论著

文章编号:1000-5404(2012)22-2314-04

肺腺癌组织中 TTF-1 和 SPA 的表达对 EGFR 突变的临床预测价值

刘瑞青[1],申淑景[2],马 杰[3],刘 杰[4],李醒亚[4] (450052 郑州,郑州大学第一附属医院:肿瘤科[1],放疗科[2];450008 郑州,河南省肿瘤医院,郑州大学附属肿瘤医院:病理科[3],内科[4])

[摘要] **目的** 探讨肺腺癌组织中甲状腺转录因子(thyroid transcription factor-1,TTF-1)和表面活性物质A(surfactant protein-A,SPA)的表达对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)突变状态的临床预测价值。**方法** 收集2005年1月至2011年11月在河南省肿瘤医院行EGFR突变检测的肺腺癌患者235例,其中能找到石蜡组织共120例,采用免疫组织化学方法检测组织中的TTF-1和SPA的表达。分析TTF-1和SPA的表达与EGFR突变状态、临床特征的关系。**结果** 入组患者的EGFR突变率为43.8%(103/235);其中的120例患者中有50例发生EGFR突变;TTF-1阳性表达多见于女性($P=0.029$)、不吸烟($P=0.025$)和Ⅰ~Ⅱ期($P=0.044$)患者;EGFR突变多发生于TTF-1或者SPA($P=0.043$)阳性表达患者,TTF-1阴性表达时EGFR很少发生突变($P=0.004$),TTF-1对EGFR突变状态的阴性预测价值高达92.6%;TTF-1表达与SPA表达呈显著正相关($r=0.380$, $P=0.005$)。**结论** 肺腺癌组织中TTF-1和SPA的表达情况能预测EGFR突变状态,TTF-1或者SPA阴性表达患者很少发生EGFR突变;TTF-1和SPA的表达具有很好的相关性。

[关键词] 肺腺癌;表皮生长因子受体;甲状腺转录因子;表面蛋白A

[中图法分类号] R394.1;R446.8;R734.2 [文献标志码] A

Clinical value of TTF-1 and SPA expression in predicting EGFR mutations in lung adenocarcinoma

Liu Ruiqing[1], Shen Shujing[2], Ma Jie[3], Liu Jie[4], Li Xingya[4]([1]Department of Oncology, [2]Department of Radiotherapy, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450052; [3]Department of Pathology, [4]Department of Internal Medicine, Henan Province Tumor Hospital, Zhengzhou, Henan Province, 450008, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the clinical value of the expression of thyroid transcription factor-1 (TTF-1) and surfactant protein-A (SPA) in predicting epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in lung adenocarcinoma. **Methods** A total of 235 patients with lung adenocarcinoma who were examined for EGFR mutations from January 2005 to November 2011 in Henan Province Tumor Hospital were enrolled, and 120 patients had paraffin-embedded lung tissue specimens. The expression of TTF-1 and SPA was detected by immunohistochemistry. The correlation of the TTF-1 and SPA expression with EGFR mutations and clinical features in lung adenocarcinoma were analyzed. **Results** There were 103 patients with EGFR mutations in exon 19 or 21 (43.8%, 103/235), and 50 patients with EGFR mutations in the 120 patients. TTF-1 expression was significantly associated with female ($P=0.029$), non-smokers ($P=0.025$) and stage Ⅰ-Ⅱ lung adenocarcinoma ($P=0.044$). EGFR mutation was commonly detected in the patients with TTF-1 or SPA ($P=0.043$) positive expression, but was rarely found in the patients with TTF-1 negative expression ($P=0.004$). The negative predictive value of TTF-1 expression for EGFR mutations was 92.6%. TTF-1 expression was correlated with SPA expression ($r=0.380$, $P=0.005$). **Conclusion** The expression of TTF-1 and SPA in lung adenocarcinoma helps predict EGFR mutations, and the patients with negative expression of TTF-1 and SPA have few EGFR mutations. The expression of TTF-1 is closely correlated with SPA expression.

[**Key words**] lung adenocarcinoma; epidermal growth factor receptor; thyroid transcription factor-1; surfactant protein-A

Corresponding author: Li Xingya, Tel: 86-371-65588180, E-mail: zlzjonline@yahoo.com.cn

