

N₂₋₃ 期鼻咽癌 EGFR、VEGF、EBER 表达与放化疗敏感性的关系

曲 媛,车轶群,沈 迪,杨 琳
(中国医学科学院肿瘤医院,北京 100021)

摘 要: [目的] 探讨 N₂₋₃ 期鼻咽癌 EGFR、VEGF、EBER 表达与放化疗敏感性间的关系。 [方法] 采用免疫组织化学方法研究 143 例经病理确诊的鼻咽癌患者组织 EBER、EGFR 和 VEGF 表达。定量 PCR 和酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 92 例 N₂₋₃ 期鼻咽癌患者血浆 EB 病毒游离 DNA (EBV/DNA)、EGFR、VEGF 的表达水平,并对 92 例 N₂₋₃ 期鼻咽癌随访 2 年。 [结果] N₂₋₃ 期鼻咽癌 EBER、EGFR 及 VEGF 表达阳性率分别为 97.8%(90/92)、95.7%(88/92)和 35.9% (33/92)。EBER 表达与远处转移、复发及临床缓解相关,VEGF 和 EGFR 表达强度与远处转移均呈正相关。N₂₋₃ 期鼻咽癌患者血浆 EBV/DNA、EGFR、VEGF 治疗前与同步放化疗后比较差异均有统计学意义 (P 均 <0.05)。血浆中 EGFR 和 VEGF 表达水平与远处转移相关。 [结论] 血浆和组织中 EGFR 和 VEGF 表达水平均可能与鼻咽癌远处转移相关。

关键词: 鼻咽癌;EBER;EGFR;VEGF

中图分类号:R739.63 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2014)01-0072-05

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2014.01.A017

Correlation of EGFR, VEGF and EBER With Chemoradiotherapy Sensitivity in Nasopharyngeal Carcinoma N₂₋₃

QU Yuan, CHE Yi-qun, SHEN Di, et al.

(Cancer Hospital, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the correlation of EGFR, VEGF, EBER expression with chemoradiotherapy sensitivity in nasopharyngeal carcinoma (NPC) N₂₋₃. [Methods] The expression of EGFR, VEGF and EBER protein was examined in 143 cases with NPC pathologically proven. Plasma VEGF & EGFR were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and EB virus free DNA (EBV/DNA) was detected by real-time PCR in 92 patients with NPC N₂₋₃ and followed-up 2 years. [Results] The positive rate of EBER, EGFR and VEGF was 97.8%(90/92), 95.7%(88/92) and 35.9% (33/92) respectively in NPC cancer tissue. The level of EBER was correlated to distant metastasis, recurrence and clinical remission ($P<0.05$). There was a positive correlation between VEGF, EGFR expression and distant metastasis. The plasma VEGF, EGFR and EBV/DNA levels of pretreatment were higher than those of post-treatment. The plasma EGFR and VEGF were correlated to distant metastasis. [Conclusion] Expression of VEGF and EGFR in tissues and plasma might be an early warning for distant metastasis.

Key words: nasopharyngeal carcinoma; EBER; EGFR; VEGF

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)为我国常见的头颈部恶性肿瘤之一,全世界 80%的鼻咽癌发生在中国。70%鼻咽癌患者确诊时已达局部晚期,5 年生存率 34%~52%。同期放化疗是目前我国 N₂₋₃ 期鼻咽癌标准治疗方案,NCCN 推荐的同期放化疗

联合辅助化疗,因化疗毒副反应严重,中国患者耐受性差且不能改变总生存率^[1]。这就要求我们寻找一种新的综合治疗方案,在提高依从性的同时保证有效率,避免过度医疗。

近年来研究表明表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、EB 病毒

收稿日期:2013-11-22;修回日期:2013-12-05
基金项目:北京希望马拉松专项(LC2013B29)
通讯作者:车轶群, E-mail:cyq@cicams.ac.cn

