

Snail 表达水平预测乳腺癌新辅助化疗效果的临床价值

曾韵洁¹, 曲少华², 沈溪明¹, 罗 铭³, 聂 燕², 龚 畅^{2,*}

(中山大学孙逸仙纪念医院 1.病理科;2.乳腺肿瘤医学部;3.肿瘤放疗科,广东广州 510120)

摘要:【目的】用免疫组化 SP 法检测接受新辅助化疗前的乳腺癌组织中 snail 的表达水平,探讨其预测新辅助化疗效果和预后的临床价值。【方法】接受含蒽环类药物新辅助化疗的乳腺癌患者 192 名,用免疫组化 SP 法检测乳腺癌组织中 snail 的蛋白表达水平,统计学分析 snail 的表达水平与临床病理特征、新辅助化疗临床效果及预后的关系。【结果】乳腺癌 snail 高表达(阳性率 $\geq 80\%$)比低表达(阳性率 $< 80\%$)患者的原发肿瘤大($P = 0.02$),淋巴结转移多($P = 0.002$),对新辅助化疗临床反应差($P = 0.002$),无瘤生存率低($P = 0.037$),总生存率低($P = 0.022$)。【结论】新辅助化疗前乳腺癌组织 snail 的表达水平有助于预测乳腺癌新辅助化疗的效果和预后。

关键词:乳腺癌;snail;新辅助化疗

中图分类号:R737.9

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2012)05-0655-05

Snail Expression Predicts Clinical Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer

ZENG Yun-jie¹, QU Shao-hua², SHEN Xi-ming¹, LUO Ming³, NIE Yan², GONG Chang^{2,*}

(1.Department of Pathology; 2.Breast Tumor Center; 3.Department of Oncology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 Whether snail expression in breast cancer predicts the efficacy of neoadjuvant chemotherapy and prognosis is investigated. 【Method】 Immunohistochemical assay was used to detect the snail protein level of 192 breast cancer tissues obtained by core needle biopsy before neoadjuvant chemotherapy. The relationship of snail expression with clinicopathological characteristics and efficacy as well as prognosis of neoadjuvant chemotherapy was statistically analyzed. 【Results】 High snail expression was associated with larger primary tumor size, more lymph node metastasis, poor clinical response to neoadjuvant chemotherapy, poor disease free survival and overall survival. 【Conclusion】 The protein level of snail shows predictive value of the efficacy of neoadjuvant chemotherapy based on anthracyclines and prognosis in breast cancer.

Key words: breast cancer; snail; neoadjuvant chemotherapy

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2012,33(5):655-659]

新辅助化疗,也称术前化疗,是指未发生远处转移的肿瘤病人在局部治疗(手术或放疗)前,先给予细胞毒药物进行全身化疗。乳腺癌新辅助化疗能够降低原发肿瘤和区域淋巴结分期,增加保乳机会,减少微小转移灶的扩散并预测个体对化疗方案的敏感性^[1-2]。目前,预测新辅助化疗效果的指标包括临床指标(如临床分期和淋巴结状态等)和分子指标(如激素受体状态,DNA 损伤指标

及基因芯片评分等)^[3]。但是,这些指标均不能完全准确的预测新辅助化疗效果和预后。转录因子 snail 是一种锌指 DNA 结合蛋白,它通过诱导细胞由上皮样表型向间质样表型转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)促进肿瘤的远处转移^[4-5],诱导细胞产生干细胞样特性^[6]。不仅如此,snail 也是导致肿瘤细胞多药耐药的重要原因^[7],已有研究报道 snail 与顺铂化疗耐药有关^[8]。化疗是

收稿日期:2012-04-22

基金项目:中山大学教师培育项目(11ykpy28,11ykzd12)

作者简介:曾韵洁,主治医师,研究方向:临床病理学,E-mail:zyj81332590@126.com; *通信作者:龚畅,博士,副主任医师,研究方向:乳腺肿瘤,E-mail:changong282@163.com

乳腺癌重要的治疗手段之一,尤其是以蒽环类为基石的化疗方案在乳腺癌的新辅助化疗中应用最为广泛。然而,snail 表达水平对含蒽环类药物的新辅助化疗方案敏感性和反应性的临床预测价值未见报道。本研究收集接受蒽环类药物进行新辅助化疗的患者 192 例,利用空心针穿刺活检获得化疗前的乳腺癌组织,通过免疫组化 SP 法检测 snail 蛋白表达水平,探讨其预测新辅助化疗效果和预后的临床价值。

