

乳腺癌病人血清 HER-2/neu 检测及其临床意义

朱美琴, 滕小玉, 姜文奇, 刘冬耕, 张东生, 周宁宁

(华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心 内科, 广东 广州 510060)

摘要: 【目的】本研究分析晚期乳腺癌患者血清 HER-2/neu 的水平与预后的关系, 并探讨其临床意义。【方法】酶联免疫法(ELISA)检测 94 例晚期乳腺癌患者血清 HER-2/neu 的浓度, 分析血清与组织中 HER-2/neu 表达的相关性, 并分析其与患者预后的关系。【结果】94 例晚期乳腺癌患者就诊时的血清 HER-2/neu 浓度为 0.34~275.25 $\mu\text{g/L}$ (平均浓度为 23.69 $\mu\text{g/L}$)。血清 HER-2/neu 浓度的高低与化疗的有效性、疾病进展时间的长短无关。晚期乳腺癌患者的血清 HER-2/neu 浓度与肿瘤组织中 HER-2/neu 表达强阳性是一致的。【结论】血清 HER-2/neu 尚不能确立为独立的预后指标, 需要更多的病例进行分析。

关键词: 乳腺肿瘤; 血清 HER-2/neu; 酶联吸附法; 预后

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)06-0678-05

Detection of Serum HER-2/neu and Its Significance in Breast Cancer Patients

ZHU Mei-qin, TENG Xiao-yu, JIANG Wen-qi, LIU Dong-geng, ZHANG Dong-sheng, ZHOU Ning-ning

(State Key laboratory of Oncology in South China//Department of Medical Oncology, Cancer Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】 This study was to analyze the relationship between the serum HER-2/neu protein levels and prognosis in advanced breast cancer patients. 【Methods】 The serum HER-2/neu protein levels of 94 advanced breast cancer patients were detected using ELISA method. The relationship between the protein level and patient prognosis were analyzed retrospectively. Besides, the consistency of expression in serum and tissue was also analyzed. 【Results】 The concentrations of serum HER-2/neu were 0.34 $\mu\text{g/L}$ to 275.25 $\mu\text{g/L}$ (mean 23.69 $\mu\text{g/L}$). There was no correlation between serum HER-2/neu levels and time to progress (TTP). In addition, the level of serum HER-2/neu was concordance with strong expression of HER-2/neu in tumor tissue in advanced breast cancer. 【Conclusion】 The clinical utility of serum HER-2/neu as a prognostic indicator has not yet been established and needs more cases to evaluate.

Key words: breast neoplasm; serum HER-2/neu; enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA); prognosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(6):678-682]

乳腺癌已成为女性最常见的恶性肿瘤, 也是常见的女性肿瘤死亡原因^[1]。大约有 20%~30% 的乳腺癌患者 HER-2/neu 高表达, HER-2/neu 高表达与患者的不良预后密切相关^[2]。HER-2/neu 基因是人表皮生长因子家族的第 2 位成员。定位于染色体 17q21, 其编码一种分子量为 185 ku 的跨膜糖蛋白, 具有酪氨酸激酶活性, 结构上分为膜外配体结合域、跨膜区和膜内酪氨酸激酶的活性域^[3]。HER-2/neu 蛋白的胞外部分可以从细胞的表面脱

落至血液中, 形成分子量大约为 105 ku 的可溶性蛋白 HER-2ECD。这种可溶性蛋白可以用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定^[4]。我们用 ELISA 法检测了于 2003 年 3 月至 2006 年 4 月在中山大学肿瘤防治中心内科住院的初治复发乳腺癌患者共 94 例, 比较了晚期乳腺癌患者肿瘤组织和血清 HER-2/neu 水平的相关性, 研究了血清 HER-2/neu 水平对晚期乳腺癌患者化疗近期疗效和远期生存的预测价值。

收稿日期: 2007-06-30

基金项目: 广东省卫生厅科研基金(B2005054)

作者简介: 朱美琴(1981-), 女, 广东化州人, 硕士研究生, 现就职于深圳人民医院肿瘤科; 周宁宁, 通讯作者, 主治医师, 课题负责人, E-mail: zhounn@mail.sysu.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 研究对象

