

# 非小细胞肺癌 EGFR 基因突变与 E-cadherin、Vimentin 表达的相关性

郭宁宁

(广东省惠州市第三人民医院 肿瘤内科, 广东 惠州 510000)

**摘要:**目的:探究非小细胞肺癌患者肺组织中 E-cadherin、Vimentin 表达与 EGFR 突变的关系。方法:收集在本院进行治疗的非小细胞肺癌患者 104 例作为研究对象,采用 PCR 检测患者肿瘤组织中 EGFR 基因突变情况,采用免疫组化法检测肺组织中 E-cadherin、Vimentin 表达情况,分析 EGFR 基因突变、E-cadherin、Vimentin 与患者临床参数的关系;Pearson 相关性分析 E-cadherin、Vimentin 相关性;Logistic 回归分析影响非小细胞肺癌患者 EGFR 突变的危险因素。结果:非小细胞肺癌患者 EGFR 突变 61 例。非小细胞肺癌患者 EGFR 基因突变与患者性别、肿瘤组织类型、患者吸烟有关( $P < 0.05$ )。与 EGFR 基因野生型患者相比,EGFR 基因突变者肺组织中 E-cadherin 表达显著升高,Vimentin 表达显著降低( $P < 0.05$ )。E-cadherin、Vimentin 与非小细胞肺癌患者肿瘤分期相关( $P < 0.05$ )。Pearson 相关性分析显示,非小细胞肺癌患者 E-cadherin 与 Vimentin 呈显著负相关( $r = -0.483, P < 0.05$ )。结论:非小细胞肺癌患者 E-cadherin 高表达,Vimentin 低表达与 EGFR 突变患者有关。

**关键词:**非小细胞肺癌;上皮-间质转化;E-钙黏蛋白;波蛋白

**中图分类号:** R73-3

**文献标识码:** B

**文章编号:** 2095-512X(2020)03-0257-04

肺癌严重影响人类身体健康,非小细胞肺癌在所有肺癌中占据 80%,以手术为主、放化疗辅助治疗的方式广泛用于肺癌,然而部分非小细胞肺癌患者 5 年存活率不足 20%<sup>[1]</sup>。研究发现非小细胞肺癌多数患者中均可检测到 EGFR 基因突变,且 EGFR 基因突变影响患者生存状况<sup>[2]</sup>。因此,及早寻找影响 EGFR 基因突变原因对于缓解治疗效果迫在眉睫。过往研究发现上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在肿瘤浸润及转移过程中尤为重要,上皮型标志蛋白 E-钙黏蛋白(E-cadherin)的丧失与间质型标志蛋白波蛋白(vimentin)的获得为 EMT 转化主要特征,二者均可反映疾病状况<sup>[3,4]</sup>。然而目前 E-cadherin、Vimentin 在非小细胞肺癌患者 EGFR 突变中的作用,目前尚不明确。本研究通过检测非小细胞肺癌 EGFR 基因突变患者 E-cadherin、Vimentin 的表达,旨在探究两者与非小细胞肺癌患者 EGFR 突变的相关性。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

选择 2018-05~2019-03 在本院进行治疗的 104 例非小细胞肺癌患者进行研究,男性 61 例,女性 43 例,年龄 37~79 岁,平均年龄  $58.95 \pm 12.16$  岁,病理类型:鳞癌 31 例,鳞腺混合癌 6 例,腺癌 67 例,I~II 期 56 例,III~IV 期 48 例,EGFR 基因突变 61 例,EGFR 野生型 43 例。

### 1.2 纳入与排除标准

纳入标准:(1)患者均经病理学检测为肺癌;(2)年龄不超过 80 岁;(3)符合 TNM 肿瘤病理学分型标准<sup>[5]</sup>;(4)患者资料完整。排除标准:(1)术前接受过放疗、化疗等肿瘤相关的治疗;(2)合并其它部位恶性肿瘤;(3)肝、肾等器官发生重要损伤;(4)妊娠、精神疾病患者。

### 1.3 研究方法

**1.3.1 主要试剂与仪器** DNA 提取试剂盒(KL111201)购自美国 Omega 公司;免疫组化试剂盒(WE0316)购于北京百奥莱博公司;PCR 仪(7500)购于美国 ABI 公司;E-cadherin、Vimentin 抗体均购于英国 Abcam 公司;EGFR 基因引物均在上海生工生物工程有限公司合成;显微镜 BX51 购于日本奥林巴斯公司。

收稿日期:2020-02-05;修回日期:2020-04-23

基金项目:惠州市课题计划项目(2018Y177)

