

肝细胞癌及癌旁肝组织 EGFR 和 EGFR v 的表达及其临床意义

徐立¹, 张昌卿², 冯凯涛², 李锦清

(华南肿瘤生物学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心 1. 肝胆科, 2. 中心实验室, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】检测人体肝癌组织及癌旁肝组织中表皮生长因子受体 EGFR 及其突变体 EGFRv 的表达情况, 并分析其临床意义。【方法】用免疫组化法检测 58 例肝细胞癌患者肿瘤及癌旁肝组织中 EGFR、EGFRv 的表达情况, 与患者的临床资料进行相关分析, 同时对 EGFR 和 EGFRv 不同表达的患者无瘤生存期和总生存期进行生存分析。【结果】肝癌组织 EGFR、EGFRv 表达的阳性率分别为 74.1%、63.8%; 癌旁肝组织 EGFR、EGFRv 表达阳性率分别为 81.0%、77.6%。肝癌组织 EGFRv 的表达情况与肿瘤病理分级 ($P=0.028$) 及术前 AFP 值 ($P=0.035$) 呈负相关。癌栓及/或卫星灶 ($P<0.001$) 和肿瘤病理分级 ($P=0.023$) 是肝癌术后无瘤生存期的主要影响因素; 肝癌患者术后总生存期的主要影响因素包括患者的肿瘤家族史 ($P=0.014$)、肿瘤最大径 ($P<0.001$)、癌栓及/或卫星灶 ($P=0.039$) 以及肿瘤的病理分级 ($P=0.002$)。生存分析显示肝癌组织 EGFR 及 EGFRv 表达阴性的患者与表达阳性的患者无瘤生存率及总生存率均无明显差异。【结论】肝细胞癌患者肿瘤组织及癌旁肝组织中均存在 EGFR 以及 EGFRv 高表达, EGFR 以及 EGFRv 过度表达可能是肝癌发生过程中的事件。肝癌组织 EGFRv 的表达情况与肿瘤病理分级及术前 AFP 值呈负相关, 肝癌组织 EGFR 及 EGFRv 的表达情况不是肝癌预后的独立影响因素。

关键词: 肝肿瘤/病理学; 表皮生长因子受体; 突变

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)04-0467-05

Clinical Significance of EGFR and EGFRv Expression in Tumor and Liver Tissue of HCC

XU Li¹, ZHANG Chang-qing², FENG Kai-tao², LI Jin-qing¹

(1. Department of Hepatobiliary Oncology, 2. Central Laboratory, State Key Laboratory of Oncology of Southern China // Cancer Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract:【Objective】To detect expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its variant EGFRv in human hepatocellular carcinoma (HCC) and liver tissue just around the tumor (LAT), and to analyze their clinical significance.【Methods】Fifty-eight HCC patients entered this study. Expression of EGFR and EGFRv in tumor and LAT were detected with immunohistochemical assay. Then correlated analysis was done within different expression status and clinical data. Survival analysis was done for tumor-free survival and overall survival of the patients with different expressions of EGFR and EGFRv.【Results】Expression rates of EGFR and EGFRv were 74.1% and 63.8% in HCC, respectively. Expression rates of EGFR and EGFRv were 81.0% and 77.6% in LAT, respectively. Expression of EGFRv in HCC had negative correlations with cancer pathologic grading ($P=0.028$) and preoperative AFP value ($P=0.035$). Tumor embolus and/or satellite tumor ($P<0.001$) and pathologic grading ($P=0.023$) were main influential factors for tumor-free survival. The influential factors for overall survival of HCC patients included family history of cancer ($P=0.014$), tumor size ($P<0.001$), tumor embolus and/or satellite tumor ($P=0.039$), and pathologic grading ($P=0.002$). Survival analysis indicated tumor-free survival and overall survival were of no difference between the patients with different expression of EGFR and EGFRv.【Conclusions】EGFR and EGFRv are both overexpressed in HCC and LAT. Overexpression of EGFR and EGFRv might be an event during hepatocellular

收稿日期: 2006-03-20

作者简介: 徐立(1974-), 女, 云南昆明人, 博士生, 主治医师; 李锦清, 教授, 博士生导师, 通讯作者. E-mail: lijinq@mail.sysu.edu.cn

carcinogenesis. Expression of EGFRv in HCC is negatively correlated with the cancer pathologic grading and preoperative AFP value. Expressions of EGFR and EGFRv are not independent prognostic factors of HCC.