收集 2003 年 3 月至 2006 年 4 月在中山大学肿瘤防治中心内科住院经组织病理确诊的初治复发乳腺癌患者共 94 例, 患者的临床特征详见表 1。

采集治疗前患者的全静脉血 2 mL, 共 94 份, 置于干燥无抗凝试管中, 静置 15 min 后 3 000 r/min($r=10$ cm)离心 10 min, 取血清置于 EP 管, 于 -20 °C 冰箱中保存备用。

1.2 实验主要试剂与设备

1.2.1 主要试剂 96 孔可溶性人 SP- 185 ELISA

表 1 94 例患者的临床特征

Table 1 Clinical characteristics of 94 breast cancer patients with metastasis

Item	Cases	Percentage (%)
Total		
Age		
< 35 years	16	17.0
35 years	78	83.0
Menstrual status		
Postmenopausal	42	44.70
Premenopausal	52	55.30
Pathological subtype		
Invasive duct carcinoma	89	94.70
Invasive lobular carcinoma	2	2.12
Paget' disease and infiltrating	1	1.06
Papillary carcinoma	1	1.06
Medullary carcinoma	1	1.06
ER		
Positive	52	55.3
Negative	42	44.7
PR		
Positive	55	58.5
Negative	39	41.5
Occurrence of metastasis after operation		
< 24 months	50	53.2
24 months	44	46.8
Numbers of metastasis		
1	15	16.0
>1	79	84.0
Location of metastasis		
Bone/soft tissue only	28	29.8
Visceral metastasis	66	70.2

定量检测商品试剂盒, 购自深圳晶美生物公司(原装 Bender Medsystems 产品)。

1.2.2 实验步骤 首先采集患者静脉血 2 mL, 离心后分离上层血清, -20 °C 冰箱保存备用。将实验血清标本由 -20 °C 冰箱中取出, 室温让其自然解冻融化, 摇匀所有的检测试剂。1:20 稀释血清标本得检测样品(1:20 是推荐稀释比例, 预实验得出此稀释比例合理)。用冲洗缓冲液清洗孔板 2 次, 倾去缓冲液, 立即将平板反盖于吸水纸上, 吸去游离水分。加 100 μ L 检测缓冲液于双孔至所有的标准孔板中, 空余第一个孔板(10 μ g/L)。准备标准稀释液, 移取 200 μ L SP185-HER-2 标准液至孔 A1、A2, 双孔。移取 100 μ L 至孔 B1、B2, 分别混合 B1、B2 中的物质, 并将 100 μ L 移至 C1、C2。此步骤重复 4 次, 制造出 2 组 SP185 稀释液, 从 10^{-0.16} μ g/L。从最后一个孔板中, 丢弃 100 μ L 液体(G1、G2)。加 100 μ L 检测缓冲液至空白孔中, 双孔。加 100 μ L 的 1:20 稀释待测样品至指定的孔中, 双孔。加 50 μ L 稀释的 HRP-亲和素至所有的孔板中, 包括空白板。盖上塑料遮盖皮, 放于旋转器上以 100 r/min 速度旋转, 在室温中孵育 2 h。移走塑料遮盖皮, 倾去平板中的液体, 用冲洗缓冲液冲洗平板 3 次, 倾去缓冲液, 立即将平板反盖于吸水纸上, 吸去游离水分。移取 100 μ L 混合的 TMB 底物溶液到所有的孔中, 放于旋转器上以 100 r/min 速度旋转, 避光在室温中孵育 10 min。向每孔加入 100 μ L 的终止溶液终止反应, 并立即用 450 nm 波长读取每孔吸光度(A 值)。

以每孔读取的吸光光度值减去空白孔阴性对照平均吸光度值为每孔 A 值, 再以每个样品复孔的平均 A 值为每个样品的 A 值。根据标准品浓度与吸光度绘出标准曲线, 再根据标准曲线得出每个检测样品的浓度, 每个检测样品乘以稀释比例 20 即为待测标本的浓度。

