

乳腺导管原位癌分子分型的临床研究

陈文静¹ 张江宇¹ 陈中扬² 吴坤河¹ 郭红艺¹ 林慧娟¹

【摘要】 目的 研究乳腺导管原位癌(DCIS)的组织学级别及各分子分型与临床病理特征之间的关系。**方法** 收集2005年1月至2016年1月广东省妇幼保健院收治的240例DCIS患者的手术标本进行回顾性研究,应用免疫组织化学方法检测ER、PR、HER-2和Ki67的表达,并根据结果对所有病例进行分子分型。分析不同级别及不同分子分型DCIS患者的临床病理特征。年龄及组织学分级比较采用非参数检验(Kruskal-Wallis H检验),其余指标比较采用 χ^2 检验。ER、PR、HER-2表达的两两比较用 χ^2 分割法。**结果** 在全部240例患者中,低级别DCIS有74例(30.8%),中级别DCIS 139例(57.9%),高级别DCIS 27例(11.3%);luminal A型92例(38.3%),luminal B型70例(29.2%),HER-2过表达型76例(31.7%),三阴型2例(0.8%)。不同级别DCIS患者年龄分布的差异无统计学意义($\chi^2=5.224, P=0.073$),但ER、PR及HER-2表达的差异均有统计学意义($\chi^2=62.974, 59.391, 58.501, P$ 均 <0.001)。两两比较结果显示,ER、PR在低级别DCIS中的表达均高于中级别和高级别DCIS(ER: $\chi^2=36.345, 67.769, P$ 均 <0.014 ; PR: $\chi^2=41.172, 51.440, P$ 均 <0.014);HER-2在高级别DCIS中的表达高于中、低级别的DCIS($\chi^2=6.391, 50.132, P$ 均 <0.014)。不同分子分型患者的年龄分布及患侧差异无统计学意义($\chi^2=0.811, 4.332, P=0.847, 0.228$),但是组织学分级差异有统计学意义($\chi^2=80.779, P<0.001$)。组织学分级在luminal A型分别与luminal B型、HER-2过表达型、三阴型比较, luminal B型与HER-2过表达型比较时,差异均有统计学意义(P 均 <0.050)。**结论** 检测DCIS的分子分型,可为临床诊疗及预后预测提供参考。

【关键词】 乳腺肿瘤; 导管原位癌; 分子分型; 免疫组织化学

【中图分类号】 R737.9 **【文献标志码】** A

Clinical study on molecular subtypes in breast ductal carcinoma in situ Chen Wenjing¹, Zhang Jiangyu¹, Chen Zhongyang², Wu Kunhe¹, Gao Hongyi¹, Lin Huijuan¹. ¹Department of Pathology, ²Department of Breast Diseases, Guangdong Women and Children's Hospital, Guangzhou 510010, China
Corresponding author: Zhang Jiangyu, Email: superchina2000@foxmail.com

【Abstract】 Objective To study the relationship of different histological grades and molecular subtypes with clinicopathological characteristics in breast ductal carcinoma in situ (DCIS) patients. **Methods** The surgical specimens from 240 patients with DCIS in Guangdong Women and Children's Hospital from January 2001 to January 2016 were collected for a retrospective study. The expressions of ER, PR, HER-2 and Ki67 were detected by immunohistochemistry. Based on the results, all patients were divided into 4 molecular subtypes. The clinicopathological characteristics of DCIS patients were analyzed according to different histological grades and molecular subtypes. The data on age and histological grade were compared by nonparametric test (Kruskal-Wallis H test), and the other indexes were analyzed by χ^2 test. χ^2 segmentation was used for pairwise comparison in ER, PR and HER-2 expression. **Results** Among the 240 patients, there were 74 cases (30.8%) of low-grade DCIS, 139 cases (57.9%) of middle-grade DCIS and 27 cases (11.3%) of high-grade DCIS. There were 92 cases (38.3%) of luminal A subtype, 70 cases (29.2%) of luminal B subtype, 76 cases (31.7%) of HER-2-overexpressed subtype and 2 cases (0.8%) of triple-negative subtype. The age distribution showed no significant difference in DCIS patients at different histological grades ($\chi^2=5.224, P=0.073$), but there were significant differences in ER, PR and HER-2 expressions ($\chi^2=62.974, 59.391, 58.501$; all $P<0.001$). The results of pairwise comparison showed that the expression of ER/PR in low-grade DCIS was significantly higher than that in middle-grade or high-grade DCIS (ER: $\chi^2=$

