

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.03.007

文章编号: 1005-8982(2016)03-0034-05

论著

晚期非小细胞肺癌中上皮细胞间质转型和表皮生长因子受体的检测及其相关性研究

柴春香¹, 王晓敏², 郭文君², 孙永红²

(潍坊医学院附属医院 1. 医务科, 2. 病理科, 山东 潍坊 261000)

摘要:目的 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)中上皮细胞间质转型(EMT)与表皮生长因子受体(EGFR)的相关性。**方法** 免疫组织化学法(EnVision)检测 78 例晚期 NSCLC 组织和 16 例正常肺组织中的 EGFR、E-钙黏素(E-cadherin)和波蛋白(Vimentin)的表达。*EGFR* 18~21 号外显子聚合酶链反应(PCR)扩增及基因测序。**结果** 78 例 NSCLC 中,*EGFR*、E-cadherin 和 Vimentin 在 NSCLC 中阳性表达率分别为 61.5%(48/78)、43.6%(34/78)和 56.4%(44/78),*EGFR* 基因突变率为 24.4%(19/78),正常组为阴性。*EGFR* 野生型组的 EMT 发生率高(67.8% vs 21.1%),*EGFR* 蛋白与 EMT 呈正相关性($r=0.236, P=0.037$)。**结论** E-cadherin 降低或全部丢失及 *EGFR* 通过信号传导通路可以促进 EMT 的发生。

关键词: 晚期非小细胞肺癌; 上皮细胞间质转型; 表皮生长因子受体

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Relationship between EGFR and EMT in advanced non-small cell lung cancer

Chun-xiang Chai¹, Xiao-min Wang², Wen-jun Guo², Yong-hong Sun²

(1. Medical Department, 2. Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261000, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Immunohistochemistry (EnVision method) was used to detect the expressions of EGFR, E-cadherin and vimentin. Exons 18-21 of *EGFR* were detected by PCR and gene sequencing. **Results** The positive expression rate of EGFR, E-cadherin and vimentin was 61.5% (48/78), 43.6% (34/78), 56.4% (44/78) respectively in the 78 cases of NSCLC; while they were not expressed in the normal group. The mutation rate of *EGFR* gene was 24.4% (19/78) in the NSCLC group. The incidence of EMT was higher in the *EGFR* wild-type group than in the mutation group (67.8% vs 21.1%). There was a positive correlation between EGFR protein expression and EMT ($r=0.236, P=0.037$). **Conclusions** Lost E-cadherin and EGFR signaling pathways could promote the formation of EMT.

Keywords: non-small cell lung cancer; epithelial-mesenchymal transition; epidermal growth factor receptor

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 是目前较常见的肿瘤相关死亡原因, 晚期 NSCLC 患者发生淋巴结或远处转移, 治疗效果及预后较差。肿瘤细胞的侵袭性是肿瘤转移主要因素之

一, 研究表明, 上皮细胞间质转型(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在肿瘤细胞侵袭过程中起重要作用, EMT 的发生与多种蛋白分子和信号传导通路有关, 以 E-钙黏素(E-cadherin)表征上皮型

收稿日期: 2014-01-07

[通信作者] 王晓敏, E-mail: wangxiaomin1986@sina.cn

指标蛋白的丧失以及波蛋白(Vimentin)表征间质型指标蛋白的获得为主要特征。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)介导的信号传导通路在 NSCLC 的研究中较热门,尤其是基因检测及靶向治疗中的应用价值被广泛认可。本实验对 78 例发生转移的晚期 NSCLC 患者肿瘤组织中 EGFR 进行基因测序, E-cadherin、Vimentin 和 EGFR 蛋白进行免疫组织化学法检测, 分析 3 者在晚期 NSCLC 中的临床意义及内在联系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2010 年 1 月 -2013 年 1 月在潍坊医学院附属医院行穿刺或支气管镜活检的晚期 NSCLC 患者的肿瘤组织。根据 2009 年第七版的肺癌 TNM 分期标准, 78 例患者临床分期为 IV 期(包括淋巴结及远处转移)。其中, 男性 54 例, 女性 24 例; 年龄 <60 岁 30 例, ≥60 岁 48 例, 平均 62.5 岁; 有吸烟史 52 例, 无吸烟史 26 例; 肺腺癌 57 例, 鳞癌 21 例。正常肺组织标本 16 例作为对照组。