1 材料与方 法

1.1 一般资料

收集 2005 年 9 月至 2008 年 9 月我院乳腺肿瘤医学部确诊的原发性 II b ~ III 期乳腺癌患者 192 例,新辅助化疗前经空心针穿刺活检证实病理类型均为浸润性导管癌。患者均为女性,平均年龄 45.2 岁,一般情况良好,Karnofsky 评分为 80 分以上,初诊时肿块大小平均直径是 3.1 cm,中位随访是 49 个月。所有患者在就诊前均未接受过任何相关治疗,在首次就诊时通过彩超,X 线和 CT 等影像学检查均证实无远处转移,并通过血常规、心功能及肝肾功能检查证实所有患者均无化疗禁忌证。

1.2 治疗方案及疗效评估

新辅助化疗前所有患者接受空心针穿刺活检获得乳腺癌组织,免疫组化 SP 法检测 snail 的表达水平。所有患者均接受 CEF(环磷酰胺+表阿霉素+氟尿嘧啶)或 ET(表阿霉素+多西紫杉醇)的初始化疗方案。其中 CEF 方案为:环磷酰胺 600 mg/m²,表阿霉素 90 mg/m²,5-氟尿嘧啶 500 mg/m²,静脉滴入,每 21 d 为 1 个疗程。ET 方案为:多西紫杉醇 75 mg/m²,持续 3 h 静脉滴入,表阿霉素 90 mg/m²,静脉滴入,化疗前 1 d 给予泼尼松龙 40 mg/12 h,口服,连用 3 d,化疗前 30 min 给予地塞米松 10 mg,静脉注射,每 21 d 一个疗程。完成化疗 2 个周期后,第 3 个化疗周期前 1 ~ 2 d 行临床体检及影像学检查,根据实体瘤缓解评估标准(RECIST)评估疗效。临床反应差者包括疾病进展(progressive disease,PD)和疾病稳定(stable disease,SD)者行手术治疗,临床有反应者包括临床完全缓解(cCR)及部分缓解(partial response,PR)的患者继续完成 2 个周期后 10 ~ 14 d 接受手

术治疗,根据临床评估决定手术方式。新辅助化疗有效者术后继续原方案化疗 2 个周期,未达到临床完全缓解(cCR)及部分缓解(cPR)的患者者改用其他化疗方案。雌激素受体阳性者予术后口服他莫昔芬或芳香化酶抑制剂内分泌治疗。

1.3 乳腺癌标本收集及处理

B 超引导下空心针穿刺活检获得的乳腺癌组织用 40 g/L 多聚甲醛溶液固定,送本院病理科行病理检查并进行免疫组化实验。

1.4 免疫组化检测

所有组织均用多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,4 μm 连续切片。采用免疫组化 SP 三步法检测 snail 蛋白表达水平。一抗购自德国 novus 公司(NBP1-19529,1:100),检测试剂盒购自福州迈新公司,DAB 显色试剂盒购自武汉博士德公司。

1.5 结果评判标准

Snail 阳性百分率采用计数估计半定量判断标准,即随机选择 10 个高倍镜(× 400)视野,以每个视野 500 个细胞计数,Snail 在胞浆和胞核中均有表达,胞浆或胞核淡黄或棕黄染色为阳性细胞,计算 snail 阳性率,以 snail 阳性率 ≥ 80% 为 snail 高表达,snail 阳性率 < 80% 为低表达^[9-10]。

1.6 随访

所有患者随访均从术后第 1 天开始算起,至 2012 年 4 月截止。随访信息通过电话随访或门诊随访获得。

1.7 统计学分析

所有资料都应用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析,χ² 检验分析 snail 表达水平与临床病理特征和临床效果之间的关系。Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,统计结果 P < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Snail 在乳腺癌组织中的表达水平与临床病理特征的关系

免疫组化 SP 法检测 192 例乳腺癌组织标本中 snail 的表达情况。在 192 例乳腺组织标本中,7 例组织标本中完全没有 snail 表达,snail 阳性表达率为 96.4%。其中,snail 高表达(阳性率 ≥ 80%)109 例占 56.8%,snail 低表达(阳性率 < 80%)83 例占 43.2%(图 1)。snail 低表达组与高表达组患者在

年龄、激素受体状态、组织学分级方面无统计学差异 ($P > 0.05$)。但乳腺癌 snail 高表达比低表达患者的原发肿瘤大 ($\chi^2 = 4.84, P = 0.02$), 淋巴结转移多 ($\chi^2 = 12.065, P = 0.002$), 临床分期晚 ($\chi^2 = 4.304, P = 0.038$)。这提示 snail 高表达组恶性程度更高(表 1)。

