· 论 著 ·

PIK3CA 基因突变状态在乳腺癌不同临床病理特征中的研究

邓粤敏¹, 徐楹健^{2△}

(1. 广州医科大学附属肿瘤医院检验科, 广州 510095; 2. 广州医科大学附属第一医院检验科, 广州 510120)

摘要:目的 检测乳腺癌组织磷脂酰肌醇-3-激酶催化亚单位 α (PIK3CA) 基因突变状态, 并分析突变与临床病理特征的关系。方法 选取 176 例原发性乳腺癌患者石蜡组织标本, 提取组织 DNA, 对外显子 9 及 20 进行探针扩增阻滞突变系统聚合酶链反应 (ARMS-PCR) 扩增, 检测 PIK3CA 基因的突变状态, 另取 20 例乳腺腺病组织标本作为阴性对照。结果 176 例乳腺癌组织中发现突变 45 例, 突变率 25.6%, 其中以 20 号外显子 H1047R 突变率为主, 突变率 26.7% (12/45); PIK3CA 基因突变在 ER 阳性和阴性、PR 阳性和阴性患者中差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但在 HER2 阳性和阴性患者中差异无统计学意义 ($P > 0.05$); PIK3CA 基因突变与乳腺癌患者肿瘤大小、年龄、淋巴结状态之间无明显相关性, 但与组织学分级有相关性。结论 PIK3CA 基因突变与乳腺癌激素受体表达和肿瘤进展相关, PIK3CA 基因突变检测对指导临床制订个体化治疗有重要意义。

关键词: 乳腺癌; PIK3CA 基因; 突变

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.15.022

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)15-2110-02

Study of PIK3CA gene mutation status in different clinicopathological characteristics of breast cancer

DENG Yuemin¹, XU Yunjian^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Tumor Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510095, China; 2. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: Objective To detect the mutation status of PIK3CA genes in breast cancer and to analyze its relation with clinicopathological characteristics. Methods The paraffin tissue samples in 176 cases of breast cancer were selected and the tissue DNA was extracted, exon9 and exon20 were amplified by ARMS-PCR. The mutation status of PIK3CA genes were detected, other tissue samples in 20 cases of mammary gland disease were taken as the negative control. Results Among 176 samples of breast cancer tissues, 45 cases of mutation were found with the mutation rate of 25.6%, which was dominated by H1047R mutation rate of exon20 with the mutation rate of 26.7% (12/45); There were statistical difference between ER(+) and ER(-) and between PR(+) and PR(-), but no statistical difference was found between HER(+) and HER(-); PIK3CA gene mutation had correlation with cancer histological grade, but no obvious correlation with tumor size, age and lymph node status. Conclusion PIK3CA gene mutation is correlated with breast cancer hormone receptor (HR) expression and tumor progression; the PIK3CA gene mutation detection has an important significance for guiding the formulation of clinical individualized treatment.

Key words: breast cancer; PIK3CA; mutation

乳腺癌是严重威胁女性健康的常见恶性肿瘤, 其发病率逐年上升, 并趋于年轻化, 目前已成为女性发病第一的恶性肿瘤, 约占女性恶性肿瘤的 16%^[1]。乳腺癌肿瘤组织的雌激素受体 (ER)、孕激素受体 (PR) 和表皮生长因子受体-2 (HER2) 的表达对乳腺癌预后的判断及治疗方案的选择具有重要的指导意义。乳腺癌发生和发展的分子机制主要为癌基因激活和抑癌基因失活导致细胞异常增殖。磷脂酰肌醇-3-激酶催化亚单位 α (PIK3CA) 基因突变通过 PIK3/AKT 信号通路与乳腺癌的发生相关^[2]。本研究通过对乳腺癌组织中的 PIK3CA 基因外显子 9 和 20 两个突变区检测, 探讨 PIK3CA 基因突变和乳腺癌分子病理及临床特征的联系, 为本地区乳腺癌患者的个体化诊疗提供新思路, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2014~2015 年广州医科大学附属肿瘤医院和广州医科大学附属第一医院收集的原发性乳腺癌组织 176 例。患者入选标准: (1) 所有病例均经病理科确诊均为乳腺癌并用免疫组织化学方法分型; (2) 确保所获得的标本能满足检测需要; (3) 取材均符合伦理要求。年龄 36~65 岁, 平均 (50.2±9.80) 岁。另收集乳腺腺病 20 例标本作对照。

