

· 短篇论著 ·

非小细胞肺癌表皮生长因子受体突变与表皮生长因子受体和 ki67 表达相关性分析

郑神英 余琦 李宁

【摘要】 目的 检测非小细胞肺癌(NSCLC)患者表皮生长因子受体(EGFR)基因外显子的突变情况并探讨其与EGFR和ki67表达之间的联系。**方法** 用测序法检测80例NSCLC患者标本的基因突变情况,并用免疫组织化学法检测EGFR和ki67的表达。**结果** 80例NSCLC患者中有16例存在EGFR基因突变,其中5例为第19外显子缺失突变,11例为第21外显子替代突变。女性患者突变率高于男性患者;腺癌患者突变率高于非腺癌患者。EGFR和ki67的表达与EGFR基因突变无关。**结论** EGFR基因突变率以女性和腺癌患者较高,且与EGFR和ki67表达无关。

【关键词】 癌,非小细胞肺; 受体,表皮生长因子; 突变; ki67

肺癌是最常见的肺原发性恶性肿瘤,也是最具致死性的恶性肿瘤之一。目前肺癌是全世界癌症死因的第1位,5年生存率只有15%^[1]。2008年全世界有140万人死于肺癌^[2],而且每年人数都在上升。非小细胞肺癌(NSCLC)占肺癌的75%~80%,但是只有约20%的患者能够根治性切除或者放射治疗,5年生存率<10%^[3]。由于超过60%的患者在诊断时已经处于中晚期^[4],所以常规治疗只能改善症状而不能获得长期疗效。而表皮生长因子受体阻滞剂的出现给这些患者的治疗带来了新的希望。表皮生长因子受体(EGFR)是原癌基因CerbB-1的表达产物,EGFR家族包括EGFR、CerbB-2、CerbB-3、CerbB-4四个成员,均位于细胞膜上。EGFR的高表达可以促进肿瘤血管生成以及肿瘤细胞的增殖、黏附、侵袭、转移^[5]。正常肺组织中EGFR不表达或低表达,而在NSCLC患者中常表现为活性增高。多项研究显示40%~80%的NSCLC患者存在EGFR的高表达^[6]。在美国人群中EGFR突变率为13%,而在亚洲人群中EGFR突变率接近30%^[7]。因此EGFR成为最有前途的特异性治疗靶点之一。而目前大多数回顾性研究已经发现EGFR突变的NSCLC中,70%~80%对表皮生长因子受体阻滞剂有反应,而EGFR无突变者只有10%有反应^[8]。由此EGFR的突变检测会对NSCLC患者的个体化治疗有很大帮助。而对于EGFR和ki67表达与基因突变之间的关系尚不明朗。本研究旨在探讨NSCLC患者中EGFR的突变情况以及与EGFR和ki67之间的关系。

一、材料与方

1. 材料:收集我院病理科2010~2011年存档标本或新鲜标本共80例,均来自未接受表皮生长因子受体阻滞剂治疗的NSCLC患者。其中手术切除标本48例,纤维支气管镜活检或穿刺标本32例。

2. EGFR基因突变检测:所有蜡块切4 μm厚切片5~10张,显微镜下进行微切割,富集肿瘤细胞,石蜡组织充分消化后用Nucleic Acid and Protein Purification试剂盒(MN公司)提取DNA。将提取的基因组DNA应用PCR扩增法,分别扩增EGFR第18~21外显子,其引物序列分别是第18号外显子上游引物

(F):5'-CTGAGGTGACCCTTGTCTCTG-3',下游引物(R):5'-CCAAACACTCAGTGAAACAAAGAG-3';第19号外显子上游引物(F):5'-TGCCAGTTAACGTCTTCCTT-3',下游引物(R):5'-CAGGGTCTAGAGCAGAGCAG-3';第20号外显子上游引物(F):5'-CATTTCATGCGTCTTCACCTG-3',下游引物(R):5'-TTATCTCCCTCCCGTATC-3';第21号外显子上游引物(F):5'-CTTCCATGATGATCTGTCC-3',下游引物(R):5'-TTATCTCCCTCCCGTATC-3'。PCR扩增产物纯化后用ABI 3730测序仪进行双向测序,测序结果采用Chromas软件进行分析。