编码的小 RNA (Epstein-Barr virus encoded RNAs, EBER) 不仅参与细胞的增殖及分化, 而且在肿瘤的浸润、转移及血管形成等过程中起重要作用。本研究旨在探讨 EGFR、VEGF、EBER 在 N₂₋₃ 期鼻咽癌组织和血浆中的表达情况, 并分析其表达与鼻咽癌临床特征的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2010 年 6 月至 2013 年 6 月中国医学科学院肿瘤医院病理科确诊的初治鼻咽癌活检标本 143 例, 其中男性 118 例, 女性 25 例, 年龄 13~70 岁, 中位年龄 43 岁。根据 UICC 2010 年肿瘤临床分期标准分期, N₂₋₃ 期 92 例。所有入选病例均接受根治性调强适形放射治疗, 临床分期为 III、IV 期病例采取同步放化疗, 化疗方案为顺铂 100mg/m²/3 周。所有病例有完整的临床及病理学资料并具有可供切片分析的足够质量及数量的组织标本。病理切片诊断由 2 位主治医师以上病理科医师根据世界卫生组织相关标准进行判读确定。入选患者均进行随访, 放疗结束后每 3 个月进行一次随访, 每 6 个月进行全面的体格检查, 不能来院复诊患者电话随访。

1.2 标本收集

所有患者采用放疗前、后血常规检测剩余血样, EDTA 抗凝血 3~3.5ml, 离心机 1600 rpm 分离血浆, 置-20℃保存备用。实验前 30min 取出平衡至室温。检测血浆中 EBV、EGFR 及 VEGF 水平。

1.3 检测方法及结果判定

1.3.1 免疫组织化学法

使用的一抗为鼠抗人 EGFR 蛋白单克隆抗体、鼠抗人 VEGF 蛋白单克隆抗体, 以上试剂均购自北京中杉金桥公司。采用二步法按照试剂盒操作说明进行操作。阳性对照使用上述抗原的阳性片, 阴性对照使用 PBS 代替一抗。EGFR、VEGF 蛋白阳性染色均呈棕黄或棕褐色, 且均定位于细胞浆。采用半定量方法分为 0~3 分 4 个等级: 阳性细胞百分数中 0 分为没有阳性细胞出现, 1 分为阳性细胞 <30%, 2 分为阳性细胞 30%~70%, 3 分为阳性细胞 ≥70%: 细胞染色强度中 0 分为没有显色, 1 分为浅黄色, 2 分为橘黄色, 3 分为棕黄色。最后评分的判定为前两项计

分的和与 2 的比值, 其中阴性(-)、弱阳性(+)、阳性(++)、强阳性(+++)分别为 0 分、0.5~1 分、1.5~2 分、2.5~3 分。≥1 分计为阳性。

1.3.2 双抗夹心 ELISA 法检测血浆中 VEGF、EGFR 水平

试剂盒 (进口分装) 购自深圳晶美生物工程公司, 实验过程严格按照试剂盒说明书进行。采用 BIO-RAD550 型酶标仪测定, 在 450nm 处读取吸光度(D), 测定值按标准曲线换算成含量。

1.3.3 血浆 EB 病毒游离 DNA 的检测

提取 DNA 采用德国 QIAGEN 公司提供的 QI-Aamp DNA mini blood kit, 操作方法及步骤严格按照说明书。DNA 抽取后在紫外分光光度计上对其吸光度进行测量, 分别为 260nm 及 280nm。EBV/DNA 水平的测定采用美国 BIO-RAD CFX96 实时荧光定量 PCR 仪完成。所扩增的目的基因来自 EB 病毒的 BamHI-W 片段。同时设空白对照、阴性对照及阳性对照电泳检测 PCR 产物。

1.4 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析, 计量资料组间比较用 *t* 检验, 计数资料用卡方检验或 Fisher's 精确概率检验。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 EBER、EGFR 和 VEGF 表达与 NPC 患者临床特征关系