1.2 主要试剂和仪器 人类 PIK3CA 基因突变检测试剂盒

(荧光 PCR 法) 和石蜡包埋组织 DNA 提取试剂盒均购自厦门艾德生物医药科技有限公司; 微量紫外分光光度计购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; CFX96 荧光定量 PCR 仪购自美国 BIO-RAD 公司。

1.3 方法

1.3.1 组织学评价 常规对乳腺癌术后病理组织进行免疫组织化学检测, 测定 ER、PR 和 HER2 水平。ER 及 PR 阳性定义: $\geq 1\%$ 肿瘤细胞核内表达激素受体标记阳性。HER2 呈 (++) 时为阳性; $> 10\%$ 的肿瘤细胞呈现强而完整的细胞膜染色; (-)/(+) 判为阴性; (++) 表示 $> 10\%$ 的肿瘤细胞呈现不完整和 (或) 弱至中等程度的细胞膜染色, 应该用免疫组织化学做进一步检测或选取不同的组织块重新检测^[3]。ER、PR 和 HER2 均表达缺失的乳腺癌为三阴性乳腺癌。

1.3.2 组织学分级 从以下 3 个方面进行评估: (1) 腺管形成, 有多数明显腺管为 1 分, 有中度分化腺管为 2 分, 细胞呈实性片块或条索状生长为 3 分。 (2) 细胞核大小、形状及染色质不规则, 细胞核大小、形状及染色质一致为 1 分, 细胞核中度不规则为 2 分, 细胞核明显多形性为 3 分。 (3) 染色质增多及核分裂象 ($\times 400$), 1/10HPF 为 1 分, 2~3/10HPF 为 2 分, $> 3/10HPF$ 为 3 分。各标准的 3 项指标所确定的分数相加, 3~5

分为 I 级(分化好),6~7 分为 II 级(中等分化),8~9 分为 III 级(分化差)。

1.3.3 石蜡切片样品病理评估 抽取用于检测的连续切取石蜡切片一张,HE 染色。低倍镜下评估全片肿瘤组织的分布情况,如存在明显的无肿瘤区域,蜡笔划出,在所有待检测石蜡切片上剔除该部分。高倍镜下选择切片上、下、左、右、中 5 个视野,每个视野连续计数细胞 30 个,合并 5 个视野的计数结果,计算平均肿瘤细胞含量作为送检样品的肿瘤细胞含量。

1.3.4 DNA 提取及 ARMS-PCR 反应 采用手工-柱提取法,严格按照艾德石蜡包埋组织 DNA 提取试剂盒的说明进行操作。组织 DNA 调整浓度到 3.0 ng/ μ L 加样,严格按照艾德人类 PIK3CA 基因突变检测试剂盒的说明进行。PCR 反应参数如下:95 $^{\circ}$ C 5 min,1 个循环;95 $^{\circ}$ C 25 s,64 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,15 个循环;93 $^{\circ}$ C 25 s,60 $^{\circ}$ C 35 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,31 个循环。在第三阶段 60 $^{\circ}$ C 收集信号。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据分析。分析 PIK3CA 基因突变的状态与乳腺癌分子亚型、临床病理特征关系用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PIK3CA 基因突变检测结果 176 例乳腺癌组织中,PIK3CA 基因突变 45 例,突变率 25.6%,其中 E542K 突变 10 例(22.2%),E545D 突变 5 例(11.1%),E545K 突变 9 例(20.0%),H1047R 突变 12 例(26.7%),H1047L 突变 3 例(6.7%)。E542K、E545K、E545D 均位于外显子 9,编码螺旋区;H1047R、H1047L 位于外显子 20,编码激酶区。在对照组 20 例良性病中均没发现 PIK3CA 基因突变。