Key Words: liver neoplasm/pathology; epidermal growth factor receptor; mutation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(4):467- 471]

表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 是原癌基因 c- erbB- 1(HER- 1) 的表达产物, 是生长因子受体家族的重要成员之一, 为相对分子质量 170×10^3 的跨膜受体蛋白。研究表明 EGFR 在与其配体结合后可以引起细胞生长、增殖和分化, 在正常的细胞生理过程中发挥十分重要的调控作用。多种实体瘤中均检测到 EGFR 过度表达, 并已作为肿瘤治疗的重要靶点^[1]。研究发现 EGFR 存在 3 种胞外型突变体, 即 EGFRv₁、EGFRv₂ 和 EGFRv₃, 与这些突变的受体结合后的 EGFR 信号通路通常异常激活, 引起细胞异常增殖。其中 EGFRv₁ 是人类肿瘤中最为常见的突变形式^[2]。迄今为止 EGFRv₁ 尚未在正常组织中检出, 被视为恶性肿瘤特异性表达的 EGFR 突变体^[3]。本研究应用免疫组化法检测肝癌患者的肿瘤及癌旁组织中 EGFR、EGFRv₁ 表达情况, 并分析其特征及临床意义。

1 资料与方法

1.1 病例资料

选取了 2001 年 12 月至 2002 年 11 月期间在中山大学肿瘤防治中心肝胆科临床诊断为原发性肝癌, 行手术切除肿瘤, 并有完整随访资料的肝癌患者 58 例。58 例患者术前肝功能均为 Child-Pugh A 级, CT 检查显示为单个肿瘤, 术前均未接受过其他治疗, 术前及术中未发现区域淋巴结或远处转移, 切除手术按照肝癌的Ⅱ级根治标准^[4], 所有患者术后经病理确诊为肝细胞癌。患者年龄 28~76 岁, 中位年龄 48 岁, 男女比例 55 : 3。肿瘤最大径 1.5 ~18 cm, 中位数 7.5 cm; 术前 AFP (alpha fetoprotein, 甲胎蛋白) 1.52 ~71 210 ng/mL, 中位数 84.38 ng/mL。表 1 为患者主要的临床资料。

1.2 标本处理

所有肝癌标本均于肿瘤边缘(同时包含肿瘤及癌旁肝组织)取材, 体积分数 10%的福尔马林固定, 常规石蜡包埋, 按 4 μm 厚度切片备用。

1.3 试剂

表 1 患者的临床资料

Table 1 Clinical data of patients (n=58)

Items	Cases(n)	Percentage(%)
Hepatitis background		
None	1	1.7
Hepatitis B	56	96.6
Hepatitis B plus C	1	1.7
Family history of cancer		
None	43	74.1
Liver cancer	9	15.5
Other cancers	6	10.4
Tumor envelope		
None	17	29.3
Incomplete	15	25.9
Complete	26	44.8
Tumor embolus and/or satellite tumor		
None	37	63.8
Single	11	19.0
Multiple	10	17.2
Maximal diameter of tumor (cm)		
< 5	13	22.4
5 ~10	38	65.5
>10	7	12.1
Pathologic grading of cancer		
	17	29.3
	25	43.1
	13	22.4
	2	3.5
Unavailable	1	1.7
Preoperative alpha fetal protein (ng/mL)		
< 25	22	37.9
25 ~400	11	19.0
401 ~10 000	12	20.7
>10 000	13	22.4