EGFR 和 VEGF 阳性表达在细胞浆, 原位杂交分析 EBER 的表达, 信号位于细胞核 (Figure1)。NPC 组织的 EBER、EGFR 和 VEGF 阳性表达率分别为 91.6% (131/143)、95.8% (137/143) 和 30.1% (43/143)。鼻咽部非癌组织的 EBER、EGFR 和 VEGF 阳性表达率 21.9% (7/32)、25.0% (8/32) 和 12.5% (4/32)。EGFR 表达阳性率与原发灶分期之间差异有统计学意义 (P=0.045), VEGF 与淋巴结分期 (P=0.042)、临床分期 (P=0.030) 之间差异有统计学意义, EBER 与原发灶分期、淋巴结分期及临床分期之间差异有统计学意义 (Table 1)。EBER、EGFR 和 VEGF 均与年龄、性别、分化程度无相关性 (P>0.05)。

2.2 N₂₋₃ 期 NPC 患者 EGFR、VEGF、EBER 表达与放化疗敏感性

我们进一步对 92 例 N₂₋₃ 期鼻咽癌患者随访 2

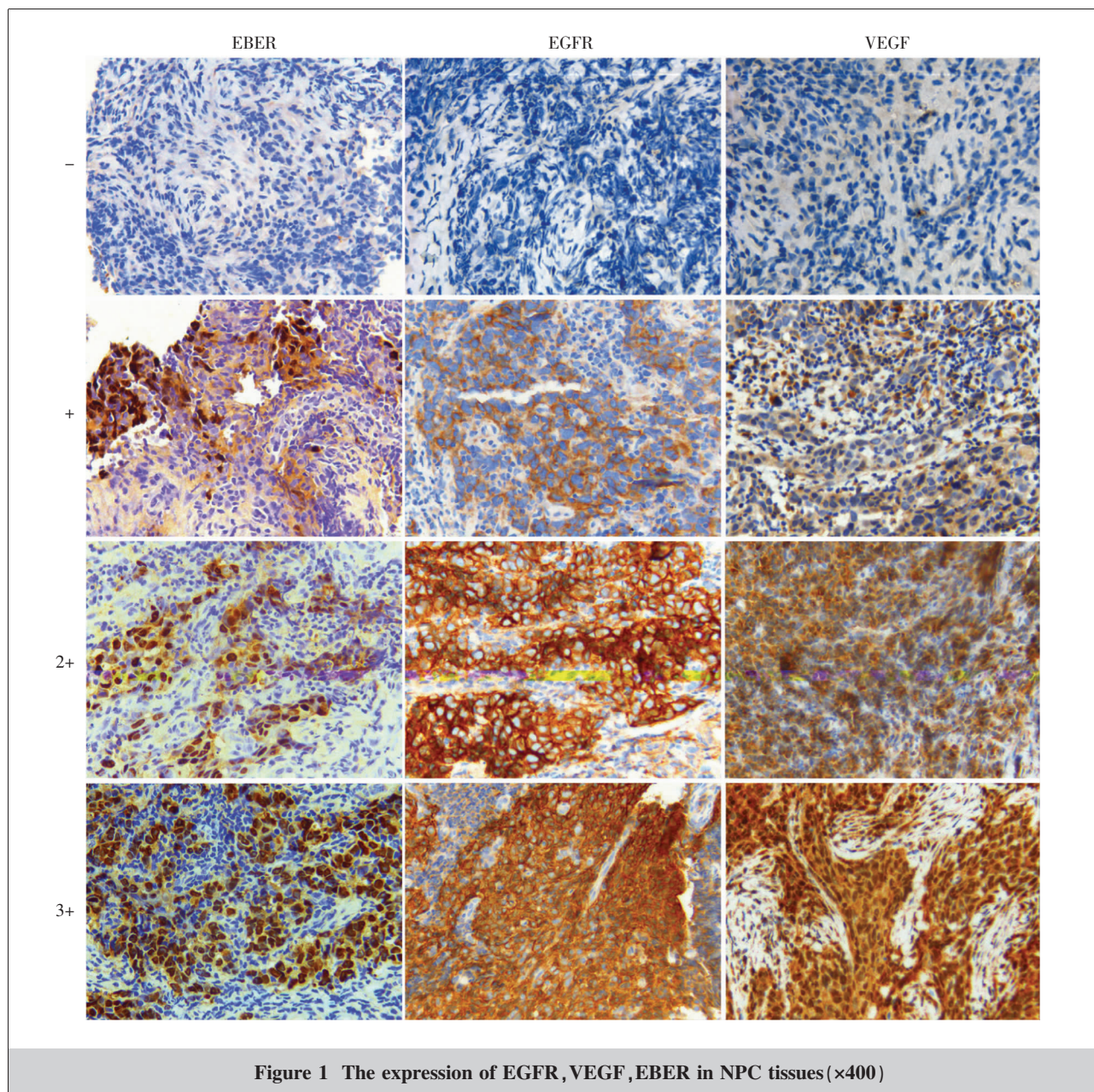


Figure 1 The expression of EGFR,VEGF,EBER in NPC tissues($\times 400$)

年探讨鼻咽癌组织中EBER、EGFR 及 VEGF 表达强度与放化疗敏感性的关系。 N_{2-3} 期鼻咽癌 EBER、EGFR 及 VEGF 表达率分别为 97.8%(90/92)、95.7%(88/92) 和 35.9%(33/92)。EBER 表达强弱与远处转移、复发及临床缓解相关(P 均 <0.05),VEGF 表达强度与远处转移相关($P=0.029$),EGFR 表达与远处转移相关($P=0.005$)(Table2)。

2.3 N_{2-3} 期 NPC 放化疗敏感性与血浆 EBV、EGFR、VEGF 的表达

定量 PCR 检测 92 例 N_{2-3} 期鼻咽癌患者血浆

EBV/DNA 表达,酶联免疫吸附(ELISA)检测 EGFR、VEGF 的表达水平,采用组间比较 t 检验分析 EGFR、VEGF、EBV/DNA 治疗前与同步放化疗后比较差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。血浆 EGFR 和 VEGF 表达水平高低与远处转移相关。EBV 表达与远处转移、复发显著相关(Table 3)。

