

· 论 著 ·

肺腺癌中表皮生长因子受体基因突变及表皮生长因子受体 2、血管内皮生长因子的表达及与临床的关系

邵伟伟¹, 兰建云¹, 宋 曙¹, 郝兰香², 邹 琳¹

(江苏省盐城市第一人民医院:1. 病理科;2. 内分泌科 224000)

摘要:目的 探讨肺腺癌中表皮生长因子受体(EGFR)基因突变及人表皮生长因子受体 2(HER-2)、血管内皮生长因子(VEGF)的表达与临床病理因素间的关系。**方法** 采用 ARMS-PCR 法检测 10 例正常肺组织及 49 例肺腺癌组织的 EGFR 基因突变的情况,同时应用免疫组织化学方法检测 HER-2 和 VEGF 蛋白表达水平。**结果** (1)肺腺癌组织标本 EGFR 基因突变率及 HER-2、VEGF 蛋白表达率均比正常肺组织高($\chi^2=10.8756, P=0.001; \chi^2=12.4560, P=0.000; \chi^2=6.7752, P=0.009$)。(2) EGFR 突变的发生与患者性别、是否吸烟有关($P<0.05$),与年龄、肿块大小、肿瘤分化程度、有无淋巴结转移、TNM 分期、有无胸膜浸润无关($P>0.05$)。HER-2 与 VEGF 蛋白表达均与肿瘤的分化程度、肿块大小、TNM 分期、有无淋巴结转移、有无胸膜浸润相关($P<0.05$),与患者性别、年龄、有无吸烟史无关($P>0.05$)。(3)肺腺癌中 HER-2 与 VEGF 的表达呈正相关($r=0.3764, P=0.0077$)。**结论** EGFR 突变与肺腺癌的发生密切相关,其在女性、非吸烟者的高表达有重要的临床意义。HER-2 和 VEGF 在肺癌的发生、发展、转移中起协同作用,有助于临床评估预后,并为肺腺癌的新分子靶向治疗提供理论依据。

关键词:肺腺癌; 表皮生长因子受体; 人表皮生长因子受体 2; 血管内皮生长因子
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.20.016 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2016)20-2843-04

Lorrelation of gene mutation of EGFR, the expressions of HER-2, VEGF in lung adenocarcinoma and clinical pathological factors

SHAO Weiwei¹, LAN Jianyun¹, SONG Shu¹, HAO Lanxiang², ZOU Lin¹

(1. Department of Pathology; 2. Department of Endocrinology, the First People's Hospital of Yancheng, Yancheng, Jiangsu 224006, China)

Abstract: Objective To investigate the gene mutation of epithelial growth factor receptor(EGFR) and the expressions of human epidermal growth factor receptor 2(HER-2) and vascular endothelial growth factor(VEGF) in lung adenocarcinoma and their relationships with the clinical pathological factors. **Methods** ARMS-PCR method was used to detect the gene mutation of EGFR in 49 lung adenocarcinoma specimens and 10 normal tissue specimens. Immunohistochemical method was also used to detect the expressions of the HER-2 and VEGF in them. **Results** (1) The mutation rates of EGFR and the positive rates of HER-2 and VEGF in lung adenocarcinoma were significantly higher than those in the normal tissues($P<0.01$). (2) The occurs of EGFR mutation were correlated with sex and the smoking habit($P<0.05$); but not correlated with age, the size of tumor, differential, lymph nodes metastasis, TNM stages and pleural invasion($P>0.05$). The HER-2 and VEGF protein expressions in lung adenocarcinoma were correlated with differential, the size of tumor, TNM stages, lymph nodes metastasis and pleural invasion($P<0.05$); but not correlated with sex, age, and the smoking habit($P>0.05$). (3) The expressions of HER-2 and VEGF protein in the lung adenocarcinoma were positively correlated with each other($P<0.01$). **Conclusion** EGFR mutation is closely related to the occurrence of lung adenocarcinoma, its high expressions in the women, non smoking people have important clinical significance. HER-2 and VEGF could promote the lung adenocarcinoma's occurrence, development and transfer. They could be used to evaluate the patients' prognosis, and provide new molecular targeted therapy.