1.2.3 结果判定 血清 SP-185 ELISA 定量检测商品试剂盒反应结束后, 经分光光度仪扫描, 读数高于 15 者为阳性, 低于 15 者为阴性(根据试剂盒说明)。

1.3 病例随访和疗效评价标准

在病案室随访每个病例的病历, 记录其年龄、性别、治疗方案、绝经情况、病理类型、激素受体情况、转移器官数目、有无内脏侵犯、中位生存期(从发现转移至死亡时间)、生存率及中位无疾病进展

时间(发现转移后进行治疗至疾病进展时间)等。所有患者在治疗前均有 CT 或 B 超检查等记录评价病灶,均有可评价病灶,血常规、肝肾功能和心电图检查均正常。疗效的评价按照 WHO(1981 年)制定的实体瘤客观疗效评定标准。

1.4 统计学方法

用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计学分析,相关性分析采用 χ^2 检验,生存分析采用寿命表法、单因素 Kaplan-Meier 法。以 $P < 0.05$ 定义为有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 HER-2/neu 浓度与肿瘤组织中 HER-2/neu 表达的关系

94 例晚期乳腺癌患者就诊时的血清 HER-2/neu 浓度为 0.34 ~275.25 $\mu\text{g/L}$ (平均浓度为 23.69 $\mu\text{g/L}$),以 15 $\mu\text{g/L}$ 为标准,将 94 例予姑息化疗的晚期乳腺癌患者划分为两组,其中 22 例患者血清 HER-2/neu 浓度 $>15 \mu\text{g/L}$, 占所有病例的 23.4%, 72 例血清 HER-2/neu 浓度 $\leq 15 \mu\text{g/L}$, 占所有病例的 76.6%。以免疫组化中+++ 代表阳性,其余为阴性,分析血清 HER-2/neu 浓度与组织中表达的关系。本研究结果显示,晚期乳腺癌患者的血清 HER-2/neu 浓度与肿瘤组织中 HER-2/neu 表达是一致的(表 2)。

表 2 晚期乳腺癌患者血清 HER-2/neu 水平与肿瘤组织 HER-2/neu 表达的关系

Table 2 The relationship between serum and tissue HER-2/neu of advanced breast cancer patients

Group	n(%)		χ^2	P
	High level group	Low level group		
Positive	15 (68.2)	13 (18.1)	20.245	0.000
Negative	7 (31.8)	59 (81.9)		

2.2 生存情况

全组 94 例晚期乳腺癌患者均获全程随访,中位随访期 18.5 个月(5~46 个月)。全组截止随访时间为 2007 年 3 月。全组生存 64 例,死亡 30 例,均死于肿瘤进展。中位无疾病进展时间为 8 个月(0~32 个月),中位生存期 18.5 个月(5~46 个月)。预计 1、2 年生存率分别为 81.9%、64.1%(图 1)。

以就诊时血清 HER-2/neu 是否 $>15 \mu\text{g/L}$ 分为两组,用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,就诊时

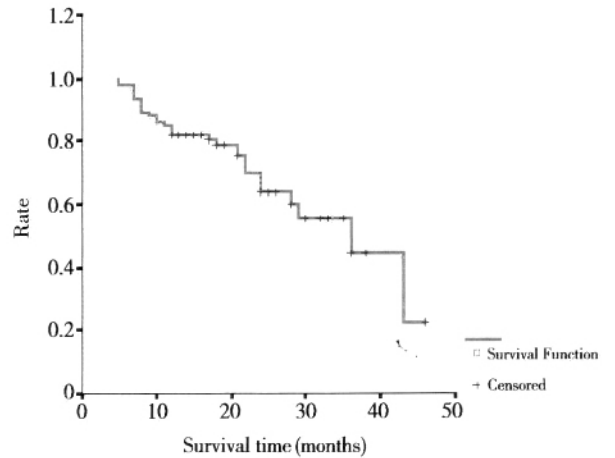


图 1 94 例晚期乳腺癌患者的生存曲线

Fig.1 Overall survival curve of 94 cases of advanced breast cancer patients

血清 HER-2/neu $>15 \mu\text{g/L}$ 组的中位生存期 17.5 个月,预计 1 年和 2 年生存率分别为 77.3%和 51.5%;就诊时血清 HER-2/neu $\leq 15 \mu\text{g/L}$ 组中位生存期 19 个月,预计 1 年和 2 年生存率分别为 83.3%和 67.7%。经 log-rank 检验分析,治疗前血清 HER-2/neu 升高组的 1 年和 2 年生存率和 HER-2/neu 正常组无明显差异 ($\chi^2=0.84, P=0.359$)。两组的生存曲线见图 2。

