

肺腺癌 EGFR 突变及与 TTF-1、CK7、NapsinA 蛋白表达的关系

邹珏, 张倩倩, 沈丽华

(南京市胸科医院, 江苏 南京 210029)

摘要: [目的] 探讨新分类肺腺癌中 EGFR 突变情况与 TTF-1、CK7、NapsinA 表达的关系及临床意义。[方法] 收集南京市胸科医院 2013~2015 年外科手术切除标本 307 例, 根据 2011 年 IASLC/ATS/ERS 肺腺癌国际多学科新分类进行病理分型, 用 ARMS 法检测 EGFR 基因, 用免疫组化法检测 TTF-1、CK7、NapsinA 蛋白的表达。[结果] EGFR 在肺腺癌中突变率为 51.1% (157/307), 19 外显子缺失突变 (del) 和 21 外显子 (L858R) 突变率分别为 43.9% 和 51.0%, 乳头和实体型腺癌突变率分别为 65.4% 和 29%。EGFR 突变与性别、吸烟及肺腺癌病理分型均有相关性 ($P < 0.001$), 与 TTF-1、CK7 蛋白表达有相关性 (均 $P < 0.05$), 与 NapsinA 无相关性 ($P = 0.108$)。[结论] EGFR 基因突变多见于女性非吸烟患者, 较少见于实体为主型肺腺癌, 突变以 21 (L858R) 和 19 外显子缺失突变为主, TTF-1 蛋白表达及肺腺癌病理分型对 EGFR 突变有着较好的提示作用。

关键词: 肺腺癌; EGFR; 病理分型; TTF-1

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)11-1076-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.11.B008

Relationship Between EGFR Mutation and TTF-1, CK7, Napsin A Protein Expression in Lung Adenocarcinoma

ZOU Jue, ZHANG Qian-qian, SHEN Li-hua

(Nanjing Chest Hospital, Nanjing 210029, China)

Abstract: [Objective] To investigate the relationship between EGFR mutation and protein expression of TTF-1, CK7, NapsinA in patients with lung adenocarcinoma and its clinical significance. [Methods] A total of 307 patients with lung adenocarcinoma underwent surgical resection from 2013 to 2015 in Nanjing Chest Hospital, the tumors were classified according to the 2011 international multidisciplinary IASLC/ATS/ERS classification. The mutations of EGFR gene were detected by the amplification refractory system method, the expression of TTF-1, NapsinA and CK7 proteins was detected by immunohistochemistry. [Results] There were 157 cases of EGFR mutations in 307 cases of lung adenocarcinoma (51.1%). The mutation rates of 19 exon deletion and 21 exon (L858R) were 43.9% and 51.0%, respectively; the mutation rate of papillary and solid predominant adenocarcinoma were 65.4% and 29% respectively. EGFR mutation was associated with gender, smoking and pathological type of lung adenocarcinoma ($P < 0.001$), it was correlated with the expression of TTF-1, CK7 protein and was not correlated with the expression of Napsin A protein (all $P < 0.05$). [Conclusion] EGFR mutations are more common in female non-smoking patients and less common in solid predominant lung adenocarcinoma, mutations in 21 exon (L858R) and 19 exon deletion are dominated. TTF-1 protein expression and pathological type of lung adenocarcinoma may indicate EGFR mutation.

Subject words: lung adenocarcinoma; EGFR; pathological typing; TTF-1

表皮生长因子受体 (epithelial growth factor receptor, EGFR) 突变率在亚洲人群晚期肺腺癌患者中

通讯作者: 邹珏, 主治医师, 硕士; 南京市胸科医院病理科, 江苏省南京市鼓楼区广州路 215 号 (210029); E-mail: zouxue1981@126.com
收稿日期: 2018-01-03; **修回日期:** 2018-04-25

的发生率高达 50%^[1], 更多肺腺癌患者从靶向药物中获益。EGFR 突变主要位于 18~21 外显子, 近 90% 突变是 21 外显子 (L858R) 和 19 外显子缺失突变 (19del)^[2]。我们从肺腺癌的病理分型及腺癌的常用

标记 TTF-1 (thyroid transcription factor)、CK7(cytokeratin)、NapsinA 探讨与 EGFR 突变的关系,对指导肺腺癌患者的靶向治疗提供更多的参考依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集南京市胸科医院 2013~2015 年外科手术切除标本 307 例,男性 151 例,女性 156 例,年龄 33~84 岁,中位年龄 60 岁,平均年龄 59.5 岁。根据 2011 年 2 月由国际肺癌研究学会(IASLC)、美国胸科协会(ATS)、欧洲呼吸协会(ERS)联合发表了关于肺腺癌国际多学科新分类^[3],将所有手术标本分为贴壁为主型 21 例 (6.8%),乳头为主型 78 例 (25.4%),腺泡为主型 103 例 (33.6%),实体为主型 93 例 (30.2%),微乳头为主型 12 例 (3.9%)。