Key words: lung adenocarcinoma; epithelial growth factor receptor; epidermal growth factor receptor 2; vascular endothelial growth factor

随着人口老龄化及吸烟(主动及被动)、大气污染等因素的影响,原发性肺癌已居我国恶性肿瘤的首位,其中 80% 是非小细胞肺癌(NSCLC)^[1]。以往研究认为 NSCLC 中鳞状细胞癌比较多见,但现在发现肺腺癌的发病率正逐年升高,EGFR-TKI 的使用已成为一线药物治疗的首选。肺癌的发生发展过程同时涉及到肿瘤细胞的异常增殖及血管的异常新生,因此通过对提取组织的 DNA 进行扩增阻滞突变系统聚合酶链反应法(ARMS-PCR)检测肺腺癌中表皮生长因子受体(EGFR)的第 18、19、20、21 号外显子是否存在突变,同时应用免疫组织化学方法检测人表皮生长因子受体 2(HER-2)、血管内皮生长因

子(VEGF)蛋白的表达情况,探讨它们之间的相互关系及与临床病理因素间的关系,为肺腺癌的预后评估及治疗提供一些理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 1 月至 2015 年 6 月盐城市第一人民医院手术切除的肺腺癌组织标本 49 例,全部病例术前均未进行放化疗,经 2 位高年资主任医师重新阅片明确诊断与临床分期。取 10 例周边正常的肺组织作为对照,所有标本均采用中性福尔马林固定后常规石蜡包埋、切片。

1.2 方法

1.2.1 EGFR 基因突变检测 对本标本的 DNA 采用 ARMS-PCR 法检测 EGFR 的第 18、19、20、21 基因突变。所用试剂购自厦门艾德生物医药科技有限公司。实验步骤：(1)提取组织 DNA。(2)PCR 扩增。(3)分析扩增曲线。

1.2.2 HER-2 及 VEGF 免疫组织化学检测 HER-2 及 VEGF 兔抗人单克隆抗体及 SP 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司，均为即用型。石蜡切片常规脱蜡、水化、组织抗原修复、10%正常血清封闭后按说明书操作步骤进行，显微镜控制下 DAB 显色、复染、脱水、透明、封片。使用 PBS 代替 1 抗处理的切片作为阴性对照，已知阳性片作为阳性对照。

1.2.3 结果判断 (1)EGFR 突变判读：按照试剂说明书上的标准进行判读。(2)免疫组织化学结果判读：根据目前欧美国家实验室标准^[2]，HER-2 阳性染色定位于细胞膜上，呈棕黄色或棕褐色颗粒，无细胞膜着色为阴性，阳性细胞数大于 10%且细胞膜为非连续完整着色为阳性，阳性细胞数大于 10%且细胞膜为中等强度连续完整着色为(++)，阳性细胞数大于 10%且细胞膜为强而连续完整着色为(+++)。VEGF 阳性染色定位于细胞浆中，呈棕黄或棕褐色，每张切片随机计数 500 个以上肿瘤细胞，阳性细胞数大于或等于 50%为(+++)，49%~26%为(++)，25%~6%为(+)，小于或等于 5%为(-)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.5 统计软件对数据进行分析，计数资料以例数和百分率表示，组间比较使用 χ^2 检验和 Fisher-exact 检验，采用 Spearman 等级相关分析两指标间的关系。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 种组织标本检测结果比较 正常肺组织标本无 EGFR 基因突变，49 例肺腺癌有 28 例出现突变，突变集中在第 19、21 号外显子，两者之间差异有统计学意义($\chi^2=10.875\ 6, P=0.001$)。HER-2 在正常肺组织无表达，在癌组织中表达率为 61.22%(30/49)，差异有统计学意义($\chi^2=12.456\ 0, P=0.000$)。VEGF 在正常肺组织中有 1 例呈中等强度表达，在癌组织中表达率为 55.01%(27/49)，差异有统计学意义($\chi^2=6.775\ 2, P=0.009$)。见表 1 和图 1~3。