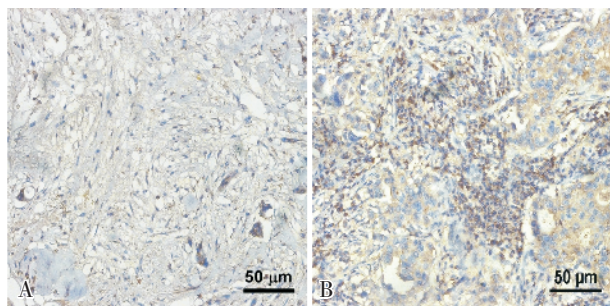


图 1 Snail 在乳腺癌中的表达(SP 法)

Fig.1 Expression of snail in breast cancer (SP)

A: Low snail expression; B: High snail expression.

表 1 Snail 表达水平与乳腺癌临床病理特征之间的关系

Table 1 Association between snail expression and clinicopathologic features of breast cancer patients

Item	N	Snail expression		χ^2	P
		Low(<80%)	High(\geq 80%)		
Age / years				0.78	0.377
≤ 45	87	34(17.7)	53(27.6)		
> 45	105	49(25.5)	56(29.2)		
Tumor size				4.48	0.028
2 ~ 5 cm	152	73(38.1)	79(41.1)		
> 5 cm	40	10(5.2)	30(15.6)		
Grade				0.502	0.778
I	35	17(8.9)	18(9.4)		
II	59	25(13.1)	34(17.7)		
III	98	41(21.3)	57(29.6)		
Clinical stage				4.304	0.038
II b	85	44(22.9)	41(21.4)		
III	107	39(20.3)	68(35.4)		
Lymph node status				12.065	0.002
N0	39	17(8.9)	22(11.5)		
N1	72	30(15.6)	42(21.9)		
N2	55	17(12.5)	31(16.1)		
N3	26	12(6.2)	14(7.3)		
Hormone receptor status				1.231	0.267
ER/PR positive	112	47(24.5)	65(33.9)		
ER/PR negative	80	36(18.8)	44(22.8)		

2.2 Snail 表达与临床获益率的关系

192 例患者资料完整, 均可评价疗效。临床评价按实体瘤的疗效评价标准(RECIST)分为临床完全缓解(cCR, 临床检查肿瘤完全消失)、部分缓解(PR, 肿瘤最大直径与其最大垂直径的乘积减少 $> 50\%$)、疾病稳定(SD, 肿瘤最大直径与最大垂直径的乘积减少 $< 50\%$ 或增加 $< 25\%$) 和疾病进展(PD, 肿瘤最大直径与最大垂直径的乘积增加 $> 25\%$)。临床总有效率为 cCR 与 PR 之和。在 snail 低表达组中, 55 例患者达 cCR 或 PR, snail 高表达组中有 41 例患者达 cCR 或 PR。Snail 低表达组的临床总有效率(cCR+PR)明显高于 snail 高表达组 (28.7% vs. 21.4%, $\chi^2 = 14.964, P = 0.002$)。Snail 高表达组中, 化疗抵抗(SD+PD)的患者明显多于化疗敏感(cCR+PR)的病人 (62.4% vs. 37.6%, $P = 0.01$)。这表明, snail 高表达与新辅助化疗获益率低相关(表 2)。

表 2 snail 表达水平与新辅助化疗临床缓解率的关系

Table 2 Clinical response to neoadjuvant chemotherapy in patients with high or low snail expression

Response to chemotherapy	N	Snail expression	
		Low(<80%)	High(\geq 80%)
cCR	23	14(7.3)	9(4.7)
PR	73	41(21.4)	32(16.7)
SD	42	12(6.2)	30(15.6)
PD	54	14(7.3)	38(19.8)
Total	192	83	109

cCR: clinical complete response; PR: partial response; SD: stable disease; PD: progressive disease. $\chi^2 = 14.964, P = 0.002$.