3. 免疫组织化学检测:所有标本均经10%甲醛溶液固定,石蜡包埋,按4 μm连续切片,烘干。采用SP法行EGFR和ki67蛋白表达检测并设立阴性对照。EGFR蛋白着色定位于细胞质和细胞膜上,ki67蛋白着色定位于细胞核上,评分根据着色细胞所占百分比和染色强度综合评价,<10%记为阴性,≥10%记为阳性。

4. 统计学分析:应用SPSS 17.0软件,应用卡方检验分析EGFR突变与临床参数之间的关系,Spearman等级相关分析评价EGFR基因突变率与EGFR蛋白表达和ki67表达的关系, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

二、结果

1. 临床资料:80例NSCLC标本均成功检测。男49例,女31例;年龄35~86岁,中位年龄59岁;无吸烟史患者37例,有吸烟史患者43例;组织病理学证实腺癌患者52例,非腺癌患者28例。

2. EGFR基因突变状况:80例NSCLC标本中16例检测出EGFR突变,总检出率20%,其中第19号外显子5例突变,突变检出率为6.25%,均为杂合缺失突变;第21号外显子11例突变,突变率为13.75%,均为杂合替代突变。

3. EGFR基因突变与临床病理特征之间的关系(表1):80例EGFR基因突变检测患者中,女性突变率高于男性,差异有统计学意义[突变率分别为32.3%(10/31)、12.2%(6/49), $P = 0.029$];腺癌显著高于非腺癌,二者差异有统计学意义[突变率分别为28.8%(15/52)、3.6%(1/28), $P = 0.007$]。不吸烟患者高于吸烟患者,二者差异没有统计学意义[突变率分别为27%(10/37)、13.9%(6/43), $P = 0.145$];EGFR基因突变与年龄、分化程度、肿瘤大小、淋巴结转移及标本类型无关($P > 0.05$)。

4. EGFR蛋白表达情况及与临床病理特征之间的关系:80例

表1 NSCLC组织EGFR基因突变检测及EGFR与ki67表达与临床参数的关系[例,(%)]

临床特征	例数	EGFR 基因			EGFR 表达			ki67 表达		
		突变[例,(%)]	χ^2 值	P 值	阳性[例,(%)]	χ^2 值	P 值	阳性[例,(%)]	χ^2 值	P 值
性别			4.753	0.029		0.905	0.341		9.243	0.002
男	49	6(12.2)			42(85.7)			43(87.8)		
女	31	10(32.3)			24(77.4)			18(58.1)		
年龄			1.270	0.260		0.269	0.604		3.078	0.079
>60岁	35	9(25.7)			28(80.0)			30(85.7)		
≤60岁	45	7(15.6)			38(84.4)			31(68.9)		
组织学类型			7.266	0.007		0.308	0.579		4.042	0.044
腺癌	52	15(28.8)			42(80.8)			36(69.2)		
非腺癌	28	1(3.6)			24(85.7)			25(89.3)		
吸烟史			2.124	0.145		0.758	0.384		4.927	0.026
有	43	6(13.9)			34(79.1)			37(86.1)		
无	37	10(27.0)			32(86.5)			24(64.9)		
分化程度			2.088	0.148		0.218	0.641		4.636	0.031
高分化	19	6(31.6)			15(78.9)			11(57.9)		
中低分化	61	10(16.4)			51(83.6)			50(81.9)		
肿瘤大小			0.616	0.433		0.810	0.368		0.013	0.911
≥3 cm	43	10(23.3)			37(86.0)			33(76.7)		
<3 cm	37	6(16.2)			29(78.4)			28(75.7)		
淋巴结转移			0.748	0.387		0.444	0.505		0.797	0.372
有	23	6(26.1)			20(86.9)			16(69.6)		
无	57	10(17.5)			46(80.7)			45(78.9)		
标本类型			0.117	0.732		0.058	0.810		0.046	0.830
手术	48	9(18.8)			40(83.3)			37(77.1)		
穿刺或气管镜	32	7(21.8)			26(81.3)			24(75.0)		

标本中EGFR阳性66例,阳性率为82.5%。EGFR表达与性别、年龄、组织学类型、吸烟史、分化程度、肿瘤大小、淋巴结转移和标本类型均无关系($P>0.05$)。

