

乳癌的生物指標Ki67

曾嶽元

惡性腫瘤有多種生物學上的特徵，其中「細胞失控地增殖」無疑地是最重要的特徵之一。評估細胞增殖程度的方法有好幾種，譬如計算有絲分裂像、計算嵌入DNA的放射性核苷酸、或以流式細胞術（flow cytometry）評估位於S期的細胞比率^{1,2,3}。其中臨床上最常用來評估細胞增殖的方法，就是以免疫組織化學染色法（immunohistochemistry; IHC）來計量Ki67抗原的表現^{4,5}。因為這個395kD的Ki67核蛋白可出現於細胞週期中除了G0期外的任何一個階段^{6,7}，所以「Ki67的指數」比起「有絲分裂像的指數」更能反映處在增殖狀態的細胞比率。

由於腫瘤的惡性度常與細胞的增殖程度有關，因此Ki67的指數常被用來測試是否可成為腫瘤的預後指標（prognostic marker）。乳癌當然也不例外地被許多研究者仔細評估過^{8,9}，而90%以上的研究都指出Ki67是評估早期乳癌之預後指標⁴。譬如有一研究發現，Ki67指數 > 10%的乳癌病人，其癌症復發率或死於癌症的機率，較Ki67指數 < 10%者高11倍¹⁰。對於早期乳癌（T1N0M0）而言，癌症是否會復發以及病人是否會死於癌症，「高指數的Ki67」是各項測試的參數中最強的預後指標¹⁰。總之，多年來的研究已明確地指出，Ki67指數是荷爾蒙受體

（hormone receptor; HR）陽性之乳癌患者非常有用的預後指標^{11,12}。

Ki67指數也被認為可作為療效的預測指標（predictive marker）。在輔助性療法（adjuvant therapy）方面，有研究發現，Ki67指數 > 10%的乳癌病人接受荷爾蒙輔助療法時，使用「復乳納膜衣錠（letrozole）」優於使用「泰莫西芬（tamoxifen）」¹²。另外，Ki67指數也與輔助性化療有關。譬如，PACS01臨床試驗中證明Ki67為高指數的ER陽性乳癌病人，預期可從輔助性化療（docetaxel / fluorouracil / epirubicin）中獲益¹³。接受歐洲紫杉醇（docetaxel）輔助性療法的ER陽性乳癌病人，其5年之無病存活率在Ki67陽性的病人為84%，而Ki67陰性的病人則為81%¹³；而「Breast Cancer Study Group International Research Group 001臨床試驗」也得到類似的結論¹⁴。不過另一臨床試驗（International Breast Cancer Study Group Trials VIII and IX）卻發現ER陽性及淋巴結陰性的病人，無法以高指數的Ki67來預測是否在荷爾蒙療法外需合併使用化療（cyclophosphamide / methotrexate / fluorouracil）¹⁵。

在前置治療（neoadjuvant therapy）方

通訊作者：曾嶽元 教授

電話：886-2-2690-7965 ext 2518

傳真：886-2-2691-9800

地址：106 台北市仁愛路四段280號 國泰綜合醫院 病理暨檢驗醫學部

電子郵件：jeffbucknell@gmail.com

面，IMPACT臨床試驗指出，前置荷爾蒙療法（neoadjuvant hormonal therapy）兩週後之Ki67值比起未使用藥物前之Ki67值更能反應腫瘤復發的可能性¹⁶。也有研究指出，前置化療（neoadjuvant chemotherapy）之病理反應與Ki67指數有關¹⁷；Ki67指數愈高者病理反應愈佳，而Ki67指數<25%者則無病理反應。前置化療後之Ki67指數可用來預測無病存活率，Ki67指數低者（<12%）有較佳的無病存活率¹⁷。前置化療可使腫瘤的Ki67值下降，而其中有療效者下降的幅度更大¹⁸。若前置化療後不出現「病理完全反應（pathological complete response）」的話，殘留腫瘤之Ki67值可反映預後¹⁹。對於這些預後不佳者，應給予輔助療法。

除了上述的臨床意義，Ki67的潛在價值還可由它和Oncotype的關聯性得到佐證。Oncotype為美國臨床腫瘤學會（American Society of Clinical Oncology）推薦用於評估早期乳癌患者是否應接受輔助性化療的參考。而最近有研究指出，Ki67 \geq 25%之腫瘤九成以上為Oncotype高風險或中度風險²⁰。

由上所述可知Ki67是評估早期乳癌有用的指標，但是在臨床上使用Ki67卻頗為困難⁸。因為研究者各自訂定自己的Ki67閾值，大多數所訂的閾值在10%到20%之間²¹，但是範圍從1%到28%都有⁴。也因此，美國臨床腫瘤學會（American Society of Clinical Oncology）於2007年時認為，證據尚未足以證明Ki67可用於評估乳癌病人的預後²²。不過到了2009年，有研究者以「接收者操作特徵（receiver operating characteristic; ROC）」曲線評估Ki67的數值，發現13.5%是最佳的閾值¹¹。因此，2011年

