

## ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 和EGFR在人肺癌组织芯片中的表达和意义

陈素琴,袁海洪

(武清区人民医院病理科,天津 301700)

**【摘要】目的** 探讨雌激素受体 $\alpha$ (ER $\alpha$ )和 $\beta$ (ER $\beta$ )及表皮生长因子受体(EGFR)在肺癌患者肿瘤组织中的表达及意义。**方法** 选取癌前病变组(不典型腺瘤样增生)12例,原发肺癌组77例,淋巴结转移性肺癌组12例构建成进展组织芯片。应用免疫组化方法检测ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 和EGFR在此芯片中的表达,并探讨其相互关系。**结果** 在进展组织芯片癌前病变组、原发肺癌组及淋巴结转移性肺癌组中ER $\alpha$ 的表达阳性率分别为91.67%、62.34%和25.00%,不同组间比较差异有统计学意义( $P<0.01$ );ER $\beta$ 的表达阳性率分别为91.67%、55.84%和16.67%,不同组间比较差异有统计学意义( $P<0.01$ );EGFR的表达阳性率分别为25.00%、59.74%和91.67%,不同组间比较差异有统计学意义( $P<0.01$ )。在原发肺癌中,ER $\alpha$ 表达与性别、组织学分型、肿瘤分化程度及P-TNM分期有关( $P<0.05$ ),ER $\beta$ 表达与性别、组织学分型、肿瘤分化程度、P-TNM分期及淋巴结转移有关( $P<0.05$ ),EGFR表达与淋巴结转移及肿瘤的P-TNM分期有关( $P<0.05$ )。ER $\beta$ 和EGFR的表达呈正相关( $r=0.612, P<0.01$ )。**结论** ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 及EGFR均与肺癌的发生发展有关,且ER $\beta$ 和EGFR的表达相关,这种潜在的机制及关联性为将来的进一步研究提供了基础。

**【关键词】** 组织芯片;免疫组织化学;肺癌;雌激素受体 $\alpha$ ;雌激素受体 $\beta$ ;表皮生长因子受体

**【中图分类号】** R734.2   **【文献标识码】** A   **【文章编号】** 1003—6350(2017)04—0521—04

**Expression and significance of estrogen receptor  $\alpha$ , estrogen receptor  $\beta$ , and epidermal growth factor receptor in human lung cancer by tissue microarray.** CHEN Su-qin, YUAN Hai-hong. Department of Pathology, the People's Hospital of Wuqing District of Tianjin, Tianjin 301700, CHINA

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression and biological significances of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ), and epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer. **Methods** We constructed a tissue microarray in which there were 12 cases of precancerous lesion, 77 cases of primary lung cancer, and 12 cases of lung cancer with lymph node metastasis, and detected the expression of ER $\alpha$ , ER $\beta$  and EGFR in these specimens by using Elivision immunohistochemical method. **Results** The positive rate of ER $\alpha$  was 91.67% in precancerous tissues, 62.34% in primary lung cancer and 25.00% in lung cancer with lymph node metastasis, and there were significant differences among them ( $P<0.01$ ). The positive rate of ER $\beta$  was 91.67% in precancerous tissues, 55.84% in primary lung cancer and 16.67% in lung cancer with lymph node metastasis, and the differences were statistically significant ( $P<0.01$ ). The positive rate of EGFR was 25.00%, 59.74%, and 91.67%, respectively, and the differences among them were significant ( $P<0.01$ ). In primary lung cancer, the expression of ER $\alpha$  was significantly correlated with gender, histological types, grade and P-TNM stage ( $P<0.05$ ), and the expression of ER $\beta$  was significantly correlated with gender, histological types, grade, P-TNM stage and lymph node metastasis ( $P<0.05$ ). The expression of EGFR was significantly correlated with lymph node metastasis and P-TNM stage ( $P<0.05$ ). Correlation analysis showed that there was a positive correlation between ER $\beta$  and EGFR ( $r=0.612, P<0.01$ ). **Conclusion** The expression of ER $\alpha$ , ER $\beta$  and EGFR are related to the occurrence and development of lung cancer, and the expression of ER $\beta$  is correlated with EGFR. The underlying mechanism and potential translational relevance provide the foundation for further investigation.

