

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.21.001

非小细胞肺癌中 EGFR 突变与雌激素受体表达的相关性研究*

闫 明¹,王淑玲²,赵 驰³,陈小兵⁴,李 印¹

(1. 郑州大学附属肿瘤医院胸外科 450008;2. 郑州大学基础医学院 450008;

3. 郑州大学第四附属医院病理科 450008;4. 郑州大学附属肿瘤医院肿瘤内科 450008)

[摘要] **目的** 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)组织中雌激素受体 α (ER α)的表达与表皮生长因子受体(EGFR)突变之间的关系。**方法** 应用免疫组织化学法及实时荧光定量聚合酶链反应法检测 286 例 NSCLC 中 ER α 的表达及 EGFR 突变情况,并分析其与临床特性的关系。**结果** ER α 表达阳性率为 36.0%(103/286),在女性患者中的表达要显著高于男性患者($P=0.004$),肿瘤最大直径小于或等于 3 cm 的患者显著高于肿瘤直径大于 3 cm 的患者($P<0.01$)。EGFR 基因突变 62 例(21.7%),在女性、腺癌、肿瘤直径较小的患者显著增多,在 ER α 表达阳性患者中显著高于 ER α 阴性者($P=0.001$)。**结论** NSCLC 中 ER α 的阳性表达与 EGFR 基因突变相关,可能与 EGFR 信号通路的交叉调控有关。

[关键词] 癌,非小细胞肺;受体,表皮生长因子;受体,雌激素**[中图分类号]** R734.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)21-2881-03

The relationship between expression of estrogen receptor alpha and epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer*

Yan Ming¹, Wang Shuling², Zhao Chi³, Chen Xiaobing⁴, Li Yin¹

(1. Department of Thoracic Surgery, the Affiliated Tumor Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450008, China; 2. Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450008, China;

3. Department of Pathology, the Fourth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450008, China; 4. Department of Medical Oncology, the Affiliated Tumor Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450008, China)

[Abstract] **Objective** To investigate expression of ER α (estrogen receptor alpha) and EGFR mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC) and explore their correlation to clinicopathologic characteristics. **Methods** We evaluated 286 resected NSCLC specimens for ER α expression by immunohistochemistry. EGFR mutations were evaluated with TaqMan real time polymerase chain reaction (RT-PCR). The correlation with clinicopathologic characteristics was analyzed. **Results** The positive expression rate of ER α was 36.0%(103/286). The positive expression of ER α in women was significantly higher than that in men ($P=0.004$) and the different ER α expression was associated with tumor diameter ($P<0.01$). 62(21.7%) patients were EGFR mutation positive. EGFR mutation status was significantly associated with gender (woman versus man, $P<0.01$), pathological subtypes (squamous carcinoma versus adenocarcinoma, $P<0.01$) and the tumor diameter (≤ 3 cm versus >3 cm, $P<0.01$). The expression of ER α had significant positive association with EGFR mutation status (mutation rate was significantly higher in patients with positive ER α expression than that of patients with negative ER α expression). **Conclusion** Expression of ER α is related with EGFR mutation status in NSCLC and may associate with the crosstalk in EGFR signaling pathways.

[Key words] carcinoma, non-small-cell lung; receptor, epidermal growth factor; receptor, estrogen

近年来世界各国肺癌的发病率和病死率都有明显升高的趋势,女性发病率增长速度尤其快,较多的证据显示雌激素及其受体(estrogen receptor, ER)可能起了重要作用^[1]。针对女性表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)突变率高的分子靶向治疗即表皮生长因子酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI),能使女性获益更多^[2]。ER 与 EGFR 突变在女性非小细胞肺癌(NSCLC)发生发展的作用与关系尚未完全清楚,本研究采用免疫组化法及实时荧光定量聚合酶链反应(TaqMan real time PCR)法分别检测 ER α 在 NSCLC 的表达及

EGFR 突变的情况,并分析其与肺癌临床病理的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集郑州大学附属肿瘤医院胸外科 2010 年 7 月至 2012 年 6 月手术切除并病理证实的 NSCLC 标本 286 例。术前均未作化疗、放疗。其中男 194 例,女 92 例,年龄 34~75 岁,平均 65.2 岁;病理诊断按照 WHO 1999 年肺癌组织学分类:鳞癌 78 例,腺癌 208 例。根据 2009 年国际抗癌联盟的肺癌临床分期标准(第 7 版): I 期 122 例, II 期 49 例, III 期 92 例, IV 期 23 例。另取 20 例癌旁正常组织作对照。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81172240)。 作者简介:闫明(1977-),硕士,副主任医师,主要从事肺癌和食管癌综合治疗的研究。