[通信作者] 李醒亚,电话:(0371)65588180,E-mail:zlzjonline@yahoo.com.cn

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)是含酪氨酸激酶区域的1个受体,在肿瘤的发生与发展中起重要作用;肺腺癌中EGFR突变患者对靶向药物——表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)以及化疗敏感性高,而且愈后较好[1-3]。但目前检测EGFR突变状态受肿瘤组织、实验设备、质量控制等多因素的限制[4],部分患者失去检测的机会。如果能找到一个简单、易检测的指标来预测EGFR的突变状态,将有重要的临床意义。甲状腺转录因子(thyroid transcription factor-1,TTF-1)属于核转录因子NK-2家族成员,在甲状腺、肺和前脑的发育过程中发挥重要作用[5-6];表面活性物质A(surfactant protein-A,SPA)由磷脂和蛋白质组成的复合物,具有降低肺泡表面张力的作用;TTF-1和SPA均是肺腺癌特异性标志物[7]。肺腺癌组织中TTF-1阳性表达和EGFR突变都与女性、不吸烟以及长生存期有关[1,8]。利用免疫组化检测组织中TTF-1和SPA的表达在一般实验室的条件即可实现,本研究拟探讨TTF-1和SPA的表达与EGFR突变的关系,观察这两个指标是否能对EGFR的突变起到简单的预测作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

2005年1月至2011年11月在河南省肿瘤医院行EGFR突变检测的肺腺癌患者共235例,一般临床特征见表1,其中男性120例,女性115例;中位年龄59(31~81)岁;非吸烟患者148例,吸烟患者87例;按UICC(2009)第7版TNM分期标准,能明确分期的共212例,其中Ⅰ期61例、Ⅱ期36例、Ⅲ期43例、Ⅳ期72例(部分患者由于资料不全,无法明确分期)。所有患者取标本前未进行化疗或放疗等抗肿瘤治疗。其中120例患者具有石蜡包埋组织,采用免疫组化方法检测组织中TTF-1和SPA的表达,117例患者有TTF-1结果,有SPA结果的共118例(由于实验过程中组织脱片,同时有TTF-1和SPA结果的共111例)。

1.2 检测方法

EGFR突变检测采用RT-PCR、ARMS探针法。RT-PCR的仪器号为:Stratagene Mx30009(德国),主要对突变点19和21外显子进行检测,具体探针序列见表2。

将石蜡包埋组织块进行4 μm连续切片,采用免疫组化S-P法测定组织中TTF-1、SPA表达。高压修复抗原后,滴加适当稀释的一抗试剂(鼠抗人),4 ℃过夜。待恢复室温后,滴加适当二抗,显色。经PBS液清洗后在显微镜下观察。鼠抗人TTF-1单克隆抗体(克隆号:8G7G3/1 稀释:1∶100)与鼠抗人SPA单克隆抗体(克隆号:PE-10 稀释:1∶75),均购于福州迈新生物技术有限公司。

表1 患者一般临床特征[例(%)]

特征	总数据	检测TTF-1例数	检测SPA例数
性别			
男	120(51.1)	60(51.3)	61(51.7)
女	115(48.9)	57(48.7)	57(48.3)
吸烟史			
有	87(37.0)	44(37.6)	46(39.0)
无	148(63.0)	73(62.4)	72(61.0)
突变类型			
19外显子	43(18.3)	20(17.1)	21(17.8)
21外显子	60(25.5)	30(25.6)	29(24.6)
N分期			
N_0	80(34.0)	58(49.6)	58(49.2)
$N_{1\sim3}$	100(42.6)	47(40.2)	48(40.7)
TNM分期			
Ⅰ期	61(26.0)	44(37.6)	44(37.0)
Ⅱ期	36(15.3)	29(24.8)	27(22.7)
Ⅲ期	43(18.3)	29(24.8)	29(24.4)
Ⅳ期	72(30.6)	4(2.5)	6(5.0)
合计	235	117	118

表2 突变点19和21外显子探针序列

	探针序列	氨基酸改变
19外显子	2 235-2 249delGGAATTAAGAGAAGC	delE746-A750
	2 236-2 250delGAATTAAGAGAAGCA	delE746-A750
	2 257delTAAGAGAAGCAACATCTC	del747-P753insS
21外显子	探针突变点	
	2 573 T>G	L858R
	2 582 T>G	L861Q

1.3 TTF-1、SPA阳性判断标准

TTF-1以细胞核染为棕黄色或棕褐色为阳性细胞,SPA以细胞质出现棕黄色颗粒为阳性细胞。每张切片随即观察5个高倍视野,按阳性细胞百分比以及染色的强弱综合计分判读结果,阳性细胞小于5%为0分,6%~25%为1分,26%~50%为2分,>50%为3分,染色程度无着色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分,两项指标的评分相乘,0~1分阴性(-),2~3分为弱阳性(+),4~6分为中度阳性(++),7~9分强阳性(+++)。