**[Key words]** Tissue microarray; Immunohistochemical; Lung cancer; Estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ); Estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ); Epidermal growth factor receptor (EGFR)

基金项目:天津市武清区科技发展计划项目(编号:WQKJ201214)

通讯作者:陈素琴。E-mail:sukeyar@163.com

\*\*\*\*\*

进展[J]. 河北医药, 2015, 37(9): 1398-1400.

- [10] Li Z, Jiang H, Xie W, et al. Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction [J]. Science, 2000, 287(5455): 1046-1049.
- [11] Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, et al. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation [J]. Science, 2000, 287(5455): 1049-1053.
- [12] Ceranowicz D, Warzecha Z, Dembinski A, et al. Role of hormonal axis, growth hormone-IGF-1, in the therapeutic effect of ghrelin in the course of cerulein-induced acute pancreatitis [J]. Physiol Pharmacol, 2010, 61(5): 599-606.

[13] Zhou CH, Li X, Zhu YZ, et al. Ghrelin alleviates neuropathic pain through GHSR-1a-mediated suppression of the p38 MAPK/NF-kappaB pathway in a rat chronic constriction injury model [J]. Reg Anesth Pain Med, 2014, 39(2): 137-148.

[14] Wang X, Wang XL, Chen HL, et al. Ghrelin inhibits doxorubicin cardiotoxicity by inhibiting excessive autophagy through AMPK and p38-MAPK [J]. Biochem Pharmacol, 2014, 88(3): 334-350.

[15] 郭闻师, 丁丽颖, 单海燕, 等. p38MAPK介导Ghrelin对TNF- $\alpha$ 诱导的人脑微血管内皮细胞MCP-1 mRNA表达的抑制[J]. 山东医药, 2011, 51(4): 16-20.

(收稿日期:2016-09-12)

雌激素在多种肿瘤中的促癌作用已经得到证实。雌激素受体(ER)的表达与肺癌的发生发展密切相关。表皮生长因子受体(EGFR)属于酪氨酸激酶家族,在多种癌症中有过表达,包括肺癌<sup>[1]</sup>。相对于男性而言,女性肺癌对酪氨酸激酶抑制剂(TKI)治疗的反应更好一些<sup>[2]</sup>,这表明EGFR和ER之间可能存在某种关联。本研究目的在于探讨雌激素受体ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 及EGFR在我国肺癌进展组织芯片中的表达情况及其与肺癌的临床特点的关系,以及三者在肺癌中表达的相互关系。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选取肺癌手术切除标本,癌前病变(不典型腺瘤样增生)12例,原发肺癌77例,淋巴结转移性肺癌12例。此77例原发肺癌标本临床资料完整,其中腺癌35例,鳞癌33例,大细胞癌9例(按2004年WHO肺癌组织学分类标准);男性58例,女性19例;年龄45~75岁,中位年龄61岁;周围型51例,中央型26例;有淋巴结转移者36例,无淋巴结转移者41例;高、中分化46例,低、未分化31例;I~II期48例,III~IV期29例(根据P-TNM分期)。所有病例在肿瘤切除前均未进行放疗和化疗。

1.2 组织芯片制作方法 在显微镜下找出肿瘤组织切片中有代表性的区域,并在相应石蜡包埋组织切面上做标记。用0.6 mm组织穿刺针在每个标本的标记点分别取样,而后将其依次排列于模具内预融的石蜡中构成组织微阵列蜡块,待石蜡凝固后切割3~4  $\mu\text{m}$ 组织微阵列切片,将其粘附于玻片上,封蜡,4℃保存。