1.2 免疫组化检测方法及判读

手术标本均经 10%中性福尔马林固定,脱水后石蜡包埋,切片 4~5 张,厚度 4 μ m。TTF-1、CK7、NapsinA 均为单克隆抗体,均有两位病理科医师进行病理诊断为肺腺癌。免疫组化染色采用 Envision 两步法,试剂购自福州迈新公司。自动免疫组化染色仪购自美国 Ventana 公司。细胞核或胞质表达均根据染色阳性细胞百分比及染色强度进行综合评分。染色强度评分:无色为 0 分,浅黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分;阳性细胞百分比评分:阳性细

胞数<10%为 1 分,10%~49%为 2 分,50%~79%为 3 分,80%为 4 分。两项得分结果相乘>3 分为阳性,相乘 $\leq$ 3 分阴性。

1.3 ARMS 法检测 EGFR 突变

采用 DNA FFPE Tissue Kit 提取试剂盒进行 DNA 提取,Thermo 核酸蛋白定量测定仪 ND-2000 测定提取 DNA 产物的浓度和质量,要求 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8~2.0 之间。采用 EGFR 基因外显子 18~21 的 29 种突变类型检测试剂盒配制检测样本,参照试剂盒说明书操作,并做阴阳性质控,应用 Roche 4800 荧光定量 PCR 仪进行检测,根据 EGFR 突变检测试剂盒的使用说明书判读结果。试剂均购自厦门艾德生物科技有限公司。

1.4 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行数据分析,组间比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺腺癌中 EGFR 突变情况

307 例手术肺腺癌标本中 EGFR 突变 157 例,突变率为 51.1%。突变类型以 19del 和 21 外显子 (L858R) 为主,两者突变率分别为 43.9%(69/157)和 51.0%(80/157)。还有一种少见突变外显子 18 的 G719X 占突变总例数 3.8%(6/157),19、21 外显子双突变 1.2%(2/157)。不同病理类型的 EGFR 突变率:

Table 1 Relationships between clinical features and the TTF-1,CK7,NapsinA protein expression and EGFR mutation

Clinical features	EGFR			TTF-1			CK7			NapsinA		
	Mutant	Wild type	P	Positive	Negative	P	Positive	Negative	P	Positive	Negative	P
Gender			<0.001			<0.05			0.548			0.128
Male	61	90		98	53		142	9		90	61	
Female	96	60		124	32		144	12		106	50	
Age(years old)			0.324			0.794			0.955			0.407
≤ 60	77	82		116	43		148	11		105	54	
>60	80	68		106	42		138	10		91	57	
Smoking situation			<0.001			<0.05			0.882			0.199
Yes	60	91		100	51		141	10		91	60	
No	98	58		122	34		145	11		105	51	
Clinical stage			0.079			<0.05			0.396			0.123
I~II	89	70		123	36		150	9		106	53	
III~IV	68	80		99	49		136	12		90	58	
Lymph node metastasis			0.388			0.474			0.227			0.079
Yes	76	80		110	46		148	8		107	49	
No	81	70		112	39		138	13		89	62	

贴壁为主型 47.6%,乳头型为主 65.4%,腺泡型为主 61.2%,实体型为主 29.0%,微乳头型为主 50%。

2.2 TTF-1、CK7、NapsinA 蛋白表达及 EGFR 突变与临床特征之间的关系

EGFR 突变与性别、吸烟均有相关性($P<0.001$),与临床分期无统计学相关($P>0.05$)。TTF-1 表达与性别、吸烟情况及临床分期均有相关性 ($P<0.05$),EGFR 突变及 TTF-1 蛋白表达均与年龄和淋巴结转移无统计学相关($P>0.05$)。CK7、NapsinA 蛋白表达与临床特征均无统计学意义($P>0.05$)(Table 1)。

2.3 EGFR 与 TTF-1、NapsinA、CK7 蛋白表达及肺腺癌病理分型的关系

TTF-1、NapsinA、CK7 蛋白表达及肺腺癌病理分型见 Figure 1,EGFR 突变与 TTF-1、CK7 及肺腺癌病理分型均有相关性($P<0.05$),与 NapsinA 无统计学意义相关($P=0.108$)(Table 2)。

