

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.06.018

· 临床研究 ·

EGFR、HER2、CXCR4 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义*

刘莉 陆远 王媛 任新玲[△]

(第四军医大学西京医院呼吸科 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 研究 EGFR(epidermal growth factor receptor)、HER2(human epidermal growth factor receptor-2)及 CXCR4(chemokine (C-X-C motif) receptor 4)在 NSCLC 中的表达,分析它们与 NSCLC 临床病理特征的关系。**方法:** 选择我科 2009 年 7 月 -2012 年 12 月收治的 75 例非小细胞肺癌(NSCLC)患者为研究对象,支气管镜活检得到 NSCLC 肿瘤组织标本,免疫组织化学技术分别检测 EGFR、HER2、CXCR4 在 NSCLC 组织中的表达,并分析 EGFR、HER2、CXCR4 的表达与 NSCLC 患者临床病理指标和生存期的相关性。**结果:** EGFR、HER2 及 CXCR4 在 NSCLC 中的表达与患者淋巴转移及远处转移有关($P<0.05$)。EGFR、HER2 及 CXCR4 在 NSCLC 中的表达均呈正相关,EGFR 与 HER2,EGFR 与 CXCR4,HER2 与 CXCR4 的相关系数分别为 $r=0.296$ ($P<0.01$), $r=0.578$ ($P<0.01$), $r=0.426$ ($P<0.01$)。3 种基因表达越多,患者中位生存时间越短($P<0.05$)。**结论:** EGFR、HER2 及 CXCR4 与 NSCLC 的发生发展关系密切,针对性的多个靶向抑制,可更好发挥抑癌作用。根据三者不同的表达情况初步筛选出针对靶向治疗的单一或联合靶点,有助于为 NSCLC 患者提供个体化的治疗方案。为进一步治疗提供依据。

关键词: 表皮生长因子受体;人表皮生长因子 2;C-X-C 家族趋化因子受体 4;非小细胞肺癌

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)06-1069-05

Expression and Clinical Significance of EGFR,HER2 and CXCR4 in Non-small Cell Lung Cancer*

LIU Li, LU Yuan, WANG Yuan, REN Xin-ling[△]

(Department of Pulmonary Medicine, XiJing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of EGFR(epidermal growth factor receptor), HER2(human Epidermal growth factor receptor-2) and CXCR4 (chemokine (C-X-C motif) receptor 4) in NSCLC and analyze their relationship with clinicopathological features of Non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods:** 75 cases of NSCLC admitted in our hospital from July 2009 to December 2012 were selected, and the expressions of EGFR, HER2 and CXCR4 in NSCLC tissues from bronchoscopic biopsy were detected by immunohistochemical technique. The correlation between EGFR, HER2 and CXCR4 expression and clinicopathological features as well as survival was analyzed. **Results:** The positive EGFR, HER2 and CXCR4 expression in NSCLC was significantly correlated with lymph node metastasis and distant metastasis ($P<0.05$). The correlation of EGFR, HER2 and CXCR4 expression were positively. The correlation coefficient of EGFR, HER2 and CXCR4 respectively was $r=0.296$ ($P<0.01$), $r=0.578$ ($P<0.01$), $r=0.426$ ($P<0.01$). Survival period of EGFR, HER2 and CXCR4 in positive cases were significantly shorter than negative cases; and the more positive expression, the shorter survival time ($P<0.05$). **Conclusion:** Upregulation of the EGFR, HER2 and CXCR4 expression was closely related with NSCLC metastasis and prognosis. These three proteins which was inhibited may play a better suppressor role. Under the different expression of the three proteins can screened a single or combined therapeutic target, which is benefit for NSCLC patients to provide individualized therapy and the further treatment basis.