3 讨论

鼻咽癌为我国常见恶性肿瘤,放疗为首选治疗

方式。早期病例单纯放疗疗效极佳,中晚期病例治疗后易出现局部复发和远处转移。远处转移是 N₂₋₃ 期病例主要失败模式。为进一步提高 N₂₋₃ 期鼻咽癌患

者预后,降低远处转移及复发,临床开展了多种化放疗综合治疗临床研究,但化疗在局部晚期鼻咽癌病例中作用仍未达到一致。易俊林等^[2]分析 416 例鼻

Table 1 The relationship between EGFR, VEGF and EBER protein and clinical characteristics

Clinical characteristics	N	EGFR				VEGF				EBER			
		<1	≥1	χ ²	P	<1	≥1	χ ²	P	<1	≥1	χ ²	P
Age (years)				0.067	0.796			0.882	0.348			0.139	0.709
≤50	102	4	98			69	33			8	94		
>50	41	2	39			31	10			4	37		
Gender				1.327	0.249			0.062	0.804			0.006	0.938
Male	118	6	112			82	36			10	108		
Female	25	0	25			18	7			2	23		
Stage				4.031	0.045			0.188	0.665			7.062	0.008
T ₁₋₂	56	0	56			38	18			9	47		
T ₃₋₄	87	6	81			62	25			3	84		
Lymph node				0.015	0.903			4.126	0.042			12.973	0.001
N ₀₋₁	51	2	49			41	10			10	41		
N ₂₋₃	92	4	88			59	33			2	90		
Clinical stage				1.327	0.249			4.704	0.030			15.153	0.001
I ~ II	25	0	25			22	3			7	18		
III ~ IV	118	6	112			78	40			5	113		
Type				1.255	0.263			0.898	0.343			0.190	0.663
Differentiation	49	3	46			36	13			5	44		
Undifferentiation	54	1	53			35	19			7	47		