5. ki67蛋白表达情况及与临床病理特征之间的关系:80例标本中ki67阳性61例,阳性率为76.25%。其中男性高于女性($P=0.002$);非腺癌高于腺癌($P=0.044$),进一步分析鳞癌高于腺癌($P=0.023$);有吸烟史高于无吸烟史者($P=0.026$);中低分化高于高分化($P=0.031$)。与年龄、肿瘤大小、淋巴结转移和标本类型无关($P>0.05$)。

6. EGFR和ki67蛋白表达与EGFR基因突变的关系(表2,3):EGFR蛋白表达与基因突变之间无关($r=-0.016$, $P=0.885$);ki67蛋白表达与EGFR基因突变之间也无相关性($r=-0.088$, $P=0.437$)。

表2 EGFR表达与EGFR基因突变的关系(例)

EGFR 表达	EGFR 基因突变		合计
	-	+	
-	11	3	14
+	53	13	66
合计	64	16	80

注: $r=-0.016$, $P=0.885$

表3 ki67表达与EGFR基因突变的关系(例)

ki67 表达	EGFR 基因突变		合计
	-	+	
-	14	5	19
+	50	11	61
合计	64	16	80

注: $r=-0.088$, $P=0.437$

三、讨论

随着肿瘤个体化治疗观念深入及针对EGFR为分子靶点的靶向药物的出现使得EGFR基因突变的检测越来越有必要。大量临床试验表明,EGFR的突变状态是决定酪氨酸激酶抑制剂(TKIs)药物,如吉非替尼和厄罗替尼一线治疗的关键因素。腺癌、不吸烟、女性和亚裔等群体具有更高的EGFR突变率,是TKIs一线治疗的优势人群,这两种药物治疗有效率高。相反,对EGFR基因不存在突变的患者,这两种药物的治疗有效率低,甚至无效。有研究显示在亚洲、美国和欧洲,EGFR突变患者对TKIs药物的有效率为55%~91%,而未经过筛选的患者有效率仅为8.0%~8.9%^[9]。

目前EGFR突变检测的方法很多,包括直接测序法、PCR酶

切法,探针扩增阻滞突变系统(ARMS)等,但目前对最佳方法尚没有共识。测序法作为判断EGFR突变的金标准是使用最多的方法。我们采用直接测序法分析了80例NSCLC患者的EGFR基因突变情况,结果显示总突变率20%,稍低于以往文献报道,这可能与直接测序法不敏感和影响因素较多有关,有文献指出肿瘤细胞小于25%的病例中很难检测出突变^[10],直接测序法的影响因素包括:等位基因的拷贝数,PCR扩增的不平衡,非肿瘤细胞中混杂有野生型的等位基因以及从石蜡包埋组织中提取DNA时可能人为地产生序列误差^[11]。EGFR基因位于7号染色体短臂7p12~14区,由28个外显子组成,大于90%的基因突变位于19~21^[12]。其中更以第19和21外显子为主;第19外显子以743~755位点的杂合缺失突变为主,而第21外显子以858密码子杂合点突变为主。本次检测16例突变中5例19外显子突变,11例21外显子突变,符合文献报道。

大量的研究表明EGFR基因突变与女性、不吸烟和腺癌密切相关^[13]。我们检测的80例患者中不吸烟患者相比较于吸烟患者突变率较高,但研究表明吸烟并不对EGFR的突变起到保护作用^[14],这与以往的研究结果相似,但差异没有统计学意义,分析原因可能与病例较少和测序法不敏感有关;而检测的EGFR突变除1例为鳞癌外均发生在腺癌患者,说明腺癌患者相比较鳞癌患者更易突变,由于不同组织类型EGFR突变率差别较大的原因尚不明确,所以目前对于非腺癌患者是否需要EGFR检测存在较大争议。

所检测样本中手术标本相比较支气管镜、穿刺标本突变率无差异,表明支气管镜及穿刺小组织中也能检测出EGFR突变,且能较好反映肿瘤组织中基因突变情况。

本次检测中EGFR蛋白阳性率为82.5%,与文献报道EGFR蛋白在NSCLC中表达率多在50%以上符合。关于EGFR蛋白表达与临床病理特征之间的关系,相关文献报道意见不一。分析可能原因有:抗体选择不同和评分的主观性等。本次检测中发现EGFR与性别、年龄、组织学类型、肿瘤大小、分化程度和淋巴结转移等临床病理特征均无关。EGFR蛋白表达是否能作为基因突变的筛选和作为临床应用EGFR-TKIs的标准目前意见也不统一。本次检测中,EGFR蛋白表达与基因突变之间无关($P=0.883$),因此不支持将EGFR蛋白表达作为基因突变的筛选和临床应用EGFR-TKIs药物的标准。

