

肝内胆管结石合并胆管癌组织中 erbB 家族蛋白表达及其临床意义

王平¹, 何宇², 马晓东³, 孙北望¹, 黄滨源¹, 朱灿华¹, 刘衍民¹

(¹ 广州医科大学附属第一医院肝胆外科, 广东 广州 510120; ² 第三军医大学西南医院肝胆外科, 重庆 400038; ³ 华南师范大学药物研究所, 广东 广州 510631)

[摘要] **目的:**探讨肝内胆管结石合并胆管癌组织中 erbB1(EGFR)和 erbB2(HER2)的表达差异及其临床意义。**方法:**收集 94 例肝内胆管结石合并肝内胆管癌患者的肝内胆管癌组织和 50 例癌旁肝组织样本,组织切片后进行 EGFR 和 HER2 免疫组化染色检测,分析癌与癌旁组织的表达差异;对部分患者进行 EGFR 分子靶向治疗(埃罗替尼, Erlotinib, 150 mg/d, 1 个疗程),并进行 5 年无瘤生存分析。**结果:**两组 EGFR 阳性表达率分别为 58.5%(55/94)和 26.0%(13/50),差异有统计学意义($P < 0.001$);两组 HER2 阳性表达率分别为 33.0%(31/94)和 16.0%(8/50),差异有统计学意义($P < 0.05$)。在胆管癌组中,EGFR 和 HER2 阳性患者的肿瘤组织学分级、浸润深度和肝门淋巴结转移明显高于阴性患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在胆管癌患者中 EGFR 或 HER2 阳性患者的 5 年无瘤生存率显著低于阴性患者($P < 0.05$)。进一步分子靶向治疗发现,EGFR 阳性患者埃罗替尼治疗后生存期延长,5 年无瘤生存率较 EGFR 和 HER2 均阳性者高(81.3% vs. 59.4%),但差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**EGFR 和 HER2 高表达在肝内胆管结石合并肝内胆管癌的发生发展中可能发挥重要作用,且二者高表达与肿瘤的恶性程度以及临床预后密切相关,并可能对临床分子靶向治疗具有指导意义。

[关键词] 肝内胆管结石;胆管癌;表皮生长因子受体

[中图分类号] R735.8

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)04-466-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20160418

The protein expression of erbB family in tissues of hepatolithiasis combined with bile duct carcinoma and its clinical significance

Wang Ping¹, He Yu², Ma Xiaodong³, Sun Beiwang¹, Huang Binyuan¹, Zhu Canhua¹, Liu Yanmin¹

(¹Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120; ²Department of Hepatobiliary Surgery, the Southwest Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400038; ³Institute of Drug Research, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression differences of erbB1(EGFR) and erbB2(HER2) in tissues of hepatolithiasis combined with bile duct carcinoma and its clinical significance. **Methods:** We collected 94 intrahepatic bile duct carcinoma tissues of patients with hepatolithiasis combined with intrahepatic bile duct carcinoma and 50 liver tissues adjacent to carcinoma samples. EGFR and HER2 were detected by immunohistochemical staining after biopsy. Then, we analyzed the expression differences between carcinoma tissues and tissues adjacent to carcinoma. EGFR molecule targeted therapy was performed in some patients (Erlotinib, 150 mg/d, one course of treatment), and 5-year-disease-free survival rate was analyzed. **Results:** EGFR positive expression rate of the two groups was 58.5% (55/94) and 26.0% (13/50), respectively, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$); HER2 positive expression rate of the two groups was 33.0% (31/94) and 16.0% (8/50), respectively, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). In the bile duct carcinoma group, tumor histologic grading, infiltrating depth and hilus lymph node metastasis of EGFR and HER2 positive patients were obviously higher than those of the negative patients, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). In patients with cholangiocarcinoma, 5-year disease-free survival rate of EGFR or HER2 positive patients was significantly lower than that of the negative patients ($P < 0.05$). Further found in the molecular targeted therapy, EGFR positive patients treated with erlotinib could extend survival, and 5-year disease-free survival rate was higher than that of EGFR and HER2 positive patients (81.3% vs. 59.4%), but there was no statistically significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion:** EGFR and HER2 expression in patients with intrahepatic bile duct stone combined with the occurrence of intrahepatic cholangiocarcinoma may play an important role in the development, and the two high expression are closely related to the degree of malignant tumor and clinical prognosis, and may have a guiding significance in clinical molecular targeted therapy.

