

EGFR 在三阴性乳腺癌中的表达及放疗后表达变化的意义

王 璐 林 清 陆春花 张 颖 董晓庆 石 静 贾朝阳

摘 要 **目的** 探讨 EGFR 与三阴性乳腺癌患者临床与病理的关系及 X 射线对人三阴性乳腺癌细胞 EGFR 基因表达的影响。**方法** 回顾性分析 EGFR 与 88 例三阴性乳腺癌患者临床和病理指标之间的关系,并用 2.5、5 和 10 Gy X 射线照射体外培养的人三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞和 HCC1937 细胞,采用荧光实时定量 PCR 技术检测两种细胞经照射后 6、12、24 和 48h 的 EGFR mRNA 表达水平,以未照射组为对照。**结果** EGFR 在三阴性乳腺癌的阳性表达率为 67.0% (59/88),且与年龄、肿块直径、脉管侵犯、组织学分级、ki-67 等临床及病理指标之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但在淋巴结有转移及临床分期 III 期组的表达率明显升高 ($P < 0.05$)。EGFR mRNA 的表达在 2.5、5 和 10Gy X 射线照射后早期整体下降,但晚期呈上升趋势,大部分时间点差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** EGFR 在三阴性乳腺癌中具有较高的表达率,且与淋巴结转移和临床分期有关,提示其可能与三阴性乳腺癌的预后不良相关。较大剂量 X 射线在早期可下调 MDA-MB-231 细胞和 HCC1937 细胞 EGFRmRNA 的表达,可能控制了肿瘤细胞的增殖和远处转移,提示放疗在三阴性乳腺癌的治疗中具有重要作用;但在晚期 EGFRmRNA 的表达有所回落甚至上升,可能与三阴性乳腺癌细胞易形成辐射抗性有关。

关键词 三阴性乳腺癌 EGFR X 射线 照射

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.03.030

Expression of EGFR in Triple Negative Breast Cancer and the Significance of Expression Changes after Radiotherapy. Wang Lu, Lin Qing, Lu Chunhua, et al. Department of Radiotherapy, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

Abstract Objective To investigate the relationship with the expression of EGFR and clinicopathological in triple negative breast cancer and to study the effects of X-rays radiation on the expression of EGFR gene in human triple negative breast cancer cells. **Methods**

The expression of EGFR in 88 cases of triple negative breast cancer was summarized and the relationship with clinicopathological was studied. MDA-MB-231 cells and HCC1937 cells were exposed to different doses of X-rays (2.5, 5 and 10 Gy) and the relative level of EGFR mRNA in the cells was detected by using real time-PCR at 6, 12, 24 and 48h after irradiation. The untreated MDA-MB-231 cells and HCC1937 cells were used as the control. **Results** ①The expression of EGFR in triple negative breast cancer was 67.0% (59/88) and had no correlation with age, tumor size, vascular invasion, histological grade, expression of Ki-67 ($P > 0.05$), but it was much higher in lymph node metastasis group and clinical stage III group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). ②The expression of EGFR mRNA trended to decrease after irradiated with 2.5, 5 and 10Gy in the earlier period and increased on the advanced stage with the statistical difference at the most time points ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of EGFR in triple negative breast cancer was higher and significantly related with lymph node metastasis and clinical stages, which indicates that it may be related to poor prognosis of triple negative breast cancer. Higher doses of X-rays may degrade the expression of EGFR mRNA in human MDA-MB-231 cells and HCC1937 cells in the earlier period, then may control the proliferation and distant metastasis, which indicates that radiotherapy may play an important role in triple negative breast cancer. But X-rays also may upgrade the expression of EGFR mRNA on the advanced stage, which might be correlated with the radiation resistance of the triple negative breast cancer cells.

