

非小细胞肺癌上皮-间质转化与 EGFR 突变以及临床病理特征之间的关系

邓沁芳,周彩存,苏春霞

Clinicopathologic Features and Epidermal Growth Factor Receptor Mutations Associated with Epithelial-mesenchymal Transition in Non-small Cell Lung Cancer

DENG Qin-fang, ZHOU Cai-cun, SU Chun-xia

Department of Oncology, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University, Shanghai 200433, China

Corresponding Author: ZHOU Cai-cun, E-mail: caicunzhou@yahoo.com.cn

Abstract **Objective** To explore clinicopathologic features and epidermal growth factor receptor mutations associated with epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. **Methods** The status of epithelial-mesenchymal transition of 62 patients with surgically resected non-small cell lung cancer specimens were tested by immunohistochemical staining. The rate of tumor epithelial phenotype was calculated with stratification factors of clinicopathologic features and EGFR genotype. Statistical significance was assessed by chi-square tests and logistic regression. **Results** The overall frequency rate of epithelial phenotype among 62 NSCLC was 35.48% (22 of 62). The frequency of epithelial phenotype (E-cadherin positive) was greater for EGFR mutants versus wild types (77.78% versus 18.18%; $P < 0.0001$); females patients versus males patients (54.55% versus 25%; $P = 0.02$); adenocarcinomas versus other histology (39.47% versus 29.17%; $P = 0.4087$); never smokers versus ever smokers (42.42% versus 27.59%; $P = 0.2231$); age < 60 year versus age ≥ 60 year (43.33% versus 28.12%; $P = 0.211$); early-stage disease versus advanced disease (38.24% versus 32.12%; $P = 0.6178$). **Conclusion** The clinicopathologic features of patients with lung cancer showing epithelial markers tend to be women, nonsmokers, adenocarcinoma and with EGFR mutation.

Key words: Epithelial-mesenchymal transition; Lung cancer; Epidermal growth factor receptor; Tyrosine kinase inhibitor

摘要:目的 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)上皮-间质转化(EMT)与表皮生长因子受体(EGFR)突变和临床病理特征之间的关系。方法 采用免疫组化法检测 NSCLC 患者癌组织中 E-钙黏素和波蛋白的表达情况。采用卡方检验和 Logistic 回归分析,探讨临床病理特征和 EGFR 基因型 NSCLC 中 EMT 的影响。结果 62 例 NSCLC 标本中,上皮表型 35.48% (22/62)。EGFR 突变 NSCLC 中,上皮表型显著高于野生型(77.78% vs 18.18%; $P < 0.0001$);女性显著高于男性(54.55% vs 25%; $P = 0.02$);腺癌高于其他病理类型(39.47% vs 29.17%; $P = 0.4087$);不吸烟者稍高于吸烟者(42.42% vs 27.59%; $P = 0.2231$);年龄 < 60 岁和年龄 ≥ 60 岁组差异无统计学意义(43.33% vs 28.12%; $P = 0.211$),早期肺癌与晚期肺癌组差异无统计学意义(38.24% vs 32.12%; $P = 0.6178$)。结论 EGFR 突变型、女性、非吸烟者、腺癌倾向于上皮表型,与 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂疗效分布人群的临床特征相一致。

关键词: 上皮-间质转化;肺癌;表皮生长因子受体;酪氨酸激酶抑制剂

中图分类号:R730.23 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2008)04-0258-05

0 引言

肺癌是世界上恶性肿瘤死亡的首要原因。尽管

临床医师不断提高了诊治水平,肺癌对现有的手术及化放疗的反应仍难尽人意。分子靶向治疗由于其选择性高、毒性低而倍受青睐。针对肿瘤分子靶向治疗中存在的如何选择合适的患者人群及如何预测疗效等问题也成为日益关注的焦点。

上皮细胞-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是上皮细胞在与周围间质的相互作用过程中逐渐获得了某些间质细胞特有性状的现