1.4 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件行χ^2检验和相关性分析。

2 结果

2.1 TTF-1以及SPA表达与EGFR突变关系

结果见表3。14例TTF-1阴性表达中仅有1例发生EGFR突变(7.1%),特异度为19.4%,TTF-1阳性表达中有49例发生EGFR突变(47.6%),灵敏度为98.0%,差异有统计学意义($P=0.004$);按本数据中EGFR在肺腺癌中的突变率为43.8%来计算,TTF-1对EGFR突变的阴性预测值为92.6%。EGFR突变患者在SPA阳性表达中占50.6%(38/75),在SPA阴性表达患者中占30.2%(13/43),差异有统计学意义($P=0.043$),其灵敏度和特异度分别为74.0%和44.1%,阴性预测

价值为68.5%。

表3 TTF-1及SPA表达与EGFR突变的关系

	n	EGFR		P
		突变型	野生型	
TTF-1	117			0.004
阳性	103	49	54	
阴性	14	1	13	
SPA	118			0.043
阳性	75	37	38	
阴性	43	13	30	

2.2 TTF-1、SPA表达和EGFR突变与临床特征的关系

235例肺腺癌患者中有103例发生EGFR突变(43.8%),其中19和21外显子突变分别占18.3%(43/235)和25.5%(60/235),TTF-1和SPA在腺癌中阳性表达率分别为88.0%(103/117)和63.5%(75/118),TTF-1阳性表达多见于女性、不吸烟以及早期肺腺癌患者;EGFR突变在腺癌中多见于女性、不吸烟患者,与TTF-1类似。SPA在肺腺癌中阳性表达与年龄、性别、吸烟史、淋巴结转移以及分期关系不显著($P>0.05$)。见表4。

表4 组织中TTF-1、SPA的表达以及EGFR突变与临床特征分析

临床特征	TTF-1		P	SPA		P	EGFR		P
	阳性	阴性		阳性	阴性		突变	野生	
年龄(岁)									
≤65	74	13	0.091	51	37	0.030	70	98	0.290
>65	29	1		24	6		33	34	
性别									
男	49	11	0.029	37	24	0.498	40	80	0.001
女	54	3		38	19		63	52	
吸烟史									
无	68	5	0.028	48	24	0.380	76	72	0.002
有	35	9		27	19		27	60	
N分期									
N_0	48	10	0.093	39	19	0.169	39	41	0.276
$N_{1\sim3}$	44	3		26	22		33	49	
TNM分期									
Ⅰ~Ⅱ	60	12	0.044	45	25	0.251	46	50	0.111
Ⅲ~Ⅳ	33	1		19	17		43	73	

2.3 组织中TTF-1与SPA表达的关系

SPA阳性表达在TTF-1阳性表达患者中占70.1%,SPA阴性表达在TTF-1阴性表达中占78.6%,差异具有统计学意义($P=0.000$)。将TTF-1与SPA按其表达阳性程度进行对应比较得出Kappa值为0.271($P=0.000$),说明两者具有一致性。TTF-1与SPA显著正相关($r=0.380$,$P=0.005$)。见表5。

表5 TTF-1与SPA表达关系

SPA	TTF-1				r	P
	+++	++	+	−		
++	9	9	3	1		
+	13	29	5	2	0.380	0.005
−	6	15	8	11		

将SPA中+++和++合并

3 讨论

TTF-1多用于鉴别肺腺癌和肺鳞癌,区分转移性以及原发性肺癌[9]。Tang[8]和Berghmans等[10]研究证明TTF-1是肺癌,尤其是肺腺癌的独立预后因子。TTF-1在肺腺癌中阳性率70%~88%。本实验数据显示:TTF-1阳性表达在肺腺癌中占88.0%;其阳性表达多见于女性、非吸烟以及早期患者,这与以往的研究[8]结果一致。SPA在肺腺癌组织中高表达,而在肺癌其他类型中表达率较低,肺内TTF-1参与并调节SPA基因的转录[6],本研究显示:SPA在肺腺癌中的阳性率为63.5%;肺腺癌中TTF-1与SPA的表达具有显著正相关性($r=0.380$,$P=0.005$)。

本研究结果显示肺腺癌组织中TTF-1的表达情况能预测EGFR的突变状态。2011年ASCO大会上Somaiah等[11]报道224例TTF-1阴性表达的肺腺癌患者中仅有2例发生EGFR突变,TTF-1检测EGFR突变的灵敏度和特异度分别为99.1%和36.4%。韩国Sun等[12]报道TTF-1阴性表达患者中有6%出现EGFR突变。本研究表明:14例TTF-1阴性表达患者中仅有1例发生EGFR突变(7.1%),TTF-1对于检查EGFR突变状态的灵敏度和特异度分别为98.0%和19.4%,阴性预测价值为92.6%。本实验结果与ASCO报道不一致的原因可能是我们的样本量偏小,由于TTF-1在肺腺癌中高表达,导致肺腺癌中TTF-1阴性表达的病例难以收集,其次与我国患者EGFR突变率高有关。此外,法国有学者报道:在肺腺癌中TTF-1阳性患者中对EGFR-TKI可能更有效果。以上证据表明EGFR突变与TTF-1的表达密切相关,Somaiah等[11]和我们的研究均证实TTF-1阴性表达患者中很少出现EGFR突变。本研究表明SPA的表达与EGFR突变具有一定的关系,而且差异具有统计学意义($P=0.043$),SPA对EGFR突变的阴性预测价值为68.5%。