Key words Triple negative breast cancer (TNBC); EGFR; X-rays; Radiation

乳腺癌具有高度异质性。三阴性乳腺癌 (triple negative breast cancer, TNBC) 是以雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor,

PR) 和人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 表达均阴性为临床病理特征的一类乳腺癌^[1]。人类表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 是酪氨酸激酶生长因子受体,在 TNBC 中常呈高表达,且与乳腺癌的增殖、侵袭能力及肿瘤分期等密切相关,有望成

作者单位:200072 上海,同济大学附属第十人民医院放疗科

通讯作者:林清,副教授,电子信箱:linqing.linda@163.com

为 TNBC 治疗的重要靶点^[2,3]。EGFR 及其下游的信号转导通路与乳腺癌细胞的发展及辐射敏感度具有密切关系,其下游信号通路的过度激活会导致乳腺癌细胞对放射线产生抗拒^[4]。本研究分析了 EGFR 与三阴性乳腺癌患者临床和病理指标之间的关系,并以不同剂量 X 射线照射人三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 和 HCC1937 细胞,观察 EGFR 基因 mRNA 水平表达变化,并探讨其可能的生物学意义。

资料与方法

1. 一般资料:收集了笔者医院 2011 年 7 月 1 日~2015 年 7 月 1 日 88 例行根治或保乳术后经病理确诊为三阴性乳腺癌患者的临床和病理资料。所有患者术前均未接受新辅助放化疗及内分泌治疗等、未合并第 2 原发恶性肿瘤和发生远处转移。所有患者 KPS $\geq$ 70 分,其中 $\leq$ 40 岁患者 7 例,>40 岁者 81 例,患者平均年龄为 55.3 ± 12.4 (31~83) 岁;肿块直径 $\leq$ 2cm 的患者 26 例,>2cm 但 $\leq$ 5cm 者 40 例,>5cm 者 22 例;淋巴结有转移者 31 例,无转移者 57 例;组织学分级 I~II 级 33 例,III 级 55 例;脉管侵犯者 32 例,无侵犯者 56 例;根据 AJCC (2009 年版) TNM 分期,临床分期 I 期 20 例,II 期 54 例;III 期 14 例;Ki-67 表达 $\leq$ 14% 者 6 例,15%~49% 13 例, $\geq$ 50% 69 例。

2. 细胞与试剂:HCC1937 细胞株和 MDA-MB-231 细胞株购自中科院上海细胞库,为上海第十人民医院中心实验室常规保存,RNA 提取试剂 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司,PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒购自 TaKaRa 公司,SYBR FASTqPCR MasterMix 试剂盒购自 KAPA 公司,EGFR 基因引物、内参(β -Actin)引物均由北京六合华大基因有限公司合成。

3. 细胞培养和照射条件:HCC1937 细胞和 MDA-MB-231 细胞在 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中用含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基进行培养。取处于对数生长期的 HCC1937 细胞和 MDA-MB-231 细胞,常温下以直线加速器(由上海第十人民医院放射治疗科提供,厂家:ELEKTA,型号:Precise) X 射线(能量:6MV,SSD:100cm)进行照射,剂量率 450 cGy/min,吸收剂量分别为 2.5、5 和 10Gy,照射后分别继续培养 6、12、24 和 48h。

4. 总 RNA 提取和 RT-PCR 检测:按 Trizol 说明书提取细胞总 RNA,进行反转录反应合成 cDNA,反应条件:37℃,15min;85℃,5s。EGFR 基因上游引物序列为 5'-CCACCTGTGTCAACAGCAC-3',下游为

5'-GCATTTTCAGCTGTGGAGC-3',扩增片段长度约 154bp。 β -Actin 上游:5'-GCACCACACCTTC-TACAATGA-3';下游:5'-TGTCACGCACGATTTC-3',大小 377bp。取 2 μ l 反转录产物作为模板进行 RT-PCR 检测,程序设置如下:95℃,3min;95℃,3s;60℃,30s;40 循环。

