

拓扑异构酶 II α 表达与蒽环类药物在晚期乳腺癌中疗效的关系

杜文娟 王 宁 王雅杰

摘 要 **目的** 观察晚期乳腺癌患者肿瘤组织中拓扑异构酶 II α (topoisomerase II α , Topo II α) 的表达与蒽环作为一线化疗药物疗效的关系。**方法** 采用免疫组化法检测 200 例乳腺癌石蜡切片标本中 Topo II α 的表达, 观察其与晚期乳腺癌患者临床病理参数及近期化疗有效率之间的关系。**结果** 200 例晚期乳腺癌远处转移部位数、组织学分级、ER 和 Her-2 表达与 Topo II α 表达有关。对于应用含有蒽环方案有效的患者, 其肿瘤组织 Topo II α 阳性表达明显高于无效者 ($P < 0.001$)。采用非蒽环类方案的患者, 其肿瘤组织 Topo II α 表达与疗效无关。**结论** Topo II α 的表达状态与晚期乳腺癌患者一线化疗疗效密切相关, 化疗方案中含蒽环类药物者肿瘤组织表达 Topo II α 近期有效率更高。

关键词 乳腺肿瘤 蒽环类抗生素 拓扑异构酶 II α 化疗

Association between Expression of Topoisomerase II α and Efficacy of Epirubicin in Patients with Breast Cancer. Du Wenjuan, Wang Ning, Wang Yajie. Department of Oncology, Changhai Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract Objective To analyze retrospectively whether the expression of topoisomerase II α protein influences the response to anthracycline-containing first-line regimens in advanced breast cancer. **Methods** In this study topoisomerase II α protein was evaluated by immunohistochemistry in formalin-fixed paraffin-embedded tissue from 200 samples of primary breast cancer. The clinical pathological parameters and chemotherapy response were evaluated. **Results** Over-expression of topoisomerase II α was associated with ER, Her-2, histological grading and distant metastasis. The over-expression of topoisomerase II - alpha (Topo II α) in the tumors predicted response to anthracycline-containing first-line regimens. However, the expression of topoisomerase II - alpha (Topo II α) was not correlated with clinical response rate of the non-anthracycline-containing regimens. **Conclusion** The expression of topoisomerase II - alpha in primary breast cancer tissue is a predictive factor for anthracycline response in advanced breast cancer.

Key words Breast neoplasms; Anthracyclines; Topoisomerase II α ; Chemotherapy

蒽环类化疗药物是细胞周期非特异性药物, 主要作用于细胞核内的 DNA, 与其结合从而抑制核酸的合成和有丝分裂而达到治疗肿瘤的目的。蒽环类药物也可以作用于肿瘤细胞的拓扑异构酶 II α (topoisomerase II α , Topo II α) 抑制肿瘤的生长。蒽环类药物是乳腺癌化疗方案中的基础药物之一, 无论在新辅助化疗、辅助化疗以及姑息治疗中均具有突出的优势。各项临床研究结果证实, 蒽环类药物并非对所有的乳腺癌患者均有疗效; 即便治疗开始有效的患者在多次治疗后往往出现耐药。因此对蒽环类药物疗效的预测指标成为乳腺癌个体化治疗的重要部分。作为蒽环类药物潜在的靶点, 我们推测 Topo II α 有可

能成为含蒽环类化疗的疗效预测指标。因此, 本文回顾性分析乳腺癌患者的肿瘤组织中 Topo II α 的表达状况, 并总结含蒽环类化疗方案对晚期乳腺癌患者的临床疗效, 旨在探讨乳腺癌组织中 Topo II α 的表达与疗效的关系。

资料与方法

1. 研究对象: 选取解放军总医院 2000 年 1 月 ~ 2008 年 1 月收治的女性晚期乳腺癌患者 200 例进行回顾性研究。年龄 19 ~ 75 岁, 中位年龄 47 岁。患者首次就诊肿瘤为局部晚期或者已经发生远处转移, 无法进行根治性手术切除。所有患者均行肿瘤组织切取活检并且病理诊断明确, 其中浸润性导管癌 172 例, 浸润性小叶癌 10 例, 髓样癌 4 例, 黏液样癌 8 例, 复合癌 6 例。治疗前经 CT 或者 MRI 检查确认有可测量、可评估的肿瘤病灶。患者未行放疗, 既往未接受蒽环方案治疗; 所采用的化疗方案包括: ① CEF 方案 (环磷酰胺; 表柔比星; 5-FU); ② TAC 方案 (多西他赛; 表柔比星; 环磷酰胺); ③ CAF 方案 (环磷酰胺; 表柔比星; 5-FU); ④ AC 方案 (表柔比星; 环磷酰胺); ⑤ CTF 方案 (环磷酰胺; 吡柔比星; 5-FU); ⑥ CMF 方案 (环