[Key words] intrahepatic bile duct stones; bile duct cancer; the epidermal growth factor receptor

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(04):466-469]

肝内胆管结石长期存在是引发胆管癌的重要因素,我国作为肝内胆管结石的高发地区,合并胆管癌占 1/20~1/10,且有约 1/3 的胆管癌合并有肝内胆管结石^[1]。内皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)家族是一类参与肿瘤发生发展的关键蛋白^[2],其中 erbB1(又称 EGFR)的生物学功能已在多种恶性肿瘤中得到证实,并可能在肝内胆管癌发展中具有协同作用^[3],目前已有 EGFR 分子靶向药物用于临床治疗,但对于其他 EGFR 家族蛋白在肝内胆管癌发生发展中的作用鲜有报道,其中另一重要蛋白 erbB2(又称 HER2)也仅在肝外胆管癌中得到研究^[4]。因此,本研究着重探讨 EGFR 和 HER2 在肝内胆管结石合并肝内胆管癌组织中的表达,并分析与临床病理或预后转归的关系,进一步发现二者表达情况对临床分子靶向治疗的指导意义。

1 资料和方法

1.1 资料

收集本院 2005 年 8 月至 2015 年 2 月经外科治疗的 94 例肝内胆管结石合并肝内胆管癌患者的肝切除组织石蜡标本(胆管癌组),并获得 50 例癌旁肝组织石蜡标本(癌旁组),所有患者均经病理检查确诊。本组患者中男 54 例,女 40 例,平均年龄(55.8 ± 12.3)岁,按照 WHO 标准有组织学分级 I 级 20 例, II 级 31 例, III 级 29 例, IV 级 14 例;分化程度有高分化 40 例,中分化 33 例,低分化 21 例;侵及黏膜下层 30 例,局限于黏膜层 64 例;肝门淋巴结转移 29 例,无肝门淋巴结转移 65 例。患者术前均未接受放疗、化疗、抗炎治疗或其他抗肿瘤治疗,且患者不伴有严重心、脑、血管、肾脏或代谢性疾病。患者 KPS 评分均在 60~80 分,且患者本人或亲属均已签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化法检测组织中 EGFR 和 HER2 的表达

EGFR 单克隆抗体购于福州迈新公司、HER2 多克隆抗体购于美国 Dako 公司,SP 法免疫组化试剂盒购于北京中杉金桥公司。胆管癌或癌旁组织标本经甲醛固定、脱水、包埋并制成切片,再经二甲苯脱蜡,乙醇透明,经蒸馏水冲洗后进行修复抗原(0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液微波 15 min 后室温放至冷却,PBS 漂洗 3 次后滴加甲醇 H₂O₂ 进行非特异性抗原封闭室温 10 min,继续漂洗 3 次后滴加免疫组化封

闭液室温孵育 20 min,甩去并滴加一抗放于 4℃过夜,PBS 漂洗 3 次后滴加二抗 37℃孵育 60 min,继而漂洗 3 次后滴加 SP 复合物 37℃孵育 30 min,PBS 漂洗 3 次后 DAB 显色,自来水冲洗停止染色,苏木素复染,脱水、透明和封片。阴性对照采用 PBS 代替一抗,阳性对照则用已知阳性组织片。

1.2.2 结果评定

EGFR 和 HER2 均表达定位于细胞膜或细胞质,并采用以下方法对染色结果进行评定:按细胞染色强度划分,0 分,无着色;1 分,浅黄色;2 分,棕黄色;3 分,棕褐色。按阳性染色百分比划分,0 分,阴性;1 分,阳性细胞数 ≤ 10%;2 分,10% < 阳性细胞数 ≤ 50%;3 分,50% < 阳性细胞数 ≤ 75%;4 分,阳性细胞数 > 75%。最后按染色强度得分和阳性染色百分比得分的乘积结果划分为 4 个等级,-:0~2 分;+:3~5 分;+:6~8 分;+:9~12 分;其中 ≥ 3 分均为阳性。