36.345, 67.769, both $P < 0.014$; PR: $\chi^2 = 41.172, 51.440$, both $P < 0.014$), while the expression of HER-2 in high-grade DCIS was significantly higher than that in middle-grade or low-grade DCIS ($\chi^2 = 6.391, 50.132$, both $P < 0.014$). There was no significant difference in age distribution and affected side among patients with different molecular subtypes ($\chi^2 = 0.811, 4.332$; $P = 0.847, 0.228$), while the histological grade showed a significant difference ($\chi^2 = 80.779, P < 0.001$). The histological grades were significantly different comparing luminal A subtype with luminal B, HER-2-overexpressed and triple-negative subtypes respectively (all $P < 0.050$). The histological grade of luminal B subtype was significantly different from that of HER-2-overexpressed subtype ($P < 0.050$). **Conclusion** The molecular typing can be used as a reference for clinical diagnosis and prognosis prediction in DCIS patients.

【Key words】 Breast neoplasms; Ductal carcinoma *in situ*; Molecular classification; Immunohistochemistry

乳腺癌是组织形态多变、有不同免疫表型和预后的异质性肿瘤。目前,乳腺癌的分类及治疗方案主要取决于组织学特征及传统的预后预测因子,2000年,cDNA微点阵研究显示一种新的乳腺癌分组有不同的预后,乳腺癌根据其分子表达情况可分为4组:luminal A型、luminal B型、HER-2过表达型及三阴型^[1-3]。乳腺癌的基因表达特征和蛋白表达情况基本吻合。乳腺癌的分子分型是在原来TNM分期基础上,把分子生物学的最新研究成果应用于TNM分期中,从而为肿瘤的个体化治疗和预后分析提供可靠的依据^[3]。

DCIS是指肿瘤局限于乳腺导管系统内,未侵犯基底膜和周围间质。随着乳腺影像学及微创活组织检查的开展和普及,DCIS的诊断率逐渐上升。以往标准根据肿瘤排列方式和核异型性将DCIS分为低级别、中高级别、高级别。在评价复发危险度和进展为浸润性癌危险度的前瞻性研究中已证实这种分型是有价值的^[4]。然而,观察介于中间状态的中分化亚型的变化仍是一个难题,DCIS的异质性也常常导致亚型的改变^[5]。既然DCIS是浸润性导管癌(invasive ductal carcinoma, IDC)的前身,那么在此过程中,ER、PR、HER-2及Ki67的表达是否发生某种程度的变化?是否可用免疫组织化学方法建立与浸润性乳腺癌分子分型相类似的DCIS分子分型,以完善原有的形态学分类?根据乳腺癌分型标准^[6],笔者对广东省妇幼保健院收治的DCIS患者进行分子分型的研究,综合分析其特点,旨在为临床个体化诊治提供参考。

资料与方法

一、研究对象

收集本院2005年1月至2016年1月经手术切除并由病理检查证实的240例DCIS患者的手术标本进行回顾性研究,应用免疫组织化学法检测其ER、PR、HER-2、Ki67的表达,并对其进行分子分型。患者均为女性,年龄为21.0~83.0岁,平均(46.9±

11.1)岁。本研究方案获得广东省妇幼保健院医学伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

二、检查方法、结果判断及分子分型

所有标本由本院病理科统一处理,经固定、石蜡包埋、切片、脱蜡、脱水后行免疫组织化学SP法染色观察。根据2012年WHO的诊断标准,所有病例均诊断为DCIS^[7]。DCIS根据核异型性可分为低级别、中高级别和高级别。DCIS管腔直径均超过2mm,肿瘤细胞均未突破导管基底膜。低级别DCIS肿瘤细胞大小较一致,核分裂象少,坏死不常见。高级别DCIS肿瘤细胞核异型性明显,核分裂象易见,常见粉刺性坏死。中高级别DCIS介于两者之间。

免疫组织化学判断标准:ER、PR和Ki67阳性标准为细胞核着棕黄色颗粒;HER-2的判定标准参照《乳腺癌HER-2检测指南(2014版)》^[8]。根据免疫组织化学结果及乳腺癌的临床分子分型标准^[9](表1),对所有患者进行分子分型。