2.2 PIK3CA 基因突变在乳腺癌不同肿瘤特征中的分布 PIK3CA 基因突变在乳腺癌分子亚型中:ER 阳性型 37 例(30.6%),PR 阳性型 35 例(31.0%),HER2 过表达型 8 例(27.6%),三阴性乳腺癌 3 例(8.6%)。PIK3CA 基因突变在 ER 阳性和阴性、PR 阳性和阴性患者中差异有统计学意义($P < 0.05$),但在 HER2 阳性和阴性患者中差异无统计学意义($P > 0.05$);三阴组的 PIK3CA 基因突变率均低于各阳性组。见表 1。

表 1 PIK3CA 基因在乳腺癌不同肿瘤特征中的突变状态

类型	n	突变例数	突变率(%)	χ^2	P
ER 阳性	121	37	30.6	5.1075	0.0238
ER 阴性	55	8	14.5		
PR 阳性	113	35	31.0	4.8465	0.0277
PR 阴性	63	10	15.9		
HER2 阳性	29	8	27.6	0.0743	0.7852
HER2 阴性	147	37	25.2		
三阴组	35	3	8.6	—	—

注:—表示无数据。

表 2 PIK3CA 基因在不同临床病理特征中的突变

临床特征	n	突变情况[n(%)]	χ^2	P	
年龄	>50 岁	92	23(25.0)	0.032 7	0.856 5
	≤50 岁	84	22(26.2)		
淋巴结转移	有转移	65	20(30.8)	1.465	0.226 1
	无转移	111	25(22.5)		
肿瘤大小	>2 cm	80	26(32.5)	3.703 1	0.054 3
	≤2 cm	96	19(19.8)		
组织学分级	I 级	23	2(8.7)	3.901 5	0.048 2
	II~III 级	153	43(28.1)		

2.3 PIK3CA 基因突变与患者临床病理特征的关系 PIK3CA 基因突变与患者的年龄、淋巴结转移和肿瘤大小均无相关性,但与组织学分级有相关性,II 和 III 级的 PIK3CA 基因突变率远远高于 I 级($P < 0.05$)。见表 2。

3 讨 论

PIK3CA 基因编码 I 类磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)的 p110 催化亚单位,PI3K 是一种脂质激酶,是由调节亚基 p85 和催化亚基 p110 组成的异源二聚体。PIK3CA 是目前 PI3K 家族成员中发现的唯一一个可以发生体细胞突变而致癌的基因。PIK3CA 基因突变通过 PI3K/AKT 的途径引发 AKT 持续活化,导致成纤维细胞和乳腺上皮细胞的生长和转化,抑制细胞凋亡,与乳腺癌发生和发展密切相关。研究表明,在乳腺癌中发现 PIK3CA 基因突变发生率为 8%~40%,约 4/5 发生在螺旋区(exon9)和激酶区(exon20)这两个热点区域^[4]。本研究 PIK3CA 基因突变率为 25.6%,以 20 号外显子 H1047R 突变为,在 20 例良性对照组中均没发现 PIK3CA 基因突变,基本与国内外报道^[5-6]相符。

本研究中 PIK3CA 基因突变在乳腺癌不同分子亚型中突变发生率不同,在 ER 阳性和阴性、PR 阳性和阴性患者中差异有统计学意义($P < 0.05$),但在 HER2 阳性和阴性患者中差异无统计学意义($P > 0.05$);三阴组的 PIK3CA 基因突变率均低于受体阳性组。PIK3CA 基因突变存在于所有类型的乳腺癌中,更常见于 PR 阳性及 ER 阳性的乳腺癌。这与文献^[7]报道 PIK3CA 基因突变在激素受体(HR)阳性组(21.5%)比 HR 阴性组(15.4%)更加频繁相符,其中 HR 阳性组包含了 PR 阳性及 ER 阳性。目前有关 PIK3CA 基因突变和 HER2 表达关联的报道研究结果不完全一致。有报道认为 PIK3CA 基因突变与 HER2 阴性表达相关,HER2 基因扩增的乳腺癌 PIK3CA 基因突变率较无 HER2 基因扩增的乳腺癌低^[8];而另一些报道则认为 PIK3CA 基因突变和 HER2 过表达相关,HER2 基因扩增的乳腺癌 PIK3CA 基因突变率远高于无 HER2 基因扩增的乳腺癌^[9],而本研究与此报道相符。与患者临床病理特征的关系上,PIK3CA 基因突变与患者的年龄、淋巴结转移和肿瘤大小均无相关性,但与组织学分级有相关性,II~III 级的 PIK3CA 基因突变率远远高于 I 级($P < 0.05$),提示 PIK3CA 基因突变可能在乳腺癌的发生、发展中起作用。Bozhanov 等^[10]报道 PIK3CA 基因突变与淋巴结转移和肿瘤分级相关,本研究与此报道部分不符合,可能与研究病例和地域不同有关。