1.2.3 随访和靶向疗效观察

以患者无瘤生存作为随访观察主要内容,以出现肿瘤复发或者转移作为不良事件终点,进行为期 5 年的随访观察。为排除靶向 EGFR 治疗的干扰,已将 46 例未接受 EGFR 靶向治疗的患者单独进行 5 年无瘤生存分析,包括 7 例 EGFR 阳性和 39 例 EGFR 阴性患者,同时将余下接受了 EGFR 分子靶向治疗(埃罗替尼,Erlotinib,150 mg/d,1 个疗程)的 48 例患者也另行 5 年无瘤生存的分析观察。

1.3 统计学方法

采用 SPSS11.5 统计学软件进行数据分析。计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料采用卡方检验,Spearman 等级相关分析 EGFR 和 HER2 表达相关性,Kaplan-Meier 寿命表法分析无瘤生存率并绘制生存曲线图,log-rank 检验比较组间生存差异, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肝内胆管癌 EGFR 和 HER2 表达情况

EGFR 和 HER2 蛋白阳性表达均为定位于胆管细胞膜或细胞质内的棕或黄褐色均质物或颗粒物。胆管癌组和癌旁组的 EGFR 阳性表达率分别为 58.5%(55/94)和 26.0%(13/50),两组比较有统计学差异($\chi^2=13.84, P < 0.001$);HER2 阳性表达率分别为 33.0%(31/94)和 16.0%(8/50),差异有统计学意

义($\chi^2=4.76, P=0.029$), 见表 1。Spearman 等级相关分析显示 EGFR 和 HER2 在肝内胆管癌组织中的表达无明显相关性($P > 0.05$)。

表 1 两组样本 EGFR 和 HER2 表达情况

Table 1 Expression of EGFR and HER2 in two groups (n)

染色结果	EGFR		HER2	
	胆管癌组 (n=94)	癌旁组 (n=50)	胆管癌组 (n=94)	癌旁组 (n=50)
-	39	37	63	42
+	18	8	13	6
++	22	4	10	1
+++	15	1	8	1

2.2 EGFR、HER2 与临床病理特征

肝内胆管癌组织中 EGFR 和 HER2 的表达与患者性别、年龄和分化程度均无关, 而与肿瘤组织学分级、浸润深度和淋巴结转移有密切关系, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 表 2)。

本研究通过门诊定期随访、信访或电话等方式成功随访患者 94 例, 无失访者出现, 随访率 100%。在 46 例未接受 EGFR 分子靶向治疗的患者中, 7 例 EGFR 表达阳性, 39 例 EGFR 表达阴性, 15 例 HER2 表达阳性, 31 例 HER2 表达阴性。EGFR 阳性者 5 年无瘤生存期和生存率分别为 (33.4 ± 8.9) 个月和 42.9%, 明显低于 EGFR 阴性者的 (51.9 ± 2.5) 个月和 76.9%, 差异有统计学意义($P=0.018$); 同样, HER2 阳性者 5 年无瘤生存期和生存率分别为 (36.7 ± 5.8) 个月和 46.7%, 明显低于 HER2 阴性者的 (51.3 ± 3.0) 个月和 77.4% ($P=0.022$, 图 1、2)。

2.3 指导分子靶向治疗

进一步对 48 例接受 EGFR 分子靶向治疗 (埃罗替尼) 的患者进行 5 年无瘤生存分析后发现, 16 例 EGFR 和 HER2 均阳性者与 32 例 EGFR 阳性者的 5 年无瘤生存期和生存率比较有明显差异, EGFR 阳性者 5 年无瘤生存期和生存率 [(51.8 ± 4.3) 个月和 81.3%] 优于 EGFR 和 HER2 均阳性者 [(44.0 ± 3.6) 个月和 59.4%], 但差异无统计学意义 ($P=0.159$, 图 3)。

3 讨论

目前已证实肝内胆管结石的长期存在是引发胆管癌的重要因素之一^[5]。因为肝内胆管的解剖学特点, 肝内胆管结石易致胆汁滞留, 且常伴有不同程度的胆管机械性损伤或感染, 进而引起慢性炎症增生、不典型增生, 甚至发展为胆管癌变。胆汁滞留和炎症的长期影响进而体现为以下几种可能的癌