表1 乳腺癌的临床分子分型标准^[9]

分子分型	免疫组织化学表达
luminal A型	ER阳性、PR阳性、HER-2阴性、Ki67<14%
luminal B型	ER阳性、PR阳性、HER-2阳性或ER阳性、PR阳性、HER-2阴性、Ki67≥15%或PR阴性
HER-2过表达型	ER阴性、PR阴性、HER-2阳性
三阴型	ER、PR、HER-2均为阴性

三、统计学分析

应用SPSS 24.0软件进行统计学处理,不同级别DCIS患者的年龄及组织学分级比较采用非参数检验(Kruskal-Wallis H),其余指标比较采用 χ^2 检验,检验水平 $\alpha = 0.050$ 。ER、PR、HER-2表达的两两比较用 χ^2 分割法,新的检验水平 $\alpha' = 0.014$ 。

结果

一、不同级别DCIS患者的临床病理特征

在全部240例患者中,低级别DCIS有74例

(30.8%), 中高级别 DCIS 139 例(57.9%), 高级别 DCIS 27 例(11.3%)。

不同级别 DCIS 患者的年龄分布差异无统计学意义($\chi^2 = 5.224, P = 0.073$), 但 ER、PR 及 HER-2 表达差异有统计学意义($\chi^2 = 62.974, 59.391, 58.501, P < 0.001$, 表 2)。两两比较结果显示 ER、PR 在低级别 DCIS 中的表达均高于中高级别 DCIS (ER: $\chi^2 = 36.345, 67.769, P$ 均 < 0.014 ; PR: $\chi^2 = 41.172, 51.440, P$ 均 < 0.014); HER-2 在高级别 DCIS 中的表达高于中、低级别的 DCIS ($\chi^2 = 6.391, 50.132, P$ 均 < 0.014)。

表 2 240 例导管原位癌患者的临床病理特征与癌组织学分级关系

临床病理特征	导管原位癌			χ^2 值	P 值
	低级别 (n=74)	中高级别 (n=139)	高级别 (n=27)		
年龄 ^a					
<40 岁	27	34	4	5.224	0.073
40~55 岁	34	84	23		
56~70 岁	5	14	0		
>70 岁	8	7	0		
ER ^b				62.974	<0.001
阳性	72	81	5		
阴性	2	58	22		
PR ^c				59.391	<0.001
阳性	66	61	4		
阴性	8	78	23		
HER-2 ^d				58.501	<0.001
阳性	7	77	22		
阴性	67	62	5		

注: ^a 采用非参数检验; ^b 低级别与中高级别、低级别与高级别及中高级别与高级别 DCIS 比较, $\chi^2 = 36.345, 67.769, 14.311, P$ 均 < 0.014 ; ^c 低级别与中高级别、低级别与高级别及中高级别与高级别 DCIS 比较, $\chi^2 = 41.172, 51.440, 8.019, P$ 均 < 0.014 ; ^d 低级别与中高级别、低级别与高级别及中高级别与高级别 DCIS 比较, $\chi^2 = 42.665, 50.132, 6.391, P$ 均 < 0.014 。

二、不同分子分型 DCIS 患者的临床病理特征

240 例 DCIS 中, luminal A 型例数最多, 有 92 例(38.3%), 三阴型最少, 仅 2 例(0.8%), luminal B 型有 70 例(29.2%), HER-2 过表达型有 76 例(31.7%)。

不同分子分型患者的年龄分布、患侧差异均无统计学意义($\chi^2 = 0.811, 4.332, P = 0.847, 0.228$), 但是组织学分级差异有统计学意义($\chi^2 = 80.779, P < 0.001$, 表 3)。两两比较结果显示, 组织学分级在 luminal A 型分别与 luminal B 型、HER-2 过表达型、三阴型比较, luminal B 型与 HER-2 过表达型比较时, 差异均有统计学意义(P 均 < 0.050)。低级别