Table 2 The expression of EGFR, VEGF, EBER and chemoradiotherapy sensitivity in NPC N₂₋₃

Index	EBER				EGFR				VEGF			
	≤1	>1	χ ²	P	≤1	>1	χ ²	P	≤1	>1	χ ²	P
Metastasis			8.032	0.005			8.021	0.005			4.741	0.029
No	20	50			21	45			57	11		
Yes	0	22			1	25			15	9		
Recurrence			6.820	0.009			3.050	0.081			0.860	0.354
No	19	47			19	47			50	16		
Yes	1	25			3	23			22	4		
Complete remission			5.732	0.017			1.600	0.207			1.380	0.240
Yes	16	36			15	37			43	9		
No	4	36			7	33			29	11		

Table 3 The expression of plasma EGFR, VEGF, EBV/DNA in NPC N₂₋₃

Group	EGFR (pmol/L)	P	VEGF (pg/ml)	P	EBV/DNA (copies/ml)	P
Pretreatment	1226.1±208.6	0.038	526.17±102.39	0.011	49900	0.041
Post-treatment	844.5±139.7		231.25±87.03		22640	
Benign	608.3±96.8	0.081	65.20±18.10	0.056	5000	0.052
Control	487.6±75.3		36.20±6.67		1200	
Recurrence		0.202		0.169		0.033
No	785.2±126.6		171.38±97.21		12560	
Yes	857.5±139.2		201.55±90.16		39850	
Metastasis		0.027		0.001		0.018
No	698.0±156.1		198.33±81.20		11890	
Yes	1365.0±236.7		763.85±192.46		67500	

咽癌调强放疗长期结果显示:333例Ⅲ~Ⅳ期鼻咽癌5年总生存率为77%,同步化放与单纯调强放疗比较未提高5年总生存率和无远处转移生存率。Lee等^[3]将NPC9901和NPC9902研究分析:同步化疗加辅助化疗并未提高总生存率,未降低远处转移率。以上研究提示需进一步探寻鼻咽癌远处转移的肿瘤标志物,针对远处转移高危病例采取个体化的化放疗综合治疗,才能进一步提高局部晚期病例疗效。

VEGF是目前已知最具活性的促血管生成因子之一,能促进血管内皮增殖,增加血管通透性,为血管内皮细胞的生长、迁移提供基质条件,并且具有抑制肿瘤细胞凋亡的重要作用。EGFR对VEGF具有高度亲和性,两者特异结合后,促发细胞分裂信号,引起细胞增殖,EGFR表达异常,可使正常细胞转化成肿瘤细胞,并增加肿瘤的侵袭和转移能力。NPC细胞能分泌EGF,通过EGF/EGFR自分泌环路促进自身增殖和转移,通过Ras/MAPK、PI3K/AKT等信号传导途径,继而导致肿瘤细胞的分裂增殖,同时促进肿瘤血管生成^[4]。本课题组实验结果表明组织EGFR在N₂₋₃期NPC组织中的表达(95.7%)明显高于鼻咽部非癌组织(25.0%),VEGF阳性表达率30.1%(43/143)略高于鼻咽部非癌组织的12.5%(4/32)。VEGF、EGFR过表达与肿瘤远处转移呈正相关。鼻咽癌患者可能由于肿瘤细胞分泌的VEGF随血液细胞穿过血管壁进入血液循环;或是VEGF使血管壁通透性增加而弥散至血液中。血浆VEGF、EGFR水平与组织的表达一致性有待进一步增加样本量深入研究。