1.2 方法

1.2.1 ER α 的检测 ER α 检测试剂盒、SP 试剂盒均购于福州迈新生物技术开发公司。免疫组织化学方法:将石蜡包埋的癌组织制成 4~5 μm 切片,常规进行脱蜡,并浸入 0.01 mol/L、pH 6.0 的枸橼酸盐缓冲液内 20 min。按照说明书用 S-P 法进行免疫组织化学染色。用已知的阳性切片作阳性对照,用 PBS 做阴性对照。结果判定:ER α 以肿瘤细胞核或细胞质呈现棕黄色颗粒为阳性,阳性细胞总数大于 25% 为阳性。

1.2.2 EGFR 基因突变检测 石蜡组织 DNA 提取采用 TAKAKA 试剂盒并按说明书步骤进行。首先将 3~5 片 10 μm 的石蜡切片放于 Eppendorf 管中,加入 DNA 抽提液 10 滴并混匀,100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min,13 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液直接用于 Real-time PCR。EGFR 基因突变实时荧光定量 PCR 法检测试剂盒由北京金菩嘉医疗科技有限公司提供,采用 Taqman 探针技术检测 EGFR 19 号外显子 3 种碱基缺失突变及 21 号外显子 2 种碱基置换突变。PCR 反应体系包括:正反向引物、模板、MasterMix 及 Taqman 标记探针。每次实验均设定阴、阳性对照孔及空白对照孔。反应循环参数为:50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 以激活 DNA 聚合酶。95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,62 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,循环共 40 次。Real-time PCR 仪为 7900 (Applied Biosystems,美国)。结果判读:以无模板对照扩增曲线的最高点为准设定阈值,没有出现扩增曲线或 Ct>38.0 为阴性样本,出现扩增曲线且 Ct \leq 34.0 的样本为阳性样本,出现扩增曲线且 34.0<Ct \leq 38.0 的样本需重复检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计学软件进行分析,计数资料用率表示,采用 χ^2 检验,相关性分析采用等级变量 Spearman 相关分析,Logistic 回归分析用于二分类变量的多因素相关分析,纳入变量的水准为单因素分析 $P<0.2$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ER α 的表达 ER α 阳性部位定位于肿瘤细胞核或细胞质(图 1),表达阳性率为 36.0%(103/286)。其中在女性患者中的表达要显著高于男性患者($P=0.004$),肿瘤最大直径小于或等于 3 cm 的患者显著高于肿瘤直径大于 3 cm 的患者($P<0.01$),见表 1。

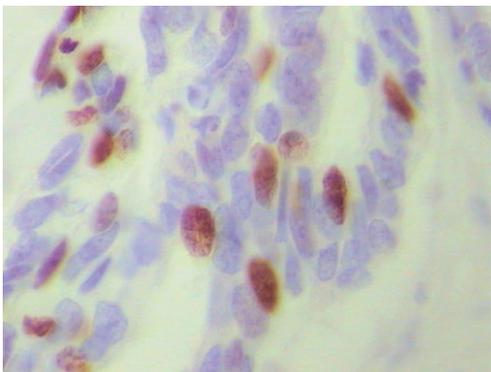


图 1 腺癌中 ER 的阳性表达 SP 法(HE \times 400)

2.2 EGFR 基因突变 在 286 例标本中共检测到 62 例(21.7%)EGFR 基因突变:29 例(10.1%)为 19 号外显子碱基缺失突变;33 例(11.5%)为 21 号外显子碱基置换突变。在携带 19 号外显子碱基缺失突变的 29 位患者中,23 例为 E746-

A750del 突变,3 例为 L747-S752del 突变,仅有 2 例为 L747-A750del 突变。在携带 21 号外显子碱基置换突变的 33 位患者中,28 例为 L858R 突变,5 例为 L861Q 突变。本研究没有发现 19 号和 21 号外显子同时突变的病例。EGFR 基因突变和患者临床病理之间的关系见表 2。其中 EGFR 基因突变在女性、腺癌、肿瘤直径小于或等于 3 cm 的患者显著增多($P<0.01$),在 ER α 表达阳性患者中显著高于 ER α 阴性者($P<0.01$)。经过单因素分析后,把 $P<0.20$ 的变量纳入到 Logistic 回归模型中进行多因素分析,结果显示女性($OR=2.975$; 95%CI:1.550~5.721; $P=0.001$)、ER α 阳性表达($OR=3.906$; 95%CI:1.996~7.692; $P<0.01$)为 EGFR 基因突变的独立影响因素。由于鳞癌的标本中没有检测到 EGFR 基因的突变,所以没有把病理分型选进模型之中。

