

EGFR、Her-2、HIF-1 α 在食管鳞癌的表达及意义

石祥东 孟令新 丁兆军 孙树艳 梁粉花 王刚平

【摘要】 目的 研究EGFR、Her-2和HIF-1 α 在食管鳞癌中的表达,探讨三者的表达与食管鳞癌临床病理学特征之间的关系及三者之间的相关性。方法 应用免疫组化Envision二步法检测80例食管鳞癌的切除标本和40例正常鳞状上皮组织中EGFR、Her-2和HIF-1 α 的表达。结果 HIF-1 α 、EGFR、Her-2在食管鳞癌及癌旁正常鳞状上皮组织表达阳性率分别为62.5% vs. 0.0% ($P=0.000$)、67.5% vs. 12.5% ($P=0.000$)和7.5% vs. 0.0% ($P=0.183$)。HIF-1 α 、Her-2、EGFR表达均与肿瘤细胞分化、TNM分期、淋巴结转移有关,与性别、年龄无关。食管鳞癌中HIF-1 α 的表达与EGFR、Her-2的表达正相关($r=0.565$, $P=0.000$; $r=0.221$, $P=0.039$);食管鳞癌中Her-2与EGFR表达无相关性($r=0.198$, $P=0.079$)。结论 HIF-1 α 、EGFR在食管鳞癌高表达,可能在食管鳞癌的发生发展中起重要作用,可作为监测肿瘤发生、预测转移和预后的有用指标,有可能成为靶向治疗的新靶点。而Her-2因在食管鳞癌表达阳性率低不适合成为靶向治疗的靶点。

【关键词】 受体,表皮生长因子; 受体,erbB-2; 缺氧诱导因子1, α 亚基; 食管肿瘤; 肿瘤,鳞状细胞

Significance of EGFR, Her-2, and HIF-1 α expression in esophageal squamous cell carcinoma Shi Xiangdong*, Meng Lingxin, Ding Zhaojun, Sun Shuyan, Liang Fenhua, Wang Gangping. *Department of Oncology, Wulian County People's Hospital, Rizhao 276826, China
Corresponding author: Meng Lingxin, Email: menglx001623@163.com

【Abstract】 **Objective** To explore EGFR, Her-2, HIF-1 alpha expression in esophageal squamous cell carcinoma(ESCC) and investigate the relationship between clinical pathological features in esophageal squamous carcinoma and the correlation between the three index. **Methods** Immunohistochemical Envision two-steps method was applied to assay EGFR, Her-2, HIF-1 alpha expression in 80 cases specimens of ESCC and 40 cases of adjacent normal squamous epithelial tissues. **Results** HIF-1 alpha, EGFR and Her-2 in ESCC and adjacent normal squamous epithelial tissues positive expression rate were 62.5% vs. 0.0% ($P=0.000$), 67.5% vs. 12.5% ($P=0.000$), 7.5% vs. 0.0% ($P=0.183$) each other. The expression of HIF-1 alpha, Her-2, EGFR had correlation with tumor cell differentiation, TNM staging and lymph node metastasis, had nothing to do with gender, age. HIF-1 alpha expression in esophageal squamous carcinoma had positive correlation with EGFR and Her-2, correlation coefficient were 0.565($P=0.000$) and 0.221 ($P=0.039$). However, EGFR had no correlation with Her-2, correlation coefficient was 0.198($P=0.079$). **Conclusions** EGFR and HIF-1 alpha high expression may plays an important role in tumor genesis and development of ESCC, may be used as useful indicators for predicating tumor genesis, metastasis, prognosis and may be likely to become new target for targeted therapy of ESCC. Her-2 expression was low in ESCC, and may be not suitable for be targeted therapy targets.