PIK3CA 基因状态还决定靶向药物赫赛汀、表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)、抗 EGFR 单抗和 PI3K 抑制剂的疗效,HER2 阳性乳腺癌患者的靶向药物主要为赫赛汀和拉帕替尼。据 Majewski 等^[11]研究在 HER2 阳性乳腺癌中,PIK3CA 野生型患者的病理完全缓解率为 53.1%,而 PIK3CA 基因突变患者的病理完全缓解率为 28.6%。Henry 等^[12]的研究也发现 PIK3CA 基因突变的乳腺癌患者的病理完全缓解可能性较低,无进展生存期较短。由于 PIK3CA 基因突变的 HER2 阳性乳腺癌患者接受赫赛汀治疗的疗效显著降低,总生存期显著缩短。因此,PIK3CA 基因突变的 HER2 阳性乳腺癌患者将对化疗和抗 HER2 治疗产生耐药,需要对此类人群确定其他的治疗方案。

参 考 文 献

[1] 姚宇锋,龚建平,唐金海,等.多西他赛联合洛铂新辅助化疗方案治疗三阴性乳腺癌的临床观察[J].临床肿瘤学杂志,2013,18(8):723-725. (下转第 2114 页)

制及做法就显得很迫切,可以减少献血者的流失,同时加强低危、固定献血者的队伍建设,但据深圳市报道的重复献血者 HIV 感染率也存在急剧增长趋势^[1],加剧了招募工作的难度,所以征询工作的重要性就显得尤为重要。要取得献血者的信任,征询环境的私密性以及和献血者的沟通服务都很重要,直接影响采集血液的质量安全。

2009~2015 年 HIV 抗体确认阳性的献血者 94.9% 为男性,女性仅占 5.1%。18~30 岁的青壮年占 67.7%,高于乔淑艳等^[7]报道的 20~30 岁的占 53.8% 和李仲平等^[8]报道的广州地区 18~29 岁的占 60.3%,可看出 HIV 感染呈现年轻化的趋势,同时这个年龄段又将是献血的主力军。职业来看,各种职业呈现多样化,主要集中在工人农民、公司职员,分别占 53.5%、29.3%。从学历上看,各学历均有一定比例,主要以中专以下为主占 81.8%,原因可能与这群人的文化程度相对低,缺少自我保护的知识有关。因此,应该对献血人群进行相关的调查,针对学历相对低和劳务工人多加强献血知识的宣传与普及,有利于加强低危、固定献血者的队伍建设,进而保障和提高血液源头质量。

所以,在做招募献血员工作时,建议要加强体检时的有效沟通^[9],加强血站体检工作人员的征询能力和技巧,学习有效沟通的方式、方法,以提高高危行为告知率。针对一些有高危行为的无偿献血者发一些小卡片,指导其到就近的疾控中心做专业的咨询检测,既提高输血安全系数又能预防 HIV 扩散感染。针对试剂假阳性的问题,建立回访跟踪监测及献血资格回归的工作制度,有利于加强低危、固定献血者的队伍建设,减少献血者的流失。同时选择更加灵敏、高特异性的试剂检测血液,选择高灵敏度的核酸扩增方法进行检测,并且本站已经全面实行病毒核酸的检测,可以尽量缩短因窗口期感染的风险,确保输血安全。