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81072175); 上海市卫生局科研项目 (2009113); 上海市重点学科建设项目 (B905)

作者单位: 200433 上海, 第二军医大学长海医院肿瘤科

通讯作者: 王雅杰, 电子信箱: yajiewa0459@163.com

磷酰胺;甲氨蝶呤;5-FU)。应用含蒽环药物的化疗方案中,表柔比星的剂量为 90mg/m²,吡柔比星剂量为 40~50mg/m²。患者应用不同化疗方案情况见表 1。每位患者接受化疗至少 4~6 个周期。

2. 研究方法:(1)试剂与仪器:Topo II α 一抗采用鼠抗人 Topo II α 单克隆抗体;Topo II α 二抗采用二步法抗兔/鼠通用型二抗;DAB 显色剂均购自北京中杉生物技术公司。(2)免疫组化方法:Topo II α 表达测定采用 SP 免疫组化染色方法,所有标本均经 10% 甲醛固定,石蜡包埋,连续切片 4 μm 厚,常规用 3% H₂O₂ 溶液作用 10min,微波修复抗原,依次加入一抗(抗 Topo II α),二抗(抗 Topo II α),DAB 显色,苏木素复染后封片观察。以 TBS 液代替一抗做阴性对照,用已知扁桃体组织做阳性对照。

3. 患者肿瘤标本指标:乳腺癌患者发病年龄、原发肿瘤直径、组织学分级、远处转移数情况进行分类评估。其中组织病理学分级法是由 Elston 和 Ellis 提出的 Nottingham 联合乳腺癌组织学分级法(Nottingham combined histology grade, Scarff-Bloom-richardson 分级系统的 Elston-Ellis 修正版)。

4. 染色结果判定标准:(1)ER、PR:阳性染色定位于胞核和(或)胞质同时染色,以核染色为主,仅仅胞质染色为阴性。ER 和 PR 表达阳性为阳性细胞比例大于 20%,否则为阴性。(2)Her-2 阳性:美国临床肿瘤协会(ASCO)和美国病理家协会(CAP)于 2006 年 12 月联合发布了《乳腺癌 Her-2 检测的 ASCO/CAP 指南共识》,制定了乳腺癌 Her-2 临床检测指南,将超过 30% 的肿瘤细胞呈现完整的细胞膜染色判定为阳性。本研究采用 IHC 方法检测 Her-2 的表达情况,IHC 3+ 定义为 Her-2 阳性或者过表达。(3)Topo II α 染色主要位于胞核内,呈清晰棕黄色或黄色弥漫性分布。由 2 位以上病理医师在不知患者临床和病理资料的情况下对免疫组化染色结果进行评定,阳性细胞数大于 20% 为阳性(+),小于 20% 为阴性(-)。

5. 疗效判断:采用 WHO 实体瘤疗效评价标准。完全缓解(CR):病变完全消失,超过 1 个月。部分缓解(PR):肿块两最大垂径乘积缩小 ≥ 50%,并超过 1 个月。稳定(SD):肿块两最大垂径乘积缩小不及 50%,或增大未超过 25%。进展(PD):肿块两最大垂径乘积增大 ≥ 25%,或出现新病灶。统计学分析时将完全缓解和部分缓解合并为化疗有效,稳定和进展合并为化疗无效。疗效每 3 个化疗周期进行评估,达到 PR 和 CR 者 4 周时需要疗效确认。

6. 统计学方法:研究中涉及数据应用 SPSS 13.0 软件进行分析,以 $P < 0.05$ 表示显著性差异。患者 Topo II α 表达与和各项临床病理学指标的关系采用 χ^2 检验。样本理论频数小于 1 时,用 Fisher 精确概率法进行统计分析。

结 果

1. 乳腺癌患者的一般情况和 Topo II α 表达情况:200 例患者中 40 例采用了 CMF 方案,其余的 160 例患者化疗方案中均包含蒽环类药物。经过免疫组