2.2 各指标与临床病理因素间的相关性 EGFR 基因突变的发生与患者性别、是否吸烟有关($P<0.05$)，与肿块大小、年龄、肿瘤分化程度、有无淋巴结转移、TNM 分期、有无胸膜浸润无关($P>0.05$)。HER-2 与 VEGF 蛋白表达均与肿瘤的分化程度、肿块大小、TNM 分期、有无淋巴结转移、有无胸膜浸

润有关($P<0.05$)，与患者性别、年龄、有无吸烟史无关($P>0.05$)。见表 2。

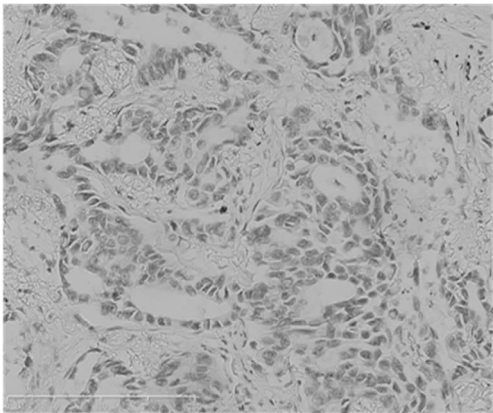


图 1 正常肺组织 HER-2 阴性表达

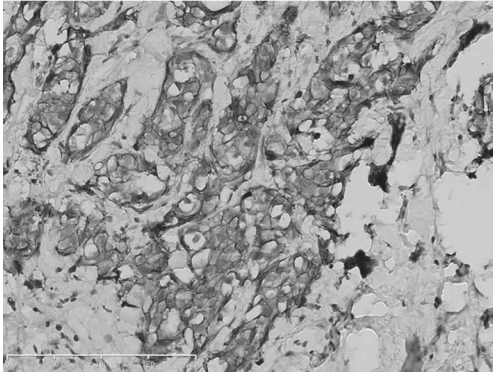


图 2 中分化肺腺癌组织 HER-2 在细胞膜的表达

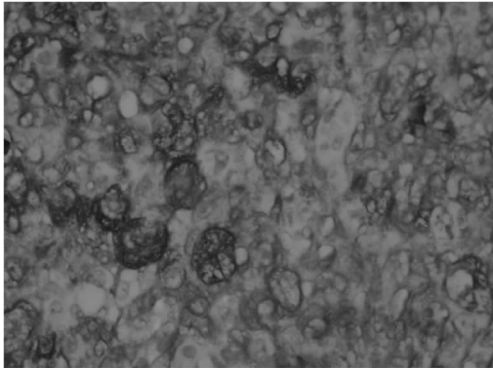


图 3 低分化肺腺癌组织 VEGF 在细胞质的表达

表 1 2 种组织标本各指标检测结果比较(n)

标本类型	n	EGFR			HER-2			VEGF		
		无突变	有突变	P	阴性(-)	阳性(+)	P	阴性(-)	阳性(+)	P
正常肺组织	10	10	0	0.001	10	0	0.000	9	1	0.009
肺腺癌组织	49	21	28		19	30		22	27	

表 2 各指标与临床病理因素间的相关性(n)

病理因素	<i>n</i>	EGFR			HER-2					VEGF					
		无突变	有突变	<i>P</i>	—	+	++	+++	<i>P</i>	—	+	++	+++	<i>P</i>	
性别	男性	28	17	11	0.004	15	5	3	5	0.104	17	2	6	3	0.066
	女性	21	4	17		4	5	5	7		5	5	7	4	

续表 2 各指标与临床病理因素间的相关性(*n*)