表 2 肝内胆管癌 EGFR 和 HER2 表达与临床病理联系

Table 2 Relationship between the expression of EGFR and HER2 in intrahepatic cholangiocarcinoma and its clinical pathology (n)

临床特征	EGFR		P 值	HER2		P 值
	阳性	阴性		阳性	阴性	
性别			0.499			0.720
男	30	24		17	37	
女	25	15		14	26	
年龄(岁)			0.701			0.717
≤60	36	27		20	43	
>60	19	12		11	20	
组织学分级			<0.001			0.009
I~II	21	30		9	42	
III~IV	34	9		22	21	
分化程度			0.839			0.415
高分化	24	16		15	25	
中分化	18	15		8	25	
低分化	13	8		8	13	
浸润深度			0.046			<0.001
局限黏膜层	33	31		12	52	
侵及黏膜下层	22	8		19	11	
肝门淋巴结转移			0.023			<0.001
无	33	32		11	54	
有	22	7		20	9	

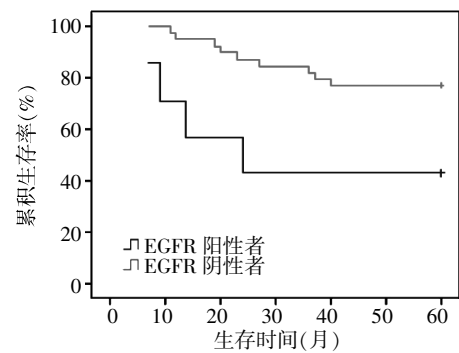


图 1 EGFR 阳性表达与 5 年无瘤生存分析曲线图
Figure 1 Disease-free survival comparison chart for five years in EGFR positive patients

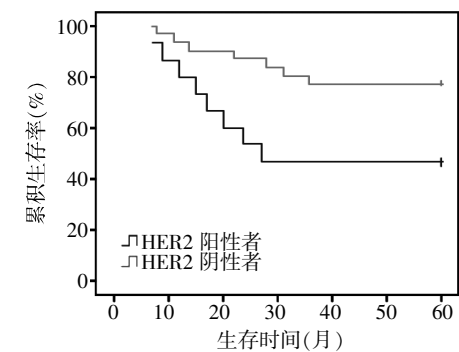


图 2 HER2 阳性表达与 5 年无瘤生存分析曲线图
Figure 2 Disease-free survival comparison chart for five years in HER2 positive patients

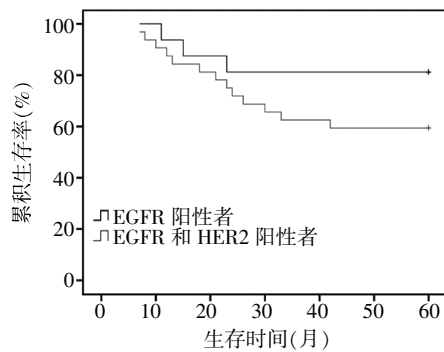


图3 埃罗替尼对 EGFR 和 (或)HER2 阳性患者 5 年无瘤生存比较曲线图

Figure 3 Disease-free survival comparison chart for five years in EGFR and (or)HER2 positive patients treated with erlotinib