2.3 Snail 表达与预后的关系

为评价 snail 表达水平对新辅助化疗效果的预测价值, 我们首先比较了 snail 低表达组与高表达组的治疗方案。两组患者在化疗方案、化疗周期、手术方式、内分泌治疗方面均无统计学差异(表 3)。

经中位随访 49 个月之后, snail 低表达组 6 人疾病进展(其中骨转移 4 人, 肝转移 2 人), snail 高表达组 13 人疾病进展(其中骨转移 7 人, 肝转移 4 人, 肺转移 1 人, 脑转移 1 人)。应用 Kaplan-Merier 生存分析发现, snail 低表达组无瘤生存率为

表 3 Snail 表达水平与治疗方案的关系

Table 3 Treatment paradigms between patients with high and low snail expression *n*(%)

Response to chemotherapy	<i>N</i>	Snail expression		<i>P</i>
		Low(<80%)	High(≥80%)	
Neoadjuvant chemotherapy				
CEF	113	61(31.8)	52(27.0)	0.187
ET	79	35(18.2)	44(23.0)	
Surgical therapy				
Mastectomy	87	40(20.8)	47(24.5)	0.302
Conservation	105	55(28.6)	50(26.1)	
Cycles of chemotherapy				
Two	31	14(7.2)	17(8.9)	0.963
Three	47	20(10.4)	27(14.1)	
Four	114	51(26.6)	63(32.8)	
Endocrine therapy				
AI	63	28(14.6)	35(18.2)	0.983
TAM	49	21(10.9)	28(14.6)	
None	80	48(25.0)	32(16.7)	

CEF: cyclophosphamide/epirubicin/fluorouracil; ET: epirubicin/docetaxel; AI: aromatase inhibitors; TAM: tamoxifen

88.25%, 而 snail 高表达组无瘤生存率为 71.33%, 两组之间有显著的统计学差异 ($\chi^2 = 4.332, P = 0.037$; 图 2)。Snail 低表达组 1 人死亡, snail 高表达组 5 人死亡。应用 Kaplan-Meier 生存分析发现, snail 低表达组总生存率为 98.8%, snail 高表达组总生存率为 91.6%, 两组间有明显统计学差异 ($\chi^2 = 5.238, P = 0.022$; 图 3)。结果显示, snail 低表达组的无瘤生存率及总生存率均高于 snail 高表达组, 提示 snail 表达水平有助于预测接受蒽环类新辅助化疗患者的预后。

3 讨论

新辅助化疗是可手术的局部晚期乳腺癌综合治疗的重要组成部分。其适用范围从局限于肿瘤较大(超过 5 cm)或腋窝淋巴结有转移的可手术乳腺癌患者, 扩展到更早期(IIb 期及以上)的乳腺癌患者。新辅助化疗后获得病理完全缓解的乳腺癌病人无病生存率及总生存率可以得到显著提高。NSABP-B18 临床研究比较了可手术乳腺癌术前化疗和术后化疗的区别, 结果发现虽然术前化疗与术后化疗无病生存(disease free survival, DFS)与总生

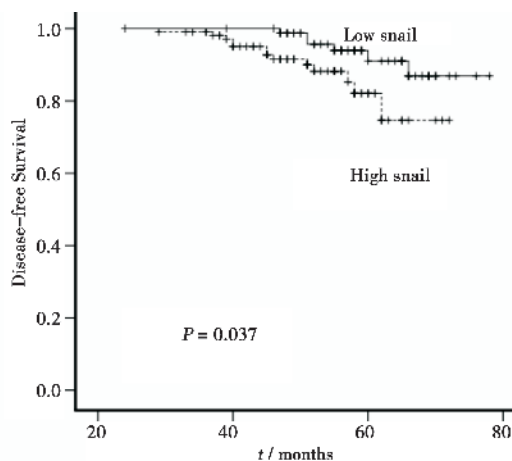


图 2 Snail 表达水平与无病生存率之间的关系

Fig.2 The disease-free survival curves of patients with high or low snail expression

The DFS rates were significantly higher in the patients with low snail expression than in those with high snail expression ($P = 0.037$)

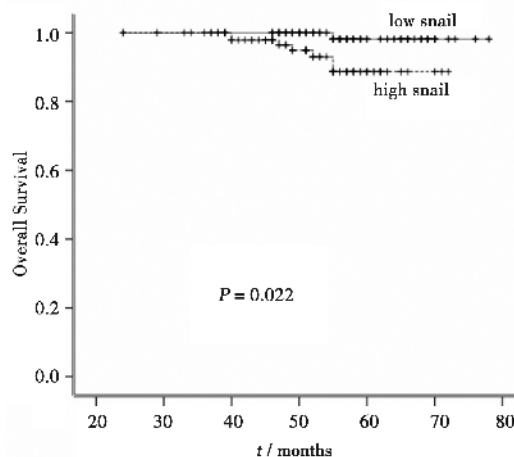


图 3 Snail 表达水平与总生存率之间的关系

Fig.3 The overall survival curves of patients with high or low snail expression

The OS rates were significantly higher in patients with low snail expression than in those with high snail expression ($P = 0.022$)