病理因素	<i>n</i>	EGFR				HER-2					VEGF				
		无突变	有突变	<i>P</i>		—	+	++	+++	<i>P</i>	—	+	++	+++	<i>P</i>
年龄(岁)	≤59	21	10	11	0.560	12	3	4	2	0.060	9	1	8	3	0.239
	>59	28	11	17		7	7	4	10		13	6	5	4	
吸烟	无	32	10	22	0.024	13	8	6	5	0.228	12	5	9	6	0.455
	有	17	11	6		6	2	2	7		10	2	4	1	
分化	高	18	6	12	0.515	8	7	1	2	0.028	12	2	4	0	0.045
	中	18	8	10		9	2	3	4		8	3	5	2	
	低	13	7	6		2	1	4	6		2	2	4	5	
肿块大小	≤3 cm	32	14	18	0.862	17	9	3	3	0.000	18	7	7	0	0.000
	>3 cm	17	7	10		2	1	5	9		4	0	6	7	
TNM 分期	I 期	21	10	11	0.903	11	7	2	1	0.001	13	2	6	0	0.002
	II 期	13	5	8		6	3	0	4		5	4	3	1	
	III 期	4	2	2		0	0	3	1		3	0	1	0	
	IV 期	11	4	7		2	0	3	6		1	1	3	6	
淋巴结转移	无	28	12	16	1.000	9	9	6	4	0.030	13	6	9	0	0.006
	有	21	9	12		10	1	2	8		9	1	4	7	
胸膜浸润	无	35	13	22	0.201	14	10	6	5	0.025	17	7	10	1	0.002
	有	14	8	6		5	0	2	7		5	0	3	6	

2.3 肺腺癌组织 HER-2 与 VEGF 表达的相关性 49 例患者 HER-2 与 VEGF 同时阳性表达者有 21 例,同时阴性表达者有 13 例,两者具有相关性($\chi^2=6.941\ 0,P=0.008$)。Spearman 等级相关分析显示,两者的表达呈正相关关系($r=0.376\ 4,P=0.007\ 7$)。

3 讨 论

恶性肿瘤的发生离不开细胞周期的异常转化,肺癌的高发病率及高病死率均与细胞周期因子的异常变化密切相关。表皮生长因子(EGF)又称为 HER-1,具有酪氨酸激酶活性,无活性状态下以单体形式存在,与相应配体(EGF 等)结合后以二聚体形式参与肿瘤细胞的黏附、侵袭、转移等过程^[3-4]。在肺腺癌组织中 EGF 含量远超过正常肺组织,因此 EGFR 与 EGF 结合,通过过表达、基因扩增及基因突变等形式表现为活性增高,从而激活酪氨酸蛋白激酶促进肿瘤的恶性进展。本研究也证实,正常肺组织标本无 EGFR 基因突变,肺腺癌组织的突变率远高于正常组织,两者差异有统计学意义($P<0.05$)。临床使用酪氨酸激酶抑制剂(吉非替尼、厄洛替尼等)正是通过竞争性地结合酪氨酸激酶结构域上的腺苷三磷酸,达到抑制 EGFR 下游信号的转导,起到阻断 EGFR 诱导肿瘤的生长和转移。本研究结果表明,女性患者 EGFR 突变率(80.95%)远高于男性(39.29%),原因可能是由于 EGFR 突变的发生与患者雌激素水平有关。有研究认为雌激素受体和 EGFR 通路间存在相互作用^[5]。非吸烟患者突变率(68.75%)高于吸烟患者(35.29%),提示虽然吸烟是已被公认是发生肺癌的危险因素之一,但烟草不是 EGFR 突变的致癌剂。本研究未发现 EGFR 突变与其他临床因素间的关系,可能是由于在肺腺癌恶性生长、转移过程中,EGFR 突变不是唯一的影响因素。

