

粒状头样 2 和表皮生长因子受体蛋白在食管鳞癌中的表达及预后判断价值

林吉兴¹, 王柏霖¹, 刘阳², 梁朝阳¹, 郭俊唐¹, 杨博², 王钰琦²

¹解放军总医院海南分院, 海南三亚 572000; ²解放军总医院, 北京 100853

摘要: **目的** 探讨粒状头样 2 (grainyhead-like 2, GRHL2) 和表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 在食管鳞癌中的表达及对预后判断的意义。 **方法** 收集解放军总医院及解放军总医院海南分院根治性切除的食管鳞癌标本 63 例, 应用免疫组化 EnVision 法检测癌及癌旁正常组织 GRHL2 和 EGFR 蛋白的表达。 **结果** GRHL2 和 EGFR 在食管鳞癌中阳性表达明显高于癌旁正常组织 (P 均 < 0.05)。 GRHL2 高表达与肿瘤大小、分化程度、淋巴结转移、分期显著相关 (P 均 < 0.05)。 EGFR 高表达仅与分化程度和分期显著相关 ($P < 0.05$)。 Spearman 相关分析表明 GRHL2 与 EGFR 呈负相关 ($r = -0.359$, $P = 0.004$)。 Kaplan-Meier 生存曲线分析表明 GRHL2 低表达者的总体生存时间为 (32.902 ± 1.017) 个月, 明显短于高表达者的 (54.015 ± 2.208) 个月 ($P = 0.000$)。 GRHL2 低表达者的无疾病进展时间为 (18.447 ± 1.101) 个月, 明显短于高表达者的 (38.976 ± 1.747) 个月 ($P = 0.000$)。 相反, EGFR 高表达者的 OS 为 (36.522 ± 1.931) 个月, 明显短于低表达者的 (48.168 ± 3.331) 个月 ($P < 0.05$)。 EGFR 高表达者的 DFS 为 (22.190 ± 1.564) 个月, 明显短于低表达者的 (31.810 ± 2.487) 个月 ($P < 0.05$)。 COX 回归分析显示 GRHL2、淋巴结转移和肿瘤分期是影响食管鳞癌患者术后预后的独立危险因素。 **结论** GRHL2 和 EGFR 在组织中异常表达可能参与食管鳞癌的发生发展, 联合检测 GRHL2 和 EGFR 有助于判断食管鳞癌患者的预后。

关键词: 食管肿瘤; 粒状头样 2; 表皮生长因子受体; 免疫组织化学

中图分类号: R 735.1 文献标志码: A 文章编号: 2095-5227(2017)05-0440-05 DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2017.05.015
网络出版时间: 2017-03-23 11:34 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20170323.1134.002.html>

Expressions of grainyhead-like 2 and epidermal growth factor receptor in esophageal squamous cell carcinoma and their prognostic significance

LIN Jixing¹, WANG Bailin¹, LIU Yang², LIANG Chaoyang¹, GUO Juntang¹, YANG Bo², WANG Yuqi²

¹Hainan branch of Chinese PLA General Hospital, Sanya 572000, Hainan Province, China; ²Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: WANG Yuqi. Email: wyq301@gmail.com

Abstract: Objective To investigate the expressions of grainyhead-like2 (GRHL2) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and their prognostic significance. **Methods** EnVision immunohistochemical method was used to detect the expressions of GRHL2 and EGFR in ESCC and adjacent normal squamous epithelium in 63 patients who received radical resection of esophageal cancer in Chinese PLA General Hospital and Hainan Branch Hospital. **Results** GRHL2 and EGFR expressed significantly higher in ESCC than in adjacent normal tissues ($P < 0.05$, respectively). The expression of GRHL2 was significantly correlated with tumor size, differentiation, lymph node metastasis and tumor staging ($P < 0.05$, respectively). The expression of EGFR was correlated with differentiation degree and tumor staging ($P < 0.05$, respectively). Spearman correlation analysis showed a negative correlation between GRHL2 and EGFR ($r = -0.359$, $P = 0.004$). Kaplan-Meier survival curve analysis showed that disease free survival (DFS) and overall survival (OS) in patients with GRHL2 low expression were shorter than those with GRHL2 high expression (DFS: 18.447 ± 1.101 vs 38.976 ± 1.7 months; OS: 32.902 ± 1.017 vs 54.015 ± 2.208 months; $P = 0.000$, respectively). On the contrary, DFS and OS in patients with EGFR high expression were shorter than those with EGFR low expression (DFS: 22.190 ± 1.564 vs 31.810 ± 2.487 months; OS: 36.522 ± 1.931 vs 48.168 ± 3.331 months; $P < 0.05$, respectively). COX regression analysis showed that GRHL2, lymph node metastasis and tumor staging were independent prognostic factors for postoperative ESCC. **Conclusion** The abnormal expression of GRHL2 and EGFR may be involved in the occurrence and development of ESCC. Combined detection of GRHL2 and EGFR may help to determine the prognosis of patients with ESCC.