5. 统计学方法:登录笔者医院 HEIS 系统,调出入组病例的临床资料和笔者医院病理科出具的术后病理报告进行分析,统计学分析采用 SAS 8.1 统计软件进行处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,EGFR 的表达与临床病理资料之间的关系采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. EGFR 在三阴性乳腺癌患者中的表达率及与临床病理特征之间的关系:EGFR 在三阴性乳腺癌患者组织中的表达率高达 67% (59/88),在随访的 88 例三阴性乳腺癌患者中,EGFR 的表达与年龄($\chi^2 = 0.038$, $P = 0.561$)、肿块直径($\chi^2 = 2.734$, $P = 0.255$)、组织学分级($\chi^2 = 0.734$, $P = 0.389$)、脉管侵犯($\chi^2 = 2.652$, $P = 0.103$)、ki-67($\chi^2 = 3.235$, $P = 0.198$)等临床及病理指标之间差异无统计学意义($P > 0.05$),但在淋巴结有转移组($\chi^2 = 6.132$, $P = 0.013$)及临床分期 III 期组($\chi^2 = 9.485$, $P = 0.009$)的表达率明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$, 表 1)。

2. RT-PCR 法的特异性:熔解曲线分析显示,目的基因 EGFR 及内参 β -Actin 的熔解曲线均成单一峰,熔解温度均一,峰形锐利。反应曲线的其他位置未见到波形,结合 Tm 值分析提示 PCR 产物为特异性产物,可以进行结果分析。

3. EGFR mRNA 相对表达量:以未照射组(6、12、24 和 48h) EGFR mRNA 的表达量为 1,照射后 HCC1937 细胞和 MDA-MB-231 细胞中 EGFR 基因的相对表达的结果见图 1 和图 2。与各时间点未照射组相比,EGFR mRNA 的表达在 2.5、5、10Gy 各剂量组 X 射线照射后早期两种三阴性乳腺癌细胞株中整体呈降低趋势,但在晚期各剂量组其表达有所回落甚至升高,大部分时间点差异有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

在所有女性侵袭性乳腺癌中,三阴性乳腺癌的发生率接近 15%,且发病年龄越发趋于年轻化^[5]。三阴性乳腺癌作为乳腺癌的一种特殊亚型,约 80%~90% 是基底细胞样型,且与基底细胞样型具有相同的

表 1 EGFR 表达与患者临床病理特征之间的关系

项目	亚组	n	EGFR		χ^2	P
			+	-		
年龄(岁)	≤40	7	4	3	0.338	0.561
	>40	81	55	26		
肿块直径(cm)	≤2	26	17	9	2.734	0.255
	>2 但≤5	40	30	10		
	>5	22	12	10		
淋巴结情况	有转移	31	26	5	6.132	0.013
	无转移	57	33	24		
临床分期	I	20	8	12	9.485	0.009
	II	54	39	15		
	III	14	12	2		
脉管侵犯	有	32	18	14	2.652	0.103
	无	56	41	15		
组织学分级	I ~ II	33	25	8	0.743	0.389
	III	55	34	11		
Ki-67	≤14%	6	5	1	3.235	0.198
	15% ~ 49%	13	11	2		
	≥50%	69	43	26		

