DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.23.015
第25卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 23
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)23-2097-04

论著

乳腺癌中细胞增殖标记物PCNA及MIB1(Ki-67)的表达与预后

邓 军,柳凤轩,刘友生,闫晓初,刘丽梅 (第三军医大学附属西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨细胞增殖标记物(PCNA、ki-67)在乳腺癌中的表达及与乳腺癌预后的关系。方法 应用免疫组织化学法EnVision法染色,检测112例乳腺癌原发灶PCNA(单克隆抗体PC10)的表达,计数MIB1标记指数(MIB1 Labelling index, MIB1 LI),同时根据腺管形成、核的多形性及核分裂像数确定的分级标准、舟山会议推荐方案和TNM国际分期标准,对112例乳腺癌进行组织学分类、分型、分级和分期,收集临床资料并进行随访。结果 112例中肿瘤直径超过2 cm的患者、临床分期为Ⅲ~Ⅳ期的患者、腋窝淋巴结有转移的患者和腋窝淋巴结受累个数4个以上的乳腺癌患者的MIB1 LI、PCNA高表达的比率均分别显著高于肿瘤直径不足2 cm的患者、临床分期为Ⅰ~Ⅱ期的患者、腋窝淋巴结无转移的患者和腋窝淋巴结受累个数少于3个(含3个)的乳腺癌患者($P<0.05$),而前者的10年累积生存率均分别低于后者;患者年龄和月经状况与MIB1 LI、PCNA表达强度及10年累积生存率无显著性差异($P>0.05$)。结论 MIB1 LI、PCNA表达强度与乳腺癌肿瘤直径、临床分期、腋窝淋巴结状况及腋窝淋巴结受累个数显著影响MIB1 LI、PCNA的表达强度,是判定乳腺癌预后的可靠和重要的指标之一。

关键词:乳腺肿瘤;组织学;预后;增殖细胞核抗原
中图法分类号:R394.2;R737.9 文献标识码:A

Relationship between expressions of cell proliferation markers (PCNA and Ki-67) and prognosis in breast carcinoma

DENG Jun, LIU Feng-xuan, LIU You-sheng, YAN Xiao-chu, LIU Li-mei (Research Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between the expressions of cell proliferation markers (PCNA and Ki-67) and prognosis of breast carcinoma. Methods The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (monoclonal antibody PC10) in 112 cases of primary breast carcinoma was detected by immunohistochemical method (EnVision staining). MIB1 labelling index (MIB1 LI) in the breast carcinoma was detected. Histological classification, typing, grading and staging of 112 cases of breast carcinoma were conducted on the basis of the reported diagnostic criteria. The clinical data were collected and a follow-up was conducted. Results Expressions of MIB1 LI and PCNA in patients with tumor larger than 2 cm in size, at Ⅲ—Ⅳ, with metastasis in axillary lymph nodes, or with more than four axillary lymph nodes involved were significantly higher than those in patients with tumor less than 2 cm in size, at Ⅰ—Ⅱ, without metastasis in axillary lymph nodes, or with no more than 3 axillary lymph nodes involved ($P<0.05$). The cumulative 10-year survival rate of the former was lower than that of the latter. Ages and menstrual conditions were not significantly related with expression levels of MIB1 LI and PCNA and cumulative 10-year survival rate ($P>0.05$). Conclusion Expression intensity of MIB1 LI and PCNA, closely associated with many clinical and pathological factors, may be the reliable and important factor for judging the prognosis of breast carcinoma.

Key words: breast carcinoma; histology; prognosis; proliferating cell nuclear antigen

乳腺癌是妇女最常见的恶性肿瘤,其预后与诸多临床病理因素有关。目前,关于细胞增殖标记物PCNA-PC10、MIB1(Ki-67)与乳腺癌预后关系的分析有少量的文献报道[1,2]。为进一步探讨PCNA、MIB1与乳腺癌预后的关系,本研究对我院112例有完整随访资料的乳腺癌作PCNA-PC10、MIB1检测,同时结合患者的年龄、月经状况、乳腺癌的大小、临床分期、组织学类型、分级、腋窝淋巴结状况等临床病理因素,对患者的预后进行比较分析。

1 材料和方法

1.1 病例资料

收集1989—1998年本院外科手术切除的标本,经病理确诊

作者简介:邓 军(1975—),男,四川省安岳县人,硕士研究生,医师,主要从事乳腺肿瘤病因、发病学及预后方面的研究。电话:(023)65461827

收稿日期:2002-11-13;修回日期:2003-02-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