HER-2 是一种原癌基因,具有酪氨酸激酶的活性,其数量与结构的异常变化可促进细胞发生恶性转化,其高表达与癌细

胞增殖、迁移和血管生成有关^[6]。已有报道在肺癌、乳腺癌、胃癌中存在 HER-2 的过表达^[7-9]。本研究结果显示,正常肺组织无 HER-2 蛋白表达,但在癌组织中其表达率为 61.22%(30/49),差异有统计学意义($P<0.05$)。肺腺癌组织阳性表达率的差异与患者性别、年龄、有无吸烟无关,但是与肿瘤的低分化、晚期临床分期、较大体积、有淋巴结转移、胸膜浸润有关。本组认为,由于 HER-2 蛋白在正常情况下处于非激活状态,但在受到体内某些因素作用时其配体表达增多,致使 HER-2 过多地与配体结合,激活细胞内酪氨酸激酶,启动细胞内的信号转导通路,多种核转录因子被活化,从而导致细胞无序增殖,所以在体积大、临床分期晚、分化程度差的组织中高表达。肿瘤的恶性进展、侵袭能力的获得与新生血管数目增多密切相关。本研究提示 HER-2 与 VEGF 蛋白的表达呈正相关,说明 VEGF 通过诱导新生血管,降低血管通透性,HER-2 通过激活信号转导通路加强细胞增殖速度及能力,两者协同作用促进了癌细胞的淋巴结转移及侵袭胸膜的能力。

VEGF 是一种内皮细胞特异性致分裂原,由肿瘤细胞产生,在正常组织中低表达,但在恶性肿瘤中瘤细胞可大量分泌 VEGF。一方面其在肿瘤的生长、发展过程中起重要作用,另一方面在血管的形成和发育过程中起正向调节作用,被认为是诱导肿瘤血管形成特异性最高的生长因子之一^[10]。在多种实体肿瘤中已被证实存在 VEGF 的过表达^[11-13]。本研究结果证实,VEGF 在肺腺癌组织的表达显著高于正常肺组织,在低分化、高 TNM 分期、肿块大于 3 cm、有淋巴结转移、胸膜浸润的肺腺癌组织中也高表达,与国内外研究基本一致^[14-15]。本组认为肺腺癌的发生、发展过程中,VEGF 通过与其受体结合,一方面在直接刺激血管内皮细胞分化、增殖、迁移的基础上加快了癌细胞生长,另一方面在加快血管基底膜降解、提高血管通透性的基础上,有利于癌细胞的脱落转移,因此在晚期临床分

期、有淋巴结转移、肿块较大、出现胸膜浸润的患者其表达较高。

肺癌的治疗现已进入分子化、个体化阶段,这就要求尽可能多地了解在其发生、发展过程中所涉及到的相关分子,希望通过本研究能够为今后肺癌的分子靶向治疗、预后评估提供一些理论依据。

参考文献

[1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.

[2] Hammock L, Lewis M, Phillips C, et al. Strong HER-2/neu protein overexpression by immunohistochemistry often dose not predict Oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization[J]. Hum Pathol, 2003, 34(8): 1043-1405.

[3] Stella GM, Scabini R, Inghilleri S, et al. EGFR and KRAS mutational profiling in fresh non-small cell lung cancer (NSCLC) cells[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2013, 139(8): 1327-1335.

[4] Zhang L, Zhang J, Chen Z, et al. Epidermal growth factor (EGF) triggers the malignancy of hemangioma cells via activation of NF- κ B signals[J]. Bio Pha, 2016, 82(82): 133-140.

[5] 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.

[6] Villalva C, Duranton-Tanneur V, Guilloteau K, et al. EGFR, KRAS, BRAF, and HER-2 molecular status in brain metastases from 77 NSCLC patients[J]. Cancer Med, 2013, 2(3): 296-304.

[7] Yang L, Lu JG, Tan QH, et al. Value of COX-2 and HER-

2 in judging condition and prognosis in non-small cell lung cancer patients[J]. Clin Oncol Cancer Res, 2010, 7(3): 200-205.