收稿日期:2007-05-31;修回日期:2007-09-07
基金项目:上海市科委课题资助项目(04DZ19109)
作者单位:200433 上海,同济大学附属上海市肺科医院
肿瘤科
通讯作者:周彩存, E-mail:caicunzhou@yahoo.com.cn
作者简介:邓沁芳(1976-),女,硕士,主治医师,主要从事非小细胞肺癌 EGFR TKI 耐药机制的研究

象,以 E-钙黏素(E-cadherin)、连环蛋白(catenin)等表征上皮型指标蛋白的丧失以及波蛋白(vimentin)和纤维粘连蛋白(fibronectin)等表征间质型指标蛋白的获得为主要特征,并且与肿瘤细胞的原位侵袭和远处转移有着密切的关系^[1]。最新研究显示,上皮型的肺癌对表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor, EGFR)酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)治疗较间质化改变的敏感,提示肺癌的 EMT 状态有望成为靶向治疗疗效的预测因素应用于临床^[2,3]。本研究将对非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)的 EMT 状态与 EGFR 基因型以及患者临床病理特征间的关系进行探讨,为 E-cadherin、vimentin、fibronectin 等 EMT 标志物作为治疗预测因子最终应用于临床做前期研究。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集上海市肺科医院 2003 年 9 月~2004 年 6 月行手术切除并经病理证实的 NSCLC 标本 62 例。其中男 40 例、女 22 例。中位年龄 62 岁(39~83 岁);病理类型:腺癌 38 例、鳞癌 24 例、鳞腺混合癌 2 例;按 1997 年 UICC 修订的肺癌 TNM 病理分期标准:I 期 29 例、II 期 5 例、III 期 25 例和 IV 期 3 例。各例术前均未接受化疗和放疗。

1.2 NSCLC 的 EGFR 突变分析

采用上海华舜生物有限公司小量组织细胞基因组 DNA 快速抽提纯化试剂盒抽提冰冻组织的基因组 DNA。按照 Paez 等^[4]报道的方法,采用巢式 PCR 技术对 EGFR 基因的 18、19、21 外显子进行扩增。扩增片段包含外显子及其相连的内含子部分。PCR 条件:变性 95 15 min;95 20 s、60 30 s 和 72 1 min 循环 35 次;延伸 72 10 min。PCR 产物送交上海惠康生物技术有限公司进行测序鉴定 EGFR 基因 18、19 和 21 外显子突变区域。

1.3 免疫组织化学检测

采用免疫组织化学方法(SP 法)检测 NSCLC 组织中 E-cadherin 和 vimentin 的表达。E-cadherin 和 vimentin 抗体均为鼠抗人单克隆抗体,购自上海长岛公司,工作液浓度为 1:100。石蜡切片经脱蜡、水化、抗原修复等处理后加入一抗 4 过夜。二抗 37 30 min;DAB 显色;苏木素复染;盐酸酒精分化;脱水、透明;中性树脂封固。用已知阳性切片做阳性对照,PBS 代替一抗做阴性对照。

结果判定:胞膜和(或)胞浆着棕黄色染色颗粒提示阳性显色结果。随机观察 10 个高倍视野,根据

切片中癌细胞阳性数的有、无及阳性细胞的百分率将表达结果分为:阴性(-)为无棕黄色染色或染色阳性细胞数 < 10%;弱阳性(+)为阳性细胞数 10%~24%;中等阳性(++)为阳性细胞数 25%~49%;强阳性(+++)为阳性细胞数 50%。

1.4 统计学方法

采用卡方检验分析 EMT 现象和年龄、性别、肿瘤分期、组织类型、吸烟情况以及 EGFR 基因型等因素的关系;Logistic 回归分析进一步检验各因素与 EMT 状态的关系;计算 Kappa 值对 E-cadherin 染色和 vimentin 染色表征 EMT 状态一致性进行检验。所有统计学分析均采用 SAS 9.0 进行, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 的 EGFR 突变分析

62 例肺癌标本中,18 例患者存在 EGFR 基因的突变,突变率为 29.03%(18/62)。其中 12 例为缺失突变,6 例点突变,EGFR 基因点突变或缺失突变均为杂合型。所有缺失突变都发生在 19 外显子的密码子的 EGFR TK 区域。所有点突变都发生在 21 外显子的密码子 858,造成 T-G 转换。但未检测到 18 外显子的基因突变,见图 1。

