 组患者的影响是明显的, SPF 降低,这说明新辅助化疗可以降低肿瘤细胞的增殖活性,而对化疗无效组的影响则不明显。因此,笔者认为将 SPF 与其他指标相结合用于评估新辅助化疗患者的临床进程,可以为制定合理的新辅助化疗方案提供一定的参考。

3.2 SPF 与临床病理特征之间的关系

Muss 等^[8]研究了 101 例腋窝淋巴结阴性的女性原发乳腺癌细胞 DNA 含量与临床特征、生物化学指标之间的关系,结果显示 SPF 与预后有关。本研究显示新辅助化疗前 SPF 与肿块直径、腋窝淋巴结转移、临床分期有关而与年龄、月经状况无关。考虑到新辅助化疗后癌灶中的 SPF 与新辅助化疗前相比已经发生了变化,新辅助化疗后的 SPF 不能真实反映其与临床病理特征之间的关系,所以本研究只分析了新辅助化疗前的 SPF 与临床病理特征之间的关系,结果显示新辅助化疗前癌灶的 SPF 与患者年龄、月经状况无明显相关($P>0.05$),而与肿瘤直径、腋窝淋巴结转移、肿瘤分期有关。Wenger 等^[9]总结分析了 273 篇有关乳腺癌 SPF 的研究文献指出,SPF 与乳腺癌的其他预后指标有明显的相关性,高 SPF 者常常分级较差,肿瘤直径较大,腋窝淋巴结转移阳性等。

3.3 临床新辅助化疗中出现 pCR 的相关因素

目前乳腺癌研究比较统一的观点是新辅助化疗确实能够使乳腺癌患者临床分期降低,临床总有效率达到 70% 以上,其中有 10%~20% 的患者达到 pCR^[10-12]。尽管该比率不高,但很有临床价值,因为达到 pCR 的患者与化疗后依然有肿瘤残余的患者相比,其无瘤生存率及总生存率均明显增加。将本组 6 例 pCR 的患者新辅助化疗前的 SPF 与 41 例 PR 患者及 19 例化疗无效患者比较,差异无统计学意义,这说明虽然 SPF 值较大者对新辅助化疗敏感,但患者接受新辅助化疗后能否出现 pCR,可能其他临床病理因素有关。NSABPB-18 试验结果显示:在 759 名接受新辅助化疗的乳腺癌患者中,80% 的患者肿瘤减小,36% 的患者获得临床完全缓解,其中有 26% 出现 pCR。在淋巴结阳性病例中,89% 有淋巴结状态改变,73% 出现了临床完全缓解,44% 出现 pCR,病理阴性的淋巴结增加了 37%。结果显示肿瘤直径及淋巴结状态是临床完全缓解的独立预测因素^[13]。惠锐等^[14]认为:影响新辅助化疗患者获得 pCR 的因素之一就是肿瘤大小,肿瘤越小,缓解率越高。本研究出现的 6 例 pCR 患者中淋巴结均未出现癌细胞转移,只有 1 例肿瘤直径>5.0 cm,其余 5 例肿瘤直径介于 2 cm~5 cm 之间。

参考文献

- [1] 姜军. 乳腺疾病腔镜治疗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012;1.
- [2] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [3] 杨宝玉,施纯玫,陈强. 乳腺癌新辅助化疗的临床研究进展[J]. 肿瘤研究与临床, 2009, 21(10):715-717.
- [4] 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[J]. 临床肿瘤学杂志, 2000, 18(5):95-96.
- [5] Haagedoorn EM, De Vries J, Robinson E. The UICC/WHO-CCCE Cancer Education project: a different approach [J]. J Cancer Educ, 2000, 15(4):204-208.
- [6] Chevillard S, Pouillart P, Beldjord C, et al. Sequential assessment of multidrug resistance phenotype and measurement of S-phase fraction as predictive markers of breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy[J]. Cancer, 1996, 77(2):292-300.
- [7] 卫燕,李金峰,王天峰,等. 激素受体和 Ki67 的表达与乳腺癌癌环类新辅助化疗疗效的相关性[J]. 北京大学学报(医学版), 2007, 39(5):481-484.
- [8] Muss HB, Kute TE, Case LD, et al. The relation of flow cytometry to clinical and biologic characteristics in women with node negative primary breast cancer [J]. Cancer, 1989, 64(9):1894-1900.
- [9] Wenger CR, Clark GM. S-phase fraction and breast cancer--a decade of experience[J]. Breast Cancer Res Treat, 1998, 51(3):255-265.
- [10] Straver ME, van Adrichem JC, Rutgers EJ, et al. Neoadjuvant systemic therapy in patients with operable primary breast cancer: more benefits than breast-conserving therapy [J]. Ned Tijdschr Geneesk, 2008, 152(46):2519-2525.
- [11] Shien T, Akashi-Tanaka S, Miyakawa K, et al. Clinicopathological features of tumors as predictors of the efficacy of primary neoadjuvant chemotherapy for operable breast cancer [J]. World J Surg, 2009, 33(1):44-51.
- [12] Fuzhong T, Nan L, Jiajia G, et al. Clinical significance of the relationship between expression of survivin and effects of neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer [J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2008, 35(8):1319-1323.
- [13] Fisher B, Brown A, Mamounas E, et al. Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18 [J]. J Clin Oncol, 1997, 15(7):2483-2493.
- [14] 惠锐,张瑾,范宇. 乳腺癌新辅助化疗后病理缓解的临床意义[J]. 中华医学杂志, 2008, 88(14):961-964.

(收稿日期:2013-01-06)

(本文编辑:刘军兰)

张景臣,毛大华. S 期细胞比率对乳腺癌新辅助化疗敏感性的预测价值[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2013, 7(4):259-262.