EGFR 及 EGFRv₁ 单克隆抗体为美国 ZYMED 公司产品, 非生物素 PV- 9000 二步法试剂盒及 DAB 为美国 GBI 公司产品。

1.4 免疫组化实验步骤

严格按照试剂说明书进行操作。

1.5 结果判断

光学显微镜观察。样本染色评分参照 Form-witz 评分方法。每张玻片随机观察 5 个 40 ×10 倍视野, 无阳性细胞者计 0 分, 阳性细胞 <25% 者 1 分,

阳性细胞 25%~50%者 2 分, 阳性细胞 50%~75%者 3 分, 阳性细胞 >75%者 4 分。显色情况评分: 无色 0 分, 淡黄色 1 分, 棕黄色 2 分, 棕褐色 3 分。以上 2 项得分的乘积即该样本的染色得分, 根据上述得分评价样本染色情况: 0 分为阴性 (-), 1~4 分弱阳性 (+), 5~8 分阳性 (++) , 9~12 分强阳性 (+++)。对每张切片中肝癌组织和癌旁肝组织分别进行评分。

1.6 统计方法

用 SPSS 13.0 for Windows 统计软件分析。对肝癌及癌旁肝组织 EGFR、EGFRv 的表达与肿瘤最大径、包膜、病理分级、术前 AFP 值及癌栓/卫星灶情况进行 Spearman's 非参数相关分析。分别对患

者无瘤生存期和总生存期与 EGFR、EGFR v 表达情况以及各项临床参数进行 Cox 回归分析, 并按肿瘤组织中 EGFR、EGFRv 阴性或阳性表达将患者分组, 进行 Kaplan-Meier 法生存分析, Log rank 检验各组无瘤生存率及总生存率差别。显著性标准取值用双侧 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 EGFR 的表达情况

EGFR 为细胞膜或细胞浆内阳性表达, 见图 1。58 例患者肝癌组织和癌旁肝组织 EGFR 的阳性表达率分别为 74.1%、81.0%, 见表 2。

表 2 患者肝癌组织及癌旁肝组织 EGFR 和 EGFR v 表达情况
Table 2 Expression information of EGFR and EGFRv in HCC and LAT

Tissue	Antigen	Positive expression				Total n (%)
		-	+	++	+++	
HCC	EGFR	15(25.9)	24(41.4)	13(22.4)	6(10.3)	58
	EGFR v	21(36.2)	23(39.7)	12(20.7)	2(3.4)	58
LAT	EGFR	11(19.0)	8(13.8)	27(46.5)	12(20.7)	58
	EGFR v	13(22.4)	5(8.6)	26(44.8)	14(24.2)	58

EGFR: epidermal growth factor receptor; HCC: hepatocellular carcinoma; LAT: liver tissue around the tumor

2.2 EGFR v 的表达情况

EGFR v 为细胞膜或细胞浆内阳性表达, 见图 2。58 例患者肝癌组织和癌旁肝组织中 EGFR v 的阳性表达率分别为 63.8%、77.6%, 见表 2。

2.3 肝癌组织及癌旁肝组织表达 EGFR 和 EGFRv 的差异

卡方分析显示, 无论是 EGFR ($\chi^2=15.515, P=0.001$) 还是 EGFRv ($\chi^2=27.612, P<0.001$), 癌旁肝组织表达程度较肝癌组织更强。癌旁肝组织中 EGFR 及 EGFRv 大多表达于细胞浆内, 呈颗粒状, 而在肝癌组织中 EGFR 及 EGFR v 则多为细胞膜表达, 细胞浆中仅出现模糊的染色, 见图 3, 4。