2.2 E-cadherin 和 vimentin 在 NSCLC 的表达及与 EGFR 基因型的关系

E-cadherin 主要定位于肿瘤细胞膜,少量细胞浆染色,在 NSCLC 组织中阳性表达率为 35.48%(22/62),见图 2。EGFR 基因突变的肿瘤 E-cadherin 的表达水平显著高于 EGFR 野生型(77.78% vs 18.18%, P < 0.0001)。

vimentin 主要表达于胞膜和胞浆,阳性表达率为 67.74%(42/62),见图 3。EGFR 野生型 vimentin 表达水平较突变型显著增高(84.09% vs 27.78%)。两例标本 E-cadherin 和 vimentin 同时表达为阳性。

2.3 肺癌 EMT 状态与 EGFR 基因型、临床病理特征的关系

按照 Yauch 等^[3]的报道,胞膜染色/胞浆染色与 Western blot 结果有很好的一致性,采用免疫组化结果表征 EMT 状态具有较高的可靠性。以 E-cadherin 阳性、vimentin 阴性表征上皮型,反之表征间质型。Kappa 值分析提示以 E-cadherin 和 vimentin 染色来确定 EMT 状态的结果有较高一致性(Kappa = 0.9281;95%可信区间,0.8303~1.0259; P < 0.0001),因此选择 E-cadherin 染色表征肺癌的 EMT 状态。



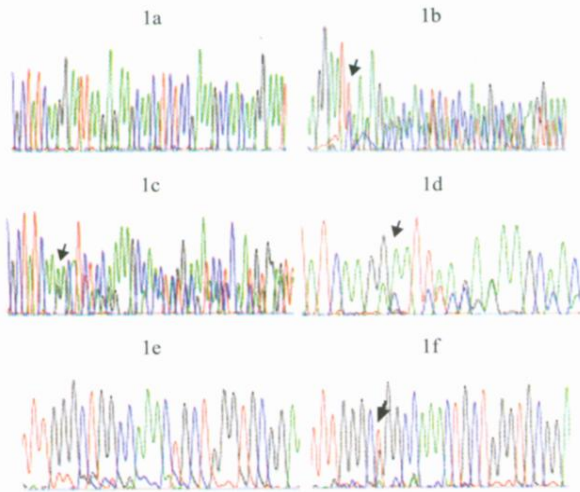


Fig 1a; shows the nucleotide sequence of the wild-type EGFR gene in tumor specimen from No. 13B patient CGCTATCAAGG AATTAA-GAGAAGCAACATCTCCG AAAGCCAACAAGGAAAT (nucleotide 2227-2276); Fig 1b; shows the nucleotide sequence of the EGFR gene with heterozygous in-frame deletion of "TAAGAGAAGCAACATCTC" in No. 50C patient; Fig 1c; shows the nucleotide sequence of the EGFR gene with heterozygous in-frame deletion of "GAATTAAGAGAAGCA" in No. 50C patient; Fig 1d; shows the nucleotide sequence of the EGFR gene with heterozygous in-frame deletion of "ggaattaagagaagc" in No. 30C patient; Fig 1e; shows the nucleotide sequence of the EGFR gene exon 21 in No. 27B patient (wild-type) TTTGGGCTGGCCAAACTGCTGGGTGCCGA; Fig 1f; shows heterozygous missense mutation (T → G substitution) in exon 21 in No. 33B patient TTTGGGCTGGCCAAACTGCTGGGTGCCGA; Arrows show starts of heterozygous deletions or place of point mutation.