并有完整随访资料的乳腺癌112例中除2例为男性患者以外，其余均为女性，年龄27～83岁，高峰期为40～46岁组，平均年龄45.1岁。肿块直径最小为1.0 cm，最大者为11.0 cm，平均直径为4.1 cm。组织用10%的中性缓冲福尔马林固定、常规脱水及石蜡包埋。石蜡切片3 μm厚，常规HE染色进行病理形态学研究及免疫组织化学分析。

1.2 乳腺癌组织学分类、分级标准

112例乳腺癌由一名有经验的病理医师在不知随访结果的前提下阅片。参照文献[3]推荐方案，将乳腺癌分为非浸润性癌、早期浸润性癌、浸润性普通型癌和浸润性特殊型癌四大类。乳腺癌的组织学分级依照腺管形成、核的多形性及核分裂像多少分为Ⅰ级(低度恶性)、Ⅱ级(中度恶性)、Ⅲ级(高度恶性)。术后病理证实有淋巴结转移的45例(40.2%)。按TNM国际分期标准，112例中Ⅰ期15例(13.4%)，Ⅱ期33例(29.5%)，Ⅲ期37例(33.0%)，Ⅳ期27例(24.1%)。

1.3 免疫组织化学染色

PCNA和Ki-67检测均采用EnVision法，试剂用单抗PC10(MAB-0145)和MIB1(MAB-0129)，与二抗均为福州迈新公司产品。一抗工作浓度分别为1∶150和1∶50。4 ℃过夜，DAB显色。

1.4 免疫组织化学染色判断方法

肿瘤细胞PCNA、MIB1阳性定位于细胞核上，呈弥漫或颗粒状深浅不等的棕褐色，细胞浆无着色，见图1、2。PCNA和MIB1检测均采用半定量、双盲法阅片(先后两次阅片，无随访资料参考)。MIB1计算其标记指数(MIB1 Labelling index，MIB1 LI)，PCNA记算其阳性细胞所占的百分比。在计算时，由于同一切片内阳性细胞分布疏密不均，为避免计数范围小引起的偏差，对每张切片计数5个高倍视野(High Power Field，HPF)内阳性细胞占所有增生或肿瘤细胞的百分比(每张切片计数细胞总数在1 000个以上)作为MIB1 LI和PCNA阳性细胞所占的百分比。结果将PCNA表达分为高、低两组，高表达：切片内阳性细胞占肿瘤细胞的比例在51%以上者；低表达：阳性细胞占肿瘤细胞的50%以下者。

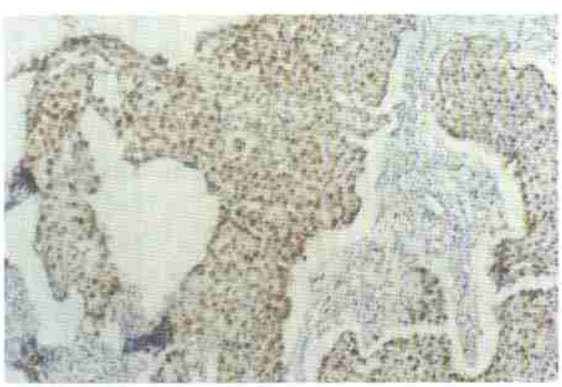


图1 PCNA阳性定位于细胞核，呈弥漫或颗粒状深浅不等的棕褐色，细胞浆无着色 (EnVision×100)

Fig 1 Positive expression of PCNA is located in nucleus appearing as brown-coloured granules or widespread, but no expression in cytoplasm (EnVision×100)



图2 Ki-67阳性亦定位于细胞核上，呈弥漫或颗粒状深浅不等的棕褐色，细胞浆无着色 (EnVision×100)

Fig 2 Positive expression of Ki-67 is also located in nucleus appearing as brown coloured granules or widespread, but no expression in cytoplasm (EnVision×100)

1.5 统计学处理

应用医学统计软件SPMR和SPSS进行数据处理，分别采用χ^2检验、t检验、方差分析和Kaplan-mier生存曲线分析。

2 结果

2.1 PCNA-PC10免疫组化检测结果

按上述标准，112例乳腺癌PCNA-PC10免疫组化检测结果见表1。其中高表达36例，占32.1%。高表达组10年累积生存率35.7%，显著低于低表达组($\chi^2=6.10$，$P<0.05$)。