变表型,包括自主性细胞增殖、细胞侵袭和转移、衰老和逃避细胞凋亡^[6]。胆汁滞留形成的大量胆汁酸可能介导了 EGFR 活化或高表达,并可能通过提高抗凋亡因子 Mcl-1 的表达水平参与了肿瘤的发生发展^[7]。而且,EGFR 等蛋白表达可能与细胞增殖、癌变和侵袭等密切相关^[8]。EGFR 重要配体表表皮生长因子(EGF)可有效激活 NF- κ B 分子信号通路,进而增强肿瘤细胞的侵袭力等^[9]。在其他研究^[3]中已经证实了肝内胆管炎症与胆管癌发生发展间可能存在的联系,并且可能在肝内胆管癌中与其他细胞因子一同参与了其发生发展过程。再者,目前已有 II 期临床报道了 EGFR 阻滞剂埃罗替尼在 EGFR 表达无差异患者中均存在无反应和有反应两种情况^[10],但具体是否与其他相关基因表达有关尚待进一步研究,且临床治疗效果尚未明确。同时,目前其他 EGFR 家族蛋白在肝内胆管癌发生发展中的作用鲜有报道,其中 erbB2(又称 HER2)已在乳腺癌分子靶向治疗(赫赛汀)中获得良好临床疗效,显著改善了部分乳腺癌患者的生存期,并且在肝外胆管癌中的研究证实了 HER2 与肝外胆管癌的发生发展有关,并可能成为其临床预后的预测指标^[4]。在本研究中虽然未能发现 EGFR 与 HER2 表达上的相关性,但在 94 例肝内胆管癌患者组织标本中均得到了较癌旁更高的蛋白表达,提示了这两种基因在肝内胆管癌发生发展中可能均发挥了重要的生物学作用,并在临床病理联系分析中发现组织学分级、浸润深度和肝门淋巴结转移与二者高表达的相关性,所以进一步随访分析了二者高表达是否可能预测预后,分析结果显示 EGFR 和 HER2 高表达与 5 年无瘤生存预后存在负相关性,说明二者共同检测有助于预测肝内胆管癌患者的临床预后,尤为重要,本研究对

48 例肝内胆管结石合并胆管癌患者联合给予了 EGFR 阻滞剂埃罗替尼的分子靶向治疗,其中含有 32 例 EGFR 单独高表达者和 16 例 EGFR 和 HER2 均高表达者,随访 5 年无瘤生存后发现,二者均高表达者的 5 年无瘤生存劣于 EGFR 高表达者,但尚待进一步大样本临床研究证实,这也可能解释了前期学者报道的 EGFR 无差异阳性表达患者中出现了无反应和有反应两类患者。同时,这也提示 EGFR 和 HER2 主要在肿瘤形成期发挥其生物学作用,但晚期再进行干预或抑制为时已晚。

[参考文献]

- [1] Kuroki T,Tajima Y,Kanematsu T. Hepatolithiasis and intrahepatic cholangiocarcinoma:carcinogenesis based on molecular mechanisms[J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2005,12(6):463-466
- [2] Sirica AE. Role of erbB family receptor tyrosine kinases in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. World J Gastroenterol,2008,14(46):7033-7058
- [3] 黄 奋,陈汝福,周泉波,等. 核因子 κ B、表皮生长因子受体及黏蛋白 1 在肝内胆管结石合并肝内胆管癌组织的表达及其意义[J]. 中华肝胆外科杂志,2011,17(9):755-759
- [4] 郑 军,吴高松,邹声泉. 原癌基因 c-erbB2 蛋白在肝外胆管癌组织中的表达及临床评价 [J]. 临床外科杂志,2006,14(3):178-178
- [5] Nakanuma Y,Harada K,Ishikawa A,et al. Anatomic and molecular pathology of intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg,2003,10(4):265-281
- [6] Malhi H,Gores GJ. Cholangiocarcinoma;modern advances in understanding a deadly old disease[J]. J Hepatol,2006,45(6):856-867
- [7] Werneburg NW,Yoon JH,Higuchi H,et al. Bile acids activate EGF receptor via a TGF- α -dependent mechanism in human cholangiocyte cell lines[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2003,285(1):G31-G36
- [8] 蒋 丽,张 丽,彭 韬,等. 表皮生长因子受体信号通路调控人肝细胞癌细胞增殖分子机制的研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2007,27(6):523-526
- [9] 孔凡民,李昱骥,刘小方,等. 通过核转录因子- κ B 诱导基质金属蛋白酶的表皮生长因子对胆管癌细胞侵袭的影响[J]. 中华实验外科杂志,2006,23(9):1092-1094
- [10] Lubner SJ,Mahoney MR,Kolesar JL,et al. Report of a multicenter phase II trial testing a combination of bi-weekly bevacizumab and daily erlotinib in patients with unresectable biliary cancer;a phase II Consortium study [J]. J Clin Oncol,2010,28(21):3491-3497

[收稿日期] 2015-06-17