

Ki67 在乳腺癌新辅助内分泌治疗中的意义

张艾琳, 毛晓韵

(中国医科大学附属第一医院乳腺外科, 沈阳 110001)

[摘要] 近年来,随着乳腺癌新辅助治疗研究的持续升温,一系列重要的预测因子在新辅助疗效评估及预后中显示出重要的作用。Ki67 作为细胞增殖相关核抗原,其表达高低与细胞周期中的有丝分裂相关,在肿瘤研究中扮演着重要的角色。Ki67 也被作为乳腺癌分子分型及预后的重要指标。根据其临床实用价值,国外已将 Ki67 作为激素受体阳性乳腺癌新辅助内分泌治疗的重要评估指标,并将用 Ki67 取代肿瘤灶变小的传统临床终点,最终用于评估新辅助内分泌治疗终点。本文就其在新辅助内分泌治疗中的意义及标准化评估方法进行综述。

[关键词] 乳腺癌; 新辅助内分泌治疗; Ki67 指数

[中图分类号] R737.9 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.12019/j.issn.1671-5144.2020.05.012

The Significance of Ki67 Index in Neoadjuvant Endocrine Therapy of Breast Cancer

ZHANG Ai-ling, MAO Xiao-yun

(Department of Breast Surgery, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Many researches are carried out and focused on neoadjuvant therapy for breast cancer in recent years, many biomarkers are considered to be important predictors for the evaluation of neoadjuvant therapy efficacy. The proliferation marker Ki67, a component of the mitotic chromosome periphery, plays an important role in cancer research. Ki67 is essential for determining breast cancer molecular subtype and a perfect predictor of breast cancer prognosis. According to its clinical practical value, Ki67 is used to be an important evaluation index and predictors in hormone receptors positive breast cancer patients with neoadjuvant endocrine therapy. It turns out to be a primary efficacy endpoint in the clinical trial of neoadjuvant endocrine treatment, more important than other evaluation of target lesions. This review aims to elucidate the significance and the assessment guidelines of Ki67 index in neoadjuvant endocrine therapy of hormone receptors positive breast cancer.

Key words: breast cancer; neoadjuvant endocrine therapy; Ki67 index

Ki67 是细胞增殖相关的核抗原, Ki67 表达高低与细胞周期中的有丝分裂相关, 与肿瘤发展密切相关。Ki67 在肿瘤组织中呈周期性高表达, 在

正常组织中低表达, 是乳腺癌分子分型及预后重要指标, 目前有研究表明其在乳腺癌治疗中可用于评估治疗疗效及预后, Ki67 是现有新辅助内分泌治疗重要评估指标, 本文就 Ki67 在乳腺癌新辅助内分泌治疗中的意义及标准化评估进行综述。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81972791)

[作者简介] 张艾琳(1997-), 女, 四川江油人, 在读硕士研究生, 主要研究方向为乳腺癌发生发展相关机制。

[通讯作者] 毛晓韵, Tel: 024-83281306, E-mail: xymao@cmu.edu.cn

1 Ki67 结构与生物学功能

Ki67 由德国 Kiel 大学 Gerdes 等人在研究霍奇金淋巴瘤细胞系核抗原时首次发现, 67 是发现这个抗原的单克隆抗体编号^[1]。Ki67 在正常细胞有

丝分裂过程的G1后期出现,表达贯穿于其后的S、G2和M期,并于M期达高峰,有丝分裂后迅速结束,在处于静止的G0期细胞不表达^[2]。利用Ki67阳性标记处于增殖周期细胞胞核的这个特性,Ki67表达的百分比可以用于判断处于分裂增殖周期细胞的百分比,成为临床上判断肿瘤增殖情况的重要指标。人Ki67蛋白由*MKI67*基因编码,定位于10q26.2,含15个外显子和14个内含子,目前发现其有两个差异剪接亚型^[3]。Ki67蛋白含N末端FHA域、PP1结合域,一个含串联重复序列的中心区域和C末端LR(富含亮氨酸/精氨酸)染色质结合结构域^[4],这些位点与其重要生物学功能相关,其存在一系列在多种细胞周期调节蛋白中必需激酶、PEST序列和fox相关结构域的潜在磷酸化位点^[5-6]。Ki67的串联重复序列组中含有丝分裂期间细胞周期素依赖激酶(cyclin dependent kinase 1, CDK1)磷酸化的残基^[7-8],后来研究也证明Ki67很多生物学功能都与磷酸化有关。