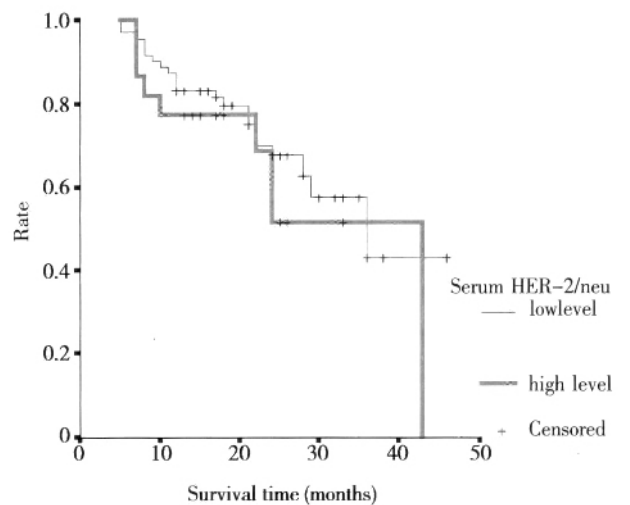


图 2 血清 HER-2/neu 正常组和升高组的生存曲线

Fig.2 Overall survival curve of the patients with different serum HER-2/neu concentrations

以就诊时血清 HER-2/neu 是否 $>15 \mu\text{g/L}$ 分为两组,用 Kaplan-Meier 法绘制 TTP(治疗至疾病进展时间)曲线,就诊时血清 HER-2/neu $>15 \mu\text{g/L}$ 组的中位 TTP6 个月(0~29 个月),血清 HER-2/

neu 15 $\mu\text{g/L}$ 组中位 TTP8 个月(0~32 个月)。血清 HER-2/neu 15 $\mu\text{g/L}$ 组中位 TTP 高于 HER-2/neu >15 ng/mL 组,但统计学上无差异($\chi^2=1.87$, $P=0.1714$)。两组的 TTP 曲线见图 3。

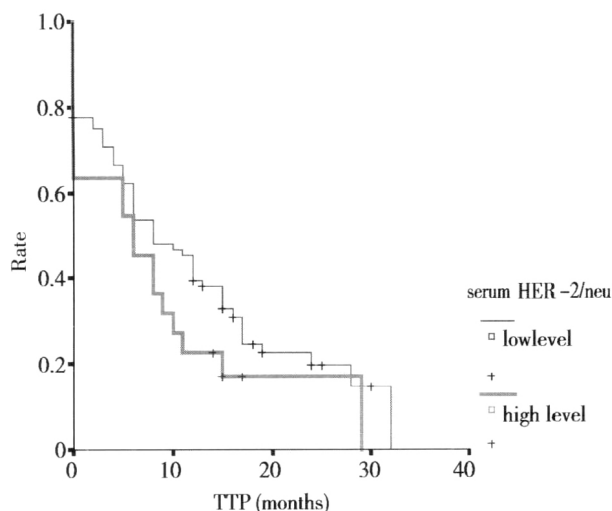


图3 血清 HER-2/neu 正常组和升高组的 TTP 曲线

Fig.3 TTP curve of the patients with different serum hER-2/neu concentrations

3 讨论

HER-2/neu 基因是人表皮生长因子家族的第 2 位成员,定位于染色体 17q21,包括信号肽、胞外区、胞浆区和跨膜区。HER-2/neu 的表达水平与肿瘤的发生、发展及预后有密切的关系^[2]。HER-2/neu 基因的过度扩增或 HER-2/neu 蛋白产物的过度表达与乳腺癌不良的预后相关。而随着目前在晚期转移性乳腺癌患者中对单克隆抗体 Herceptin 的使用,更需要精确地检测乳腺癌患者 HER-2/neu 的表达情况,以使更好地选择适合的治疗方法。