St Gallen國際專家共識會議（International Expert Consensus）²³對早期乳癌的處置決議中，即採用13.5%作為Ki67免疫染色的閾值。

有了Ki67閾值的共識後，接著要關心的是，如何得到正確的Ki67數值。其中的關鍵點是在病理醫師的判讀。判讀Ki67的基本原則如下：（1）判讀前要注意，玻片中是否可看到內建的陽性對照，例如有絲分裂像和淋巴球。（2）Ki67的染色常會出現不均勻的情況。這可能是均勻區域中的一小區有較高密度的陽性細胞，此稱為熱點（hot spot）。不均勻的情況也可以出現在腫瘤的邊緣區。在顯微鏡下計數Ki67陽性細胞時，應以高倍數物鏡評估三個區域，而且至少要算500個細胞，若可能的話儘量算到1000個細胞或更多。（3）評估時要注意檢體種類。通常粗針切片（core needle biopsy）檢體之固定效果較佳，所以細胞核的Ki67染色較均勻；至於切除下來的大標本則固定效果較差，所以細胞核的染色會有不均勻現象，甚至出現空洞區。在這種情況下，若以數位影像分析方法計算Ki67值時，易產生判讀上的困難。此外，癌細胞周圍的淋巴球為Ki67陽性，所以用數位影像分析方法計算Ki67值時，會納入淋巴球而使數值偏高。這些原因使得數位影像分析尚未被接受用於計算乳癌Ki67的數值。（4）Ki67的判讀會受到染色品質的影響。因此，外科醫師及病理實驗室應一起維護染色的品質。以下所述之品管細節值得我們注意。

- 外科醫師在取得檢體（如粗針切片）後，宜在20到80分鐘內將檢體置入適當的固定液²⁴。若過夜才將檢體放到固定液，或將檢體先予以冰凍（如使用冷凍切片剩餘檢體）都會造成Ki67指

數偏低^{25,26}。

- 適當的固定液為10%中性福馬林緩衝液（neutral buffered formalin）。若檢體以乙醇或Bouin液固定，或是檢體曾經以EDTA、酸性脫鈣液處理過，那麼Ki67值也會偏低^{25,26}。
- 檢體在10%中性福馬林緩衝液中固定4到48小時即足夠²⁷。一般而言，都不會有固定太久的問題，因為即使固定長達154天也不會明顯地減低Ki67的染色²⁸。
- 檢體於適當的固定後包埋在石蠟中可長期保存組織的抗原性^{29,30}，然而一旦切下蠟片捲置於玻片上後，於室內空氣下保存，大概只可貯存3個月左右³¹。即便以石蠟封片或將玻片貯存於氮氣中，保存效果也相當有限。所以，實驗室應儘量在執行IHC前才製作玻片，而且一旦製成玻片後需要在2週內使用。
- 偵測Ki67的抗體有很多種，其中MIB1為老鼠對人的單株抗體³⁰，對Ki67有良好的特異性和敏感性⁵。實驗室在進行抗原修復（antigen retrieval）時，宜採用微波加熱法，儘量避免使用蛋白酶或低pH法³²。SP6為兔子對人的單株抗體，對Ki67有更佳的敏感性³³。使用MIB1染色時偶爾可看到細胞質被染上，尤其是病灶出現鱗狀上皮化生時³⁴，但若使用SP6可改善此情況。不論如何，病理醫師在計算Ki67值時評估細胞核即可。通常色原質（chromogen）的染色不會造成問題，但是太弱的對比染色（counterstain）會使Ki67的值偏高³⁵。

既然許多的研究都指出，Ki67指數可作為早期乳癌預後和預測的指標，那麼善加利用Ki67，則可為乳癌的臨床處置提供重要的參考依據。然而，

儘管世界衛生組織已正式將Ki67的計算納入神經內分泌瘤的分類定義中，但是目前將Ki67用在乳癌上仍有困難³⁶。主要是因為Ki67的計算一致性不高之故。如果病理醫師使用目測法來估計Ki67指數，那麼一致性就更糟了。可惜現今大部份的病理醫師都採用目測法估計Ki67。願意算到500個或更多細胞的病理醫師，大概只有一成左右而已。既然許多的研究都指出，Ki67指數可作為早期乳癌預後和預測的指標，那麼若只是因為判讀上的困難而不能採用Ki67指數，豈非因噎廢食？這點值得國內醫界努力改進。

參考文獻

1. Tubiana M, Pejovic MH, Chavaudra N, Contesso G, Malaise EP. The long-term prognostic significance of the thymidine labelling index in breast cancer. *Int J Cancer* 1984;33:441–445.
2. Dressler LG, Seamer L, Owens MA, Clark GM, McGuire WL. Evaluation of a modeling system for S-phase estimation in breast cancer by flow cytometry. *Cancer Res* 1987;47:5294–5302.
3. Tovey SM, Witton CJ, Bartlett JM, Stanton PD, et al. Outcome and human epidermal growth factor receptor (HER) 1-4 status in invasive breast carcinomas with proliferation indices evaluated by bromodeoxyuridine labelling. *Breast Cancer Res* 2004;6:R246–R251.
4. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:7212–7220.
5. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;182:311–322.
6. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133:1710–1715.
7. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992;168: 357–363.

8. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 2010;11:174–183.
9. Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 2002;40:2–11.
10. Kronqvist P, Kuopio T, Nykänen M, Helenius H, et al. Predicting aggressive outcome in T1N0M0 breast cancer. *Br J Cancer* 2004;91:277–281.
11. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:736–750.
12. Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM, Coates AS, et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J Clin Oncol* 2008;26:5569–5575.
13. Penault-Llorca F, André F, Sagan C, Lacroix-Triki M, et al. Ki67 expression and docetaxel efficacy in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:2809–2815.
14. Hugh J, Hanson J, Cheang MC, Nielsen TO, 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 Clin Oncol* 2009;27:1168–1176.
15. Viale G, Regan MM, Mastropasqua MG, Maffini F, et al. International Breast Cancer Study Group. Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:207–212.
16. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, 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. *Clin Cancer Res* 2005;11:951s–958s.
17. Nishimura R, Osako T, Okumura Y, Hayashi M, Arima N. Clinical significance of Ki-67 in neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer as a predictor for chemosensitivity and for prognosis. *Breast Cancer* 2010;17:269–275.
18. Assersohn L, Salter J, Powles TJ, A'hern R, et al. Studies of the potential utility of Ki67 as a predictive molecular marker of clinical response in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003;82:113–123.
19. Jones RL, Salter J, A'Hern R, Nerurkar A, et al. The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009;116:53–68.
20. Sahebjam S, Aloyz R, Pilavdzic D, Brisson ML, et al. Ki 67 is a major, but not the sole determinant of Oncotype Dx recurrence score. *British Journal of Cancer* 2011;105:1342–1345.
21. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast* 2008;17:323–334.
22. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:5287–5312.
23. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 2011; 22:1736–1747.
24. Pinhel IF, Macneill FA, Hills MJ, Salter J, et al. Extreme loss of immunoreactive p-Akt and p-Erk1/2 during routine fixation of primary breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010;12:R76.
25. Mengel M, von Wasielewski R, Wiese B, Rüdiger T, et al. Inter-laboratory and inter-observer reproducibility of immunohistochemical assessment of the Ki-67 labelling index in a large multi-centre trial. *J Pathol* 2002;198:292–299.
26. Benini E, Rao S, Daidone MG, Pilotti S, Silvestrini R. Immunoreactivity to MIB-1 in breast cancer: methodological assessment and comparison with other proliferation indices. *Cell Prolif* 1997;30:107–115.
27. Munakata S, Hendricks JB. Effect of fixation time and microwave oven heating time on retrieval of the Ki-67 antigen from paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem* 1993;41:1241–1246.
28. Arber DA. Effect of prolonged formalin fixation on the immunohistochemical reactivity of breast markers. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002;10:183–186.
29. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest* 2000;80:1943–1949.
30. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992;168:357–363.
31. DiVito KA, Charette LA, Rimm DL, Camp RL. Long-term preservation of antigenicity on tissue microarrays. *Lab Invest* 2004;84:1071–1078.
32. Boon ME. Microwave-antigen retrieval: the importance of pH of the retrieval solution for MIB-1 staining. *Eur J Morphol* 1996;34:375–379.
33. Wong SC, Chan JK, Lo ES, Chan AK, et al. The contribution

of bifunctional SkipDewax pretreatment solution, rabbit monoclonal antibodies, and polymer detection systems in immunohistochemistry. Arch Pathol Lab Med 2007;131:1047–1055.

34. Faratian D, Munro A, Twelves C, Bartlett JM. Membranous and cytoplasmic staining of Ki67 is associated with HER2 and ER status in invasive breast carcinoma. Histopathology 2009;54:254–257.
35. Turbin DA, Gao D, Garratt J, et al. Effect of nuclear counterstain on Ki67 proliferative index. Abstract ID 23 / #60777–ASCO 2010 Breast Cancer Symposium (Washington DC, October 1–3, 2010)
36. Polley MY, Leung SC, McShane LM, Gao D, et al. An International Ki67 Reproducibility Study. J Natl Cancer Inst 2013 Nov 7.



生物醫學

BIOMEDICINE JOURNAL