2 Ki67与乳腺癌新辅助内分泌治疗

在乳腺癌中,Ki67用于不同分子亚型的评估,也是一个非常重要的预测因子。一项早期乳腺癌的meta分析表明Ki67表达高的患者复发风险高,生存率更差^[9]。Penault-Llorca F报道了PACS01试验高Ki67指数($\geq 20\%$)可预测雌激素受体(estrogen receptor, ER)阳性乳腺癌患者对多西紫杉醇辅助治疗的有效性^[10]。BCIRG001研究发现TAC(阿霉素或表阿霉素+环磷酰胺)化疗方案对Ki67指数高($\geq 13\%$)的ER阳性、淋巴结阳性患者的内分泌治疗有显著的补充作用^[11]。两项IBCSG研究将淋巴结阴性患者随机进入辅助性化疗+内分泌治疗和单独内分泌治疗,结果发现在1521例内分泌反应型乳腺癌患者中,Ki67指数高($\geq 19\%$)与无病生存率差相关^[12],目前研究表明在内分泌治疗有效的病例中Ki67可提示预后。

Ki67是现有新辅助内分泌治疗重要评估指标,新辅助化疗的疗效评估主要是治疗后肿物大小的影像学相关评估及病理学评估。支持Ki67作为新辅助内分泌治疗的主要评估指标的最有力证据来自两项临床研究,一项是IMPACT研究,比较新辅助内分泌治疗应用阿那曲唑(arimidex)、他莫昔芬(tamoxifen)、联合应用阿那曲唑和三苯氧胺的疗效^[13];另一项是比较来曲唑(letrozole)和他莫昔芬的新辅助内分泌疗效的P024研究^[14-15]。在讲

IMPACT研究前,我们先看一下ATAC(arimidex, tamoxifen, alone or in combination)研究,这项研究探讨了阿那曲唑、他莫昔芬、阿那曲唑与他莫昔芬联合作为绝经后早期乳腺癌患者初始5年内分泌治疗用药疗效及安全性的随机试验,研究发现阿那曲唑组的无复发生存率明显优于他莫昔芬组或二者联合组,ATAC研究是全球规模最大、随访时间最长的辅助内分泌治疗的临床研究之一,其在芳香化酶抑制剂(aromatase inhibitor, AI)辅助治疗早期乳腺癌中具有里程碑式的意义,这项研究患者中位随访时间120个月,包括阿那曲唑组24522人年数和他莫昔芬组23950人年数^[16-17]。

IMPACT研究是将ATAC设计的用于新辅助内分泌治疗激素受体阳性患者,避免了辅助治疗的疗效试验所需的大量患者及很长的随访时间,旨在对比三种新辅助内分泌治疗方案的激素受体阳性患者复发和死亡风险。Dowsett在前期研究中看到阿那曲唑治疗2周后Ki67降低幅度明显高于单用他莫昔芬或他莫昔芬联合阿那曲唑组,Ki67治疗后降低的百分比及治疗后的Ki67指数与患者的无复发生存是相关的($P=0.004$),且这种无复发生存与ATAC研究的无复发生存也是相一致的^[16-18],尽管这并不能反映新辅助内分泌治疗的较果。Dowsett研究也发现IMPACT试验患者新辅助内分泌治疗2周后的Ki67指数可以预测患者的无复发生存^[13-19]。另一项大型III期随机双盲多中心P024临床研究,来曲唑或他莫昔芬新辅助内分泌治疗4个月后,Ki67、肿瘤大小、淋巴结状态和ER状态与无复发和总生存率独立相关,由数学模型将以上这些因素组合成的术前内分泌预后指数(preoperative endocrine prognostic index, PEPI)在影响试验的独立数据集中被证实为长期预后的预测指标^[14-15]。

ACOSOG Z1031B是在Z1031A基础上修正而成,ACOSOG Z1031A随机II期临床试验旨在比较阿那曲唑、来曲唑或依西美坦疗效,Z1031B收集了Z1031A研究AI新辅助内分泌治疗2~4周后的Ki67数据,在Ki67 $>10\%$ 时,患者转而接受新辅助化疗,以病理完全缓解率(pathologic complete response, pCR) $>20\%$ 为预先设定的有效性临界值。PEPI=(T1或T2, N0, Ki67 $<2.7\%$, ER-Allred评分 >2 分)的患者,未化疗患者的5年复发风险仅为3.6%,14.4%(49/341)PEPI >0 分的患者复发^[20],新辅助内分泌后的Ki67及PEPI值可用于评估复发的风

险。另一项小规模临床报道了来曲唑新辅助内分泌治疗对治疗后原发灶 Ki67 和雌激素和孕激素受体的影响,这项研究入组了 63 例 ER 表达水平高(ER Allred 评分 5~8 分)的不可手术的局部晚期乳腺癌,研究来曲唑治疗前、治疗后 10~14 天和治疗后 3 个月 Ki67、ER 和孕激素受体(progesterone receptor, PR)的变化。以治疗 3 个月后影像学显示肿瘤体积缩小是否大于 50% 分为临床有效组与临床无效组,以病理学上是否出现细胞数量明显减少和/或明显增加纤维化分为病理有效组与病理无效组,研究发现治疗后 Ki67 不能预测临床是否有效,但可以预测是否病理有效^[21]。