1.2 方法

将 NSCLC 组织行石蜡包埋, 4 μm 厚度切片, 苏木精 - 伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)染色。

1.2.1 DNA 提取和聚合酶链反应(polymerase chain reaction, RT-PCR) 石蜡切片的 DNA 提取: ①将 5~10 个切片 10 000 r/min 离心 1 min, 加入 250 μl Buffer TL 收集管 A, 90℃ 孵育 1 h。②室温放置 1 min, 12 000 r/min 离心 2 min, 移液器吸取 200 μl 组织液体至 1.5 ml 收集管 B 中, 加入 20 μl Omega Business 蛋白酶(蛋白酶 K 20 mg/ml), 55℃ 水浴, 过夜消化。③加入 250 μl Buffer BL 于过夜消化的液体中, 加入 4 μl 助沉剂, 70℃ 水浴箱内水浴 10 min, 期间进行 DNA 吸附柱平衡准备。④DNA 吸附柱中纯化, 洗脱液体, 循环 2 次。将吸附柱装至新的无菌 Eppendorf 管中, 加入 70℃ 预热的 Elution Buffer, 静置 > 3 min, 12 000 r/min 离心 2 min。对提取的 DNA 进行质量鉴定。PCR 扩增 EGFR 18~21 号外显子。将 PCR 产物送至大连宝生生物工程有限公司进行测序, 并将测序结果与正常基因序列进行比对分析。

1.2.2 免疫组织化学(EnVision)法 常规脱蜡至水, 抗原修复处理, 滴加一抗(EGFR、E-cadherin、Vimentin), 37℃ 培养箱孵育 45 min, 滴加二抗

(K5007), 二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)显色, 苏木素复染, 1% 盐酸酒精分化, 自来水反蓝, 脱水透明, 中性树脂封固。阳性对照采用北京中杉生物科技有限公司提供的阳性片, 阴性对照采用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)液代替一抗。判读方法: 阳性为细胞出现棕黄色颗粒, 阴性为无显色。E-cadherin、Vimentin 和 EGFR 阳性着色在细胞膜和/或细胞浆。根据其染色程度及细胞数量进行染色评分判读, 阳性细胞评分法: 阴性为 0 分, 阳性细胞比例 <25% 为 1 分, 阳性细胞比例 25%~50% 为 2 分, 阳性细胞比例 51%~75% 为 3 分, 阳性细胞比例 >75% 为 4 分。细胞染色程度评分法: 肿瘤细胞不着色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。上述两项之和即为肿瘤细胞的染色评分, 总分 0 分为阴性(-), 1~2 分为弱阳性(+), 3~6 分为阳性(++), 7~12 分为强阳性(+++)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 率的比较用 χ^2 检验, $1 \leq T < 5$ 时, 采用校正公式; 相关性分析采用 Spearman 相关性分析, $P < 0.05$ 为差异统计学意义。

2 结果

2.1 EGFR、E-cadherin 和 Vimentin 在 NSCLC 组织中的表达

78 例 NSCLC 患者基因突变率为 24.4% (19/78)。EGFR、E-cadherin 和 Vimentin 阳性表达率分别为 61.5% (48/78)、43.6% (34/78) 和 56.4% (44/78), 78 例患者的 EMT 发生率为 56.4%。16 例正常肺组织 EGFR、E-cadherin 和 Vimentin 为阴性。见图 1~8 和表 1。

2.2 NSCLC 组织中 EGFR 和 EMT 的表达及其与临床病理因素的相关性

78 例 NSCLC 患者中, 腺癌 EGFR 基因突变率高于鳞癌 (50% vs 0%), 经假设检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), EGFR 基因突变与年龄、性别及吸烟史无关 ($P > 0.05$)。鳞癌患者 EGFR 阳性表达率 (81%) 高于腺癌患者 (54.4%), 经假设检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与患者的性别、年龄及吸烟史无关 ($P > 0.05$)。男性 EMT 发生率 (66.7%) 高于女性 (33.3%), 经假设检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); EMT 发生率与组织类型、吸烟史及年龄无关 ($P > 0.05$)。见表 2。