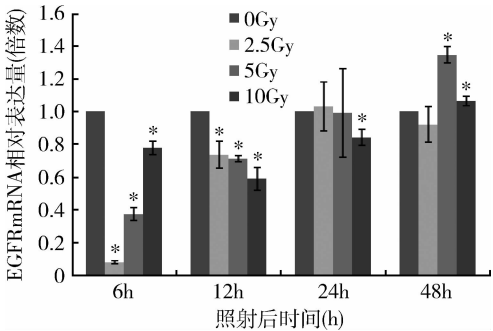


图 1 X 射线照射对 HCC1937 细胞 EGFR mRNA 表达影响
与 0h 组相比, * $P < 0.05$

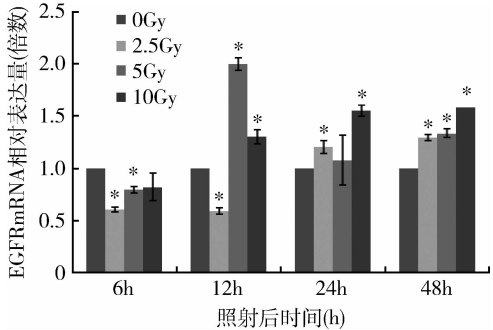


图 2 X 射线照射对 MDA-MB-231 细胞 EGFR mRNA 表达影响
与 0h 组相比, * $P < 0.05$

性,近年来备受研究者的关注。EGFR 是表皮生长因子受体(HER1)家族成员之一,具有酪氨酸激酶活性,参与调控肿瘤细胞的增殖和凋亡。EGFR 被广泛报道在多种肿瘤中存在过表达和突变,与肿瘤细胞对放射抗拒相关^[7]。研究发现,EGFR 在 TNBC 中具有高表达,且与肿瘤分化、淋巴结转移程度、组织学分级及临床分期密切相关,可以作为三阴性乳腺癌一个重要的预后指标,提示其可能是 TNBC 的有效治疗靶点^[8,9]。本研究通过回顾性调研临床资料发现 88 例 TNBC 中 EGFR 表达阳性的有 59 例,即 EGFR 在三阴性乳腺癌组织中的阳性表达率为 67.0% (59/88),这与既往文献报道 EGFR 在 TNBC 中阳性表达率 65% 基本相符^[10]。该研究还发现 EGFR 的表达与患者年龄、肿块直径、组织学分级、脉管侵犯、ki-67 等临床及病理指标之间差异无统计学意义($P > 0.05$),但在淋巴结有转移组及临床分期 III 期组的表达率明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。故本研究说明 EGFR 可能与三阴性乳腺癌的发展及预后密切相关,是临床上值得关注的靶基因,在将来可能成为一个有效的治疗靶点。

目前,放射治疗是乳腺癌综合治疗的主要手段之一。三阴性乳腺癌作为女性乳腺癌中高风险的特殊类型,具有易复发易转移等恶性生物学行为的特点,且无抗 ER、PR 及 HER2 的有效靶点,从而成为了临床治疗的难点。虽然术后辅助放疗能够改善 TNBC 的局部控制,且可以减少因局部未控而导致的远处转移^[11]。但临床上仍发现部分 TNBC 患者对放射治疗

临床特征,其三阴性表型和乳腺癌干细胞同时表达 EGFR 及其他干细胞标志物^[6,7]。因其特殊的临床病理特点,并具有高度侵袭性,预后极差,易发生远处转移,对内分泌治疗及抗 HER2 靶向治疗均不敏感的特

具有抵抗性。TNBC 存在固有的和(或)获得性的放疗抵抗,其机制与 TNBC 中多种基因靶点的缺失或过表达有关,其内部形成复杂的正负网络调控,成为了三阴性乳腺癌放射治疗失败的主要原因。三阴性乳腺腺中存在 EGFR 的过表达,这可能与其辐射抗拒有关。在 EGFR 诸多的下游信号通路中,其主要是通过 RAS/RAF/MEK/ERK 通路和 PI₃K/PTEN/AKT/mTOR 调节细胞功能,影响细胞的增殖和分化,调节细胞周期和凋亡,从而调控肿瘤的发生和发展。研究表明电离辐射可以激活 EGFR 信号转导通路,使 EGFR 通过下调下游 PI₃K/Akt 和 Ras/MAPK 通路诱导三阴性乳腺癌细胞产生放射抵抗^[12]。本研究结果显示,与各时间点未照射组相比,EGFR mRNA 的表达在 2.5、5 和 10Gy X 射线照射后早期整体呈降低趋势,但在晚期有回落趋势甚至升高,大部分时间点差异有统计学意义($P < 0.05$)。

从本研究结果来看,中高剂量 X 射线作用于 HCC1937 和 MDA-MB-231 这两种三阴性乳腺癌细胞,早期直接下调 EGFR 基因的表达,从而可能抑制肿瘤细胞的增殖和促进三阴性乳腺癌细胞的凋亡;但在晚期 EGFR 可能通过激活 PI₃K/Akt 和 Ras/MAPK 通路,从而诱导三阴性乳腺癌细胞产生放射抗性。放射抗性细胞的增殖可表现为 EGFR mRNA 的表达回落和升高。新近研究还发现电离辐射能够诱导核 EGFR 在 DNA 依赖性蛋白乙酰基转移酶作用下使底物发生磷酸化和去乙酰化,促进 DNA 双链断裂的双链 DNA 修复,从而使肿瘤放射敏感度下降,这也可能是三阴性乳腺癌细胞在放疗晚期获得放疗抵抗的机制之一,有待于后续的研究进一步证实^[13]。众所周知,抗 EGFR 单抗在非小细胞肺癌治疗中显示了良好的放疗增敏效果^[14]。从本研究结果来看,在高表达 EGFR 且具有放射抗性的三阴性乳腺癌接受放疗时,联合抗 EGFR 的靶向治疗可能也将成为一种放疗增敏的有效手段。