目前在临床实践中,新辅助内分泌治疗主要是用于初始治疗不适合接受其他治疗的激素受体阳性乳腺癌患者,这对那些一般情况较差、不能耐受新辅助化疗的患者来讲是一个安全有效的选择。新辅助内分泌临床试验目的之一在于收集内分泌药物降低复发和死亡风险的数据,新辅助内分泌治疗后的 Ki67 指数等效于辅助内分泌治疗大型临床研究中的复发风险,可作为评估患者无复发生存率的预测指标。

3 乳腺癌新辅助内分泌治疗 Ki67 指数的标准化评估

临床上公认的用于检测 Ki67 的方法为免疫组织化学检测,被病理医生报告为 Ki67 指数。检测细胞核抗原 Ki67 的细胞免疫组化染色比例已成为比较肿瘤标本间增殖的最常用方法,用于指导预后,对化疗或内分泌治疗的相对反应性或抵抗力的预测,用于对标准治疗患者残余风险的估计,以及作为新辅助治疗(尤其是新辅助内分泌治疗)之前、期间和之后采集样本的治疗效果的动态生物标志物。Ki67 越来越多地在新辅助治疗期间被用于临床研究,包括作为临床试验的主要疗效终点。Polley 等召集了一项关于 Ki67 评估多国参与的临床研究,让 8 个经验丰富的病理中心接收 100 例乳腺癌患者标本,均采用 MIB-1 抗体,每个病理中心使用自己的方法评估相同病例的 Ki67 指数,单中心评估重复性好,病理中心之间重复性中等,整体来讲评估有效性有限^[22]。在临床实践中不同医院 Ki67 评判体系不同,区分 Ki67 高和 Ki67 低的界限从 1% 到 28.6% 不等,明显限制了 Ki67 的临床实际价值。

2010 年 3 月 12 日,国际乳腺组织和北美乳腺癌组织生物标志物组共同协作成立国际乳腺癌

Ki67 协作组,旨在建立科学、均一的 Ki67 精确临床应用和评估体系,以期将这一乳腺癌重要指标评估统一化,更深入应用于临床实践^[23]。酒精、乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)固定、冰冻或脱钙处理都会对免疫组化 Ki67 指数结果产生影响,如果固定延迟 20~80min 会影响染色细胞核的完整性,这种变化对视觉评估得出的分数没有影响,但对数字图像分析则会有影响^[24-25]。福尔马林固定石蜡包埋组织块室温长期保存对 Ki67 的影响不大,但在切片后尽快染色(切片后暴露于室内空气 3 个月或以上会导致 Ki67 假阴性)^[26]。建议标本离体后尽快用中性福尔马林固定标本,固定 4~48 h,切片后尽快染色^[27-28],在免疫组化染色中建议微波修复,鉴于单克隆抗体 MIB-1 有长期和高度有效的跟踪记录,推荐抗 Ki67 单克隆抗体 MIB-1(兔抗人 Ki67 单克隆抗体 SP6 抗体也有使用,但目前数据不多)^[29-30]。MIB-1 抗体可引起 Ki67 的胞浆染色和少量的膜染色,特别是在鳞状化生乳腺癌中,在判读时应注意,只有胞核染色才应被纳入 Ki67 评分, Ki67 评分定义为阳性染色细胞占恶性细胞总数的百分比。如果染色是均匀的,建议至少计数三个随机选择的高倍($\times 40$ 倍目镜)视野。当然肿瘤内部的异质性也会表现在 Ki67 染色上,对于侵袭边缘被广泛认为是肿瘤最活跃部分的判读,理想判读是将肿瘤侵袭边缘与肿瘤核心部分进行平均,但这很难达到,而对于 Ki67 染色特别普遍的热点区域与不普遍的非热点区域的异质性,现为了保持一致性,当出现热点区域时,建议采用评估整个部分并记录总体平均得分的方法。对于计数多少细胞作为评估标准,在已发表的研究中,大多评估 500 到 2 000 个肿瘤细胞^[23]。在临床实践中,对所有细胞进行评分是不切实际的,为了达到足够的精确度,建议病理医生至少对 1 000 个细胞进行评分,并将 500 个细胞作为绝对最小值^[23]。