Key words: EGFR (epidermal growth factor receptor); HER2(human Epidermal growth factor receptor-2); CXCR4(chemokine (C-X-C motif) receptor 4; Non-small cell lung cancer (NSCLC)

Chinese Library Classification(CLC): R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)06-1069-05

前言

非小细胞肺癌(NSCLC)严重危害人类健康,无论发病率还

是死亡率均居全球癌症首位^[1]。虽然诊断、治疗手段不断进步,但确诊后 5 年生存率仍不足 15 %^[2]。EGFR 酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKIs)的应用使 NSCLC 的治疗取得了突破性进展,

* 基金项目:国家自然科学基金项目(43411C1782);陕西省社发攻关基金项目(2011K15-06-02)

作者简介:刘莉(1981-),女,主治医师,硕士研究生,研究方向:肺癌靶向治疗与耐药机制,电话:13038554715,

E-mail:13038554715@163.com

[△]通讯作者:任新玲,副教授,副主任医师,博士,E-mail:majRenXL@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2013-10-08 接受日期:2013-10-30)

EGFR 在腺癌、亚裔、女性、不吸烟等人群敏感型突变率分别为 40%、30%、42% 及 51%^[3]。EGFR-TKIs 在以上敏感型突变人群中总有效率达 78%^[4]。对 EGFR 敏感的患者应用 TKIs 客观缓解率为 70%,且无进展生存期约 10 个月^[5,6]。近来有研究发现与 EGFR 同家族的表皮生长因子受体 2(HER2)由于缺乏特异性的配体,会优先与 EGFR 结合形成异二聚体,并与相应的配体结合完成下游信号传导。其结果可以减弱细胞内吞对 EGFR 的降解,使 EGFR 在细胞膜表面停留时间延长,其生物学效应增强^[7]。还有研究指出,EGFR 通过与配体结合可以提高 NSCLC 中 CXCR4 的表达,增强癌细胞的转移能力^[8]。

本研究目的是在 NSCLC 中明确 EGFR、HER2、CXCR4 的表达情况,初步研究 EGFR、HER2 及 CXCR4 三者的相关性,进一步评估它们与 NSCLC 侵袭、转移、患者生存期之间的关系。以期阐明趋化因子受体和表皮生长因子受体相互作用,为肿瘤的转移机制指明进一步的研究方向,提示更有效的肿瘤治疗策略。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集第四军医大学西京医院呼吸科 2009 年 7 月-2012 年 12 月收治的 75 例非小细胞肺癌(NSCLC)住院患者经皮肺活检或纤维支气管镜活检标本 75 例,其中男性 51 例,女性 24 例,男:女为 2.1:1,年龄 47-81 岁,平均年龄 61.48 岁。其中腺癌 37 例(49.33%),鳞癌 32 例(42.66%)。淋巴转移 59 例(78.66%),远处转移 45 例(60.00%)。

1.2 主要材料和试剂

鼠抗人 EGFR 单克隆抗体(即用型,北京中杉金桥生物技术有限公司,产品编号:ZA-0505,克隆号:EP22)。兔抗人单克隆抗体 HER2(即用型,Ventana,产品编号:C11145,克隆号:4B5)。兔抗人单克隆抗体 CXCR4(浓缩型,1:100 稀释,Abcam,产品编号:AB124824,克隆号:UMB2)。

1.3 实验方法

肿瘤组织标本均经 4%甲醛固定,石蜡常规包埋,石蜡标本切片,厚 4 μm 。切片烤箱干烤 30 min,依次二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,灭活内源性过氧化酶,柠檬酸缓冲液高压抗原修复(0.01 M,pH 6.0),严格按照说明书进行免疫组化操作。实验设有阴性对照,以 PBS 代替一抗,其余步骤不变。用已知阳性片做阳性对照片。