作者简介:郭宁宁(1982-),女,广东省惠州市第三人民医院肿瘤内科主治医师。

**1.3.2 肿瘤组织中EGFR基因突变检测** 采用Primer5.0软件设计引物,引物序列参照基因组DNA提取试剂盒提取组织DNA,经检测浓度与纯度后,采用PCR扩增反应检测EGFR基因突变情况,反应体系:2mmol/L氯化镁,250umdnTP,2.5UTaqDNA,上下游引物各0.3uM。反应条件控制:94℃5min,94℃反应60s,57℃退火60s,72℃反应1min,反复循环30次。取5uL反应产物,经2%琼脂糖凝胶电泳观察条带大小,剪取正确条带,经纯化后进行酶切反应:0.15uL Exon-I酶,0.5uL SAP,4uL PCR反应产物,0.35uL ddH<sub>2</sub>O,酶切条件:37℃恒温反应60min,72℃15min,经循环反应后进行测序分析,统计各位点突变情况。

**1.3.3 免疫组化检测肺组织中E-cadherin、Vimentin表达情况** 收集术中切除的肺组织,在10%中性福尔马林溶液中过夜固定,进梯度乙醇溶液水合、二甲苯透明、浸蜡后进行石蜡包埋,制备肺组织石蜡切片(4μm),经烘烤后,采用二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水,用0.01M柠檬酸钠(PH6.0)缓冲液对切片进行抗原热修复20min,洗涤后添加3%过氧化氢孵育10min,清洗后加入10%山羊血清常温下孵育10min,采用E-cadherin、Vimentin一抗(1:300)4℃过夜孵育切片后,用辣根过氧化物酶标记的IgG二抗在常温孵育切片1h。PBS清洗3次,每次5min。采用100μL DAB溶液对切片进行显色反应,在显微镜下观察直至显色,冲洗后用苏木精进行复染,然后在1%盐酸中5s后用水冲洗,经乙醇脱水、二甲苯透明处理、中性树脂封片后在显微镜下观察切片中E-cadherin、Vimentin蛋白阳性表达情况。每张切片挑选10个视野,E-cadherin主要定位在细胞膜,Vimentin主要定位在细胞浆或细胞质中,采用Image-J计算阳性染色细胞百分比,蛋白阳性表达率=染色细胞数/细胞总数。

**1.2 统计学处理**

采用统计学软件SPSS 21.0进行数据分析,当P<0.05时,则代表差异具有统计学意义。计数资料以%描述,行χ<sup>2</sup>检验;计量资料以表示,两组间对比行t检验,采用Pearson相关性分析E-cadherin、Vimentin蛋白阳性表达与非小细胞肺癌患者临床参数及EGFR突变的关系。

**2 结果**

**2.1 非小细胞肺癌患者EGFR基因突变情况**

非小细胞肺癌患者中(104例),EGFR突变61例,其中33例为21号外显子点突变,20例为19号外显子缺失突变,4例为18号外显子突变。2例20号外显子突变,2例为18号和20号外显子共突变。临床分析发现非小细胞肺癌患者EGFR基因突变与患者性别、肿瘤组织类型、患者吸烟有关(P<0.05);与年龄、肿瘤分期无关(P>0.05)(见表1)。

表1 非小细胞肺癌患者EGFR基因突变与临床参数的关系

临床因素	EGFR基因突变组(n=61)	EGFR野生型组(n=43)	χ <sup>2</sup>	P
年龄(岁)			0.330	0.565
≤60	14	12		
>60	47	31		
性别			5.460	0.019
男性	30	31		
女性	31	12		
组织类型			5.624	0.018
腺癌	45	22		
非腺癌	16	21		
肿瘤分期			2.360	0.124
I~II期	29	27		
III~IV期	32	16		
吸烟			4.725	0.030
是	33	14		
否	28	29		

**2.2 非小细胞肺癌患者EGFR基因突变患者E-cadherin、Vimentin表达情况**

与EGFR基因野生型患者相比,EGFR基因突变者肺组织中E-cadherin表达显著升高,Vimentin表达显著降低(P<0.05)(见表2)。

表2 不同EGFR基因型患者E-cadherin、Vimentin表达比较

组别	E-cadherin(%)	Vimentin(%)
EGFR基因突变型(n=61)	41.12 ± 6.52	21.01 ± 4.35
EGFR基因野生型(n=43)	22.95 ± 5.16	54.24 ± 6.87
t	15.215	35.514
P	0.000	0.000

**2.3 E-cadherin、Vimentin与患者临床病理参数的关系**

E-cadherin、Vimentin与非小细胞肺癌患者组织类型相关(P<0.05);与年龄、性别、肿瘤分期、吸烟无关(P>0.05)。

表3 非小细胞肺癌患者E-cadherin、Vimentin表达与临床参数的关系

临床因素	E-cadherin		$\chi^2, P$	Vimentin		$\chi^2, P$
	高表达(n=56)	低表达(n=48)		高表达(n=54)	低表达(n=50)	
年龄(岁)			0.000,1.000			0.731,0.398
≤60	14	12		15	11	
>60	42	36		39	39	
性别			0.740,0.390			0.280,0.957
男性	35	26		33	28	
女性	21	22		21	22	
组织类型			0.624,0.429			0.104,0.747
腺癌	38	29		34	33	
非腺癌	18	19		20	17	
肿瘤分期			15.039,0.000			12.016,0.000
I~II期	40	16		19	37	
III~IV期	16	32		35	13	
吸烟			0.015,0.903			0.055,0.814
是	25	22		27	20	
否	31	26		37	30	