表1 112例乳腺癌PCNA表达与患者10年生存的关系

Tab 1 Relation of PCNA expression with 10-year survival rate in 112 cases of breast carcinoma

	n	Cumulative death for 10 years	Cumulative survival rate for 10 years(%)
Low expression	76	9	63.9 *
High expression	36	15	35.7

*: $P<0.05$ *vs* high expression

2.2 MIB1、PCNA的表达与临床病理多指标及预后的关系

乳腺癌原发灶中MIB1、PCNA的表达与患者年龄、月经状况、肿瘤大小等临床病理相关因素及预后的关系见表2。112例乳腺癌原发灶中MIB1 LI最低为1.54，最高为35.87，平均(15.36±8.12)。MIB1、PCNA的表达在肿瘤大小、临床分期、腋窝淋巴结状态等因素的各个分组间的差异均有显著性意义($P<0.05$)，并与患者的预后密切相关。而且结果还显示：在已有腋窝淋巴结转移的45例乳腺癌中，4枚以上淋巴结转移组的MIB1 LI显著高于仅有1～3枚淋巴结转移组($P<0.05$)。而患者年龄、月经状况与MIB1、PCNA的表达及预后无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 乳腺癌MIB1 LI与PCNA表达的关系

112例乳腺癌原发灶中MIB1 LI与PCNA表达的关系见表3。随着MIB1标记指数增高，PCNA表达强度逐渐增强。其中在76例PCNA低表达的病例中，MIB1 LI最大值为23，而36例高表达的病例中，MIB1 LI的最小值为4.8。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　112 例乳腺癌 MIB1、PCNA-PC10 的表达与临床病理多指标及预后的关系

Tab 2　Relation of MIB1 and PCNA-PC10 expression with prognosis and clinicopathological factors in 112 cases of breast carcinoma

Clinicopathological factor	*n*	MIB1	PCNA	Case of death	Cumulative survival rate for 10 years(%)
		MIB1 LI	PHE△(High exp/Sum)		
Age(years)					
≤35	28	15.03±7.40	28.57(8/28)	7	43.2
35~50	50	14.42±4.56	28.00(14/50)	6	50.5
>50	34	15.17±6.89	41.18(14/34)	11	34.4
Menses status					
Menopause	50	13.86±5.21	32.00(16/50)	9	58.3
Unmenopause	62	13.45±4.15	32.26(20/62)	15	44.7
Size(dia, cm)					
≤2	24	14.16±9.15	12.50(3/24)	1	96.1
>2	88	17.37±10.04	37.50(33/88)	23	45.2
Stage					
Ⅰ Ⅱ	48	14.27±7.62	18.75(9/48)	4	78.5
Ⅲ Ⅳ	64	17.24±9.23	42.19(27/64)	20	33.8
Histological type					
Non-infiltrating carcinoma & early infiltrating carcinoma	14	13.10±4.72+	7.14(1/14)	0	100
Common type of infiltrating carcinoma	70	17.15±10.38	34.29(24/70)*	21	35.2
Special type of infiltrating carcinoma	28	16.76±7.39	39.29(11/28)*	3	89.3
Histological grade					
Ⅰ	22	14.79±5.74+	18.19(4/22)	0	
Ⅱ	53	15.87±9.04	32.08(17/53)	7	46.2
Ⅲ	37	16.32±4.32	40.54(15/37)	17	25.9
Axillary lymph node(piece)					
Non-metastasis	67	13.90±4.77	23.88(16/67)	6	80.9
Metastasis	45	17.12±5.07	44.44(20/45)	18	31.0
1—3 pieces	24	15.78±4.45	29.17(7/24)	6	43.6
≥4 pieces	21	17.29±7.16	61.90(13/21)	12	20.4

△: PHE: Percentage of high expression; +: $P<0.01$ *vs* common type of infiltrating carcinoma, grade Ⅲ; *: $P<0.05$ *vs* non-infiltrating carcinoma & early infiltrating carcinoma