【Key words】 Receptor, epidermal growth factor; Receptor, erbB-2; Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit; Esophageal neoplasms; Neoplasms, squamous cell

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.08.005

基金项目: 济宁医学院面上项目(JY2013KY061)

作者单位: 276826 山东日照, 五莲县人民医院肿瘤科[石祥东(潍坊医学院在读硕士研究生)]; 济宁医学院附属日照市人民医院肿瘤科(孟令新、丁兆军), 病理科(孙树艳、梁粉花、王刚平)

通讯作者: 孟令新, Email: menglx001623@163.com

食管癌是我国常见恶性肿瘤之一, 占我国恶性肿瘤死亡的第四位, 与西方国家以腺癌为主不同, 我国约90%为鳞状细胞癌, 多数患者5年生存率不超过20%^[1], 因此临床迫切需要新的治疗方法。靶向治疗高效低毒, 成为肿瘤治疗热点。EGFR、Her-2和HIF-1 α 在食管鳞癌肌层浸润、脉管侵犯、淋巴结转移和TNM分期之间的相关性研究较少, 能否作为食管鳞癌基础研究与临床诊治的靶标应用于临床, 尚未见报道。为此, 本课题组应用免疫组化Envision二步法, 检测食管鳞癌及正常鳞状上皮组织中EGFR、Her-2和HIF-1 α 的表达情况, 为食管鳞癌的靶向治疗提供一定理论基础。

资料与方法

一、一般资料

随机抽取日照市人民医院2010年5月至2012年8月手术切除食管鳞癌标本存档蜡块80例(术前未进行任何放疗、化疗或其他抗癌治疗)。全部标本均经两位病理专家证实为食管鳞癌。80例患者中, 男77例, 女3例, 年龄38~77岁, 中位年龄61岁。临床分期按照2009年UICC和AJCC制定的食管癌TNM分期标准: IA期1例, IB期7例, IIA期9例, IIB期29例, IIIA期13例, IIIB期15例, IIIC期6例。高分化9例, 中分化59例, 低分化12例; 伴有淋巴结转移为39例, 无淋巴结转移41例; T1 11例, T2 7例, T3 60例, T4 2例; 脉管侵犯11例, 未侵犯69例。对照组40例, 选用远离肿瘤5 cm以上的食管黏膜, 并经病理检查排除肿瘤累及。

二、试剂及方法

兔抗人EGFR单克隆抗体(批号: 131011554D)、兔抗人Cerb-B₂多克隆抗体(批号: 13080156B)、浓缩型DAB显色试剂盒(批号: 1307290031)、免疫组化二抗试剂盒[包括试剂1-放大剂(批号: 130721491E); 3%过氧化氢; 试剂2-高敏型酶标抗兔/小鼠IgG聚合物(批号: 130721488E); 试剂3-内源性过氧化物酶阻断剂]均购自福建迈新生物技术有限公司。兔抗人HIF-1 α 单克隆抗体工作液(批号: 13620712)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。所有标本都经10%中性甲醛固定, 石蜡包埋, 切3 μ m厚的组织切片, 按照Envision二步法操作步骤检测, 并设阳性及阴性对照。

三、结果判定

两人双盲法观察切片, 每张切片随机观察10个高倍视野, 计数100个细胞/视野, 共计1000个, 对免疫组化结果进行评估。HIF-1 α 以细胞核或细胞质内呈棕黄色为阳性, Her-2、EGFR阳性产物定位于胞浆、胞膜, 呈棕黄色颗粒。首先依照细胞阳性着色程度打分, 分为: 0分, 无显色; 1分, 显色较弱(淡黄色); 2分, 显色适中(棕黄色); 3分, 显色较强(棕褐色), 然后依照阳性细胞所占百分比打分, 分为: 1分(指阳性细胞总数 \leq 10%); 2分(指阳性细胞总数在11%~50%); 3分(指阳性细胞总数在51%~75%); 4分(指阳性细胞总数 $>$ 75%), 按染色强度及阳性细胞数打分的乘积计算为染色指数, 染色指数 $>$ 3判断为阳性, \leq 3为阴性。

四、统计学处理

采用SPSS 19.0统计学软件进行统计学分析, 癌组织和癌旁正常组织蛋白表达比较采用分类配对设计资料下两组频数分布的 χ^2 检验; 所测蛋白与临床病理特征之间的联系采用随机区组资料 χ^2 检验。不同蛋白表达的相关性用Spearman相关分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