1.4 结果判定

免疫组化结果分析采用半定量积分法计数阳性细胞,在光学显微镜高倍视野($\times 200$)下随机选择 5 个视野,计数 500 个细胞,根据阳性细胞比例及阳性着色强度,采用的评分标准:阳性细胞数 $<5\%$, $5\%-24\%$, $25\%-50\%$, $51\%-74\%$ 及 $\geq 75\%$,分别判定为 0、1、2、3、4 分。每张切片阳性细胞的着色强度按无着色、淡黄色、棕黄色和棕褐色分别判定为 0、1、2、3 分。根据两项积分之和判定结果,0 分为阴性(-),1-2 分为弱阳性(+),3-5 分为中等阳性(++),6-7 分为强阳性(+++)。每例均设有 HE 切片作对照观察,并设阳性和阴性对照。

1.5 随访

随访以查阅既往住院病史资料和电话相结合的方式进行。

随访截止日期为 2013 年间隔 3 个月随访 1 次,连续随访 2 次均无法联系记为失访。

1.6 统计学分析

采用 SPSS21.0 统计学软件进行统计学分析,计数资料采用两个(或多个)样本率比较的检验,相关性分析采用 Spearman 等级相关分析。检验水准 $P=0.05$ 。

2 结果

2.1 3 种基因在 NSCLC 中的表达及与临床病理参数的关系

EGFR 阳性在细胞膜和(或)细胞浆着色,呈均匀一致的棕黄色或棕褐色颗粒;HER2 阳性主要在细胞膜和胞浆混合表达,少数在细胞膜单发弥漫表达,呈均匀一致的棕黄色颗粒;CXCR4 阳性在细胞膜或细胞核出现均匀一致的棕黄色或棕褐色颗粒。见图 1。EGFR、HER2 及 CXCR4 在 NSCLC 中的分级表达情况,见表 1。EGFR、HER2 及 CXCR4 在 NSCL 组织中的阳性表达率分别为 58.66%(44/75),28%(21/75),60%(45/75)。EGFR、HER2 及 CXCR4 在 NSCLC 中的表达与患者的年龄、性别及组织分型无关($P>0.05$),而与患者淋巴转移及远处转移有关($P<0.05$),有淋巴及远处转移的患者阳性表达明显增高(表 2)。

2.2 3 种基因表达的相关性

将 75 例患者标本 3 种基因表达的等级资料录入统计分析软件,依据 pearson 等级相关分析可知 EGFR、HER2 及 CXCR4 在 NSCLC 中的表达均呈正相关,EGFR 与 HER2,EGFR 与 CXCR4,HER2 与 CXCR4 的相关系数分别为 $r=0.296$ ($P<0.01$), $r=0.578$ ($P<0.01$), $r=0.426$ ($P<0.01$)。

2.3 3 种基因表达与生存期的关系

将 75 例患者标本 3 种基因表达的等级资料 and 患者生存时间的计量资料录入统计分析软件,依据 Wilcoxon 秩和检验分析可知:3 种基因均无表达的患者中位生存时间 18.3 月;单基因表达的患者中位生存时间 16.3 月;有 2 种基因表达的患者中位生存时间 6.3 月;3 种基因同时表达的患者中位生存时间 3.6 月。根据 Kaplan-Meier 生存分析曲线的结果,本研究发现 EGFR、HER2 及 CXCR4 联合同时表达病例的预后明显较无联合表达的病例差,3 个基因同时表达生存期最短。经 log-rank 检验结果具有统计学意义。提示 EGFR、HER2 及 CXCR4 均是影响 NSCLC 患者生存的危险因素,见图 2。

3 讨论

原癌基因 HER2、EGFR 均是表皮生长因子受体酪氨酸激酶家族成员。EGFR 属 I 型表皮生长因子受体。它有胞外、跨膜和胞内三个结构域。胞内结构域具有酪氨酸激酶(TPK)活性,EGFR 与配体 EGF 结合,可促使细胞内底物磷酸化,介导下游信号传导,刺激细胞增殖和分化。而 HER2 缺乏特异性的配体,可与 EGFR 结合,激活磷酸酶,继续下游信号转导,加速细胞生长。两者在内部结构和生物学功能上极其相似。它们在肿瘤细胞的生存、增殖、侵袭和转移,肿瘤生成中发挥相互协同的作用。在乳腺癌临床治疗研究中发现,联用 EGFR/HER2-TKI 拉帕替尼(trastuzumab)和曲妥珠单抗(Trastuzumab)可同时抑制 EGFR 和 HER2 的磷酸化水平,降低两者活性,从而提高疗效^[9],