织化学法检测,200 例乳腺癌患者中 62.00% (124/200) 表达 Topo II α,不同病理类型肿瘤组织表达 Topo II α 并无显著性差异(表 1)。同样,不同化疗方案的患者其肿瘤表达 Topo II α 也无显著性差异(表 1)。

表 1 Topo II α 表达与乳腺癌患者病理类型和化疗方案之间的关系 [n(%)]

变量	Topo II α (+)	Topo II α (-)	P
病人数	124(62.00)	76(38.00)	
病理类型			
浸润性导管癌	109(63.37)	63(36.63)	0.548
浸润性小叶癌	7(70.00)	3(30.00)	
黏液样癌	3(37.50)	5(62.50)	
髓样癌	2(50.00)	2(50.00)	
复合癌	3(50.00)	3(50.00)	
化疗方案			
CEF 方案	25(78.13)	7(21.88)	0.219
CAF 方案	40(57.14)	30(42.86)	
AC 方案	6(54.55)	5(45.45)	
TAC 方案	16(53.33)	14(46.67)	
CTF 方案	13(76.47)	4(23.53)	
CMF 方案	24(60.00)	16(40.00)	

2. 乳腺癌患者 Topo II α 表达与临床病理学参数之间的关系:对患者发病年龄、原位肿瘤大小、转移部位个数、组织学分级和 ER、PR 及 Her-2 表达情况进行分层,分析 Topo II α 表达与上述各个临床病理学参数之间的关系(表 2)。在本研究中,我们发现 Topo

表 2 Topo II α 表达与患者临床病理学参数的关系 [n(%)]

变量	Topo II α (+)	Topo II α (-)	P
病人数	124(62.00)	76(38.00)	
年龄(岁)			
≤50	60(59.41)	41(40.59)	0.445
>50	64(64.65)	35(35.35)	
肿瘤大小(mm)			
<20	31(51.67)	29(48.33)	0.083
20~50	73(68.87)	33(31.13)	
≥50	20(58.82)	14(41.18)	
远处转移部位数			
1	60(53.57)	52(46.43)	0.016
2~3	51(70.83)	21(29.17)	
≥4	13(81.25)	3(18.75)	
组织学分级			
I	34(72.34)	13(27.66)	0.010
II	71(54.62)	59(45.38)	
III	19(82.61)	4(17.39)	
ER			
+	50(52.08)	46(47.92)	0.006
-	74(71.15)	30(28.85)	
PR			
+	38(55.88)	30(44.12)	0.201
-	86(65.15)	46(34.85)	
Her-2			
+	41(75.93)	13(24.07)	0.014
-	83(56.85)	63(43.15)	

Ⅱα 表达与发病年龄是否大于 50 岁、肿瘤大小和 PR 表达无显著差别。而乳腺癌远处转移部位数、组织学分级、ER 和 Her-2 表达与 Topo Ⅱα 表达有关。肿瘤转移部位越多,Topo Ⅱα 阳性率愈高。4 个以上转移部位的乳腺肿瘤 Topo Ⅱα 阳性比例为 81.25%,而 1 个转移部位的肿瘤 Topo Ⅱα 阳性比例为 53.57%,前者明显高于后者($P=0.016$)。Topo Ⅱα 的表达在不同肿瘤组织学分级中的分布明显不同,在 Topo Ⅱα 阳性表达的肿瘤中,半数以上为Ⅱ级($P=0.010$)。而组织学Ⅰ级和Ⅲ级者 Topo Ⅱα 阳性表达占优势。在 ER 阴性的肿瘤组织中,Topo Ⅱα 阳性表达比例大;在 Topo Ⅱα 阳性表达的肿瘤组织中 ER 更可能为阴性,Topo Ⅱα 阴性的肿瘤组织中 ER 更可能为阳性($P=0.006$)。Her-2 过表达的肿瘤组织中近 3/4 表

达 Topo Ⅱα,Her-2 阴性的肿瘤中 Topo Ⅱα 阳性比例也高于阴性者($P=0.014$)。

3. 乳腺癌患者 Topo Ⅱα 表达与蒽环类化疗效果之间的关系:无论患者进行化疗方案中是否含有蒽环类药物,Topo Ⅱα 阳性表达者化疗近期有效率高;而且化疗有效的肿瘤组织中表达 Topo Ⅱα 者比例更大。根据表 3 所示,Topo Ⅱα 阳性表达者化疗有效率是 Topo Ⅱα 阴性表达的 4.038 倍($P<0.001$)。对于应用含有蒽环方案有效的患者,其肿瘤组织 Topo Ⅱα 阳性表达明显高于无效者;Topo Ⅱα 阳性表达者应用含蒽环药物化疗有效率是 Topo Ⅱα 阴性表达的 7.556 倍($P<0.001$)。然而在不含有蒽环方案的患者,Topo Ⅱα 表达与治疗方案的有关与否无关($P=0.813$)。