(上接第 2111 页)

- [2] López-Knowles E, O' toole SA, Mcneil CM, et al. PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(5):1121-1131.
- [3] 《乳腺癌 HER2 检测指南:2014 版》编写组. 乳腺癌 HER2 检测指南:2014 版[J]. *中华病理学杂志*, 2014, 43(4):262-267.
- [4] Kataoka Y, Mukohara T, Shimada H, et al. Association between gain-of-function mutations in PIK3CA and resistance to HER2-targeted agents in HER2-amplified breast cancer cell lines[J]. *Ann Oncol*, 2010, 21(2):255-262.
- [5] 袁鹏飞,汪建光,张丽柯,等. PIK3CA 基因在乳腺癌不同分子亚型中突变的研究[J]. *河南科技大学学报(医学版)*, 2014, 32(4):245-246,250.
- [6] Cizkova M, Susini A, Vacher S, et al. PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ER α , PR and ERBB2-based subgroups[J]. *Breast Cancer Res*, 2012, 14(1):R28.
- [7] Von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15

参考文献

- [1] 温秀明, 郭旭群, 刘永梅, 等. 深圳市志愿无偿献血者 HIV 感染状况分析[J]. *中国输血杂志*, 2012, 25(8):769-771.
- [2] 王芳, 栾燕, 刘显智. 沈阳市近 8 年来无偿献血人群 HIV 感染现状分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(8):1996-1998.
- [3] 郭晓明. 无偿献血者抗-HIV 初筛阳性结果与确认试验阳性结果的对比分析[J]. *中国医药指南*, 2014, 12(33):188-189.
- [4] 刘建敏, 董雪, 李欣, 等. 沈阳市 2013 年 HIV 抗体初筛阳性标本的复检及确证结果分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(6):844-845,851.
- [5] 孙琦, 徐莉, 张化江, 等. 2011~2014 年威海市 HIV 抗体筛查阳性标本的确证结果分析[J]. *中国艾滋病性病*, 2015, 21(11):982-984,989.
- [6] 周国平, 谢云峥, 王迅, 等. 做好假反应性献血者归队是血站的责任[J]. *中国输血杂志*, 2014, 27(10):1079-1082.
- [7] 乔淑艳, 曹会珍, 杨永生. 2009~2013 年唐山市无偿献血人员 HIV 抗体检测状况分析[J]. *医学动物防制*, 2015, 31(12):1403-1405.
- [8] 李仲平, 郑优荣, 梁浩坚, 等. 2002~2011 年广州市无偿献血人群 HIV 抗体阳性情况分析[J]. *广东医学*, 2012, 33(13):1945-1947.
- [9] 余世维. 沟通中的传言, 肢体语言和讲话的态度[M]. 北京:机械工业出版社, 2009.

(收稿日期:2016-01-23 修回日期:2016-04-29)

(7):747-756.

- [8] 胡沁, 石园, 侯英勇, 等. 乳腺癌中 PIK3CA 基因突变与 HER2 表达及其基因扩增的关系[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2013, 29(5):477-481.
- [9] 江昊, 王甜甜, 周涛. PIK3CA 和 C-KIT 基因突变与伴腋窝淋巴结转移乳腺癌临床病理特征及预后的关系[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2014, 19(2):112-116.
- [10] Bozhanov SS, Angelova SG, Krasteva ME, et al. Alterations in p53, BRCA1, ATM, PIK3CA, and HER2 genes and their effect in modifying clinicopathological characteristics and overall survival of Bulgarian patients with breast cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(11):1657-1669.
- [11] Majewski IJ, Nuciforo P, Mitempergher L, et al. PIK3CA mutations are associated with decreased benefit to neoadjuvant human epidermal growth factor receptor 2-targeted therapies in breast cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(12):1334-1339.
- [12] Henry NL, Schott AF, Hayes DF. Assessment of PIK3CA mutations in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: clinical validity but not utility[J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(29):3207-3209.

(收稿日期:2016-01-24 修回日期:2016-05-06)