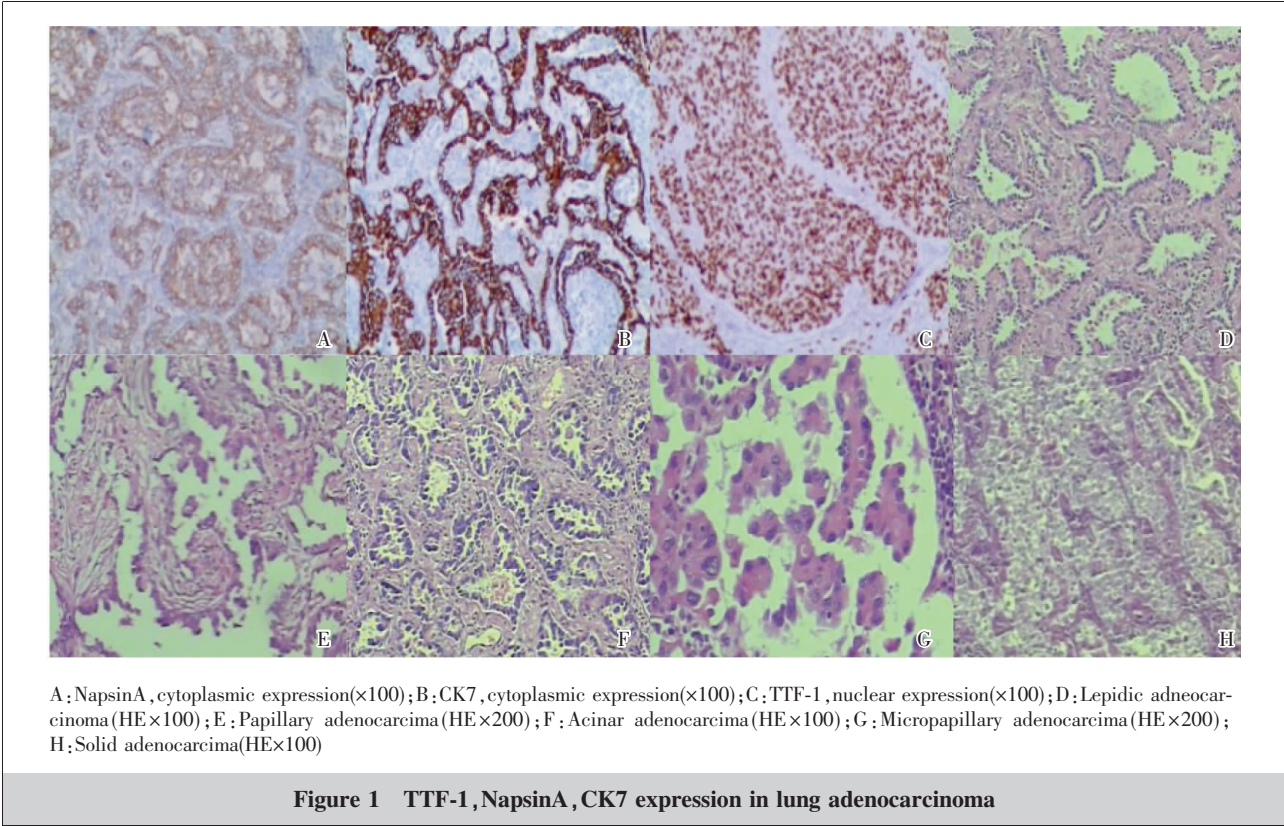
3 讨 论

大量研究结果显示,EGFR 基因突变是决定 EGFR-TKI 酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase in-

hibitor,TKI)疗效最重要的预测因子^[3]。而 EGFR 基因突变的发生率在女性、非吸烟者、腺癌、亚裔人群中发生频率较高^[1,4],本研究中肺腺癌标本中 EGFR 突变率为 51.1%。EGFR 突变主要位于 18~21 外显子,尤其是 19 外显子缺失突变(19del)和 21 外显子

Table 2 Relationships between EGFR mutation and TTF-1, NapsinA, CK7 protein expression and pathological typing

Protein and pathological typing	EGFR		P
	Mutant	Wild type	
TTF-1 protein			<0.001
Positive	152	70	
Negative	5	80	
Napsin A protein			0.108
Positive	107	89	
Negative	50	61	
CK7 protein			<0.05
Positive	151	135	
Negative	6	15	
Histologic subtype			<0.001
Lepidic	10	11	
Papillary	51	27	
Acinar	63	40	
Solid	27	66	
Micropapillary	6	6	



(L858R)为主,还有2例存在19、21双突变,还有一部分少见突变18外显子的G719X。随着肺腺癌分子机制的研究不断进步,发现了外显子20的T790M突变与EGFR-TKI获得性耐药有关^[5]。

EGFR突变最主要见于肺腺癌患者,而肺腺癌根据2011年IASLC/ATS/ERS肺腺癌国际多学科新分类可以分成五大类,贴壁为主型认为预后最好的一组,实体和微乳头型认为容易转移且预后是最差的一组,腺泡和乳头为主型位于中间^[6]。本研究中以乳头、腺泡和实体型为最常见类型,这三类型者占89.3%,肺腺癌病理分型与EGFR的突变有着相关性,乳头型最高达65.4%,实体型最低只占到29%。有学者研究发现突变主要出现在贴壁和乳头型肺腺癌中^[7]。我们发现肺腺癌中有时会存在很多种分型,实体为主型肺腺癌EGFR突变确实少见。