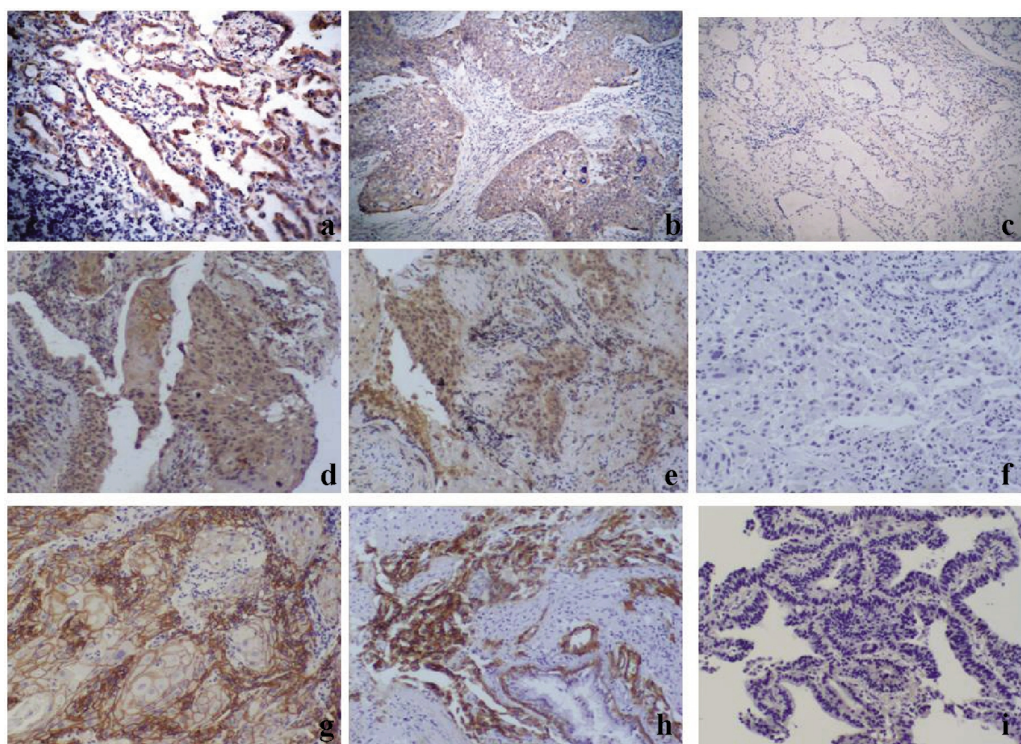


图 1 EGFR、HER2 及 CXCR4 表达结果(免疫组织化学, × 20)

* 注: a-b HER2 阳性表达, c HER2 阴性表达, d-e CXCR4 阳性表达, f CXCR4 阴性表达, g-h EGFR 阳性表达, i EGFR 阴性表达.

Fig.1 Expression of EGFR, HER2 and CXCR4 shown by Immunohistochemical staining(× 20)

*Note: a-b Positive Expression of HER2, c Negative Expression of HER2, d-e Positive Expression of CXCR4, f Negative Expression of CXCR4, g-h Positive Expression of EGFR, i Negative Expression of EGFR.