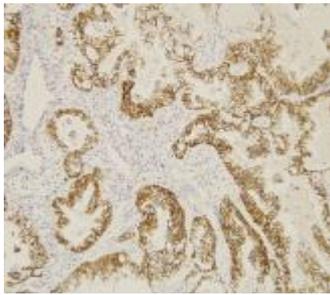


图 1 E-cadherin 在 NSCLC 肿瘤细胞膜和细胞浆中表达 (EnVision × 200)

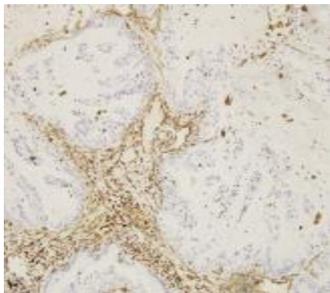


图 2 Vimentin 阴性 (EnVision × 200)

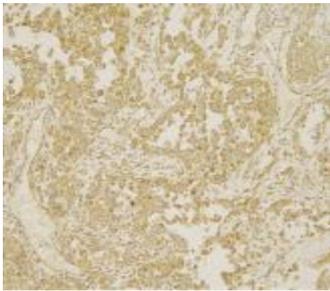


图 3 Vimentin 在 NSCLC 肿瘤细胞浆中表达 (EnVision × 200)



图 4 E-cadherin 阴性 (EnVision × 200)

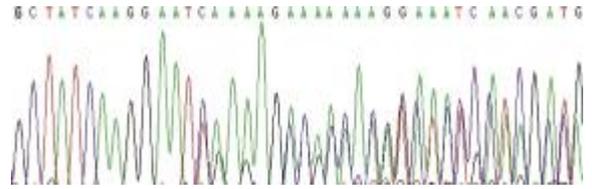


图 5 外显子 19 杂合缺失突变 (DelL747-S752)正向测序图

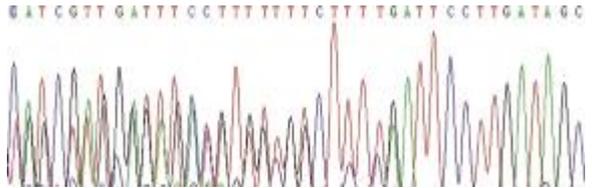


图 6 外显子 19 杂合缺失突变 (DelL747-S752)反向测序图

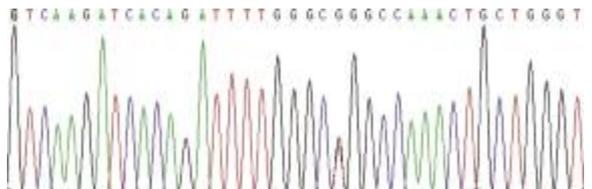


图 7 外显子 21 858 密码子杂合点突变 (CTG>CGG)正向测序图

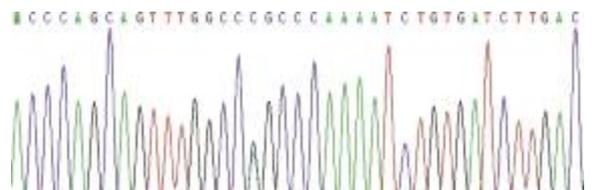


图 8 外显子 21 858 密码子杂合点突变 (CTG>CGG)反向测序图

2.3 EGFR 基因型与晚期 NSCLC 中 EMT 的相关性

晚期 NSCLC 存在 EGFR 基因突变的 EMT 发生率(21.1%)明显低于无 EGFR 基因突变的 EMT 发生率(67.8%),差异有统计学意义($P=0.000$)。

表 1 EGFR 和 EMT 在晚期 NSCLC 及正常肺组织中的表达 例

组别	例数	EGFR 基因			EGFR 蛋白			EMT 蛋白		
		+	-	P 值	+	-	P 值	+	-	P 值
NSCLC 组	78	19	59	0.036	48	30		34	48	0.001
正常组	16	0	16		0	16	0.000	0	16	