对于 Ki67 的 cut-off 值,一个适合于判断预后的阈值可能不适用于新辅助研究或用作药效学评估的 Ki67 阈值。目前,由于缺乏统一的方法,国际乳腺癌 Ki67 协作组无法就临床实践中可能使用的理想 cut-off 值达成共识。在新辅助内分泌治疗用作药效学指标时,Z1031B 和 IMPACT 研究以 10% 为新辅助内分泌 2~4 周后 Ki67 指数评估的 cut-off 值^[20, 31]。P024 研究中的 PEPI=0 的 Ki67 cut-off 值 2.7%, Ki67 水平的变化也常以基线值的百分比表

示,但很少有经验性的数据能够准确地证明百分比的变化在临床上更有意义,特别是在治疗前Ki67基线值就不高的情况下。目前认为在标准临床实践中,尤其是在临床试验中,Ki67的评估非常重要,需要严格质控下的标准化准确评判,除非评估是在一个有自己参考数据、经验丰富、严格质控的实验室进行的,否则直接应用特定的cut-off值进行决策是不可靠的^[23]。

综上所述,Ki67是乳腺癌良好的预测指标,特别是在新辅助内分泌治疗中,虽然Ki67并不能直接反映新辅助内分泌治疗的较果,但新辅助内分泌治疗后的Ki67指数却可作为评估患者无复发生存率的良好预测指标。目前Ki67的评估已有标准化流程,但不同的中心间的均一性有待提高,需要严格质控下的标准化准确评判,并做回顾性研究以期找到不同目的的cut-off值。

[参 考 文 献]

- [1] GERDES J, SCHWAB U, LEMKE H, et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation [J]. *Int J Cancer*, 1983, 31(1):13-20.
- [2] GERDES J, LEMKE H, BAISCH H, et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67 [J]. *J Immunol*, 1984, 133(4):1710-1715.
- [3] SUN X, KAUFMAN P D. Ki-67: More than a proliferation marker [J]. *Chromosoma*, 2018, 127(2):175-186.
- [4] SCHLUTER C, DUCHROW M, WOHLBERG C, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins [J]. *J Cell Biol*, 1993, 123(3):513-522.
- [5] ENDL E, GERDES J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function [J]. *Exp Cell Res*, 2000, 257(2):231-237.
- [6] STARBORG M, GELL K, BRUNDELL E, et al. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression [J]. *J Cell Sci*, 1996, 109 (Pt 1): 143-153.
- [7] SCHOLZEN T, GERDES J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown [J]. *J Cell Physiol*, 2000, 182(3):311-322.
- [8] TAKAGI M, NISHIYAMA Y, TAGUCHI A, et al. Ki67 antigen contributes to the timely accumulation of protein phosphatase 1gamma on anaphase chromosomes [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(33):22877-22887.
- [9] DE AZAMBUJA E, CARDOSO F, DE CASTRO G JR, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: A meta-analysis of published studies involving 12,155 patients [J]. *Br J Cancer*, 2007, 96(10):1504-1513.
- [10] PENAULT-LLORCA F, ANDRE F, SAGAN C, et al. Ki67 expression and docetaxel efficacy in patients with estrogen receptor-positive breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(17):2809-2815.
- [11] HUGH J, HANSON J, CHEANG M C, et al. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: Use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(8):1168-1176.
- [12] VIALE G, REGAN M M, MASTROPASQUA M G, et al. Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2008, 100(3):207-212.
- [13] DOWSETT M, SMITH I E, EBBS S R, et al. Short-term changes in Ki-67 during neoadjuvant treatment of primary breast cancer with anastrozole or tamoxifen alone or combined correlate with recurrence-free survival [J]. *Clin Cancer Res*, 2005(2 Pt 2), 11:951s-958s.
- [14] ELLIS M J, MILLER W R, TAO Y, et al. Aromatase expression and outcomes in the P024 neoadjuvant endocrine therapy trial [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 116(2):371-378.
- [15] ELLIS M J, TAO Y, LUO J, et al. Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2008, 100(19):1380-1388.
- [16] CUZICK J, SESTAK I, BAUM M, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial [J]. *Lancet Oncol*, 2010(12), 11:1135-1141.
- [17] HOWWELL A, CUZICK J, BAUM M, et al. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer [J]. *Lancet*, 2005, 365(9453):60-62.
- [18] BAUM M, BUDZAR A U, CUZICK J, et al. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: First results of the ATAC randomised trial [J]. *Lancet*, 2002, 359(9324):2131-2139.
- [19] DOWSETT M, SMITH I E, EBBS S R, et al. Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99(2):167-170.
- [20] ELLIS M J, SUMAN V J, HOOG J, et al. Ki67 proliferation index as a tool for chemotherapy decisions during and after neoadjuvant aromatase inhibitor treatment of breast cancer: Results from the American College of Surgeons Oncology Group Z1031 trial (Alliance) [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35