2.4 随访结果

截止至 2005 年 12 月, 29 例患者死于肿瘤, 12 例患者带瘤生存, 17 例患者无瘤生存。41 例患者术后出现复发/转移, 中位复发/转移时间为术后 7 个月。58 例患者术后中位无瘤生存期 13 个月, 中位总生存期为 37 个月。

2.5 相关分析

对患者各项临床参数与肝癌及癌旁肝组织 EGFR、EGFRv 的表达情况进行 Spearman's 相关分析, 肝癌组织 EGFRv 的表达情况与肿瘤病理分级 ($r=-0.289, P=0.028$) 及术前 AFP 值 ($r=-0.278, P=0.035$) 呈负相关, 其余参数与 EGFR、EGFRv 的表达程度无相关。

2.6 生存分析

Cox 回归分析结果显示: 癌栓及/或卫星灶 ($P<0.001$) 和肿瘤病理分级 ($P=0.023$) 是肝癌术后无瘤生存期的主要影响因素。肝癌患者术后总生存期的主要影响因素包括患者的肿瘤家族史 ($P=0.014$)、肿瘤最大径 ($P<0.001$)、癌栓及/或卫星灶 ($P=0.039$) 以及肿瘤的病理分级 ($P=0.002$)。

3 讨论

3.1 肝癌及癌旁组织表达 EGFR、EGFR v 的意义

EGFR 与肝癌的关系目前尚未明确, 有研究结果表明其表达与肝癌病人的临床分期、肝内外转移

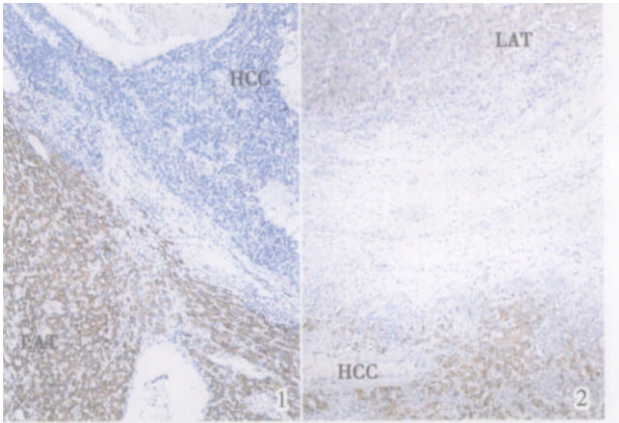


图 1 肝癌 EGFR 免疫组化染色

图 2 肝癌 EGFR v 免疫组化染色

Fig.1 EGFR immunohistochemical staining($\times 200$)

Negative expression in HCC, strongly positive expression in liver tissue around the tumor

Fig.2 EGFR v immunohistochemical staining($\times 200$)

Positive expression in HCC, weakly positive expression in liver tissue around the tumor

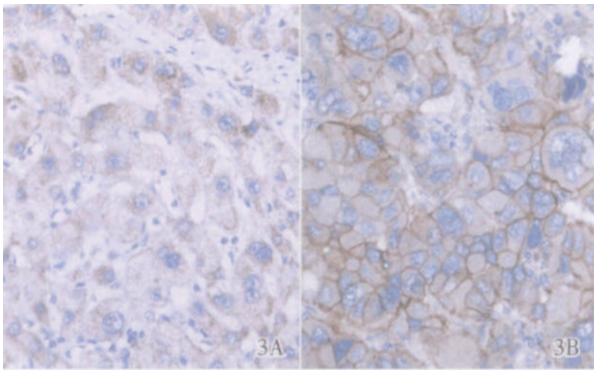


图 3 EGFR 的不同表达形式

Fig.3 Different expression patterns of EGFR ($\times 400$)

A: intracytoplasmic and granular expression in liver tissue around the tumor; B: expression at cell membrane in HCC

及组织分化程度等有关^[5,6]; 也有报道认为 EGFR 与肝癌的预后无关^[7]; Grandis 等^[8]也认为 EGFR 在肝癌的演变过程中并无决定性的作用。本文的研究结果 EGFR 在肝癌组织中的表达程度与肿瘤大小、病理分级等无明显相关, 生存分析也未显示出 EGFR 对肝癌患者生存的影响。