表 2 临床病理因素与晚期 NSCLC 组织中 EGFR 和 EMT 表达的相关性 例

临床病理因素	例数	EGFR 基因			EGFR 蛋白			EMT		
		-	+	P 值	-	+	P 值	-	+	P 值
性别										
男	54	44	10	0.073	21	33	0.909	18	36	0.010
女	24	15	9		9	15		16	9	
年龄										
≥60 岁	48	37	11	0.712	19	29	0.800	23	25	0.601
<60 岁	30	22	8		11	19		11	9	
吸烟史										
有	52	40	12	0.713	20	31	0.853	22	30	0.751
无	26	19	7		10	17		12	14	
组织类型										
腺癌	57	38	19	0.002	26	31	0.033	27	30	0.273
鳞癌	21	21	0		4	17		7	14	

2.4 EGFR 蛋白与 NSCLC 中 EMT 的相关性

Spearman 秩和相关性分析显示,78 例晚期 NSCLC 组织中 44 例发生 EMT,其中 32 例 EGFR 阳性表达,12 例 EGFR 阴性表达;34 例未发生 EMT 的晚期 NSCLC 患者中,20 例 EGFR 阳性表达,14 例 EGFR 阴性表达。对 EMT 和 EGFR 的表达状态进行 Spearman 相关性分析,结果显示两指标有相关性 ($r=0.236, P=0.037$)。

3 讨论

EMT 是上皮细胞在与周围间质的相互作用过程中,逐渐获得某些间质细胞特有性状的现象,以 E-cadherin 阳性、Vimentin 阴性为表征上皮型;以 E-cadherin 阴性、Vimentin 阳性为表征间质型。Hazan 等^[1]报道,E-cadherin 及 Vimentin 细胞膜或细胞浆染色与 Western blot 检测结果有较好的一致性,免疫组织化学法结果可以表征 EMT 状态。EMT 的发生涉及信号转导通路和上皮表型蛋白丢失^[1],因此,本实验通过分析 EMT 与 EGFR 的相关性,初步探讨 EGFR 信号转导能否诱导 EMT 的形成。

78 例 NSCLC 患者中 EGFR 基因突变率为 24.4%(19/78),腺癌高于鳞癌,差异有统计学意义($P < 0.05$),EGFR 突变与吸烟及性别无关($P > 0.05$)。国内报道,中国人 EGFR 突变率为 19.2% ~ 33.3%^[2-4]。EGFR 蛋白在许多肿瘤中过表达,在肺癌的表达率为 53% ~ 69%,其与肿瘤的生长、侵袭和转移密切相关^[5],在本实验中,NSCLC 组织中 EGFR 蛋白阳性表达率为 61.5%(48/68),腺癌的患者 EGFR 阳性表达

率低于鳞癌患者($P < 0.05$),与患者的性别、年龄及吸烟史无关,与 Pastorino 等^[6]EGFR 蛋白在鳞癌中过表达发生率较高的观点相同。

本研究采用免疫组织化学法检测 NSCLC 中 E-cadherin 和 Vimentin 的表达,阳性率分别为 43.6%和 56.4%。本研究发现,男性 EMT 发生率高于女性,差异有统计学意义($P < 0.05$),国内部分文献报道,E-cadherin 和 Vimentin 的表达与患者年龄、性别、组织类型及 TNM 分期无关^[7-9],但有待提高样本量进一步分析。E-cadherin 和 Vimentin 的表达具有较好的一致性。本实验中 EMT 的发生率为 56.4%,较田茗源等^[9]的实验数据偏高,笔者分析与本研究对象为晚期 NSCLC 患者有关,肿瘤发生转移,说明 EMT 与 NSCLC 肿瘤细胞发生原位侵袭和远处转移密切相关。研究进一步证实来源于上皮组织的恶性肿瘤中 E-cadherin 降低或全部丢失,Vimentin 表达升高,细胞间的粘附力降低,从而促进肿瘤组织发生 EMT。