Keywords: esophageal neoplasm; grainyhead-like2; epidermal growth factor receptor; immunohistochemistry

食管癌是世界第 8 大常见恶性肿瘤, 5 年生

存率为 15% ~ 25%^[1-2]。研究证实表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 在多种肿瘤组织中高表达, 在食管癌中的表达率为 70% 左右, 参与细胞增殖、侵袭与转移。目前食管癌靶向治疗中, 尼妥珠单抗联合化疗有效率约为

收稿日期: 2017-01-10

作者简介: 林吉兴, 男, 在读硕士, 医师。研究方向: 胸部肿瘤临床研究。Email: linjixing301@sina.com

通信作者: 王钰琦, 男, 博士, 副主任医师, 副教授。Email: wyq301@gmail.com

50%^[3]。新近的研究表明,粒状头样2(grainyhead-like 2, GRHL2)作为转录因子参与上皮分化调控、肺癌上皮发育及肿瘤的发生发展。GRHL2在多种肿瘤中高表达,但胃癌和乳腺癌中GRHL2能够抑制肿瘤的发生发展^[4-8]。目前其在食管癌中未见报道。本研究采用免疫组化EnVision法检测食管鳞癌组织中GRHL2和EGFR的表达,探讨其与临床病理特征的关系,并分析它们之间的相关性及预后预测价值。

资料和方法

1 临床资料 收集2011年5月-2013年6月解放军总医院和解放军总医院海南分院胸外科手术切除的63例食管鳞癌患者的病例资料及术后病理样本。本组年龄43~75岁,中位年龄58.0岁;男性35例,女性28例;高分化29例,中分化23例,低分化11例;Ⅰ期7例,Ⅱ期19例,Ⅲ期37例;上段4例,中段23例,下段36例。所有患者均经病理诊断为鳞状细胞癌。所有患者临床和随访资料齐全,包括总体生存时间(overall survival, OS)和疾病无进展时间(disease free survival, DFS)。随访时间从手术开始,2016年7月31日截止。所有患者术前未行任何抗癌治疗。

2 免疫组化方法 石蜡包埋的食管鳞状细胞癌组织连续切片,分别采用苏木素-伊红(HE)法进行常规染色,EnVision法进行免疫组织化学染色。EnVision法主要步骤:1)切片常规脱蜡和脱水后高压抗原修复;2)阻断内源性过氧化物酶后分别滴加兔抗人GRHL2和抗EGFR多克隆抗体,室温下孵育;3)滴加二抗30 min DAB显微镜下显色;4)复染、蓝化、脱水封片。分别用已知GRHL2和EGFR阳性的组织切片作为阳性对照,PBS染色为阴性对照。

3 结果判定标准 GRHL2和EGFR分别在肿瘤细胞胞质和细胞膜出现黄色或棕褐色颗粒则为阳性表达。采用半定量法判定,对阳性细胞数和阳性细胞比例分别计数。判定方法:随机观察10个高倍(400×)视野阳性细胞,每视野计数200个细胞,阳性细胞比例<5%为0分,5%~25%为1分,26%~50%为2分,>50%为3分。染色强度:无着色为0分,淡黄色为1分,深黄色为2分,棕褐色为3分。高表达:两者计分相乘结果≥4分;低表达:<4分^[9]。

4 统计学方法 采用SPSS15.0软件对数据进行统计分析。免疫组化评分比较采用 t 检验,计数资料

比较采用 χ^2 检验,相关性分析运用Spearman等级相关检验。采用Kaplan-Meier法绘制生存曲线,Log-rank法及Cox比例风险回归模型进行单因素和多因素分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 GRHL2和EGFR在癌及癌旁正常组织的表达