1.3 免疫组化 Elivision两步法 单克隆兔抗人EGFR抗体为博士德生物公司产品,工作液浓度为1:100;单克隆鼠抗人ER $\alpha$ 抗体为基因科技有限公司产品,工作液浓度为1:100;多克隆兔抗人ER $\beta$ 抗体为北京Bioss生物技术公司产品,工作液浓度为1:200;即用型第二代免疫组化Elivision plus广谱试剂盒,购自福州迈新生物技术开发有限公司。操作严格按照试剂盒说明书进行,用已知阳性切片做阳性对照,以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定 对组织芯片中各点评分,根据细胞染色强度和染色细胞所占面积两者积分之和来判断。染色强度定性积分为:不着色为0,浅黄色为1,棕黄色为2,棕褐色为3;染色面积定量积分:无着色或<5%为0,5%~24%为1,25%~50%为2,>50%为3;两种积分相加为该点得分。对组织芯片中来自同一病例的各点的得分相加取平均值,依照0为-,1~2为+,3~4为++,5~6为+++,进行半定量判断;>2(++)和+++)为阳性,≤2(-和+)为阴性进行定性判断。

1.5 统计学方法 应用SPSS19.0统计软件包,  
· 522 ·

临床病理参数间的比较采用行×列联表 $\chi^2$ 检验或Fisher确切概率法、四格表 $\chi^2$ 检验计算;显著性检验水准 $\alpha=0.05$ 。ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 和EGFR之间的相关关系采用Spearman相关分析。

## 2 结 果

2.1 肺癌进展组织芯片中ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 和EGFR的表达差异 ER $\alpha$ 阳性着色位于细胞核(图1),ER $\beta$ 阳性着色位于细胞核(图2),EGFR阳性着色位于细胞浆/膜(图3)。ER $\alpha$ 和ER $\beta$ 在癌前病变中的表达高于原发肺癌及淋巴结转移性肺癌,在原发肺癌中的表达高于淋巴结转移性肺癌。在癌前病变、原发肺癌和淋巴结转移性肺癌中ER $\alpha$ 和ER $\beta$ 的表达阳性差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。EGFR蛋白在癌前病变中的表达低于原发肺癌及淋巴结转移性肺癌,在原发肺癌中的表达低于于淋巴结转移性肺癌。在癌前病变、原发肺癌和淋巴结转移性肺癌中EGFR的表达阳性差异具有统计学意义( $P<0.01$ ),见表1。

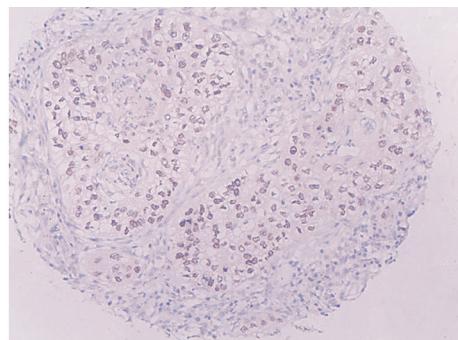


图1 ER $\alpha$ 肺腺癌细胞核阳性表达(Elivision $\times 100$ )

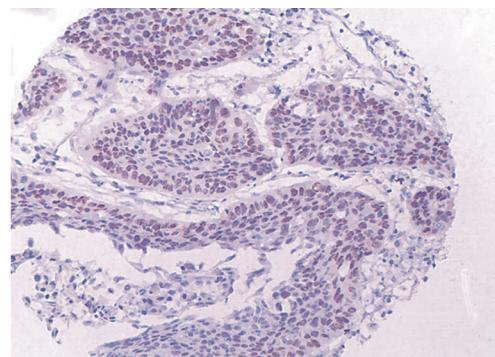


图2 ER $\beta$ 肺鳞癌细胞核阳性表达(Elivision $\times 100$ )

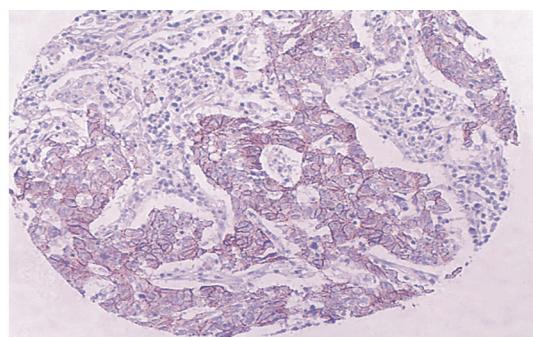


图3 EGFR肺腺癌细胞浆/膜(Elivision $\times 100$ )