目前在临床上,通常使用免疫组化法检测 HER-2/neu 的蛋白表达,或是原位荧光杂交法检测 HER-2/neu 基因的扩增。但这两种方法都存在判断方法不够标准,与检测者的主观判断有关^[5]。而 HER-2/neu 的胞外段可用 ELISA 法在循环血清中测量,并且它在晚期转移性乳腺癌患者可能是升高的^[6]。血清 HER-2/neu 胞外段可能可以作为乳腺癌患者治疗的一个重要的依据,美国 FDA 已经批准血清 HER-2/neu 胞外段可以用于晚期转移性乳腺癌不同治疗方法的疗效监测^[7]。

有研究表明,正常人群血清中存在由细胞表面脱落的 ECD 片段,但水平较低;而在晚期转移

性乳腺癌患者中,有 30%~50%患者的高于正常水平^[8]。而在本实验中,94 例晚期乳腺癌患者中 22 例患者血清 HER-2/neu 浓度 >15 $\mu\text{g/L}$, 占有病例的 23.4%,处于 Krainer 等^[9]报道的 15%~30%之间,与 Molina 等^[10]报道的 28.4%也是接近的。在本研究中,我们用 ELISA 法检测患者血清中 C-erbB2 胞外段的浓度水平和 IHC 法检测乳腺癌患者肿瘤组织中 HER-2/neu 蛋白表达是一致的,也就是说,乳腺癌患者肿瘤组织中 HER-2/neu 高表达者(+++),其血清 HER-2/neu 胞外段的浓度可能也升高。这点和 Fornier 等^[11]的研究也是一致的。

在本实验中,我们并没有发现血清 HER-2/neu 浓度的高低与 TTP 的长短相关,这个结论跟之前某些学者的看法是不一致的,可能与选择的研究群体不同有关^[12,13]。在我们的研究中,我们是同时选用了 HER-2/neu 阳性及 HER-2/neu 阴性的患者作为研究对象,但其他学者仅选择了 HER-2/neu 过度表达的晚期转移性乳腺癌患者来研究^[12,13]。此外,本研究中,我们检测到血清 HER-2/neu 的平均浓度为 23.69 $\mu\text{g/L}$, Koestler 等^[13]和 Esteva 等^[12]报道的平均浓度分别为 45.1 和 41.9 $\mu\text{g/L}$ 。我们分析了肿瘤组织中 HER-2/neu 的表达对乳腺癌患者 TTP 的影响,结果仍无统计学意义。这一点与既往的研究^[14]是不一致的。因而,本实验中血清 HER-2/neu 浓度对 TTP 无影响亦有可能是病例选择的原因,需要进一步的研究。

综上所述,本研究通过对 94 例晚期转移性乳腺癌患者血清 HER-2/neu 浓度的测定和肿瘤组织中 HER-2/neu 表达情况的检测,发现两者之间有较好的一致性。但本试验得结果不支持以血清 HER-2/neu 浓度作为晚期转移性乳腺癌患者独立的预后指标。因此仍需加大样本量进一步的研究。

参考文献:

- [1] JEMAL A, SEGEL R, WARD E, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2007, 57(1):43-66.
- [2] SLAMON D J, CLARK G M, WONG S G, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene [J]. Science, 1987, 235(4785): 177-182.
- [3] HARARI D, YARDEN Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer [J]. Oncogene, 2000, 19(53): 6102-6114.