图 1 NSCLC 患者的 EGFR 基因突变

Fig 1 Mutations in the EGFR gene in non-small cell lung cancer patients

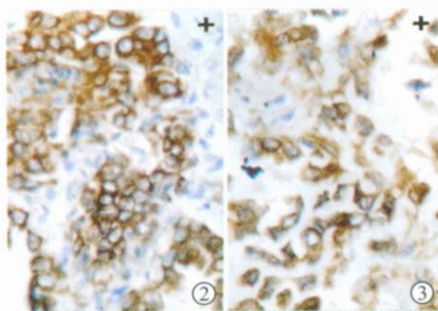


图 2 NSCLC 组织中 E-cadherin 的表达 (SP × 400)

Fig 2 membranous and cytoplasmic expression of E-cadherin in NSCLC tumor (SP × 400)

图 3 NSCLC 组织中 vimentin 的表达 (SP × 400)

Fig 3 membranous and cytoplasmic expression of vimentin in NSCLC tumor (SP × 400)

统计结果显示: NSCLC 上皮表型占 35.48 % (22/62)。上皮表型在 EGFR 突变型显著高于野生型 (77.78 % vs 18.18 % ; $P < 0.0001$) ; 女性显著高

于男性 (54.55 % vs 25 % ; $P = 0.02$) ; 腺癌高于其他病理类型但差异无统计学意义 (39.47 % vs 29.17 % ; $P = 0.4087$) ; 不吸烟者稍高于吸烟者, 差异无统计学意义 (42.42 % vs 27.59 % ; $P = 0.2231$) ; 年龄 < 60 岁和年龄 ≥ 60 岁组差异无统计学意义 (43.33 % vs 28.12 % ; $P = 0.211$) , 早期肺癌与晚期肺癌组差异无统计学意义 (38.24 % vs 32.12 % ; $P = 0.6178$, 见表 1)。

表 1 62 例肺癌患者的肿瘤 EMT 标志物与 EGFR 基因型、性别、吸烟状态和病理类型关系的分析

Tab 1 Univariate analysis of the relationship between EMT makers and EGFR genotype and gender, smoking status, histology subtype among 62 NSCLC patients

Characteristic	No. with E-cadherin positive (%)	No. with Vimentin positive (%)	P^*
Age (n)			
< 60 year (30)	13 (43.33)	19 (63.33)	0.2110
≥ 60 year (32)	9 (28.12)	23 (71.88)	
Gender (n)			
Female (22)	12 (54.55)	10 (45.45)	0.02
Male (40)	10 (25.00)	32 (80.00)	
TNM stage (n)			
Stage I and II (34)	13 (38.24)	22 (64.71)	0.6178
Stage III and IV (28)	9 (32.12)	20 (71.43)	
Histopathology (n)			
Adenocarcinoma (38)	15 (39.47)	24 (63.16)	0.4087
Other (24) **	7 (29.17)	18 (75.00)	
Smoking history (n)			
Never smoker (33)	14 (42.42)	19 (57.58)	0.2231
Ever smoker (29)	8 (27.59)	23 (79.31)	
EGFR genotype (n)			
Mutation (18)	14 (77.78)	5 (27.78)	< 0.0001
Wild-type (44)	8 (18.18)	37 (84.09)	

* : 包括鳞癌、鳞腺混合癌和腺癌; ** : Kappa 一致性分析提示 E-cadherin 和 vimentin 染色有很高的一致性, 我们最终选择 E-cadherin 染色表征肺癌的 EMT 状态。P (卡方检验) 按照 E-cadherin 染色结果计算

Logistic 回归分析显示上皮表型与 EGFR 突变密切相关 (比值比, 0.094; 95 % 可信区间, 0.026 ~ 0.349; $P = 0.0004$)。由于上皮型和间质型在年龄、临床分期和吸烟情况分层差异无统计学意义, 未对这些因素与上皮型关系行 Logistic 回归分析。

3 讨论

针对 EGFR 的靶向药物已显示出良好的临床疗效, 但并非所有患者都能从小分子 EGFR TKI (gefitinib 和 erlotinib) 治疗中获益。gefitinib 和 erlotinib 用于二线或三线治疗 NSCLC, 客观缓解