DCIS 以 luminal A 型为主, 占 77.0%(57/74), 高级别 DCIS 以 HER-2 过表达型为主, 占 66.7%(18/27)。

表 3 240 例导管原位癌患者的临床病理特征与分子分型的关系

临床病理特征	luminal A 型 (n=92)	luminal B 型 (n=70)	HER-2 过表达型 (n=76)	三阴型 (n=2)	χ^2 值	P 值
年龄 ^a						
<40 岁	29	20	16	0	0.811	0.847
40~55 岁	43	43	53	2		
56~70 岁	11	4	4	0		
>70 岁	9	3	3	0		
患侧					4.332	0.228
左侧	40	39	38	0		
右侧	52	31	38	2		
组织学分级 ^{ab}					80.779	<0.001
低级别	57	15	2	0		
中高级别	33	50	56	0		
高级别	2	5	18	2		

注: ^a 采用非参数检验; ^b luminal A 型分别与 luminal B 型、HER-2 过表达型、三阴型比较, luminal B 型与 HER-2 过表达型比较, P 均 < 0.050 。

讨 论

乳腺癌是一种组织形态、生物学特征、临床表现、治疗反应均具有异质性的肿瘤^[10-11]。基因微阵列方法研究发现, 乳腺癌的分子分型可能对乳腺癌的分类及治疗起着重要作用^[3]。通过免疫组织化学标记检测石蜡切片中的抗体已经代替基因检测, 成为检测乳腺癌分子分型可靠的方法。目前, 主要依据 ER、PR、HER-2、CK5/6 及 Ki67 的表达情况进行分型^[12-13], 即基于肿瘤分子生物学特征而不是仅限于形态学分析的乳腺浸润性癌分子分型。

在过去的 20 年中, 随着乳腺影像学及微创活组织检查的开展和普及, DCIS 的诊断率急剧上升, 对乳腺 DCIS 的进一步研究亦同样重要^[14-15]。但是, 作为浸润性癌前病变的 DCIS, 既往对其生物学亚型的详细研究分析很少, 而且这些研究的结果存在偏倚, 关于 DCIS 及浸润性癌的分子分型的发生频率也存在不一致的结果。

本研究采用乳腺浸润性癌分子分型的 4 种标志物, 按照《中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2015 版)》^[9], 将 DCIS 分成 4 种分子分型, 结果显示, luminal A 型、luminal B 型、HER-2 过表达型和三阴型 DCIS 的比例分别为 38.3%(92/240)、29.2%(70/240)、31.7%(76/240) 和 0.8%(2/240)。这与 Livasy 等^[16] 和 Paredes 等^[17] 的研究结果不一致, 他们的研究中 luminal B 型的比例较低, luminal A 型

比例较高,其原因可能在于本研究采用了另一种分类标准。以往分类中,ER 阳性、HER-2 阴性的患者,归在 luminal A 型,但在新分类中,如果 PR 阳性或 Ki67 比例 $\geq 15\%$,都将其归入在 luminal B 型,所以 luminal B 型比例增高。本研究中三阴型患者例数较少,仅为 2 例,原因在于 DCIS 中 ER、PR 和 HER-2 同时阴性表达的病例较少。

本研究结果还显示,ER、PR 和 HER-2 在不同级别 DCIS 中表达不同,差异有统计学意义。高级别 DCIS 中 HER-2 大部分表达阳性,ER、PR 一般较少表达,所以在高级别 DCIS 中为 HER-2 过表达型比例较高,占 66.7% (18/27)。然而,低级别 DCIS 与高级别 DCIS 相反,ER、PR 较多表达阳性,HER-2 却较少表达,所以,低级别 DCIS 大多为 luminal A 型,占 77.0% (57/74)。

Sang 等^[18]统计 219 例浸润性乳腺癌,其中, luminal A 型、luminal B 型、HER-2 过表达型和三阴型分别是 39 例 (17.8%)、95 例 (43.4%)、53 例 (24.2%) 和 32 例 (14.6%)。与本研究的 DCIS 患者相比,浸润性乳腺癌各种分子分型的构成比例变化较大, luminal A 型和 HER-2 过表达型比例有所减少, luminal B 型比例有所增加,三阴型比例升高。三阴型比例增加,可能是由于 HER-2 过表达型 DCIS 浸润后,癌细胞 HER-2 表达丢失,进展为三阴型浸润性癌。另一个原因可能是三阴型 IDC 在由不典型增生发展为 DCIS,再进展为 IDC 过程中,停留在 DCIS 阶段过程非常短,可能不典型增生直接就发展为 IDC。这也在三阴型 IDC 的经典病理形态学表现可以体现,其主要形态包括膨胀性浸润性边缘、显著性的核异型、核分裂和核异型易见,常缺乏 DCIS 成分,提示 DCIS 阶段很短。