EGFR的突变检测在肺腺癌中具有重要作用。在早期肺癌中,EGFR突变是一项独立的预后因子,有研究[2-3]证明突变患者接受化疗或者辅助化疗有效率更高;EGFR突变是晚期肺癌一线使用靶向药物(吉非替尼、厄洛替尼)的先决条件。目前,虽然EGFR突变的检测手段很多,但这些方法对组织标本、实验设备、质量控制等要求高,而且耗时、费用高等[4],使部分患者错失检测的机会,耽误患者治疗。而免疫组化是一个快速、简便、经济,在一般实验室都能开展的项目,本实验得出TTF-1对EGFR突变的阴性预测价值为

92.6%,此项结果提示病理科医师可以根据TTF-1或者SPA的免疫组化结果对EGFR突变状态进行简单的预测,同样临床医师也可初步判断患者的预后以及化疗效果。

以上美国、韩国、法国以及我们的数据,均来自肺腺癌的研究,在肺癌其他类型,如鳞癌、大细胞等非小细胞肺癌中TTF-1表达与EGFR突变状态的关系并不明确,需要更进一步的研究。

参考文献:

[1] Pao W, Miller V, Zakowski M, *et al*. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(36): 13306-13311.

[2] Eberhard D A, Johnson B E, Amler L C, *et al*. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(25): 5900-5909.

[3] Tsao M S, Sakurada A, Ding K, *et al*. Prognostic and predictive value of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutation status and gene copy number for adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(1): 139-147.

[4] 奉水东, 谭红专. 肺癌EGFR基因突变检测方法的研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2008, 11(3): 462-464.

[5] Fabbro D, Di-Loreto C, Stamerra O, *et al*. TTF-1 gene expression in human lung tumours[J]. Eur J Cancer, 1996, 32A(3): 512-517.

[6] Boggaram V. Thyroid transcription factor-1 (TTF-1/Nkx2.1/TITF1) gene regulation in the lung[J]. Clin Sci (Lond), 2009, 116(1): 27-35.

[7] Kaufmann O, Dietel M. Thyroid transcription factor-1 is the superior immunohistochemical marker for pulmonary adenocarcinomas and large cell carcinomas compared to surfactant proteins A and B[J]. Histopathology, 2000, 36(1): 8-16.

[8] Tang X, Kadara H, Behrens C, *et al*. Abnormalities of the TITF-1 lineage-specific oncogene in NSCLC: implications in lung cancer pathogenesis and prognosis[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(8): 2434-2443.

[9] Chang Y L, Lee Y C, Liao W Y, *et al*. The utility and limitation of thyroid transcription factor-1 protein in primary and metastatic pulmonary neoplasms[J]. Lung Cancer, 2004, 44(2): 149-157.

[10] Berghmans T, Paesmans M, Mascaux C, *et al*. Thyroid transcription factor 1--a new prognostic factor in lung cancer: a meta-analysis[J]. Ann Oncol, 2006, 17(11): 1673-1676.

[11] Somaiah N, Garrett-Mayer E, Huang X, *et al*. Use of negative thyroid transcription factor (TTF-1) status to predict for negative epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations (Mts) status with a high negative predictive value (NPV) in patients (pts) with adenocarcinomas (AC) of the lung[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(Suppl): 7530.

[12] Sun P L, Seol H, Lee H J, *et al*. High incidence of EGFR mutations in Korean men smokers with no intratumoral heterogeneity of lung adenocarcinomas: correlation with histologic subtypes, EGFR/TTF-1 expressions, and clinical features[J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(2): 323-330.

(**收稿**:2012-07-05;**修回**:2012-09-16)

(编辑 汪勤俭)

"神经创伤救治的转化医学研究"重点号2012年第23期即将出版

专家述评

1 神经创伤救治的转化医学思考…… 冯 华

论著

1 去铁胺对大鼠大脑冲击伤的治疗作用…… 张礼均等
2 瞬时受体电位通道6在大鼠大脑冲击伤后铁代谢中的作用及机制研究…… 张礼均等
3 蜕皮甾酮对大鼠脑组织自由基损伤的保护作用…… 高诗豪等
4 草麻黄中补体抑制单体防治大鼠脑冲击伤疗效的研究…… 魏林节等

本刊编辑部