率在 9% ~ 19% 之间,另外约 50% 的病例出现病情进展。诸多研究已发现在亚裔、女性、不吸烟、腺癌等患者中疗效好。然而,试图以分子预测指标来区分适合 EGFR TKI 治疗的患者人群的研究结果还不能令人满意。最初关于 EGFR 靶向治疗有效的合理推测是 EGFR 在肺癌组织较癌旁组织过表达,但是对动物模型及临床患者标本的分析结果都表明肿瘤组织 EGFR 高表达并非 EGFR TKI 治疗敏感的预测指标;同样,EGFR 的酪氨酸激酶 (tyrosine kinase, TK) 功能域发生突变与治疗敏感性密切相关的结论虽然广为认可,但是研究表明大约 10% EGFR 野生型的患者也能从 EGFR TKI 治疗中获得较好的疗效^[4-8]。因此有必要寻找新的能更有效预测 EGFR TKI 敏感性的指标。

EMT 是生物胚胎形成和发育常见的生理过程,同时 EMT 还存在于多种病理过程。最新研究显示:表达 E-cadherin 的 NSCLC 对 EGFR TKI 治疗敏感,而表达 vimentin/fibronectin 的 NSCLC,则对 EGFR TKI 不敏感^[2,3]。当发生 EMT 的肺癌重新表达 E-cadherin 后,肿瘤细胞则恢复对 EGFR TKI 治疗的敏感性。Yauch 等报道对 erlotinib 不敏感的肺癌组织往往合并 vimentin 和 (或) fibronectin 等标记物的表达^[2,3],进而推测 E-cadherin 表达水平可作为预测 NSCLC 患者对 erlotinib 临床效果的一个新的生物学标记。对于肿瘤发生 EMT 后 EGFR TKI 治疗敏感性下降,可以理解为 EMT 可能降低了肿瘤细胞生长或增殖对 EGFR 信号通路的需求。例如,当间质表型细胞出现持续的 Akt 激活,引发了非 EGFR 依赖性的 PI3K/Akt 信号通路激活,从而导致了肿瘤细胞对 erlotinib 等治疗的不敏感^[9]。所以,肿瘤的 EMT 状态与 EGFR TKI 的治疗反应性密切相关。在本研究中,我们检测了 62 例肺癌标本的 EMT 状态,进而探讨了肿瘤 EMT 状态与 EGFR 基因型、以及该患者临床病理特征的关系。

组织染色结果显示 77.78% 的 EGFR 基因突变的患者 E-cadherin 表达阳性提示为上皮型,与 EGFR 基因突变的患者 EGFR TKI 临床有效率相近,提示 E-cadherin 表达水平可能是预测 NSCLC 患者对 EGFR TKI 临床疗效的可靠指标。在 EGFR 野生型患者中 E-cadherin 的表达率仅为 18.18%,而 vimentin 表达率为 84.09%,以间质型为主。目前对 EGFR 基因野生型患者缺乏有效的治疗敏感性的生物学标记,与耐受 EGFR TKI 治疗有关的指标无论是 20 外显子的突变还是 K-RAS 突变,在中国人群中发生率很低,而本研究观察到 E-cadherin 的表达率

与文献报道的 EGFR 野生型患者 EGFR TKI 临床有效率相近,因此,以上皮或间质型来区分那些最可能受益于靶向 EGFR 治疗的患者人群具有重要的临床意义。我们的研究结果似乎与以往 EGFR 突变型的结构性活化会导致间质转化、肿瘤细胞迁移、侵袭和远处转移等结果不一致^[10]。其中的机制值得进一步研究,因为 EMT 的发生需要 Src、MAPK 及 PI3K 等众多信号通路的参与,而这些信号通路又同时参与了 EGFR 的胞内信号转导并且与 EGFR TKI 的耐药密切相关,至于 EGFR 信号转导通路是如何与 EMT 发生关系目前尚未清楚。推测上皮型或间质型受 EGFR 基因突变的影响,突变型患者肿瘤多呈上皮型,而野生型肿瘤出现间质型转化。在这 62 例 NSCLC 患者中,女性患者的上皮表型显著高于男性,差异具有统计学意义;腺癌类型以及非吸烟者也倾向于呈现上皮表型,与临床上 gefitinib 有效人群的特征一致。值得注意的是,在较早期的肺癌和较晚期的肺癌间却没有发现上皮表型的差异。因为既然 EMT 与肿瘤的侵袭和转移有关,那么在晚期肺癌中应该更多的呈现间质型改变。还有一种可能可以解释早期肺癌和晚期肺癌间无上皮表型差异的结果,即远处转移的肿瘤较多的表现为间质化,而原发肿瘤仍较多的呈现上皮型,而我们获取的均为原发肿瘤组织。