### 2.4 非小细胞肺癌患者E-cadherin、Vimentin相关性分析

Pearson相关性分析显示,非小细胞肺癌患者E-cadherin与Vimentin呈显著负相关( $r=-0.483, P<0.05$ )(见图1)。

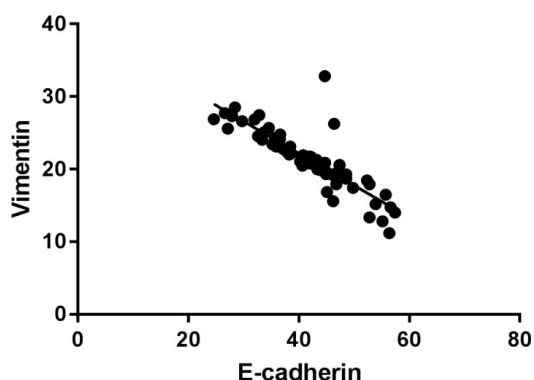


图1 Pearson相关性分析E-cadherin、Vimentin相关性

### 3 讨论

EGFR主要定位在人7号染色体,其功能区主要位于18~24号外显子区域,过往研究发现EGFR基因突变多集中在21号外显子,为858号亮氨酸转变成精氨酸;20号外显子突变出现较少,主要为770~775号密码子突变<sup>[6]</sup>。本研究发现非小细胞肺癌患

者中,EGFR突变61例,其中33例为21号外显子点突变,2例20号外显子突变,说明非小细胞肺癌患者EGFR突变大多数集中在21号外显子,20号外显子较少,与过往研究相符合<sup>[7]</sup>。研究发现肺癌患者EGFR基因突变主要发生在女性肺腺癌患者中<sup>[8]</sup>。本研究发现非小细胞肺癌女性患者EGFR突变率明显高于男性,腺癌突变率明显高于非腺癌,提示非小细胞肺癌患者EGFR基因突变在不同性别中表现出差异,可能受某些因素影响。

E-cadherin属跨膜糖蛋白,通过结合Catenin介导细胞粘附,在组织结构维持中发挥重要作用。研究发现在上皮细胞肿瘤中E-cadherin表达水平降低会造成细胞粘附能力下降,而E-cadherin表达降低也会进一步造成细胞去分化导致高侵袭性<sup>[9]</sup>。基础研究发现上皮细胞中E-cadherin过表达能够抑制细胞中增殖,诱导细胞凋亡,造成细胞连接松散,侵袭能力增强<sup>[10]</sup>。这些研究均说明E-cadherin的异常变化会影响肿瘤的表型变化。Xing等研究发现在MCF-7等癌细胞中过表达E-cadherin后,能明显降低的增殖率,提示E-cadherin可能在EGFR分子靶向治疗的过程中发挥重要作用<sup>[11]</sup>。当肿瘤出现EMT后,EGFR基因突变率升高,表明肿瘤EMT状态与EGFR基因突变密切相关。本研究发现与EGFR基因野生型患者相比,EGFR基因突变者肺

组织中 E-cadherin 表达显著升高,且 E-cadherin 表达与癌组织类型相关,进一步进行 Logistic 回归分析发现 E-cadherin 是影响非小细胞肺癌患者 EGFR 基因突变的危险因素,推测 E-cadherin 高表达可促进癌细胞侵袭、出现 EMT 增加的非小细胞肺癌 EGFR 基因突变,进而加重病情。

Vimentin 以往作为间叶组织来源肿瘤特异标志物,而在上皮肿瘤细胞中 Vimentin 过表达后会进一步促使上皮间质转化,加速肿瘤转移、侵袭等。基础研究证实抑制癌细胞中 Vimentin 表达后可降低肿瘤细胞的侵袭、转移,抑制 EMT 进程<sup>[12]</sup>。Richardson 等报道对化疗药物不敏感的肺癌患者组织中 Vimentin 高表达,说明 Vimentin 高表达与癌症患者化疗效果不佳有关,可用于预测癌症患者临床疗效<sup>[13]</sup>。Weng 等研究发现 Vimentin 表达水平升高后造成癌细胞上皮-间质转化<sup>[14]</sup>。本研究发现与 EGFR 基因野生型患者相比,EGFR 基因突变者肺组织中 Vimentin 表达显著降低,且 Vimentin 表达与癌组织类型相关,进一步进行 Logistic 回归分析发现 Vimentin 与非小细胞肺癌患者 EGFR 基因突变密切相关,说明在 EGFR 基因突变受到 EMT 的影响,推测 Vimentin 低表达可促进肿瘤转移、侵袭,加速 EMT 转化,EGFR 基因突变增高,加重病情。