GRHL2主要表达于肿瘤细胞胞质,阳性率为38.1%(24/63),癌旁组织阳性表达率为14.3%(9/63),两者IHC评分差异有统计学意义($t=5.800$, $P < 0.05$,图1A)。EGFR主要表达于ESCC的细胞膜,阳性表达率为71.4%(45/63),癌旁正常组织阳性表达率为33.3%(21/63),两者IHC评分差异有统计学意义($t=10.084$, $P < 0.05$,图1B)。

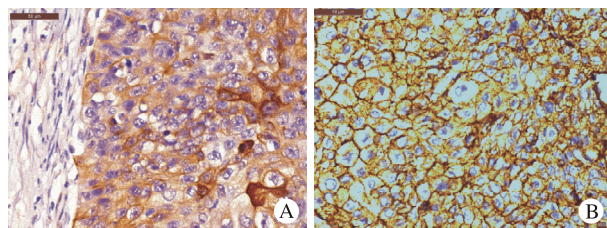


图1 GRHL2(A)和EGFR(B)在食管鳞癌组织中的阳性表达(sp×400)

Fig.1 Immunohistochemical analysis of GRHL2 (A) and EGFR (B) expressions in ESCC tissue

2 GRHL2和EGFR的表达与临床病理特征的关系

将GRHL2和EGFR蛋白的表达分为高表达和低表达两组,GRHL2表达与肿瘤大小、分化程度、淋巴结转移、分期有关(P 均<0.05),而与性别、年龄、分段、脉管侵犯无关。EGFR表达与分化程度与分期有关(P 均<0.05),与其他病理特征无关。见表1。

3 GRHL2和EGFR在癌组织中表达的相关性分析 GRHL2和EGFR在食管癌组织中均高表达者10例,均低表达者8例。Spearman相关分析表明GRHL2和EGFR的表达呈负相关($r=-0.359$, $P=0.004$)。

4 GRHL2和EGFR对食管鳞癌术后的预后预测分析 Kaplan-Meier分析发现GRHL2低表达组DFS显著短于高表达组($\chi^2=43.414$, $P=0.000$,图2A)。GRHL2低表达组OS显著短于高表达组,差异有统计学意义($\chi^2=29.890$, $P=0.000$,图2B)。EGFR高表达组DFS和OS均短于EGFR低表达组(P 均<0.001。见表2,图2C、2D)。Cox回归分析显示GRHL2、淋巴结转移和肿瘤分期是影响食管鳞癌患者术后预后的独立危险因素(表3)。