因此,EGFR 是三阴性乳腺癌重要的发生和发展参与基因,和 TNBC 的预后密切相关,其信号转导通路对三阴性乳腺癌细胞放疗敏感度的影响是多位点和多因素共同作用的结果。三阴性乳腺癌的放疗抵抗机制非常复杂,有关 EGFR 信号通路在其中的作用有待于进一步研究。EGFR 参与 TNBC 的放疗抵抗,而克服放疗抵抗提高放射治疗的疗效是未来的一个发展方向。同时,有关 EGFR 基因经 X 射线照射后表

达变化的更深层次机制及生物学意义还有待于进一步探讨。

参考文献

- 1 Rhee J, Han SW, Oh DY, *et al.* The clinicopathologic characteristics and prognostic significance of triple-negative node-negative breast cancer [J]. *BMC Cancer*, 2008, 8: 327-344
- 2 Nalwoga H, Arnes JB, Wabinga H, *et al.* Expression of EGFR and c-kit is associated with the basal-like phenotype in breast carcinomas of African women [J]. *APMIS*, 2008, 116(6): 515-525
- 3 Nakajima H, Ishikawa Y, Furuya M, *et al.* Protein expression, gene amplification, and mutational analysis of EGFR in triple-negative breast cancer [J]. *Breast Cancer*, 2014, 21(1): 66-74
- 4 Steelman LS, Navolanic P, Chappell WH, *et al.* Involvement of Akt and mTOR in chemotherapeutic and hormonal-based drug resistance and response to radiation in breast cancer cells [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(17): 3003-3015
- 5 Stevens KN, Vachon CM, Leen AM, *et al.* Common breast cancer susceptibility loci are associated with triple-negative breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(19): 6240-6249
- 6 Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, *et al.* Prognostic markers in triple-negative breast cancer [J]. *Cancer*, 2007, 109: 25-32
- 7 Modjtahedi H, Essapen S. Epidermal growth factor receptor inhibitors in cancer treatment: advances, challenges and opportunities [J]. *Anti-cancer Drugs*, 2009, 20(10): 851-855
- 8 Nozoe T, Mori E, Iguchi T, *et al.* Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor in breast cancer [J]. *Breast Cancer*, 2011, 18: 37-41
- 9 Siziopikou KP, Ariga R, Proussaloglou KE, *et al.* The challenging estrogen receptor-negative/progesterone receptor-negative/HER-2-negative patient: a promising candidate for epidermal growth factor receptor-targeted therapy [J]. *Breast J*, 2006, 12(4): 360-362
- 10 王新云, 尹迎春, 韩红梅. 三阴性乳腺癌组织中 p53、Ki-67、EGFR 的表达变化及意义 [J]. *山东医药*, 2011, 51(46): 68-69
- 11 Abdulkarim BS, Cuartero J, Hanson J, *et al.* Increased risk of locoregional recurrence for women with T1-2N0 triple-negative breast cancer treated with modified radical mastectomy without adjuvant radiation therapy compared with breast-conserving therapy [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(21): 2852-2858
- 12 Li P, Zhang Q, Torossian A, *et al.* Simultaneous inhibition of EGFR and PI3K enhances radiosensitivity in human breast cancer [J]. *Radiat Oncol Bio Phys*, 2012, 83(3): e391-397
- 13 Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, *et al.* Nuclear epidermal growth factor receptor modulates cellular radio-sensitivity by regulation of chromatin access [J]. *Radiother Oncol*, 2011, 99: 317-322
- 14 Welsh JW, Komaki R, Amini A, *et al.* Phase II trial of erlotinib plus concurrent whole-brain radiation therapy for patients with brain metastases from non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(7): 895-902

(收稿日期: 2016-06-16)

(修回日期: 2016-07-10)