存(overall survival, OS)无明显差异, 但是 4 个周期新辅助化疗比术后化疗的患者获得更高的保乳机会(67.8% vs. 59.8%, $P = 0.02$)^[11]。新辅助化疗后获得病理完全缓解的乳腺癌病人无病生存率及总生存率可以得到显著提高^[2]。现有的研究证明, 激素受体阴性、HER-2 阳性、高 Ki-67 指数和三阴性乳腺癌^[12]在预测新辅助化疗的敏感性方面有一定作用, 但均不能完全准确的预测新辅助化疗疗效及预后。因此, 发现新的更有效的可以预测化疗反

应性和预后的分子标志物具有重要的临床意义。

Snail 通过上调 FSP1、vimentin 和 Rho, 下调 E-cadherin 等的表达, 诱导 EMT 的发生。EMT 的过程可以使细胞产生干细胞特性, 而干细胞被认为是导致化疗耐药及肿瘤复发转移的重要原因^[13-14]。既往的研究发现能够诱导肿瘤干细胞特性的产生^[15], 而且与乳腺癌患者 5-FU 耐药有关^[16], 但 snail 与蒽环类药物的关系未见报道。在本研究中, 我们分析的是接受蒽环类药物新辅助治疗的局部晚期乳腺癌中 snail 的表达水平, 研究发现 snail 低表达组与高表达组患者在年龄、激素受体状态方面无统计学差异, 但乳腺癌 snail 高表达比低表达患者的原发肿瘤大, 淋巴结转移多, 临床分期晚。Snail 高表达的患者新辅助化疗的获益率低, 无瘤生存率低, 总生存率低。Snail 预测含蒽环类药物的新辅助治疗效果及预后的作用可能与其诱导 EMT 和干性的产生有关。但其明确的临床预测价值需要大样本、随机的和多中心的临床研究证据进一步证实。

参考文献:

- [1] Untch M, Von Minckwitz G. Neoadjuvant chemotherapy: early response as a guide for further treatment: clinical, radiological, and biological[J]. J Natl Cancer Inst Monogr, 2011, 2011(43):138-141.
- [2] Kaufmann M, Von Minckwitz G, Smith R, et al. International expert panel on the use of primary (preoperative) systemic treatment of operable breast cancer: review and recommendations[J]. J Clin Oncol, 2003, 21(13): 2600-2608.
- [3] 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.
- [4] Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression[J]. Curr Opin Cell Biol, 2005, 17(5): 548-558.
- [5] Come C, Magnino F, Bibeau F, et al. Snail and slug play distinct roles during breast carcinoma progression[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(18): 5395-5402.
- [6] Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells[J]. Cell, 2008, 133(4): 704-715.
- [7] Saxena M, Stephens MA, Pathak H, et al. Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters[J]. Cell Death Dis, 2011, 2(7): e179-e191.
- [8] Haslehurst AM, Koti M, Dharsee M, et al. EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer[J]. BMC Cancer, 2012, 12(1): 91-101.
- [9] Stoyianni A, Goussia A, Pentheroudakis G, et al. Immunohistochemical study of the epithelial-mesenchymal transition phenotype in cancer of unknown primary: incidence, correlations and prognostic utility[J]. Anticancer Res, 2012, 32(4): 1273-1281.
- [10] Joensuu K, Hagstrom J, Leidenius M, et al. Bmi-1, c-myc, and Snail expression in primary breast cancers and their metastases: elevated Bmi-1 expression in late breast cancer relapses[J]. Virchows Arch, 2011, 459(1): 31-39.
- [11] 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): 2672-2685.
- [12] Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(8): 1275-1281.
- [13] Achuthan S, Santhoshkumar TR, Prabhakar J, et al. Drug-induced senescence generates chemoresistant stemlike cells with low reactive oxygen species[J]. J Biol Chem, 2011, 286(43): 37813-37829.
- [14] Prud'homme GJ. Cancer Stem Cells and Novel Targets for Antitumor Strategies[J]. Curr Pharm Des, 2012, 18(19): 2838-2849.
- [15] Zhu LF, Hu Y, Yang CC, et al. Snail overexpression induces an epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in SCC9 cells[J]. Lab Invest, 2012, 92(5): 744-752.
- [16] Zhang W, Feng M, Zheng G, et al. Chemoresistance to 5-fluorouracil induces epithelial-mesenchymal transition via up-regulation of Snail in MCF7 human breast cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 417(2): 679-685.

(编辑 孙慧兰)