[8] Nechaev IN, Knyazev EN, Krainova NA, et al. Express analysis of HER-2/neu status in breast cancer biopsy specimens[J]. Bull Exp Biol Med, 2013, 155(4): 522-526.

[9] Albarello L, Pecciarini L, Doglioni C. HER2 testing in gastric cancer[J]. Adv Anat Pathol, 2011, 18(1): 53-59.

[10] Maeda A, Nakata M, Yasuda K, et al. Influence of vascular endothelial growth factor single nucleotide polymorphisms on non-small cell lung cancer tumor angiogenesis[J]. Oncol Rep, 2013, 29(1): 39-44.

[11] 陈秋兰, 周绍荣, 焦兰农, 等. 乳腺癌组织中 HER-2、VEGF 和 Ki67 的表达及临床意义[J]. 实用临床医药杂志, 2015, 19(15): 38-40.

[12] Ilhan N, Gungor H, Gul HF, et al. Expression of endoglin and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in experimental colorectal cancer[J]. Anticancer Res, 2016, 36(8): 3953-3959.

[13] Siregar GA, Halim S, Sitepu VR. Serum TNF- α , IL-8, VEGF levels in Helicobacter pylori infection and their association with degree of gastritis[J]. Acta Med Indones, 2015, 47(2): 120-126.

[14] 翟乃亮, 刘金苹, 高福泉. 非小细胞肺癌患者血清中 VEGF、Ang-2 和 survivin 的表达及相关性研究[J]. 滨州医学院学报, 2016, 39(1): 23-25.

[15] Brussino L, Culla B, Bucca C, et al. Inflammatory cytokines and VEGF measured in exhaled breath condensate are correlated with tumor mass in non-small cell lung cancer[J]. J Breath Res, 2014, 8(2): 271-275.

(收稿日期: 2016-04-22 修回日期: 2016-06-17)

(上接第 2842 页)

[2] 伍俊, 赵宏祥. 献血者丙氨酸氨基转移酶初筛的效果评价与分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(22): 1877-1878.

[3] 金齐, 王宏权, 牛文博, 等. 2010~2012 年锦州口岸出入境人员疾病监测结果分析[J]. 中国国际卫生检疫杂志, 2013, 11(6): 867-868.

[4] 唐明慧, 汪海波, 史咏梅, 等. 珠海口岸出入境人员 HBsAg、HBeAg 和转氨酶检测结果分析[J]. 热带医学杂志, 2016, 21(3): 533-534.

[5] 尤榕, 韩玲, 王健, 等. 街头无偿献血干式化学试纸条筛查 ALT 的效果评价[J]. 实验与检验医学, 2014, 32(3): 346-347.

[6] 石延社. 丙铜酸氧化酶法与赖氏法检测血清 ALT 的比较[J]. 临床输血与检验, 2003, 5(2): 139-140.

[7] Ceriotti F, Henny J, Queralto J, et al. Common reference intervals for aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and gamma-glutamyl transferase

(GGT) in serum; results from an IFCC multicenter study[J]. Clin Chem Lab Med, 2010, 48(11): 1593-1601.

[8] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验规程[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 279-280.

[9] 宋丽娟, 宋立晶. 赖氏法和速率法检测血清 ALT 方法学比较[J]. 宁夏医学杂志, 2005, 27(12): 870-871.

[10] 孙金莲, 张丽. 丙酮酸氧化酶速率法在大批量献血员 ALT 检测中的应用[J]. 包头医学院学报, 2010, 18(3): 289-290.

[11] 李天君, 赵锋, 张文学, 等. 采供血机构不同检测系统对 ALT 检测结果比对研究[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(9): 849-851.

[12] 韩金玉, 张成松, 王爱香, 等. 改良速率法检测 ALT 的探讨[J]. 临床输血与检验, 2000, 2(4): 30-31.

(收稿日期: 2016-05-11 修回日期: 2016-08-11)