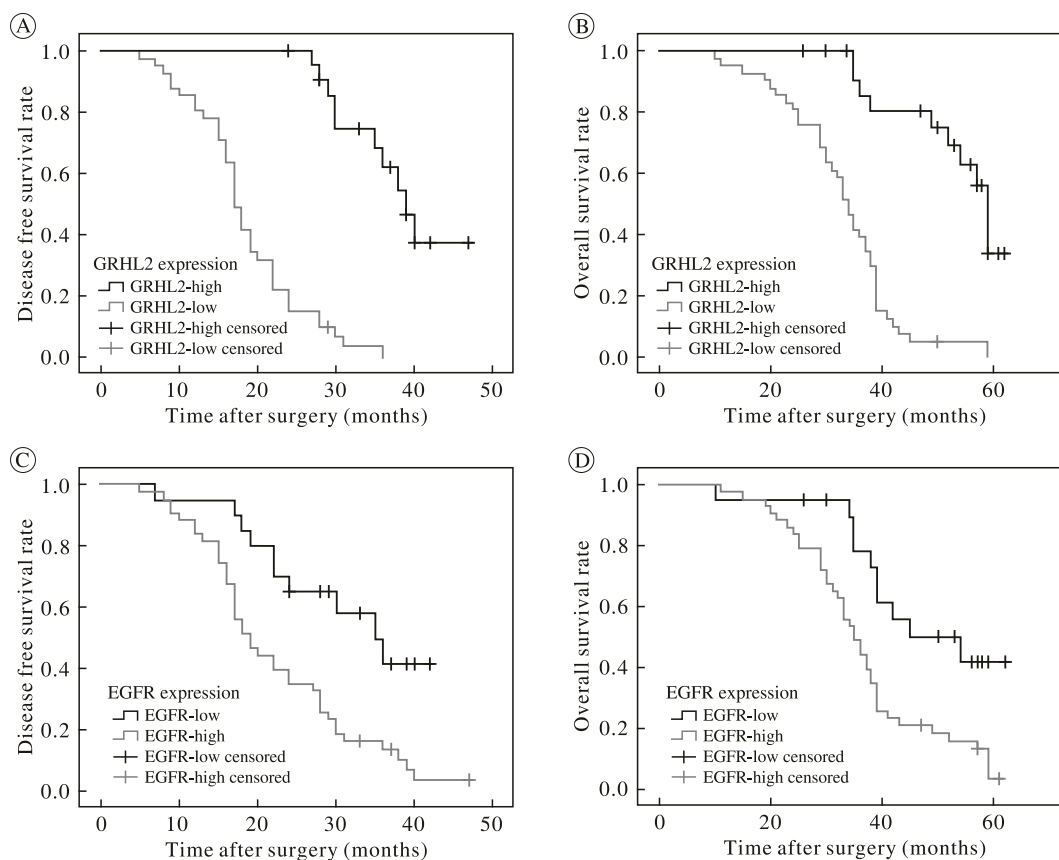


图 2 GRHL2 和 EGFR 不同表达水平的食管癌患者生存曲线

Fig.2 Survival curve of ESCC patients with different expression levels of GRHL2 or EGFR

表 1 GRHL2 和 EGFR 的表达与食管癌患者临床特征的关系

Tab. 1 Expression of GRHL2 and EGFR and their relationship with clinicopathological factors in ESCC (n, %)

Characteristics	GRHL2			EGFR		
	High (n=22)	Low (n=41)	P	High (n=43)	Low (n=20)	P
Gender						
Male (n=35)	12(19.0)	23(36.5)	0.906	21(33.3)	14(22.2)	0.116
Female (n=28)	10(15.9)	18(28.6)		22(34.9)	6(9.5)	
Age (yrs)						
< 60 (n=33)	13(20.6)	20(31.7)	0.435	21(33.3)	12(19.0)	0.409
≥ 60 (n=30)	9(14.3)	21(33.3)		22(34.9)	8(12.7)	
Tumor diameter (cm)						
< 5 (n=32)	7(11.1)	25(39.7)	0.027	21(33.3)	11(17.5)	0.649
≥ 5 (n=31)	15(23.8)	16(25.4)		22(34.9)	9(14.3)	
Tumor location						
Upper+middle (n=27)	9(14.3)	18(28.6)	0.819	15(23.8)	12(19.0)	0.061
Low (n=36)	13(20.6)	23(36.5)		28(44.4)	8(12.7)	
Differentiation grade						
Well (n=29)	14(22.2)	15(23.8)	0.040	16(25.4)	13(20.6)	0.039
Moderate+poor (n=34)	8(12.7)	26(41.3)		27(42.9)	7(11.1)	
Venous invasion						
Yes (n=28)	11(17.5)	17(27.0)	0.516	16(25.4)	12(19.0)	0.090
No (n=35)	11(17.5)	24(38.1)		27(42.9)	8(12.7)	
Lymphatic metastasis						
Yes (n=30)	5(7.9)	25(39.7)	0.004	23(36.5)	7(11.1)	0.171
No (n=33)	17(27.0)	16(25.4)		20(31.7)	13(20.6)	
TNM Stage						
I + II (n=26)	13(20.6)	13(20.6)	0.035	13(20.6)	13(20.6)	0.009
III (n=37)	9(14.3)	28(44.4)		30(47.6)	7(11.1)	

表 2 63 例食管鳞癌患者单因素分析
Tab. 2 Univariate analysis of survival time in 63 ESCC patients ($\bar{x} \pm s$)