现有相关研究普遍支持肝癌组织中 EGFR v 表达与肝癌的预后呈负相关^[9,10]。本研究也表明肿瘤组织 EGFRv 与肿瘤的病理分级呈负相关, 生存分析显示肿瘤病理分级是肝癌患者术后无瘤生存期和总生存期的重要决定因素, 肿瘤组织表达

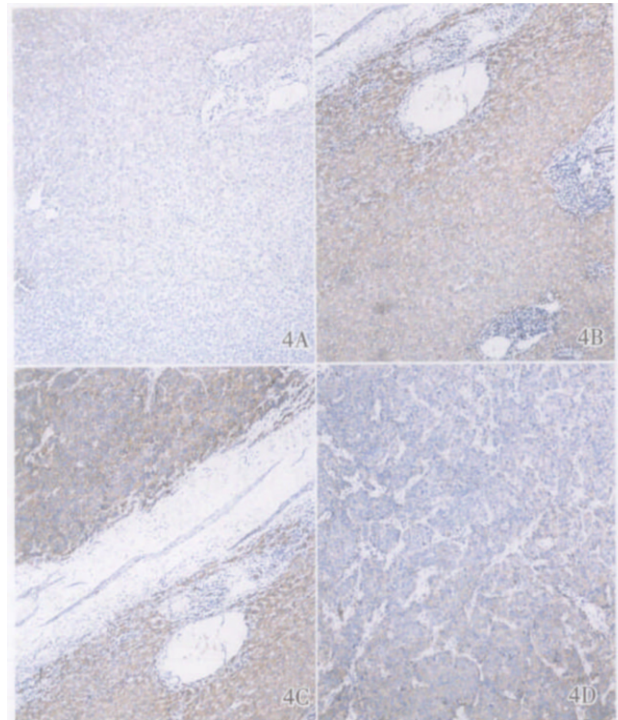


图 4 肝癌组织及癌旁肝组织 EGFR v 的过渡表达

Fig.4 Transitional expression of EGFR v in HCC and liver tissue around the tumor

A: liver tissue away from tumor ($\times 100$); B: liver tissue near the tumor ($\times 100$); C: borderline of tumor and liver tissue($\times 100$); D: inside tumor($\times 200$)

EGFR v 可能通过间接作用影响肝癌患者的预后。

3.2 癌旁肝组织表达 EGFR、EGFR v 的意义

现已认识到肝细胞反复炎症、增生以及纤维化这一逐渐演变的过程是肝癌发生的重要基础, 而肝炎、肝硬化是弥漫性病变, 因此癌旁“正常肝组织”的说法可能不够恰当。虽然在形态学上可以区分肝癌细胞和形态相对正常的肝细胞, 但这些紧邻肿瘤的肝细胞可能也已经发生了某些分子及功能的改变, 出现了某些癌变过程的事件, 严格的说, 这些肝组织已经不是“正常”组织, 而是处于肿瘤形成、生长进程中的病变。

有研究显示慢性肝炎肝硬化患者及肝癌患者中血清 EGF 含量皆较对照组明显降低, 意味着肝细胞的分化能力下降^[11]。陶开山等^[12]发现 EGFR mRNA 在肝癌组织、癌旁肝组织及正常肝组织中的阳性率分别为 95.0%、100%和 50%。本研究结果中肝癌组织与癌旁肝组织 EGFR 表达阳性率分别为 74.1%、81.0%, 癌旁肝组织与肝癌组织同样高表