表 1 ER α 在非小细胞肺癌中的表达与临床特征的关系(n)

项目	ER α 表达		P
	阴性	阳性	
年龄(岁)			
≤ 65	135	83	
> 65	48	20	0.194 0
性别			
男	135	59	
女	48	44	0.004 0
组织类型			
鳞癌	54	24	
腺癌	129	79	0.258 0
分化			
高~中	118	76	
低	65	27	0.106 0
TNM 分期			
I	80	42	
II~IV	103	61	0.629 0
肿瘤大小(cm)			
≤ 3	66	59	
> 3	117	44	0.000 5
淋巴结转移			
N0	96	44	
N1~3	87	59	0.114 0

表 2 EGFR 突变与临床特征的关系(n)

项目	EGFR 突变		P
	阴性	阳性	
年龄(岁)			
≤ 65	168	50	
> 65	56	12	>0.05
性别			
男	166	28	
女	58	34	<0.01

续表 2 EGFR 突变与临床特征的关系 (n)

项目	EGFR 突变		P
	阴性	阳性	
组织类型			
鳞癌	78	0	
腺癌	146	62	<0.01
分化			
高~中	149	45	
低	75	17	>0.05
TNM 分期			
I	96	26	
II~IV	128	36	>0.05
肿瘤大小(cm)			
≤3	86	39	
>3	138	23	<0.01
ERα			
阴性	154	29	
阳性	70	33	<0.01

3 讨 论

肺癌的发病率和病死率高居各类恶性肿瘤之首,近几十年来女性肺癌发病率呈较快增长的趋势,男女患者病情发展及预后也不同^[3]。尤为引人关注的是流行病学的一些改变:(1)肺腺癌的发病率显著升高,成为最常见的病理类型。(2)非吸烟者肺癌发病率上升,尤其是女性发生率明显上升,以腺癌为主。(3)女性肺癌发病率和病死率持续上升,已成为女性最主要的恶性肿瘤死因^[4]。(4)晚期女性 NSCLC 患者较男性存在明显的生存优势。确切的原因仍不很清楚,但较多的证据显示性激素及其受体可能起了重要作用。

EGFR 及其介导的信号转导是 NSCLC 发生、发展的重要因素^[5]。最新研究发现,ER 在 EGFR 的信号通路中发挥着重要的作用,与 EGFR 信号通路存在广泛的交叉调控^[6]。EGFR 介导的信号转导系统所引起的细胞效应包括细胞增殖、相互黏附、转移、抑制细胞凋亡及促进血管生成等多个方面。目前较为明确的主要有 3 条途径:(1)有丝分裂原活化蛋白激酶(Ras-RAF-MEK-MAPK)途径;(2)PI3K-AKT-mTOR 途径;(3)JAK-STAT 途径。导致 EGFR 通路持续激活的因素有很多,配体的不断产生、受体的高表达以及 EGFR 酪氨酸激酶的突变都可以使其持续处于激活状态^[7]。基于 EGFR 基因激酶域基因突变理论研制的靶向药物治疗给 NSCLC 患者带来了新契机,抗 EGFR 的靶向治疗主要有两种:EGFR 单克隆抗体和小分子 EGFR 酪氨酸激酶拮抗剂(TKI)。临床试验表明多种有 EGFR 突变的肿瘤对 EGFR-TKI 敏感,临床有效率 10%~30%^[5]。但是单一应用 EGFR-TKI 的较低的临床有效率及较高的继发性耐药仍无法解决^[8],因为单一靶点的治疗往往阻断不够完全,因此效果差;同时因为细胞内相关信号通路的交互作用,阻断其中一条通路又会导致其他通路的回馈性启动,进而诱导继发性耐药的发生。所以寻找多靶点阻断的联合用药是未来的发展方向,性激素受体所介导的信号通路可能成为肺