表 3 Topo Ⅱα 表达与含蒽环类药物治疗方案的关系

变量	Topo Ⅱα [n(%)]		OR	95% CI	P
	+	-			
所有方案					
有效	84(76.36)	26(23.64)	4.038	2.205 ~ 7.397	<0.001
无效	40(44.44)	50(55.56)			
含有蒽环方案					
有效	68(79.07)	18(20.93)	7.556	3.544 ~ 16.109	<0.001
无效	19(33.33)	38(66.67)			
不含有蒽环方案					
有效	16(66.67)	8(33.33)	1.143	0.378 ~ 3.454	0.813
无效	21(63.64)	12(36.36)			

OR:odds ratio,风险比;CI:confident interval,可信区间

讨 论

本研究对 200 例晚期乳腺癌患者一线应用含蒽环类的化疗方案,分析 Topo Ⅱα 阳性表达者与患者临床病理学参数以及化疗药物近期疗效的关系进行分析。结果发现应用含有蒽环方案有效的患者,其肿瘤组织 Topo Ⅱα 阳性表达明显高于无效者;然而在不含有蒽环方案的患者,Topo Ⅱα 表达与治疗方案的有关与否无关。这一结果和国内外多项研究相似,即 Topo Ⅱα 蛋白表达或者基因异常与蒽环类药物在新辅助治疗、辅助治疗以及晚期姑息治疗的疗效预测有关。Konecny 等^[1]报道高危乳腺癌患者在新辅助治疗方案中应用蒽环类药物,Topo Ⅱα 扩增的患者会获得更高的病理完全缓解率。更多的研究是对含蒽环类药物方案在辅助治疗中的疗效,Knoop 等^[2]和 Tanner 等^[3]研究显示,Topo Ⅱα 阳性组患者术后采用蒽环类药物辅助化疗无病生存期和总生存期高于

阴性组^[2-4]。O'Malley 等^[5,6]分析了 MA.5 临床研究中绝经前的淋巴结言行患者肿瘤组织 Topo Ⅱα 基因是否异常与是否含有蒽环类药物(CEF vs CMF)术后辅助治疗疗效的关系。结果发现 Topo Ⅱα 基因异常的患者中应用含有蒽环的 CEF 方案比 CMF 方案使术后复发风险降低了 65%(HR:0.35, $P=0.005$),死亡风险降低了 67%(总生存 HR:0.33, $P=0.008$)。而不表达 Topo Ⅱα 患者对 2 种化疗方案的反应相近。Durbecq 等^[7]比较了 Topo Ⅱα 表达的晚期乳腺癌患者用蒽环类药物与紫杉类解救化疗的疗效,结果发现 Topo Ⅱα 阳性表达的患者接受单药阿霉素治疗获得了较高的总缓解率,提示 Topo Ⅱα 蛋白过表达的乳腺癌患者可从蒽环类药物治疗中获益。任文晓等^[8]对 180 例曾用蒽环类药物单药或者蒽环类药物联合化疗的乳腺癌患者的回顾性研究发现,免疫组化法染色 Topo Ⅱα 阳性组蒽环类药物治疗疗效高于 Topo Ⅱα