在 EMT 过程中,E-cadherin、Vimentin 以相反的作用共同参与肿瘤细胞的转移、浸润、侵袭等生物过程。Mao 等研究发现 Vimentin 能够通过下调 E-cadherin 表达进而促进血管癌细胞的增殖、侵袭、转移<sup>[15]</sup>。本研究经 Pearson 相关性分析发现非小细胞肺癌患者 E-cadherin 与 Vimentin 呈现负相关,推测两者可能以负调控作用影响 EMT 过程,进而参与非小细胞肺癌患者 EGFR 基因突变过程。

综上所述,非小细胞肺癌患者 EGFR 基因突变多集中在 21 号外显子,在女性非腺癌患者中发生概率较高,EGFR 基因突变患者 E-cadherin 阳性表达较高,Vimentin 阳性表达较低,二者可能共同影响 EGFR 基因突变。然而临床治疗中是否能得出结论,还需要长期随访。

## 参考文献

- [1]张仁锋,张岩,温丰标,等. 6058 例肺癌患者病理类型和临床流行病学特征的分析[J]. 中国肺癌杂志, 2016;19(3): 129-135
- [2]王阿曼,宁振,刘基巍. 非小细胞肺癌 EGFR-TKI 耐药的分子机制及防治策略[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017;24(1): 71-78
- [3]胡晨,何勇. 第三代 EGFR-TKI 的耐药机制及应对策略[J]. 临床肺科杂志, 2018;23(8): 186-189
- [4]玄香兰,安昌善. c-MET 抑制剂联合 EGFR-TKI 对耐药肺癌细胞增殖、凋亡的影响及其机制[J]. 山东医药, 2017;57(39): 15-18
- [5]Hur J, Park MS, Lee JH, et al. Diagnostic accuracy of multi detector row computed tomography in T- and N staging of gastric cancer with histopathologic correlation[J]. J Comput Assist Tomogr, 2006;30(3): 372-377
- [6]董周寰,石怀银,吕亚莉,等. 非小细胞肺癌表皮生长因子受体基因突变与临床病理相关性研究[J]. 诊断病理学杂志, 2014;21(5): 274-276
- [7]Fernández-Trujillo L, Tapia L, Vallejo M, et al. Histological Transformation to Small Cell Carcinoma of an Adenosquamous Carcinoma of the Lung With Epidermal Growth Factor Receptor Mutation in Exons 20 and 21 After Treatment With Erlotinib: Case Report[J]. Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med, 2019; 13(9): 2993-2998
- [8]张卉,杨新杰,张新勇,晚期肺腺癌 EGFR 基因突变状态检测及分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014;21(19): 1517-1520
- [9]Zhao H, Zhang D, Yang L, et al. Interacts with E-cadherin in the cytoplasm so as to promote the invasion and metastasis of non-small cell lung cancer[J]. Mol Carcinog, 2018; 57(1): 89-96
- [10]Gulati N, Shetty DC, Rathore AS, et al. E-cadherin-mediated impairment increases anti-apoptotic mechanism through upregulation of Bcl-2: An immunohistochemical study in various patterns of invasion of oral squamous cell carcinoma[J]. J Oral Pathol Med, 2017;46(10): 934-939
- [11]Xing RC, Zheng J, Zheng WH, et al. Relevance of E-cadherin expression to EGFR-TKI molecular targeted therapy sensitivity/resistance and its clinical significance[J]. Genet Mol Res. 2015; 14(2): 5785-92
- [12]Jimenez L, Lim J, Burd B, et al. miR-375 Regulates Invasion-Related Proteins Vimentin and L-Plastin[J]. Am J Pathol, 2017;187(7): 1523-1536
- [13]Richardson F, Young G D, Sennello R, et al. The evaluation of E-Cadherin and vimentin as biomarkers of clinical outcomes among patients with non-small cell lung cancer treated with erlotinib as second- or third-line therapy[J]. Anticancer Res, 2012;32(2): 537-546
- [14]Weng CH, Chen LY, Lin YC, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) beyond EGFR mutations per se is a common mechanism for acquired resistance to EGFR TKI[J]. Oncogene, 2019;38(4): 455-468
- [15]Mao X, Chen D, Wu J, et al. Differential expression of fascin, E-cadherin and vimentin: Proteins associated with survival of cholangiocarcinoma patients[J]. Am J Med Sci, 2013;346(4): 261-268