表 3　112 例乳腺癌 MIB1 LI 与 PCNA 表达的关系

Tab 3　Relation of MIB1 LI with PCNA expression in 112 cases of breast carcinoma

PCNA	Low expression(n)	High expression(n)
	76	36
MIB1 LI	9.96±4.25	21.85±6.68

3　讨论

增殖细胞核抗原(PCNA)是真核细胞 DNA 合成所必需的一种 36×10^3 核蛋白, 它在 G_1 期 PCNA 的表达逐渐增加, S 期达最高峰, 而 G_2/M 期则减少。PCNA 的表达可能是 DNA 多倍体形式表达的一个标记, 也成为肿瘤细胞失调状态下的一个标记, 检测 PCNA 可以客观评价肿瘤细胞增殖状态。Ki-67 是由 Gerdes 等于 1983 年发现的位于核内的大分子蛋白, 它存在于除 G_0 期以外的细胞周期的各个阶段。由于它能反映全部细胞的增殖活性, 因而广泛用于肿瘤及非肿瘤疾病的增殖细胞动力学研究。MIB1 是 1993 年 Key 等[4]制备出的针对 Ki-67 抗原决定族的单克隆抗体, 可用于常规石蜡切片, 从而弥补了 Ki-67 抗体只能在冰冻切片中获得满意结果的不足。研究显示, PCNA 的表达情况及 MIB1 LI 对判断和预测乳腺癌的预后和早期复发均有一定帮助[1,2,5]。本研究选取 112 例有完整临床病理资料和随访结果的乳腺癌, 检测其原发灶组织中 PCNA-PC10 的表达及 MIB1 LI, 以探讨乳腺癌癌细胞的增殖活性与患者年龄、月经状况、肿瘤大小、临床分期、组织学类型、分级、腋窝淋巴结转移状况的关系及其对患者预后的影响。

3.1　PCNA 表达与乳腺癌预后关系

PCNA 的高表达意味着瘤细胞的增殖能力强, 从而影响患者的健康生存[1,2]。本组 112 例乳腺癌中, PCNA 高表达的患者其 10 年累积生存率显著低于低表达的患者, 这反映出前者的瘤细胞增殖活性比后者强, 更易从多个方面引起肿瘤的演进和向周围及远处侵犯、转移, 从而减少患者的健康生存时间。由此可见, PCNA 是判定乳腺癌患者预后的指标之一。

3.2　MIB1 LI、PCNA 的表达与肿瘤大小及预后的关系

乳腺癌原发肿瘤直径的大小与肿瘤的转移率和病人的生存率密切相关。尽管早期有人对此表示怀疑, 但事实证明这是一种简单快速和经济的判定指标, 是

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

确定腋窝淋巴结阴性病人复发率和扩散率的重要预测指标之一[6]。也有学者提出,当肿瘤具有原位及浸润两种成分时,浸润部的大小比肿瘤总体积的大小更有意义[7]。在本组研究中,我们以原发肿瘤直径2 cm为界,将112例乳腺癌分为两组,结果发现,肿瘤直径越大,PCNA-PC10的表达强度和MIB1 LI越高,即瘤细胞增殖越旺盛,而其10年累积生存率则越低。这从另外一个方面反应出原发肿瘤大小与肿瘤细胞的增殖密切相关,从而直接影响病人的预后[8]。

3.3 MIB1 LI、PCNA的表达与乳腺癌TNM分期及预后的关系

肿瘤的TNM分期是评价患者预后的非常重要的临床因素。在本研究中,由于病例数少,故将乳腺癌TNM分期中的Ⅰ期和Ⅱ期、Ⅲ期和Ⅳ期合并,分为两组进行研究,结果显示Ⅲ期和Ⅳ期的MIB1 LI和PCNA的表达强度均显著高于Ⅰ、Ⅱ期,而10年累积生存率却显著低于后者,统计学差异均具有非常显著性意义($P<0.01$)。由此可见,乳腺癌TNM分期能准确地反应瘤细胞的增殖状态,因而被认为是影响患者预后的非常重要的独立性预测指标。

3.4 MIB1 LI、PCNA的表达与腋窝淋巴结状态及预后的关系

腋窝淋巴结转移是历来被认为是决定乳腺癌预后的最重要指标之一。本组112例乳腺癌中有腋窝淋巴结转移45例,其MIB1 LI和PCNA的表达强度高于无腋窝淋巴结转移组,10年累积生存率低于无腋窝淋巴结转移组,经统计学分析,其差异均有显著性意义($P<0.01$、$P<0.05$和$P<0.05$)。因此,我们认为,乳腺癌MIB1 LI高、PCNA的表达强度强,说明肿瘤细胞的增殖活性强,更易发生侵袭和转移,因而预后更差,这与文献[8~10]报道相一致。不仅腋窝淋巴结转移与乳腺癌预后密切相关,而且受累淋巴结数目也决定着乳腺癌患者的生存率有所不同。本组45例有腋窝淋巴结转移的病例中,受累淋巴结4个以上的21例,其MIB1 LI和PCNA的表达强度高于受累淋巴结少于3个(含3个)组,10年累积生存率低于后者,其差异均有非常显著性意义,说明乳腺癌细胞核增殖能力越强,其侵袭和转移能力也越强,因而受累的淋巴结数目越多。