表 1 NSCLC 中 EGFR、HER2 及 CXCR4 的表达情况

Table 1 Expression of EGFR, HER2 and CXCR4 in NSCLC

Oncogene	EGFR	HER2	CXCR4
N	75	75	75
-	31	54	30
+	15	13	21
++	18	8	18
+++	11	0	6

表 2 NSCLC 中 EGFR、HER2 及 CXCR4 的表达与临床病理参数的关系 n(%)

Table 2 Clinicopathologic factors and expression of EGFR, HER2 and CXCR4 in NSCLC n(%)

Feature	N	EGFR P Positive	HER2 P Positive	CXCR4 P Positive
Age(Year)		0.483	0.719	0.125
<60	36	27(75)	12(33)	27(75)
≥60	39	17(44)	9(23)	18(46)
Sex		0.979	0.322	1.000
Male	51	29(57)	8(54)	31(64)
Female	24	15(62)	0(33)	14(58)
Pathologic type		0.089	0.074	0.101
Adenocarcinoma	37	25 (67)	11(29)	25(67)
Squamous cell carcinoma	32	17(53)	8(25)	18(56)
Others	6	2(33)	2(33)	2(33)
Lymph node metastasis		<0.01	<0.05	<0.01
No	16	4(25)	1(6)	4(25)
Yes	59	40(78)	20(39)	41(69)

续表 2

Feature	N	EGFR P Positive	HER2 P Positive	CXCR4 P Positive
Metastasis		<0.05	<0.01	0.01
No	30	9(30)	2(6)	10(33)
Yes	45	35(77)	19(42)	35(77)
Survival time(months)		<0.01	<0.01	<0.01
<6	26	26(100)	14(54)	26(100)
>6, <12	18	15(83)	4(22)	16(88)
≥12	31	3(9)	3(9)	3(9)

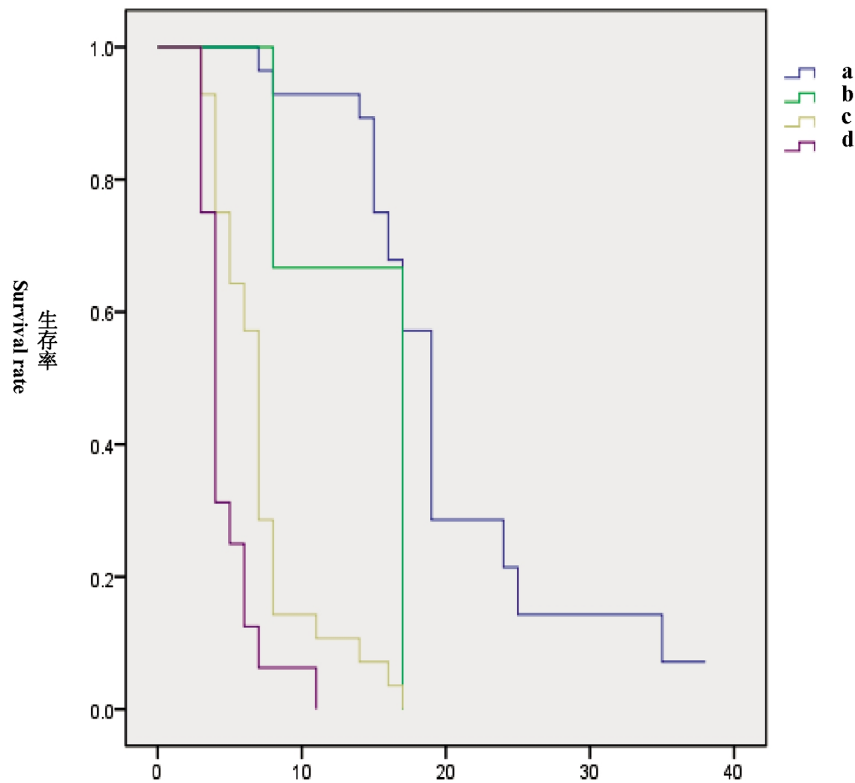


图2 EGFR、HER2 及 CXCR4 联合表达与 NSCLC 预后的关系

* 注: a 3 个基因均无表达, b 1 个基因表达阳性, c 2 个基因表达阳性, d 3 个基因表达阳性。

Fig.2 Relationship between EGFR,HER2 and CXCR4 expression and NSCLC prognosis

*Note: a Three genes were not expressed, b 1 genes were positive, c 2 genes were positive, d 3 genes were positive.