ki67是检测肿瘤细胞增殖活性最可靠的指标之一,与肿瘤恶性程度、浸润性、转移和复发等有关。但是关于ki67与NSCLC的研究比较少。本次检测中,发现ki67多见于男性、鳞癌、吸烟和分化较低者,与秦玉东等^[15]报道ki67多见于NSCLC中的鳞癌和低分化病例相符合。宋作庆等^[16]报道ki67的表达随癌细胞分化程度的降低而逐渐升高,可能是因为低分化癌组织增殖能力强于高分化癌组织。关于ki67与EGFR基因突变之间有没有关系还不清楚。本次检测中没有发现ki67与EGFR基因突变相关,不过ki67反映肿瘤组织的增殖能力,过高的增殖会不会对EGFR基因突变有影响还需要进一步研究。

由上可知,直接测序法是检测NSCLC中EGFR突变的有效方法。NSCLC患者中,以女性和腺癌患者突变多见,以第19号

外显子缺失突变和第21号外显子替代突变为主。EGFR蛋白表达与临床病理特征无关,与EGFR基因突变也无关,因此不能作为临床应用EGFR-TKIs药物依据。ki67表达多见于男性、鳞癌、吸烟和分化较低的患者,但与EGFR基因突变无关。

参 考 文 献

- [1] Lecia VS, Lynch TJ. EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. *Annu Rev med*, 2008, 59:429-442.
- [2] Doebele RC, Oton AB, Peled N, et al. New strategies to overcome limitations of reversible EGFR tyrosine inhibitor therapy in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2010, 69:1-12.
- [3] 游佳, 赵新宇, 陈县城, 等. 靶向EGFR的RNA干扰诱导非小细胞肺癌细胞A549凋亡的研究. *中华肿瘤防治杂志*, 2008, 15:1205-1209.
- [4] Reek M, Crinò L. Advances in anti-VEGF and anti-EGFR therapy for advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2009, 63:1-9.
- [5] Irmer D, Funk JO, Blaukat A. EGFR kinase domain mutations-functional impact and relevance for lung cancer therapy. *Oncogene*, 2007, 26:5693-5701.
- [6] Kim TY, Han SW, Bang YJ. Chasing targets for EGFR tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn*, 2007, 7:821-836.
- [7] Vincent A, Miller. EGFR mutations and EGFR tyrosine kinase inhibition in non-small cell lung cancer. *Seminars in Oncology Nursing*, 2008, 24:27-33.
- [8] Suda K, Onozato R, Yatabe Y, et al. EGFR T790M mutation A double role in lung cancer cell survival? *J Thorac Oncol*, 2009, 4:1-4.
- [9] Pao W, Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10:760-774.
- [10] Dacic S. EGFR assays in lung cancer. *Adv Anat Pathol*, 2008, 15:241-247.
- [11] 梁乃新, 杨华夏, 李单青. 表皮生长因子受体分子标记物及其检测方法在非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂疗效预测中的研究进展[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2011, 5:792-795.
- [12] 于国华, 董丽萍, 刘淑真. EGFR基因突变与吉非替尼的疗效和获得性耐药关系的研究概况. *中华肿瘤防治杂志*, 2007, 14:474-476.
- [13] Suda K, Tomizawa K, Mitsudomi T. Biological and clinical significance of KRAS mutations in lung cancer; an oncogenic driver that contrasts with EGFR mutation. *Cancer Metastasis Rev*, 2010, 29:49-60.
- [14] Uramoto H, Mitsudomi T. Which biomarker predicts benefit from EGFR-TKI treatment for patients with lung cancer. *Br J Cancer*, 2007, 96:857-863.
- [15] 秦玉东, 胡文芳, 黄汉涛, 等. ki-67基因在非小细胞肺癌中的表达及意义. *数理医药学杂志*, 2003, 16:399-400.
- [16] 宋作庆, 徐萧洪, 韦森, 等. 肝素酶在非小细胞肺癌中的表达及临床意义. *中国肺癌杂志*, 2009, 12:785-788.

(收稿日期:2011-12-13)

(本文编辑:戚红丹)