Characteristics	DFS		OS	
	$\bar{x} \pm s$	<i>P</i>	$\bar{x} \pm s$	<i>P</i>
GRHL2		0.000		0.000
Low (n=41)	18.447 ± 1.101		32.902 ± 1.617	
High (n=22)	38.976 ± 1.747		54.015 ± 2.208	
EGFR		0.001		0.002
Low (n=20)	31.810 ± 2.487		48.168 ± 3.331	
High (n=43)	22.190 ± 1.564		36.522 ± 1.931	
Gender		0.609		0.086
Male (n=35)	25.753 ± 2.365		41.987 ± 2.635	
Female (n=28)	25.153 ± 1.701		37.011 ± 2.139	
Age (yrs)		0.583		0.058
< 60 (n=33)	26.809 ± 1.756		42.409 ± 2.779	
≥ 60 (n=30)	26.083 ± 2.401		37.199 ± 2.083	
Tumor diameter (cm)		0.239		0.823
< 5 (n=32)	22.083 ± 2.108		38.156 ± 2.718	
≥ 5 (n=31)	28.122 ± 1.783		41.526 ± 2.276	
Tumor location		0.448		0.212
Upper+middle (n=27)	25.813 ± 2.814		41.435 ± 3.041	
Low (n=36)	24.782 ± 1.472		38.399 ± 2.093	
Differentiation grade		0.002		0.000
Well (n=29)	30.141 ± 2.649		47.733 ± 2.594	
Moderate+poor (n=34)	21.870 ± 1.508		32.998 ± 1.754	
Venous invasion		0.367		0.338
Yes (n=28)	24.406 ± 1.480		38.771 ± 2.139	
No (n=35)	26.247 ± 2.737		40.884 ± 2.961	
Lymphatic metastasis		0.002		0.046
Yes (n=30)	19.392 ± 1.882		35.100 ± 2.589	
No (n=33)	30.655 ± 1.874		44.220 ± 2.233	
TNM Stage		0.002		0.000
I + II (n=26)	31.194 ± 2.641		49.382 ± 2.373	
III (n=37)	21.642 ± 1.545		33.020 ± 1.855	

ESCC: esophageal squamous cell carcinoma

讨论

目前研究发现 GRHL2 在肿瘤中起着重要作用。GRHL2 在肝细胞癌、结直肠癌，口腔鳞癌中高表达^[4-6]，胃癌和乳腺癌中的 GRHL2 则能够抑制肿瘤的发生发展^[7-8]，可见 GRHL2 在肿瘤的发展中具有双向性，既可以促进肿瘤发生，亦可抑制肿

瘤生长。本研究通过免疫组化检测发现，GRHL2 在食管癌组织较癌旁组织表达高，其表达与食管癌的肿瘤大小、分化程度、淋巴结转移、分期有关。单因素生存分析显示 GRHL2 低表达组的 DFS 和 OS 较高表达组明显降低，说明 GRHL2 在食管癌中可能起着抑制肿瘤生长作用，然而具体机制仍需进一步研究。

Jia 等^[10]指出 EGFR 的表达水平不能预测患者对尼妥珠单抗的客观反应率。Wang 等^[11]却发现了相反的结论，EGFR 高表达的患者服用盐酸埃克替尼后，客观反应率明显高于 EGFR 中低表达者。这表明 EGFR 作为预测指标还值得进一步商榷和探讨。本研究显示 EGFR 高表达组的 DFS 和 OS 亦较低表达组明显缩短，这与既往研究结论一致^[9]。但 Zhang 等^[12]检测新疆地区不同民族食管鳞癌患者 EGFR mRNA 的水平，发现其在 mRNA 层面不能指导预后。前期研究显示 EGFR 高表达与多种因素表达相关，如分化程度、肿瘤分期、浸润深度^[9,13-14]。但是本研究仅发现 EGFR 与分化程度与肿瘤分期有关，与浸润深度无关，这可能与标本的选择有关，下一步仍需要更多的样本验证这一结论。

本研究中 Spearman 相关性分析显示 GRHL2 和 EGFR 存在弱负相关关系 ($r=-0.359$)。GRHL2 可以通过 TGF- β 信号通路抑制乳腺癌、胃癌细胞内上皮间质转化的发生^[7-8,15]。GRHL 家族如 GRHL3 可以直接激活 PTEN 基因的表达，进而抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路，影响鳞状细胞癌的发生发展^[16]。EGFR 作为 PI3K 上游靶蛋白，可以激活下游靶点促进癌细胞增殖。本研究只半定量检测了食管癌组织中靶蛋白的表达，GRHL2 作用于鳞状细胞癌机制与其他亚家族成员是否一致，仍需进一步研究。

综上所述，GRHL2 和 EGFR 在食管鳞癌组织中异常表达可能参与食管鳞癌的发生发展，联合检测 GRHL2 和 EGFR 有助于评估 ESCC 患者的预后，同时也为 ESCC 靶向和个体化治疗提供新思路。