有作者认为,35岁以下和50岁以上的乳腺癌患者预后较差,但我们的结果显示,患者的发病年龄并不影响肿瘤细胞的增殖,因而对患者的预后也无影响。虽然绝经与否可能影响雌、孕激素受体的表达,但对肿瘤细胞的增殖及患者的预后毫无影响。乳腺癌的组织学类型及组织学级别是患者预后的重要影响因素,本研究显示,原位和早期浸润性乳腺癌的增殖活性最低,而预后却最好;此外,随着组织学级别的升高,肿瘤细胞的增殖活性亦升高,而预后也越差。这与以往研究结果相一致[9]。

Ki-67和PCNA同是细胞增殖的标记物。本研究的结果显示,MIB1 LI随着PCNA表达增强而逐渐升高,均能比较客观地反映出细胞的增殖状态。同时,通过对乳腺癌原发病灶中Ki-67和PCNA表达的研究,我们发现,虽然总体上二者的表达是一致的,但在少数PCNA低表达的病例中出现了Ki-67高表达、在PCNA高表达的病例中出现了Ki-67低表达的现象,由此可见,同时检测Ki-67和PCNA的表达能够有效地避免假阳性和假阴性结果,使检测结果更科学、更可信。

总之,MIB1 LI和PCNA表达强度的高低能反应乳腺增生性病变的增殖活性的高低,因而能帮助鉴别乳腺良恶性病变,并能进一步判定乳腺癌的侵袭和转移能力,从而判定乳腺癌的预后;同时,二者的联合检测能降低假阳性和假阴性的出现。因此,MIB1 LI和PCNA是预测乳腺癌预后的两个有用的指标。

参考文献:

[1] Magno W B, Hirschfield L, Bhuyia T, *et al*. Correlation of proliferative index PCNA reactivity and Ki-67 reactivity in primary breast carcinoma with hormone status, lymph node status and disease-free survival[J]. Conn Med, 1992, 56(12): 667—669.

[2] Tahan S R, Neuberg D S, Dieffenbach A, *et al*. Prediction of early relapse and shortened survival in patients with breast cancer by proliferation cell nuclear antigen score[J]. Cancer, 1993, 71(11): 3552—3559.

[3] 刘彤华, 廖松林, 阚 秀, 等. 乳腺增生症及乳腺癌组织学分类(推荐方案)[J]. 中华病理学杂志, 1997, 26(6): 325—326.

[4] Key G, Becker M H, Baron B, *et al*. New Ki67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the ki67 epitope[J]. Lab Invest, 1993, 68(6): 629—636.

[5] Uporov A, Semiglazov V, Pozharisskii K M. Immunohistochemical study of breast neoplasms cells using different markers of proliferation[J]. Arkh Patol, 2000, 62(2): 26—30.

[6] Quiet C A, Ferguson D J, Weichselbaum R R, *et al*. Natural history of node-negative breast cancer: a study of 826 patients with long-term follow-up[J]. J Clin Oncol, 1995, 13(5): 1144—1151.

[7] Seidman H, Schnaper L A, Aisner S C. Relationship of the size of the invasive component of the primary breast carcinoma to axillary lymph node metastasis[J]. Cancer, 1995, 75(1): 65—71.

[8] Gonzalez V, Garijo M, Fernandez F, *et al*. MIB1 proliferation index in breast infiltrating carcinoma: comparison with other proliferative markers and association with new biological prognostic factors[J]. Histol Histopathol, 2001, 16(2): 399—406.

[9] 邓 军, 柳凤轩, 闫晓初, 等. 112例乳腺癌组织学类型、分级与预后[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(11): 1361—1363.

[10] Pena L I, Nieto A D, Perez A L, *et al*. Immunohistochemical detection of ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables[J]. J Vet Diagn Invest, 1998, 10(3): 237—246.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net