很多细胞外信号的生长因子与 EMT 的发生相关,如 HGF、EGF、VEGF 等,可以通过不同的信号传导途径诱导发生 EMT^[10-11],Voon 等^[12]提出 EMT 诱导胃干细胞分化和促进肿瘤发生与 EGFR 信号转导通路有关。本实验结果显示,78 例 NSCLC 组织中 EGFR 表达与 EMT 发生相关($P < 0.05$)。在细胞水平上,EGFR 和 E-cadherin 共同存在于细胞间的黏着小带,与 β -catenin 相连。当 EGFR 过表达,与细胞外的配体结合,受体自身的酪氨酸发生磷酸化,使 E-cadherin 从肌动蛋白丝上解离下来,细胞间的

黏附力下降,促使肿瘤发生 EMT。邓沁芳等^[13]研究发现,EGFR 突变患者的 NSCLC 上皮表型高于 EGFR 未突变患者(77.7% vs 18.2%, $P < 0.05$)。本研究结果与邓沁芳等^[13]的相反,笔者发现,晚期 NSCLC 存在 EGFR 基因突变的 EMT 发生率低于无 EGFR 基因突变的 EMT 发生率($P < 0.05$)。笔者分析,EGFR 发生基因突变时其介导的信号通路与诱导 EMT 发生的能力减弱。

本实验可以得出,E-cadherin 降低或全部丢失及 EGFR 通过信号传导通路可以促进 EMT 发生。同时,联合检测 EGFR 和 EMT 的表型蛋白有利于判断肿瘤的恶性程度,为临床治疗及预后提供更有效的依据。预测 EMT 的发生受 EGFR 基因突变的影响,突变型患者肿瘤不易发生 EMT,而野生型患者易出现间质型转化,其作用机制有待进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, et al. Exogenous expression of E-cadherin in breast cancer induces cell migration, invasion and metastasis[J]. J Cell Biol, 2000, 148(4): 779-790.
- [2] 王琼, 吕亚莉, 钟梅, 等. 非小细胞肺癌中的 EGFR 和 K-ras 基因突变检测分析与病理特征[J]. 诊断病理学杂志, 2012, 19(2): 144-147.
- [3] 栾焕玲, 孙蕾娜, 董娜, 等. 非小细胞肺癌中的 EGFR 和 K-ras 基因突变与蛋白表达相关性的研究[J]. 中国癌症杂志, 2010, 20(7): 486-491.
- [4] Mu XL, Li LY, Zhang XT, et al. Gefitinib-sensitive mutations of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain in Chinese patients with non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(12): 4289-4294.
- [5] Jeon YK, Sung SW, Chung JH, et al. Clinico-pathologic features and prognostic implications of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number and protein expression in non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2006, 54(3): 387-398.
- [6] Pastorino U, Anderola S, Tagliabue E, et al. Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis[J]. J Clin Oncol, 1997, 15(8): 2858-2865.
- [7] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(6): 442-454.
- [8] 石永利, 吴鸿雁, 等. 上皮-间叶转变相关蛋白在 NSCLC 中的表达及其预后意义[J]. 中国癌症杂志, 2011, 21(5): 342-347.
- [9] 田茗源, 王林辉, 等. 肺癌组织中 E-cadherin 和 Vimentin 的表达及其上皮-间质转化的相关性[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(9): 1068-1071.
- [10] Lu KV, Chang JP, Parachoniak CA, et al. VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex[J]. Cancer Cell, 2012, 22(1): 21-35.
- [11] Tanahashi T, Osada S, Yamada A, et al. Extracellular signal-regulated kinase and Akt activation play a critical role in the process of hepatocyte growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. Int J Oncol, 2013, 42(2): 556-564.
- [12] Voon DC, Wang H, Koo JK, et al. EMT-induced stemness and tumorigenicity are fueled by the EGFR/Ras pathway[J]. PLoS One, 2013, DOI: 10.1371/journal.pone.0070427.
- [13] 邓沁芳, 周彩存, 苏春霞, 等. 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[J]. 癌症防治研究, 2008, 35(4): 258-262.

(童颖丹 编辑)