达 EGFR。

EGFRv 原本被认为是一种肿瘤特异性表达的 EGFR 突变体,在胚胎、神经组织等正常组织中不能检出^[3]。欧超等^[4]报道 EGFRv 在癌旁肝组织中表达的阳性率 38.2%。本研究的结果癌旁肝组织 EGFR v 表达阳性率 77.6%,甚至高于肝癌组织中的表达,而远离肿瘤的肝细胞中则未见表达。以上结果从一定程度上说明了癌旁肝组织在某些分子的表达上已发生了变化,已不同于“正常肝组织”。组织中 EGFRv 的表达从某种程度上可以反映其癌变倾向,并可能作为一个区别癌变组织与正常组织的分子指标。

3.3 肝癌组织及癌旁肝组织表达 EGFR、EGFR v 的差异

肝癌组织和癌旁肝组织中 EGFR 及 EGFRv 无论在表达程度或表达形式上都存在差异。相应癌旁肝组织 EGFR 及 EGFRv 的表达程度多较肝癌组织中的更强。EGFR 和 EGFRv 在肝癌组织和癌旁肝组织中的表达形式也不同。另外,在同一张切片上的肝组织中,越靠近肝癌组织时,肝细胞表达 EGFRv 越强,而远离肿瘤的肝细胞几乎不表达 EGFRv。EGFRv 在远离肿瘤的正常肝细胞癌旁肝细胞肝癌细胞中的表达形式表现为由阴性或弱阳性细胞浆内出现转为细胞膜表达的逐渐过渡过程。

根据以上现象可以推测,EGFR 及 EGFRv 高表达可能是肝细胞癌变过程中的事件,这些受体由细胞浆内出现,逐渐转向细胞膜表达,发挥异常强化的受体功能,从而激活其下游通路,参与肝细胞的转化和肿瘤的形成。

参考文献:

[1] LASKIN J J, SANDLER A B. Epidermal growth factor receptor: a promising target in solid tumors [J]. *Cancer Treat Rev*, 2004, 30(1):1- 17.

- [2] MOSCATELLO D K, HOLGADO - MADRGA M, GODWIN A K, et al. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(23):5536- 5539.
- [3] OHMAN L, GEDDA L, HESSELAGER G, et al. A new antibody recognizing the v mutation of human epidermal growth factor receptor [J]. *Tumor Biol*, 2002, 23(2):61- 69.
- [4] 马曾辰,黄力文,汤钊猷,等.原发性肝癌的三级根治切除标准[J].*中华肿瘤杂志*,2004,26(1):33-35.
- [5] ITO Y, TAKEDA T, SAKON M, et al. Expression and clinical significance of erb - B receptor family in hepatocellular carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2001, 84(10): 1377 - 1383.
- [6] 欧超,吴飞翔,罗元,等.表皮生长因子受体型突变体在肝细胞癌中的表达及意义[J].*癌症*,2005,24(2):166-169.
- [7] 姜建涛,李国威,赵敏,等.EGFR、C- ErbB- 2 蛋白在原发性肝细胞性肝癌中的表达及意义[J].*中国肿瘤临床与康复*,2002,9(3):4-6.
- [8] GRANDIS J R, SOK J C. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy [J]. *Pharmacol Ther*, 2004, 102(1):37- 46.
- [9] LAL A, GLAZER C A, MARTINSON H M, et al. Mutant epidermal growth factor receptor up-regulated molecular effectors of tumor invasion [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(12):3335- 3539.
- [10] 赵荫农,曹骥,吴飞翔,等. EGF mRNA 和 EGFR mRNA 在肝细胞癌组织中的表达及其意义[J].*癌症*,2004,23(7):762-766.
- [11] 高继君,张晨光,杨清扬.慢性肝病和原发性肝癌患者血清表皮生长因子测定及其临床意义[J].*东南大学学报:医学版*,2004,23(2):120-121.
- [12] 陶开山,窦科峰.人肝癌组织中 EGF、TGF2 及其受体 EGFR mRNA 的表达 [J]. *第四军医大学学报*, 2004, 25(9): 833- 835.

(编辑 黄小延)