表 1 肺癌进展组织芯片中 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  和 EGFR 的阳性表达率比较  
[例(%)]

组别	例数	ER $\alpha$ (+)	ER $\beta$ (+)	EGFR (+)
癌前病变	12	11 (91.67)	11 (91.67)	3 (25.00)
原发肺癌	77	48 (62.34)	43 (55.84)	46 (59.74)
淋巴结转移性肺癌	12	3 (25.00)	2 (16.67)	11 (91.67)
$\chi^2$ 值		11.374	13.683	12.236
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

2.2 原发肺癌中 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  和 EGFR 的表达及其与临床病理学参数的关系 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  和 EGFR 在 77 例原发肺癌中的表达阳性见表 2。结果显示,ER $\alpha$  和 ER $\beta$  的表达与性别有关,在女性中的表达阳性率高于男性( $P<0.05$ )。ER $\alpha$  和 ER $\beta$  蛋白的表达还与肺癌的组织学类型有关,在腺癌中的表达高于鳞癌( $P<0.05$ ),在大细胞癌中的表达低于腺癌和鳞癌,但这种差异无统计学意义( $P>0.05$ )。ER $\alpha$  和 ER $\beta$  的表达阳性率随肿瘤

分化程度的升高呈上升趋势,在肿瘤高、中分化组的表达阳性率高于低、未分化组( $P<0.05$ )。ER $\alpha$  和 ER 的表达阳性率随着 P-TNM 分期的进展呈下降趋势,在 I 和 II 期中的表达阳性率高于 III 和 IV 期( $P<0.05$ )。ER $\beta$  的表达与是否有淋巴结转移有关,在无淋巴结转移组中的表达阳性率高于有淋巴结转移组( $P<0.05$ )。EGFR 的表达阳性率与 P-TNM 分期有关,随着 P-TNM 分期的进展呈上升趋势,在 I 和 II 期中的表达阳性率低于 III 和 IV 期( $P<0.05$ )。EGFR 的表达阳性率在无淋巴结转移组中的表达低于有淋巴结转移组( $P<0.05$ )。ER $\alpha$  的表达阳性率与患者年龄、肉眼类型及肿瘤的淋巴结转移无关( $P>0.05$ )。ER $\beta$  的表达阳性率与患者年龄和肉眼类型无关( $P>0.05$ )。EGFR 的表达阳性率与患者的性别、年龄、肉眼类型、组织学分型及肿瘤的分化程度无关( $P>0.05$ )。

表 2 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  和 EGFR 在 77 例原发肺癌中的表达及其与临床病理学参数之间的关系

临床特征	例数	ER $\alpha$			ER $\beta$			EGFR		
		阳性率(%)	$\chi^2$ 值或 F 值	P 值	阳性率(%)	$\chi^2$ 值或 F 值	P 值	阳性率(%)	$\chi^2$ 值或 F 值	P 值
性别		5.140	0.023		5.460	0.019		0.036	0.850	
男	58	55.17			48.28			60.34		
女	19	84.21			78.95			57.89		
年龄(岁)		0.404	0.525		1.583	0.208		0.061	0.806	
≥60	46	65.22			50.00			60.87		
<60	31	58.06			64.52			58.06		
肉眼类型		1.206	0.272		0.516	0.472		0.053	0.818	
周围型	51	66.67			52.94			58.82		
中央型	26	53.85			61.54			61.54		
组织学分型		12.098	0.002		6.880	0.032		2.306	0.316	
腺癌	35	82.86			71.43			57.14		
鳞癌	33	45.45			45.45			69.70		
大细胞癌	9	44.44			33.33			44.44		
分化程度		4.302	0.038		4.071	0.044		2.720	0.099	
高中分化	46	71.74			65.22			52.17		
低未分化	31	48.39			41.94			70.97		
淋巴结转移		1.325	0.250		5.511	0.019		4.380	0.036	
无	41	68.29			68.28			48.78		
有	36	55.56			41.67			72.22		
P-TNM 分期		6.075	0.014		6.054	0.014		10.248	0.001	
I 和 II 期	48	72.92			66.67			45.83		
III 和 IV 期	29	44.83			37.93			82.76		