结果

一、EGFR、Her-2和HIF-1 α 在食管鳞癌及正常鳞状上皮组织的表达

HIF-1 α 表达于食管鳞癌的细胞质和细胞核中(胞核强于胞质)(图1), 阳性率62.5%(50/80), 而正常鳞状上皮组织不表达(0/40), 二者差异有统计学意义($P=0.000$)。Her-2表达于食管鳞癌的细胞膜, 阳性率7.5%(6/80), 正常鳞状上皮组织不表达(0/40), 二者差异无统计学意义($P=0.183$)。EGFR表达于细胞膜(图2), 在食管鳞癌、正常鳞状上皮组织的阳性率分别为67.5%(54/80)、12.5%(5/40), 差异有统计学意义($P=0.000$), 见表1。

二、EGFR、Her-2和HIF-1 α 在食管鳞癌表达与临床病理特征的关系

HIF-1 α 表达与肿瘤细胞分化、浸润深度、TNM分期、淋巴结转移、脉管侵犯有关($P=0.013$ 、 0.001 、 0.000 、 0.000 、 0.015); 与性别、年龄无关($P=0.649$ 、 0.519)。Her-2表达与肿瘤细胞分化、TNM分期、淋巴结转移有关($P=0.000$ 、 0.004 、 0.029); 与性别、年龄、脉管侵犯、浸润深度无关($P=1.000$ 、 0.983 、 1.000 、 0.143)。EGFR表达与食管鳞癌TNM

表2 食管鳞癌EGFR、Her-2、HIF-1α表达与患者临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	EGFR		Her-2		HIF-1α	
		阳性例数	P值	阳性例数	P值	阳性例数	P值
性别			0.245		1.000		0.649
男	77	53		6		49	
女	3	1		0		1	
年龄			0.403		0.983		0.519
<60岁	33	24		3		22	
≥60岁	47	30		3		28	
浸润深度			0.012		0.143		0.001
T1	11	3		0		2	
T2	7	4		0		2	
T3	60	45		6		44	
T4	2	2		0		2	
分化程度			0.015		0.000		0.013
G1	9	3		0		2	
G2	59	40		0		38	
G3	12	11		6		10	
临床分期			0.000		0.004		0.000
IA+IB	8	0		0		0	
IIA+IIB	38	20		1		17	
IIIA+IIIB+IIIC	34	34		5		33	
血管侵犯			0.150		1.000		0.015
有	11	10		1		11	
无	69	44		5		39	
淋巴转移			0.000		0.029		0.000
有	39	38		5		34	
无	41	16		1		16	

分期、浸润深度、细胞分化、淋巴结转移有关 ($P=0.000, 0.012, 0.015, 0.000$)，与性别、年龄、脉管侵犯无关 ($P=0.245, 0.403, 0.150$)，见表2。

表1 EGFR、Her-2、HIF-1α在食管鳞癌组织和正常食管黏膜中的表达阳性率[例, (%)]

组别	例数	EGFR	Her-2	HIF-1α
正常鳞状上皮	40	5(12.5)	0(0)	0(0)
食管鳞癌	80	54(67.5)	6(7.5)	50(62.5)
P值		0.000	0.183	0.000

三、食管鳞癌EGFR、Her-2 和HIF-1α表达的相互关系

食管鳞癌中HIF-1α表达与EGFR表达正相关 ($r=0.565, P=0.000$)；食管鳞癌中HIF-1α表达与Her-2表达正相关 ($r=0.221, P=0.039$)。食管鳞癌中Her-2表达与EGFR表达无相关性 ($r=0.198, P=0.079$)，见表3。