TTF-1主要在Ⅱ型肺泡上皮和无纤毛的支气管上皮细胞表达^[8],有学者研究推测某些遗传或后天因素刺激NKX2-1/TTF-1基因在部分肺腺癌发展中起着一定的作用^[9]。TTF-1在肺腺癌中接近70%~80%,而且对早期肺腺癌患者的发生和转移有着相关性,尤其在Ⅰ期肺腺癌中TTF-1不表达的患者比表达的患者有更差的生存期^[10,11]。研究发现TTF-1介导HMG2(high mobility group AT-Hook 2)蛋白管与上皮-间充质转化,并直接结合调节HMG2蛋白、TTF-1/HMG2轴与肿瘤分化相关,介导肿瘤的侵袭性和预后^[12]。本研究中TTF-1与临床分期有相关性,可能与这些分子机制有关。CK7、NapsinA在腺上皮中表达,是诊断腺癌的常用标志物,尤其NapsinA蛋白表达在鉴别肺原发黏液分泌腺癌中起着重要的提示作用^[13]。本研究中TTF-1、CK7蛋白表达与EGFR突变有着相关性,NapsinA与EGFR突变无相关性,而且TTF-1与也是常见于女性,非吸烟的患者,早期肺癌患者表达更高,因此TTF-1蛋白表达对肺癌的预后也有一定的提示作用。我们从肺腺癌的病理分型以及TTF-1蛋白表达分析,对EGFR突变有提示作用,从而对TKI的治疗起着预测作用。然而TTF-1如何与EGFR突变有着相关性,在分子机制上还不是很清楚,这需要我们更深入的研究。

参考文献:

[1] Travis WD, Brambilla E, Noguchi M et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic

society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma[J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(2): 244-285.

- [2] Liang ZY, Zhou XY. Chinese patients with non-small cell lung cancer epidermal growth factor receptor gene detection expert consensus(2016)[J]. Chin J Pathol, 2016, 45(4): 217-220. [梁志勇, 周晓燕. 中国非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体基因检测专家共识(2016版)[J]. 中华病理学杂志, 2016, 45(4): 217-220.]
- [3] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR[J]. N Engl J Med, 2010, 362(25): 2380-2388.
- [4] Tsao MS, Sakurada A, Ding K, et al. Prognostic and predictive value of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutation status and gene copy number for adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(1): 139-147.
- [5] Cross DA, Ashton SE, Ghiorghiu S, et al. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer [J]. Cancer Discov, 2014, 4(9): 1046-1061.
- [6] Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, et al. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis 514 stage I cases[J]. Mod Pathol, 2011, 24(5): 653-664.
- [7] Kadota K, Yeh YC, Sima SC, et al. The cribriform pattern identifies a subset of acinar predominant tumors with poor prognosis in patients with stage I lung adenocarcinoma: a conceptual proposal to classify cribriform predominant tumors as a distinct histologic subtype[J]. Mod Pathol, 2014, 27(5): 690-700.
- [8] Yamaguchi T, Yanagisawa K, Sugiyama R, et al. NKX2-1/TTF1/TTF-1-Induced ROR1 is required to sustain EGFR survival signaling in lung adenocarcinoma[J]. Cancer Cell, 2012, 21(3): 348-361.
- [9] Matsubara D, Soda M, Yoshimoto T, et al. Inactivating mutations and hypermethylation of the NKX2-1/TTF-1 gene in non-terminal respiratory unit-type lung adenocarcinomas [J]. Cancer Sci, 2017, 108(9): 1888-1896.
- [10] Kadota K, Nitadori J, Sarkaria IS, et al. Thyroid transcription factor-1 expression is an independent predictor of recurrence and correlates with the IASLC/ATS/ERS histologic classification in patients with stage I lung adenocarcinoma[J]. Cancer, 2013, 119(5): 931-938.
- [11] Zou C, Zhao J, Shao J et al. Prognostic relevance of TTF-1 expression in stage I adenocarcinoma[J]. Oncotarget, 2017, 8(64): 107462-107468.
- [12] Huang TW, Lin KF, Lee CH, et al. The role of thyroid transcription factor-1 and tumor differentiation in resected lung adenocarcinoma[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 14222.
- [13] Uchida A, Samukawa T, Kumamoto T, et al. Napsin A levels in epithelial lining fluid as a diagnostic biomarker of primary lung adenocarcinoma[J]. BMC Pulm Med, 2017, 17(1): 195.