2.3 原发肺癌中 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  和 EGFR 之间的相关性 Spearman 等级相关分析显示,在原发肺癌中,ER $\beta$  和 EGFR 蛋白的表达呈正相关关系( $r=0.612, P<0.01$ ),ER $\alpha$  和 ER $\beta$ 、ER $\alpha$  和 EGFR 之间的表达无相关关系( $r_{ER\alpha-ER\beta}=-0.058, P>0.05; r_{ER\alpha-EGFR}=-0.040, P>0.05$ )。

### 3 讨论

肺癌是全球常见的恶性肿瘤之一,但是总体治疗效果并不满意。近年来越来越多的研究发现,ER 在非小细胞肺癌的发生发展过程中的确起着重要作用<sup>[3]</sup>。ER

有两种亚型,即 ER $\alpha$  和 ER $\beta$ 。ER $\alpha$  在非小细胞肺癌的表达情况在国内外各文献之间报道的差异较大,细胞核、细胞质均有阳性表达的报道<sup>[4]</sup>,而表达的阳性率也不同,本研究中 ER $\alpha$  蛋白表达于癌前病变、原发肺癌及淋巴结转移性肺癌的细胞核。与 Yun 等<sup>[5]</sup>的报道一致。He 等<sup>[6]</sup>认为在肺癌中不表达全长的 ER $\alpha$ ,但是检测到了变异的 ER $\alpha$ 。这可能是由于不同的检测方法、不同的抗体及 ER $\alpha$  自身的变异造成的。对于 ER $\beta$  蛋白在肺癌中的定位研究较一致,为细胞核。本研究中 ER

$\beta$ 蛋白表达于癌前病变、原发肺癌及淋巴结转移性肺癌的细胞核。Mah等<sup>[7]</sup>认为ER $\beta$ 的表达提示肺癌患者有长期的生存率。本研究结果显示ER $\alpha$ 和ER $\beta$ 在癌前病变、原发肺癌及淋巴结转移性肺癌的表达越来越低,随着肿瘤细胞分化程度的升高而上升,随着临床分期的进展而降低( $P<0.05$ );ER $\beta$ 在无淋巴结转移组的表达明显高于有淋巴结转移组( $P<0.05$ ),提示两者的失表达可能与肿瘤的恶性进展有关,从另一方面支持了以上说法。McHugh等<sup>[8]</sup>在分子水平的研究显示ER $\alpha$  mRNA 在肺癌女性患者中的表达明显高于男性。本研究用免疫组化的方法在蛋白水平得到类似的结果,ER $\alpha$ 和ER $\beta$ 蛋白在肺癌女性患者中的表达明显高于男性,与Luo等<sup>[9]</sup>的研究一致。此外,本研究对ER $\alpha$ 和ER $\beta$ 在不同肺癌组织学分型的表达进行了分析,结果显示在腺癌中的表达高于鳞癌( $P<0.05$ ),与McHugh等<sup>[8]</sup>和Luo等<sup>[9]</sup>的研究相符,提示了ER $\alpha$ 和ER $\beta$ 应用于肺癌靶向治疗的可能性。

ER $\beta$ 与ER $\alpha$ 在氨基酸序列和配体结合域有同源性,编码基因所在染色体不同,ER $\alpha$ 位于6q25.1,ER $\beta$ 位于14q23.2。ER $\alpha$ 与ER $\beta$ 在通过增强子元件的信号转录过程中介导的配体效应截然不同<sup>[10]</sup>。本研究结果显示,ER $\alpha$ 和ER $\beta$ 在肺癌中的表达无相关关系。因此可以推测,ER $\alpha$ 和ER $\beta$ 可能在基因调控中起不同作用。