癌潜在的治疗靶点。

雌激素的调控作用主要通过 ERα 来发挥作用。ERα 在 EGFR 的信号传导通路中发挥着重要作用。Raso 等^[9]的研究显示 NSCLC 中 ERα 的阳性表达和 EGFR 突变存在正相关,与本研究结果相似。而 Nose 等^[10]的研究则显示,EGFR 突变和 ERβ 而不是 ERα 的阳性表达相关,并且在 EGFR 基因突变阳性的患者中 ERβ 的阳性表达预示着患者较长的无瘤生存时间。虽然本研究结果显示 ERα 与 EGFR 相关,但 ERα 是否在 EGFR 信号通路中起作用及如何作用,现在仍未完全明确。在肺癌的 ERα 信号通路中,雌激素与 ER 结合后主要通过非基因途径产生效应^[11]。雌激素可以直接刺激 NSCLC 细胞核中雌激素反应基因的转录并且还可以刺激 EGFR 信号通路的传导。在雌激素刺激下 NSCLC 细胞株的 EGFR 配体会快速释放,从而激活 EGFR 及 MAPK 通路^[11]。另外,雌激素可以使 NSCLC 细胞株的 EGFR 蛋白表达下降,而雌激素拮抗剂可以使 EGFR 蛋白表达升高^[7],这表明 EGFR 通路和 ER 通路之间可能存在一定的交叉互补关系。

多项研究结果表明,阻断或干扰 ER 信号的传导,都能抑制其介导的肿瘤发展:如芳香化酶抑制剂^[12],选择性雌激素受体调节剂^[13],选择性雌激素受体下调剂(氟维司群等)^[11]。目前有多项临床实验正在进行中,以评估联合氟维司群和 EGFR 抑制剂对晚期 NSCLC 的临床价值。针对 EGFR 和 ER 两条信号通路的治疗 II 期临床研究显示出良好的协同治疗效果^[14]。

ER 及 EGFR 信号通路的交叉调控能否解释女性肺腺癌发生发展的机制,EGFR-TKI 的继发性耐药是否与 ER 通路的激活有关,这些都需要进一步的研究验证,希望本研究能更深入理解肺癌发病分子机制、开发基于雌激素受体和 EGFR 的多靶点联合治疗药物提供一个思路。

参考文献

- [1] Siegfried JM. Hormone replacement therapy and decreased lung cancer survival[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(1):9-10.
- [2] Marks JL, Broderick S, Zhou Q, et al. Prognostic and therapeutic implications of EGFR and KRAS mutations in resected lung adenocarcinoma[J]. J Thorac Oncol, 2008, 3(2):111-116.
- [3] Henschke CI, Yip R, Miettinen OS. Women's susceptibility to tobacco carcinogens and survival after diagnosis of lung cancer[J]. JAMA, 2006, 296(2):180-184.
- [4] Kligerman S, White C. Epidemiology of lung cancer in women: risk factors, survival, and screening[J]. AJR Am J Roentgenol, 2011, 196(2):287-295.
- [5] Sequist LV, Lynch TJ. EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer: an evolving story[J]. Annu Rev Med, 2008, 59(2):429-442.
- [6] Migliaccio A, Castoria G, Giovannelli P, et al. Cross talk between epidermal growth factor (EGF) receptor and extra nuclear steroid receptors in cell lines[J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 327(1/2):19-24.
- [7] Fujimoto N, Wislez M, Zhang J, et al. (下转第 2886 页)

程^[9]。本研究发现,在 TNBC 中 GSK-3 β 表达较 NTNBC 明显增高。因此,其是参与浸润性乳腺癌的 EMT 过程中 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键成分,GSK-3 β 持续高表达伴随 E-cadherin 表达缺失与 TNBC 高侵袭性、低生存期密切相关。

Snail 是近年发现的锌指转录因子,是肿瘤细胞 EMT 过程中的关键调节者^[10],其高表达和 E-cadherin 低表达,在肿瘤细胞浸润、迁移过程中发挥着重要作用^[11]。研究发现,Snail 可作为乳腺癌的独立负性诊断指标^[12],即 Snail 高表达,则乳腺癌分化差,侵袭性强,易转移,生存期短。Côme 等^[13]发现乳腺癌组织中 Snail、Slug 高表达能抑制 E-cadherin 启动子,导致其部分表达或完全缺失,且 Snail、Slug 在乳腺浸润性导管癌中高表达与淋巴结转移密切相关。本研究显示,TNBC 中 Snail 较 NTNBC 中的表达水平明显增高,在 E-cadherin 阴性表达样本中的阳性表达率显著高于 E-cadherin 阳性表达组,与 Côme 等^[13]的结果一致,表明 Snail 表达与 E-cadherin 呈负相关,TNBC 更具有强浸润、迁移能力,并易于发生淋巴结转移。