综上所述,检测 DCIS 的分子分型可为临床诊疗提供参考。DCIS 最常见的分子分型是 luminal A 型,其次是 HER-2 过表达型。乳腺癌分子分型与个体化治疗密切相关,DCIS 治疗常以手术治疗为主,少数进行内分泌治疗。本文研究 DCIS 分子分型主要在于观察乳腺癌在浸润前后 DCIS 和 IDC 分子分型构成上的变化。三阴型乳腺癌为什么在浸润之后显著增多,其原因值得进一步探讨,从而有助于精准治疗及预测预后^[19-20]。

参 考 文 献

- [1] Perou CM, Sørli T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours[J]. Nature, 2000, 406(6797):747-752.
- [2] Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, et al. Breast cancer intrinsic subtype

classification, clinical use and future trends[J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(10):2929-2943.

- [3] Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(14):8418-8423.
- [4] Ehinger A, Malmström P, Bendahl PO, et al. Histological grade provides significant prognostic information in addition to breast cancer subtypes defined according to St Gallen 2013[J]. Acta Oncol, 2016, 56(1):68-74.
- [5] Dai X, Xiang L, Li T, et al. Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes[J]. J Cancer, 2016, 7(10):1281-1294.
- [6] Falck AK, Røme A, Fernö M, et al. St Gallen molecular subtypes in screening-detected and symptomatic breast cancer in a prospective cohort with long-term follow-up[J]. Br J Surg, 2016, 103(5):513-523.
- [7] Lakhani SR, Ellis LO, Schnitt SJ, et al. WHO classification of tumours of the breast[M]. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2012:90-94.
- [8] 《乳腺癌 HER-2 检测指南(2014 版)》编写组. 乳腺癌 HER-2 检测指南(2014 版)[J]. 中华病理学杂志, 2014, 43(4):262-267.
- [9] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2015 版)[J]. 中国癌症杂志, 2015, 25(9):692-754.
- [10] Tamimi RM, Baer HJ, Marotti J, et al. Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(4):R67.
- [11] 曹一鸣, 韦长元, 黄平, 等. 乳腺癌新辅助化疗病理缓解率与组织学及分子标志相关性分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(18):1479-1483.
- [12] Norum JH, Andersen K, Sørli T, et al. Lessons learned from the intrinsic subtypes of breast cancer in the quest for precision therapy[J]. Br J Surg, 2014, 101(8):925-938.
- [13] Alshareeda AT, Soria D, Garibaldi JM, et al. Characteristics of basal cytokeratin expression in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2013, 139(1):23-37.
- [14] Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, et al. Ductal carcinoma in situ of the breast[J]. N Engl J Med, 2004, 350(14):1430-1441.
- [15] O'Sullivan MJ, Morrow M. Ductal carcinoma in situ-current management[J]. Surg Clin N Am, 2007, 87(2):333-351.
- [16] Livasy CA, Perou CM, Karaca G, et al. Identification of a basal-like subtype of breast ductal carcinoma in situ[J]. Hum Pathol, 2007, 38(2):197-204.
- [17] Paredes J, Lopes N, Milanezi F, et al. P-cadherin and cytokeratin 5: useful adjunct markers to distinguish basal-like ductal carcinomas in situ[J]. Virchows Arch, 2007, 450(1):73-80.
- [18] Sang J, Yi D, Tang X, et al. The associations between mast cell infiltration, clinical features and molecular types of invasive breast cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(49):81661-81669.
- [19] Aguiar FN, Mendes HN, Bacchi CE, et al. Comparison of nuclear grade and immunohistochemical features in situ and invasive components of ductal carcinoma of breast[J]. Rev Bras Ginecol Obstet, 2013, 35(3):97-102.
- [20] Lesurf R, Aure MR, Mørk HH, et al. Molecular features of subtype-specific progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer[J]. Cell Rep, 2016, 16(4):1166-1179.

(收稿日期:2016-11-30)

(本文编辑:刘军兰)

陈文静,张江宇,陈中扬,等. 乳腺导管原位癌分子分型的临床研究[J/CD]. 中华乳腺病杂志(电子版), 2017, 11(5):262-265.