阴性组。

我们在研究中还发现 Topo II α 表达与乳腺癌远处转移部位、组织学分级和 Her-2 表达与 Topo II α 表达有关。因为很多研究对象差异较大,对 Topo II α 检测的方法和阳性定义标准不同,故不同病理参数与 Topo II α 表达之间的关系结论不同。例如, O'Connor 等^[9]报道 Topo II 表达增加会使患者无病生存期大大缩短,而 Topo II 表达仅仅与肿瘤大小有关,与其他的病理参数无关。这一结果与我们的研究不符。但是很多研究结果提示肿瘤分化程度差、ER 阴性和 Her-2 过表达有关^[10]。多数研究更关注 Her-2 与 Topo II α 表达是否存在相关性。我们研究结果提示 Her-2 过表达的肿瘤组织中近 3/4 表达 Topo II α ,即两者有共同表达趋势,但是在 McArthur 等^[11]的报道中,Topo II α 蛋白的表达并不是完全与 Topo II α 基因扩增或 Her-2 过表达有关。与 Her-2 不同的是,Topo II α 蛋白表达在转录级翻译层面受到诸多调控,基因的表达量提高可能不会显著改变蛋白的表达情况。很多学者对 Topo II α 基因状态与 IHC 法检测 Topo II α 蛋白表达关系进行了研究,发现两者并无密切联系^[4, 12, 13]。因此,Topo II α 基因及蛋白表达情况的复杂性给 Topo II α 治疗预测的临床研究带来了诸多困难,在解释各项研究所得出的结果时也需要十分谨慎。

尽管本研究结果显示 Topo II α 蛋白的表达状态与晚期一线化疗方案是否含有蒽环类药物有关,而且 TOPO II α 表达与蒽环类药物在晚期乳腺癌中的疗效预测有关,但 2008 年公布的两项研究显示,丹麦-瑞典乳腺癌协作组研究中 Topo II α 基因扩增对 CEF 化疗疗效有预测价值,而 UK NEAT 研究发现 Topo II α 和 Her-2 表达均无预测价值。故 Topo II α 表达作为选择蒽环类药物的预测指标仍需要开展大规模的前瞻性临床研究或荟萃分析来加以证实。

参考文献

- 1 Konecny GE, Pauletti G, Untch M, *et al.* Association between HER2, TOP2A, and response to anthracycline-based preoperative chemotherapy in high-risk primary breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010,120(2):481-489
- 2 Knoop AS, Knudsen H, Balslev E, *et al.* retrospective analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide,

- midate, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group[J]. *J Clin Oncol*, 2005,23(30):7483-7490
- 3 Tanner M, Isola J, Wiklund T, *et al.* Topoisomerase II alpha gene amplification predicts favorable treatment response to tailored and dose-escalated anthracycline-based adjuvant chemotherapy in HER-2/neu-amplified breast cancer: Scandinavian Breast Group Trial 9401[J]. *J Clin Oncol*, 2006,24(16):2428-2436
- 4 Schindlbeck C, Mayr D, Olivier C, *et al.* Topoisomerase II alpha expression rather than gene amplification predicts responsiveness of adjuvant anthracycline-based chemotherapy in women with primary breast cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010,136(7):1029-1037
- 5 O'Malley FP, Chia S, Tu D, *et al.* Prognostic and predictive value of topoisomerase II alpha in a randomized trial comparing CMF to CEF in premenopausal women with node positive breast cancer (NCIC CTG MA. 5)[C]. *ASCO Meeting Abstracts*, 2006,24:533
- 6 O'Malley FP, Chia S, Tu D, *et al.* Topoisomerase II alpha and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2009,101(9):644-650
- 7 Durbecq V, Desmed C, Paesmans M, *et al.* Correlation between topoisomerase-II alpha gene amplification and protein expression in HER-2 amplified breast cancer[J]. *Int J Oncol*, 2004,25(5):1473-1479
- 8 任文晓,江泽飞,宋三泰. 乳癌 Topo II α 表达的基本规律及与蒽环类药物疗效的相关性研究[D]. 2007
- 9 O'Connor JK, Hazard LJ, Avent JM, *et al.* Topoisomerase II alpha expression correlates with diminished disease-free survival in invasive breast cancer[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006,65(5):1411-1415
- 10 Jarvinen TA, Liu ET. Her-2/neu and topoisomerase IIalpha in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2003,78(3):299-311
- 11 McArthur HL, Tan LK, Patil S, *et al.* High resolution representation of oligonucleotide microarray analysis (ROMA) suggests that TOP2 and Her-2 co-amplification is uncommon in human breast cancer[C]. *Cancer Res*, 2009,69(2):20-23
- 12 Callagy G, Pharoah P, Chin SF, *et al.* Identification and validation of prognostic markers in breast cancer with the complementary use of array-CGH and tissue microarrays[J]. *J Pathol*, 2005,205(3):388-396
- 13 Durbecq V, Paesmans M, Cardoso F, *et al.* Topoisomerase-II alpha expression as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or single-agent docetaxel[J]. *Mol Cancer Ther*, 2004,3(10):1207-1214

(收稿:2010-11-22)

(修回:2011-03-25)