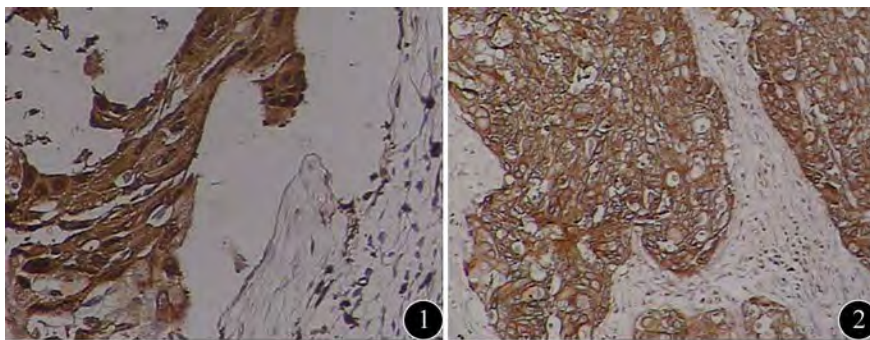
表3 食管癌EGFR、Her-2和HIF-1α表达之间的关系

相关变量	r值	P值
EGFR/HIF-1α	0.565	0.000
Her-2/EGFR	0.198	0.079
Her-2/HIF-1α	0.221	0.039

讨 论

HIF-1 (hypoxia-inducible factor) 是缺氧条件下维持氧稳态的关键性转录因子，通过激活多个缺氧反应基因的表达，介导细胞适应缺氧。HIF-1α是HIF-1的活性亚基，在多个恶性肿瘤中表达增加，与肿瘤的血管形成、侵袭、转移及放化疗抵抗等有关^[2-3]。

EGFR 是表皮生长因子受体家族成员之一，与肿瘤关系密切，EGFR 信号通路调控肿瘤细胞血管生成、增殖、侵袭、转移及凋亡抑制等多个基因^[4]。

图1 HIF-1 α 在食管鳞癌表达(IHC \times 200)图2 EGFR在食管鳞癌表达(IHC \times 200)

多项临床研究已经证实, EGFR 蛋白过表达与肿瘤血管生成、侵袭、转移和肿瘤细胞的增殖相关^[5-6]。

Her-2是原癌基因C-erbB-2的表达产物,属于I型跨膜酪氨酸激酶生长因子受体,在细胞的生长、增殖、分化等过程中起重要的调节作用,研究表明Her-2促进肿瘤细胞生长、上调血管内皮生长因子、促进肿瘤新生血管形成、抑制肿瘤细胞凋亡^[7]。

本研究显示HIF-1 α 、EGFR在食管鳞癌高表达,阳性率分别为62.5% (50/80)、67.5% (54/80),正常鳞状上皮组织分别为不表达(0/40)、低表达12.5% (5/40),与国内外研究一致^[8-10]。HIF-1 α 、EGFR在食管鳞癌高表达表明二者参与了食管鳞癌的发生,并且本研究还显示HIF-1 α 、EGFR表达与肿瘤细胞分化、浸润深度、TNM分期、淋巴结转移相关,说明HIF-1 α 、EGFR参与了食管鳞癌的恶性转化、浸润、转移过程,并发挥重要作用,HIF-1 α 、EGFR的高表达提示预后不良。Spearman相关分析显示食管鳞癌中HIF-1 α 的表达与EGFR的表达正相关($r=0.565$, $P=0.000$),表明HIF-1 α 、EGFR可能相互作用,促进了彼此的表达上调。HIF-1 α 、EGFR在食管鳞癌的联合过表达具有重要意义,二者协同作用,促进了食管鳞癌的发生转移等过程,此外多个研究^[11-12]已证实过表达HIF-1 α 、EGFR的肿瘤患者对化疗有效率低。因此对过表达HIF-1 α 、EGFR的食管鳞癌患者,采用靶向治疗等个体化治疗,不仅必要,而且可能会明显改善患者的不良预后。

食管鳞癌Her-2表达状况文献报道并不一致,在0~65%之间^[13-14],与食管鳞癌预后的关系也有争论^[15-16]。我们的研究显示Her-2在食管鳞癌低表达,阳性率仅7.5% (6/80),正常鳞状上皮组织不表达(0/40),Her-2表达与肿瘤细胞分化、TNM分期、淋巴结转移相关,表明Her-2可能在食管鳞癌的转移等过程中发挥作用。Spearman相关分析显示食