EBV是一种嗜人类淋巴细胞的 γ -DNA疱疹病毒,与鼻咽癌发生、发展密切相关,通常呈隐性感染。EB病毒的潜在致癌蛋白潜伏膜蛋白(LMP1),可上调NPC细胞。NPC细胞表达的EBV抗原LMP1和LMP2的树突细胞疫苗能安全注入NPC患者,但有效性尚待提高^[5]。研究表明,LMP1可通过诱导COX-2表达,使VEGF表达增高,促进肿瘤血管生成。COX-2抑制剂(NS-398)可以抑制VEGF表达。LMP1还通过诱导IL-8、EGFR、EGF-2、HIF-1等表达上调VEGF的表达,促进肿瘤血管生成。

血浆EBV/DNA含量明显减少曾作为自体细胞毒T淋巴细胞免疫治疗复发NPC患者疗效的评价指标^[6]。血浆EBV/DNA清除率半衰期被认为是预后指标^[7]。血浆EBV/DNA能准确地预测疾病转移,EBV

有助于判断TNM分期,避免过度的常规评价应用的影像学检查^[8]。本次研究结果表明,EBV/DNA水平在远处转移组最高,其次为局部复发组,而无瘤生存组最低。鉴于此,当血浆EBV/DNA在体内的水平检测较高时,应该注意考虑是否为远处转移。这种现象可能是因为发生转移的患者具有相对更大的肿瘤负荷、EB病毒在肿瘤细胞内更容易释放到血液中。

综上所述,血浆和组织中EGFR和VEGF表达水平均可能预警N₂₋₃期鼻咽癌远处转移,EBER(EBV/DNA)可能成为N₂₋₃期鼻咽癌远处转移和复发的潜在标志物。鼻咽癌患者血浆VEGF、EGFR、EBV水平变化有可能作为一种新的肿瘤标志物,动态观察鼻咽癌病情进展,为临床治疗提供客观指标。

参考文献:

- [1] Chen Y, Liu MZ, Liang SB, et al. Preliminary results of a prospective randomized trial comparing concurrent chemoradiotherapy plus adjuvant chemotherapy with radiotherapy alone in patients with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma in endemic regions of china[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008, 71(5):1356-1364.
- [2] Yi JL, Gao L, Huang XD, et al. Nasopharyngeal carcinoma treated by intensity-modulate radiotherapy: long-term results of 416 patients [J]. Chin J Radiat Oncol, 2012, 21(3): 196-200. [易俊林, 高黎, 黄晓东, 等. 416例鼻咽癌调强放疗远期生存与影响因素分析[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2012, 21(3): 196-200.]
- [3] Lee AW, Tung SY, Ngan RKC, et al. Factors contributing to the efficacy of concurrent-adjuvant chemotherapy for locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: combined analyses of NPC-9901 and NPC-9902 trials[J]. Eur J Cancer, 2011, 47(5):656-666.
- [4] Yarom N, Jonker DJ. The role of the epidermal growth factor receptor in the mechanism and treatment of colorectal cancer[J]. Discov Med, 2011, 11(57):95-105.
- [5] Chia WK, Wang WW, Teo M, et al. A phase II study evaluating the safety and efficacy of an adenovirus-{Delta} LMP1-LMP2 transduced dendritic cell vaccine in patients with advanced metastatic nasopharyngeal carcinoma [J]. Ann Oncol, 2012, 23(4):997-1005.
- [6] Straathof KC, Bollard CM, Popat U, et al. Treatment of nasopharyngeal carcinoma with Epstein-Barr virus-specific T lymphocytes[J]. Blood, 2005, 105(5):1898-1904.
- [7] Wang WY, Twu CW, Chen HH, et al. Plasma ebv dna clearance rate as a novel prognostic marker for metastatic/recurrent nasopharyngeal carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(3):1016-1024.
- [8] Sun P, Chen C, Cheng YK, et al. Serologic biomarkers of Epstein-Barr virus correlate with TNM classification according to the seventh edition of the UICC/AJCC staging system for nasopharyngeal carcinoma[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2013, Nov 9. [Epub ahead of print]