总之,本研究发现 EGFR 突变型、女性、非吸烟者、腺癌倾向于上皮表型,与 EGFR TKI 疗效分布人群的临床特征相一致;进一步分析显示,EGFR 突变型和野生型的 E-cadherin 表达率均与文献报道的该组患者的 EGFR TKI 临床有效率相近。因此推测上皮型或间质型很可能作为一种 EGFR TKI 临床治疗疗效的预测因子。

参考文献:

- [1] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15 (6) :740-746.
- [2] Thomson S, Buck E, Petti F, et al. Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition[J]. *Cancer Res*, 2005, 65 (20) :9455-9462.
- [3] Yauch RL, Januario T, Eberhard DA, et al. Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11 (24) :8686-8698.
- [4] 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.
- [5] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. *N Engl J*

Med, 2004, 350(21):2129-2139.

[6] Mitsudomi T, Kosaka T, Endoh H, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(11):2513-2520.

[7] Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(36):13306-13311.

[8] Tokumo M, Toyooka S, Kiura K, et al. The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(3):1167-1173.

[9] Bremnes RM, Veve R, Gabrielson E, et al. High-throughput tissue microarray analysis used to evaluate biology and prognostic significance of the E-cadherin pathway in non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(10):2417-2428.

[10] Pedersen MW, Tkach V, Pedersen N, et al. Expression of a naturally occurring constitutively active variant of the epidermal growth factor receptor in mouse fibroblasts increases motility[J]. Int J Cancer, 2004, 108(5):643-653.

[编辑校对:安 凤]

· 简讯 ·

关于举办实验室生物安全学术研讨会及国家级继续教育学习班的征文通知

为提高科研、医疗和疾病控制人员的生物安全防护意识和防护水平,特别是加强和提高生物恐怖可能对人类安全造成严重威胁的防范意识,经中华医学会全国继续教育委员会批准,2008年10月19日~10月25日在安徽省黄山市举办实验室生物安全学术研讨会及国家级继续教育学习班。

征文内容:(1)全球化的生物安全,生物恐怖与防御;(2)微生物的风险评估,病原微生物样本的采集、保存和运输;(3)实验室生物安全防护,实验动物生物安全防护;(4)实验室生物安全设备,实验室消毒与灭菌;(5)实验室生物安全管理,实验室生物安全标准化操作,实验室废弃物处理与销毁;(6)实验室生物安全法律法规,实验室突发事件的应急预案和处理;(7)临床实验室生物安全,基因工程实验室生物安全等。

稿件要求:

(1)所有稿件按《疾病控制杂志》要求撰写,来稿经大会组委会审查合格后,推荐至《疾病控制杂志》2008年第5期(刊号CN34-1188/R)刊出,按规定收取发表版面费;已发表或不发表稿件,请注明“只交流不刊出”。

(2)截稿日期:2008年7月31日(只交流不发表的稿件2008年8月31日)

(3)投稿时请汇稿件审理费40元,地址如下:稿件交送E-mail信箱:swaq2008@163.com,附件名称中请注明“会议征文”,或连同软盘寄往:安徽省合肥市梅山路81号;安徽医科大学《疾病控制杂志》编辑部,潘和平收(邮编230032),信封正面左下角请注明“会议征文”。电话传真:(0551)5161171 联系人:潘和平 13956036312 郭菊芳。详情请登陆<http://jbkz.lxbx.cn>

学分授与:国家级继续教育项目10分。项目编号2008-12-05-113(国)

会议报到地点及会务费和论文发表版面费交纳等事项见第二轮通知。未参加征文者可直接参加继续教育学习班并获学分,参加者可来电函报告。

安徽省医学会 疾病控制杂志 主办
安徽医科大学流行病与卫生统计学系