管鳞癌中HIF-1 α 的表达与Her-2的表达存在相关性($r=0.221$, $P=0.039$),Her-2的表达与EGFR的表达不存在相关性。究竟Her-2表达在食管鳞癌发生发展中的作用如何,尚需要扩大样本例数进一步研究。

目前肿瘤的个体化治疗及分子靶向治疗是肿瘤治疗最有前景的新方向,HIF-1 α 、EGFR在食管鳞癌高表达,并在食管鳞癌的发生发展中起重要作用,是食管鳞癌靶向治疗的合适靶点。

参 考 文 献

- [1] Mariette C, Finzi L, Fabre S, et al. Factors predictive of complete resection of operable esophageal cancer: a prospective study[J]. Ann Thorac Surg, 2003, 75(6): 1720-1726.
- [2] Zhu H, Feng Y, Zhang J, et al. Inhibition of hypoxia inducible factor 1 α ex-expression suppresses the progression of esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Biol Ther, 2011, 11(11): 981-987.
- [3] Munipalle PC, Viswanath YK, Davis PA, et al. Prognostic value of hypoxia inducible factor 1 α in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Dis Esophagus, 2011, 24(3): 177-181.
- [4] Stonecypher MS, Chaudhury AR, Byer SJ, et al. Neuregulin growth factors and their ErbB receptors form a potential signaling network for schwannoma tumorigenesis[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2006, 65(2): 162-175.
- [5] Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment[J]. N Engl J Med, 2008, 358(15): 1160-1174.
- [6] Ruppert AM, Wislez M, Poulot V, et al. A simple view on lung cancer biology: The EGFR pathway[J]. Rev Mal Respir, 2011, 28(4): 565-577.
- [7] 刘尧, 刘文超, 陶玉荣. Her-2过表达与乳腺癌治疗的相关性研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(1): 182-184.
- [8] 施瑞华, 朱宏, 张国新, 等. 缺氧诱导因子1 α 、2 α 和血管内皮生长因子在食管鳞癌中的表达[J]. 胃肠病学, 2004, 9(6): 335-339.
- [9] Boone J, van Hillegersberg R, Offerhaus GJ, et al. Targets for molecular therapy in esophageal cell carcinoma: an immunohistochemical analysis[J]. Dis Esophagus, 2009, 22(6): 496-504.
- [10] Wei Q, Chen L, Sheng L, et al. EGFR, HER2 and HER3 expression in esophageal primary tumours and corresponding metastases[J]. Int J Oncol, 2007, 31(3): 493-499.
- [11] Fischer-Colbrie J, Witt A, Heinzl H, et al. EGFR and steroid

receptors in ovarian carcinoma: comparison with prognostic parameters and outcome of patients[J]. *Anticancer Res*, 1997, 17(1B): 613-619.

[12] Generali D, Berruti A, Brizzi MP, et al. Hypoxia-inducible actor-1 α expression predicts a poor response to primary chemoendocrine therapy and disease free survival in primary human breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(2): 4562-4568.

[13] Dreilich M, Wanders A, Brattström D, et al. HER-2 overexpression (3+) in patients with squamous cell esophageal carcinoma correlates with poorer survival[J]. *Dis Esophagus*, 2006, 19(4): 224-231.

[14] Reichelt U, Duesedau P, Tsourlakis MCh, et al. Frequent

homogeneous HER-2 amplification in primary and metastatic adenocarcinoma of the esophagus[J]. *Mod Pathol*, 2007, 20(1): 120-129.

[15] Kawaguchi Y, Kono K, Mimura K, et al. Targeting EGFR and HER-2 with cetuximab-and trastuzumab-mediated immunotherapy in oesophageal squamous cell carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2007, 97(4): 494-501.

[16] 吴健谊, 石宏顺, 吴智勇, 等. HER2 表达与食管癌患者生存期的关系[J]. *癌变·畸变·突变*, 2010, 22(2): 86-90.

(收稿日期: 2014-03-12)

(本文编辑: 马超)

石祥东, 孟令新, 丁兆军, 等. EGFR、Her-2、HIF-1 α 在食管鳞癌的表达及意义[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2014, 8(8): 1418-1422.