综上所述,TNBC 中 GSK3 β 、Snail 高表达、E-cadherin 部分表达或完全缺失,与乳腺癌高侵袭性、易转移、生存期短密切相关,联合检测 GSK3 β 、Snail、E-cadherin 的表达,对判断 TNBC 的复发转移及预后有重要的意义。

参考文献

[1] Wang J, Xie X, Wang X, et al. Locoregional and distant recurrences after breast conserving therapy in patients with triple-negative breast cancer: A meta-analysis[J]. *Surgical Oncology*, 2013, 22(4): 247-255.

[2] 林坚, 胡梅齐, 彭炜, 等. 三阴乳腺癌的临床病理特征及预后[J]. *中国癌症杂志*, 2010, 20(6): 462-465.

[3] Sarrió D, Rodríguez-Pinilla SM, Hardisson D, et al. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(4): 989-997.

[4] Kashiwagi S, Yashiro M, Takashima T, et al. Significance

of E-cadherin expression in triple-negative breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2010, 103(2): 249-255.

[5] Baranwal S, Alahari SK. Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 384(1): 6-11.

[6] 倪露露, 李雁, 任宏丽. Wnt 信号通路和肿瘤干细胞在肿瘤复发转移中作用机制的研究述评[J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(6): 1341-1344.

[7] Chen Y, Yue S, Xie L, et al. Dual Phosphorylation of suppressor of fused (Sufu) by PKA and GSK3 beta regulates its stability and localization in the primary cilium[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(15): 13502-13511.

[8] 曾益新. 肿瘤学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 67-68.

[9] Prasad CP, Rath G, Mathur S, et al. Expression analysis of E-cadherin, Slug and GSK3beta in invasive ductal carcinoma of breast[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9(3): 325-332.

[10] Battle E, Sancho E, Franci C, et al. The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells[J]. *Nature Cell Biology*, 2000, 2(2): 84-89.

[11] Becker KF, Rosivatz E, Blechschmidt K, et al. Analysis of the E-cadherin repressor Snail in primary human cancers [J]. *Cells Tissues Organs*, 2007, 185(1/2/3): 204-212.

[12] Muenst S, Däster S, Obermann EC, et al. Nuclear expression of snail is an independent negative prognostic factor in human breast cancer [J]. *Dis Markers*, 2013, 35(5): 337-344.

[13] Côme C, Magnino F, Bibeau F, et al. Snail and slug play distinct roles during breast carcinoma progression [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(18): 5395-5402.

(收稿日期: 2015-01-21 修回日期: 2015-03-22)

(上接第 2883 页)

High expression of ErbB family members and their ligands in lung adenocarcinomas that are sensitive to inhibition of epidermal growth factor receptor[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(24): 11478-11485.

[8] Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer; correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. *Science*, 2004, 304(5676): 1497-1500.

[9] Raso MG, Behrens C, Herynk MH, et al. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors identifies a subset of NSCLCs and correlates with EGFR mutation[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(17): 5359-5368.

[10] Nose N, Sugio K, Oyama T, et al. Association between estrogen receptor-beta expression and epidermal growth factor receptor mutation in the postoperative prognosis of adenocarcinoma of the lung [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(3): 411-417.

[11] Stabile LP, Lyker JS, Gubish CT, et al. Combined targeting of the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer shows enhanced antiproliferative effects[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(4): 1459-1470.

[12] Marquez-Garban DC, Chen HW, Goodglick L, et al. Targeting aromatase and estrogen signaling in human non-small cell lung cancer[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1155(11): 194-205.

[13] 朱晓莉, 张祖贻, 朱毅. 肺癌雌激素受体表达与三苯氧胺拮抗治疗的研究[J]. *江苏医药*, 2002, 28(9): 641-643.

[14] Garon E B, Pietras R J, Finn R S, et al. Antiestrogen fulvestrant enhances the antiproliferative effects of epidermal growth factor receptor inhibitors in human non-small-cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2013, 8(3): 270-278.

(收稿日期: 2015-01-22 修回日期: 2015-03-23)