表 3 食管鳞癌患者术后影响预后的多因素分析
Tab. 3 Multivariate analysis of prognostic factors of ESCC after radical resection

Characteristics	DFS			OS		
	HR	95% CI	<i>P</i>	HR	95% CI	<i>P</i>
GRHL2 (low vs high)	0.100	0.037-0.272	0.000	0.209	0.088-0.498	0.000
EGFR (low vs high)	1.088	0.465-2.548	0.845	1.032	0.461-2.306	0.940
Differentiation grade (well vs moderate+poor)	2.461	0.514-11.785	0.260	1.342	0.286-6.300	0.709
Lymphatic metastasis (yes vs no)	0.273	0.133-0.562	0.000	0.468	0.241-0.909	0.025
Stage (I + II vs III)	5.424	1.026-28.669	0.047	5.972	1.152-30.948	0.033

参考文献

- 1 Rustgi AK, El-Serag HB. Esophageal carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371 (26): 2499–2509.
- 2 Ohashi S, Miyamoto S, Kikuchi O, et al. Recent Advances From Basic and Clinical Studies of Esophageal Squamous Cell Carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2015, 149 (7): 1700–1715.
- 3 Ramos-Suzarte M, Lorenzo-Luaces P, Lazo NG, et al. Treatment of malignant, non-resectable, epithelial origin esophageal tumours with the humanized anti-epidermal growth factor antibody nimotuzumab combined with radiation therapy and chemotherapy [J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13 (8): 600–605.
- 4 Tanaka Y, Kanai F, Tada M, et al. Gain of GRHL2 is associated with early recurrence of hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2008, 49 (5): 746–757.
- 5 全应军, 徐明, 崔鹏, 等. 粒状头样 2 在结直肠癌组织中的表达及意义 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2015, 37 (10): 764–768.
- 6 Chen W, Yi JK, Shimane T, et al. Grainyhead-like 2 regulates epithelial plasticity and stemness in oral cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2016, 37 (5): 500–510.
- 7 Xiang J, Fu X, Ran W, et al. Expression and role of grainyhead-like 2 in gastric cancer [J]. *Med Oncol*, 2013, 30 (4): 714.
- 8 Cieply B, Riley P 4th, Pifer PM, et al. Suppression of the epithelial-mesenchymal transition by Grainyhead-like-2 [J]. *Cancer Res*, 2012, 72 (9): 2440–2453.
- 9 Jia W, Wang W, Ji C S, et al. Co-expression of periostin and EGFR in patients with esophageal squamous cell carcinoma and their prognostic significance [J]. *OncoTargets and Therapy*, 2016, 9: 5133–5142.
- 10 Jia J, Cui Y, Lu M, et al. The relation of EGFR expression by immunohistochemical staining and clinical response of combination treatment of nimotuzumab and chemotherapy in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Clin Transl Oncol*, 2016, 18 (6): 592–598.
- 11 Wang X, Niu H, Fan Q, et al. Predictive value of EGFR overexpression and gene amplification on icotinib efficacy in patients with advanced esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (17): 24744–24751.
- 12 Zhang L, Wang Y, Bai G, et al. The relationship between the expression of VEGF, EGFR, and HER-2 mRNA in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and clinicopathological features of different ethnic groups in Xinjiang [J]. *Tumor Biology*, 2015, 36 (12): 9277–9283.
- 13 Wang Q, Zhu H, Xiao Z, et al. Expression of epidermal growth factor receptor is an independent prognostic factor for esophageal squamous cell carcinoma [J]. *World Journal of Surgical Oncology*, 2013, 11 (1): 278.
- 14 Zhang W, Zhu H, Liu X, et al. Epidermal growth factor receptor is a prognosis predictor in patients with esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Ann Thorac Surg*, 2014, 98 (2): 513–519.
- 15 Cieply B, Farris J, Denvir J, et al. Epithelial-mesenchymal transition and tumor suppression are controlled by a reciprocal feedback loop between ZEB1 and Grainyhead-like-2 [J]. *Cancer Res*, 2013, 73 (20): 6299–6309.
- 16 Darido C, Georgy SR, Wilanowski T, et al. Targeting of the tumor suppressor GRHL3 by a miR-21-dependent proto-oncogenic network results in PTEN loss and tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2011, 20 (5): 635–648.