这为表皮生长家族中 EGFR 和 HER2 间的相互联系提供了直接证据。本研究结果亦显示:EGFR 和 HER2 在 NSCLC 中的阳性表达率分别是 58.66% 和 28%, 且随着肿瘤淋巴转移、远处转移而明显增高($P<0.05$)。两者的相关系数 $r=0.296$ ($P<0.01$), 提示 EGFR 和 HER2 与 NSCLC 肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移等过程有关。研究指出 HER2 的扩增与 EGFR-TKI 的 T790M 耐药有关。在 EGFR-TKI 耐药的小鼠模型及患者中均发现 HER2 的扩增, 联用 Afatinb (EGFR/HER2-TKI) 和 Cetuximab (EGFR 单克隆抗体) 能显著减低 HER2 的磷酸化水平^[10]。提示同时靶向抑制 EGFR、HER2 可抑制 NSCLC 的增殖、侵袭、转移, 并缓解 EGFR-TKI 的 T790M 耐药。

肺癌转移是其最重要的生物特征之一, 也是临床治疗所面对的最大难题, 直接影响着患者的预后。2001 年, Muller 首次提出了肿瘤细胞可以利用趋化作用及其受体的特异性结合实

现器官特异性转移^[11]。近年来研究发现, 肿瘤细胞转移到特定器官是不同器官通过趋化作用吸引特定类型肿瘤细胞向特定器官归巢的结果^[12]。在众多的趋化因子受体中, 研究发现许多肿瘤都存在 CXCR4 的表达增强。CXCR4 通过与其唯一配体 CXCL12 结合可激活下游一系列细胞内信号转导通路和效应分子, 调节细胞存活、增殖、迁移和粘附^[3]。在大多数 NSCLC 细胞系中存在 CXCR4 表达上调^[14], NSCLC 组织标本中同样发现 CXCR4 高表达^[15], 且 CXCR4 的高表达与患者淋巴结转移^[16]及不良预后有关^[17]。

低氧条件下, EGFR 与配体结合激活 PI3K/PTEN/AKT 通路使 CXCR4 的表达明显增加。卵巢癌研究中, EGFR 通过转录激活使卵巢癌细胞中 CXCR4/CXCL12 的活性增强, 从而加速癌细胞的增殖和肿瘤的进展^[18]。EGFR 与 CXCR4 之间的具体激活机制还不清楚, 但已有研究发现肿瘤组织切片中能同时检

测到 CXCR4 和 EGFR 表达的患者总体生存率更低^[8]。本研究也发现:EGFR 和 CXCR4 在淋巴转移、远处转移组,两者的阳性表达率明显升高,有统计学差异($P<0.01$),两者同时表达的患者中位生存期明显缩短(6.3 月)。还有研究表明 HER2 通过促进蛋白合成以及抑制溶酶体对其自身的降解从而提高了乳腺癌细胞中 CXCR4 的表达水平^[9]。本研究中,HER2 与 CXCR4、EGFR 与 CXCR4 两两间的相关系数分别为 $r=0.578$ ($P<0.01$), $r=0.426$ ($P<0.01$),且三者同时阳性表达中位生存时间最短(3.571 月)。进一步提示:EGFR、HER2 及 CXCR4 在 NSCLC 肿瘤细胞迁移、粘附、增殖、浸润等过程中起着非常重要的作用,并且三者之间相互影响,相互促进。针对性的多个靶向抑制,更能从多条信号通路上抑制肿瘤进程,更好发挥抑癌作用。