- [4] ZABRECKY J R, LAM T, MCKENZIE S J, et al. The extracellular domain of p185/c-erbB-2 is released from the surface of human breast carcinoma cells, SK-BR-3 [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(3):1716-1720.
- [5] FORNIER M, RISIO M, VAN POZNAK C, et al. HER2 testing and correlation with efficacy of trastuzumab therapy [J]. *Oncology (Huntingt)*, 2002, 16(10):1340-1352.
- [6] ISOLA J J, HOLLI K, OKSA H, et al. Elevated erbB-2 oncoprotein levels in preoperative and follow-up serum samples define an aggressive disease course in patients with breast cancer [J]. *Cancer*, 1994, 73(3): 652-658.
- [7] COOK G B, NEAMAN I E, GOLDBLATT J L, et al. Clinical utility of serum HER-2/neu testing on the Bayer Immuno 1 automated system in breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 2001,21(2B):1465-1470.
- [8] WATANABE N, MIYAMOTO M, TOKUDA Y, et al. Serum c-erbB-2 in breast cancer patients [J]. *Acta Oncol*, 1994, 33(8):901-904.
- [9] QUARANTA M, DANIELE A, COVIELLO M, et al. C-erbB-2 protein level in tissue and sera of breast cancer patients: a possibly useful clinical correlation [J]. *Tumori*, 2006, 92(4):311-317.
- [10] MOLINA R, JO J, FILELLA X, et al. C-erbB-2 CEA and Ca 15.3 serum levels in the early diagnosis recurrence of breast cancer patients [J]. *Anticancer Res*, 1999, 19(4A):2551-2555.
- [11] FORNIER1 M N, SEIDMAN1 A D, SCHWARTZ2 M K, et al. Serum HER2 extracellular domain in metastatic breast cancer patients treated with weekly trastuzumab and paclitaxel: association with HER2 status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and with response rate [J]. *Ann Oncol*, 2005, 16(2):234-239.
- [12] SATO N, SANO M, TABELI T, et al. Combination docetaxel and trastuzumab treatment for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer: a multicenter, phase-study. [J]. *Breast Cancer*, 2006, 13(2):166-171.
- [13] KOESTLER W J, SCHWAB B, SINGER C F, et al. Monitoring of serum Her-2/neu predicts response and progression-free survival to trastuzumab-based treatment in patients with metastatic breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(5):1618-1624.
- [14] HER-2 (c-erbB-2) test update: present status and problems [J]. *Breast Cancer*, 2006, 13(3):236-248.

(编辑 张恩健)

(上接第 677 页 from page 677)

- with endometrial stromal cell proliferation and leptin gene up-regulation [J]. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8(5): 456-464.
- [6] MANTZOROS C S, MOSCHOS S, AVRAMOPOULOS I, et al. Leptin concentrations in relation to body mass index and the tumor necrosis factor- α system in humans [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82(10):3408-3413.
- [7] 王宁宁, 庄广伦, 黄建昭, 等. 卵巢子宫内膜异位症微血管密度及血管内皮生长因子表达 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25(3):264-267.
- [8] 徐红, 曲军英, 钟山, 等. 血管内皮生长因子在子宫内膜异位症中作用 [J]. *广西医科大学学报*, 2005, 22(3):339-341.
- [9] MCLAREN J, PRENTICE A, CHARNOCK-JONES D S, et al. Vascular endothelial growth factors is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids [J]. *J Clin Invest*, 1996, 98(2):482-489.
- [10] SUGANAMI E, TAKAGI H, OHASHI H, et al. Leptin stimulates ischemia-induced retinal neovascularization: possible role of vascular endothelial growth factor expressed in retinal endothelial cells [J]. *Diabetes*, 2004, 53(9):2443-2448.
- [11] KITADE M, YOSHIJI H, KOJIMA H, et al. Leptin-mediated neovascularization is a prerequisite for progression of nonalcoholic steatohepatitis in rats [J]. *Hepatology*, 2006, 44(4):983-991.
- [12] GONZALEZ R R, CHERFILS S, ESCOBAR M, et al. Leptin signaling promotes the growth of mammary tumors and increases the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor type two (VEGF-R2) [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(36): 26320-26328.
- [13] 程宝春, 万经海, 冯春国, 等. OPN 和 VEGF 在脑胶质瘤中的表达及其与预后的关系 [J]. *中华神经医学杂志*, 2006, 5(1): 22-26.

(编辑 徐杰)