EGFR 属于细胞表面酪氨酸蛋白激酶受体 erbB家族成员,是原癌基因 c-erbB-1 的表达产物,参与调控细胞代谢、增殖、肿瘤血管生成,促进细胞迁移和分化<sup>[11]</sup>。本研究发现癌前病变、原发肺癌及淋巴结转移肺癌中 EGFR 表达阳性率随肺癌的进展而升高,EGFR 蛋白的表达随临床分期的进展而表达升高,在有淋巴结转移组中的表达与显著高于无淋巴结转移组( $P<0.05$ ),表明其在肺癌的发展及肿瘤细胞的浸润转移中起到了促进的作用,对这些指标的检测有可能为估计患者预后提供重要信息。有文献报道 ER(包括ER $\alpha$ 和ER $\beta$ )与EGFR之间有相互的作用<sup>[12]</sup>。这表明他们之间存在着共同的信号通路,而这些信号通路有可能为肺癌的生物学机制提供新的思路。本次试验发现ER $\beta$ 与EGFR在肺癌的表达中呈正相关,而ER $\alpha$ 与EGFR却没有明显的相关性,推测雌激素诱导的肺癌细胞的增殖可能是通过ER $\beta$ 来实现的。

总之,雌激素受体ER $\alpha$ 和ER $\beta$ 及EGFR 均与非小细胞肺癌的发生发展有关,且ER $\beta$ 和EGFR 的表达相关,这种潜在的机制及关联性可能为将来的进一步研究提供了基础。

#### 参 考 文 献

- [1] Nurwidya F, Takahashi F, Takahashi K. Gefitinib in the treatment of nonsmall cell lung cancer with activating epidermal growth factor receptor mutation [J]. J Nat Sci Biol Med, 2016, 7(2): 119-123.
- [2] Choe C, Shin YS, Kim C, et al. Crosstalk with cancer-associated fibroblasts induces resistance of non-small cell lung cancer cells to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition [J]. Oncotargets Ther, 2015, 8: 3665-3678.
- [3] Siegfried JM, Stabile LP. Estrogenic steroid hormones in lung cancer [J]. Semin Oncol, 2014, 41(1): 5-16.
- [4] Gomez-Fernandez C, Mejias A, Walker G, et al. Immunohistochemical expression of estrogen receptor in adenocarcinomas of the lung: the antibody factor [J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2010, 18: 137-141.
- [5] Yun J, Son CH, Um SJ, et al. A different TRAP220 expression in distinct histologic subtypes of lung adenocarcinoma and the prognostic significance [J]. Lung Cancer, 2011, 71(3): 312-318.
- [6] He Q, Zhang M, Zhang J, et al. Correlation between epidermal growth factor receptor mutations and nuclear expression of female hormone receptors in non-small cell lung cancer: a meta-analysis [J]. J Thorac Dis, 2015, 7(9): 1588-1594.
- [7] Mah V, Marquez D, Alavi M, et al. Expression levels of estrogen receptor beta in conjunction with aromatase predict survival in non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2011, 74(2): 318-325.
- [8] McHugh MK, Lopez MS, Ho CH, et al. Use of the cytokinesis-blocked micronucleus assay to detect gender differences and genetic instability in a lung cancer case-control study [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2013, 22(1): 135-145.
- [9] Luo Z, Wu R, Jiang Y, et al. Overexpression of estrogen receptor beta is a prognostic marker in non-small cell lung cancer: a meta-analysis [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(6): 8686-8697.
- [10] Takeda S.  $\Delta$ 9-Tetrahydrocannabinol targeting estrogen receptor signaling: the possible mechanism of action coupled with endocrine disruption [J]. Biol Pharm Bull, 2014, 37(9): 1435-1438.
- [11] Caruso ME, Clément P, Parent S, et al. Integrated cell-based platform to study EGFR activation and transactivation [J]. Assay Drug Dev Technol, 2013, 11(7): 423-434.
- [12] Wang Z, Li Z, Ding X, et al. ER $\beta$  localization influenced outcomes of EGFR-TKI treatment in NSCLC patients with EGFR mutations [J]. Sci Rep, 2015, 5: 11392.

(收稿日期:2016-09-19)