目前肺癌在国际上公认的 TNM 分期是决定手术、放、化疗等治疗的重要依据。但相同 TNM 分期的患者往往对治疗的反应不同,甚至预后差别很大。随着靶向研究的不断深入,出现了许多肺癌敏感性靶点,使肿瘤患者的治疗依据从临床病理分期逐渐转型到分子水平,为患者的个体化治疗提供了更为可靠的证据。本研究用免疫组化方法联合检测 NSCLC 组织中 EGFR、HER2 及 CXCR4 的表达,有助于为 NSCLC 患者提供个体化的治疗方案。根据三者不同的表达情况初步筛选出针对靶向治疗的单一或联合靶点,为进一步治疗提供依据。

参考文献(References)

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-300
- [2] Sharma SV, Bell DW, Settleman J, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(3): 169-181
- [3] Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers[J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(5): 339-346
- [4] Dahabreh IJ, Linardou H, Siannis F, et al. Somatic EGFR mutation and gene copy gain as predictive biomarkers for response to tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(1): 291-303
- [5] Kim ES, Hirsh V, Mok T, et al. Gefitinib versus docetaxel in previously treated NSCLC (INTEREST): a randomized phase III trial[J]. Lancet, 2008, 372(9652): 1809-1818
- [6] Thatcher N, Chang A, Parikh P, et al. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced NSCLC: results from a randomized, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer)[J]. Lancet, 2005, 366(9496): 1527-1537
- [7] Shankaran H, Zhang Y, Tan Y, et al. Model-Based Analysis of HER Activation in Cells Co-Expressing EGFR, HER2 and HER3[J]. PLoS Comput Biol, 2013, 9(8): e1003201
- [8] Phillips RJ, Mestas J, Gharaee-Kermani M, et al. Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/ mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1alpha [J]. J. Biol. Chem, 2005, 280(23): 22473-22481
- [9] Blackwell KL, Burstein HJ, Storniolo AM, et al. Randomized study of Lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2010, 28(7): 1124-1130
- [10] Ken T, Valentina P, Maria E, et al. HER2 Amplification: A Potential Mechanism of Acquired Resistance to EGFR Inhibition in EGFR-Mutant Lung Cancers That Lack the Second-Site EGFR T790M Mutation[J]. Cancer Discov, 2012, 2(10): 922-933
- [11] Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis [J]. Nature, 2001, 410(6824): 50-56
- [12] Chu QD, Panu L, Holm NT, et al. High Chemokine Receptor CXCR4 Level in Triple Negative Breast Cancer Specimens Predicts Poor Clinical Outcome[J]. J Surg Res, 2010, 159(140): 689-695
- [13] Kim SY, Lee CH, Midura BV, et al. Inhibition of the CXCR4/CXCL12 chemokine pathway reduces the development of murine pulmonary metastases [J]. Clin Exp Metastasis, 2008, 25(3): 201-211
- [14] Tang CH, Tan TW, Fu WM, et al. Involvement of matrix metalloproteinase-9 in stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway of lung cancer metastasis[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(1): 35-43
- [15] Reckamp KL, Figlin RA, Burdick MD, et al. CXCR4 expression on circulating pan-cytokeratin positive cells is associated with survival in patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. BMC Cancer, 2009, 29(9): 213
- [16] Su L, Zhang J, Xu H, et al. Differential expression of CXCR4 is associated with the metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells[J]. Clin. Cancer Res, 2005, 11(23): 8273-8280
- [17] Chen G, Wang Z, Liu XY, et al. High-level CXCR4 expression correlates with brain-specific metastasis of non-small cell lung cancer [J]. World J. Surg, 2011, 35(1): 56-61
- [18] Porcile C, Bajetto A, Barbieri F, et al. Stromal cell derived factor 1- α (SDF-1- α /CXCL12) stimulate ovarian cancer cell growth through the EGFR receptor transactivation[J]. Exp cell Res, 2005, 308(2): 241-253
- [19] Li YM, Pan Y, Wei YK, et al. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis[J]. Cancer Cell, 2004, 6(5):459-69