DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00378

·论 著·

p63与表皮生长因子受体突变肺鳞癌患者生存的关系

王碧波[1],韩一平[1*],万善志[1],黄 玲[2],马大烈[2],郑建明[2],李 强[1]
1. 第二军医大学长海医院呼吸内科,上海 200433
2. 第二军医大学长海医院病理科,上海 200433

[摘要] **目的** 检测表皮生长因子受体(EGFR)在肺鳞癌患者中的突变率,并分析p63与*EGFR*突变肺鳞癌患者生存的关系。**方法** 收集2010年2月至2013年3月在我院初治的肺鳞癌患者的组织样本,用直接测序法检测*EGFR*突变情况,免疫组织化学法检测p63的表达。随访患者,记录患者的总生存时间(OS),评价*EGFR*突变和p63表达对患者生存的影响。**结果** 所有病理组织确诊为肺鳞癌的262例患者中,16例(6.1%)有*EGFR*突变,其中外显子19位点缺失7例,外显子21 L858R点突变9例,未见外显子18和20突变。与传统意义上的肺鳞癌患者相比,*EGFR*突变的肺鳞癌患者女性和非吸烟者所占比例较高。p63部分阳性的*EGFR*突变患者(n=4)的OS为11.28(95%CI: 9.33~15.23)个月,p63阳性的*EGFR*突变患者(n=11)的OS为5.93(95%CI: 1.75~8.39)个月,两者差异有统计学意义(P=0.039)。**结论** 肺鳞癌患者*EGFR*突变率为6.1%,均为外显子19和21敏感突变。p63部分阳性的*EGFR*突变患者比p63阳性*EGFR*突变患者生存期更长。

[关键词] p63;表皮生长因子受体;肺肿瘤;鳞状细胞癌
[中图分类号] R 734.2 [文献标志码] A [文章编号] 0258-879X(2014)04-0378-05

Relationship between p63 expression and survival of squamous lung cancer patients with mutatant epidermal growth factor receptor

WANG Bi-bo[1], HAN Yi-ping[1*], WAN Shan-zhi[1], HUANG Ling[2], MA Da-lie[2], ZHENG Jian-ming[2], LI Qiang[1]
1. Department of Respiratory Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[**Abstract**] **Objective** To detect the mutation rate of epidermal growth factor receptor (EGFR) in squamous carcinoma (SQC) of lung and to exam the relationship between p63 and survival of SQC patients with *EGFR* mutation. **Methods** SQC specimens were collected from the patients who received their initial treatment in our hospital between February 2010 and March 2013. The incidence of *EGFR* mutations was analyzed by automated direct sequencing, and immunohistochemical method was used to observe p63 expression. The patients were followed up and the impact of *EGFR* mutation and p63 expression upon survival of SQC patients was evaluated. **Results** Among the 262 histological diagnosed SQC patients, 16 (6.1%) had *EGFR* mutations, including exon 19 deletion (7 of 16 patients, 43.8%) and L858R point mutation in exon 21 (9 of 16, 56.2%), with no mutation of exon 18 and 20. SQC patients with *EGFR* mutations, compared with other SQC patients, had more females and non-smokers. The median overall survival (OS) time of 4 *EGFR*-mutated patients with p63 partial positive expression was 11.28 months (95% CI: 9.33-15.23 months), which was significantly longer than that of 11 *EGFR*-mutated patients with p63 positive expression (5.93 months [95% CI: 1.75-8.39 months], P=0.039). **Conclusion** *EGFR* mutation rate is 6.1% in our study, with all being exon 19 and 21 mutations. Patients presenting partial positive p63 expression have longer survival time than those presenting p63 positive expression.

[**Key words**] p63; epidermal growth factor receptor; lung neoplasms; squamous cell carcinoma
[Acad J Sec Mil Med Univ,2014,35(4):378-382]

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)是肿瘤靶向治疗的重要靶标,其酪氨酸激酶抑制剂如吉非替尼、厄洛替尼等治疗非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)尤其是*EGFR*敏感突变的肺腺癌(adenocarcinoma, ADC)具有显著疗效[1-2]。*EGFR*基因突变率在东亚

[收稿日期] 2013-11-04 [接受日期] 2014-01-09
[作者简介] 王碧波,硕士生. E-mail: wuxiwangbb@live.cn
* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161311, E-mail: yphan2006@163.com

裔 ADC 人群中为 30%～40%，但在同地区其他组织类型的 NSCLC 中则较低[3-4]，因此目前临床上对肺鳞癌（squamous carcinoma，SQC）患者检测 *EGFR* 突变的意义尚存争议[5]。

*p*63 是抑癌基因 *p*53 家族成员之一，由于启动子不同和 3′端剪切方式不同，*p*63 基因可编码多种具有不同活性的异构体。这些异构体主要分为具有反式激活区的 TA 异构体和 N 末端截短的 ΔNp63α 异构体，前者具有 *p*53 样活性，可诱导细胞周期停滞和凋亡，后者则抑制 *p*53 的功能，促进转化细胞的生长[6-8]。我们先前的研究表明，肺 SQC 中高表达 p63，且其表达水平与组织学或细胞学的采样方法以及分化程度无关[9]。本研究检测了 *EGFR* 在肺 SQC 患者中的突变率并分析了 p63 对 *EGFR* 突变肺 SQC 患者生存的影响。

1 材料和方法

1.1 样本采集 收集 2010 年 2 月至 2013 年 3 月经病理组织学确诊的初治肺 SQC 样本。样本来自于经 CT 引导的细针活检、支气管镜下经支气管的活检或者手术切除样本。

1.2 *EGFR* 基因突变检测 采用直接测序法对 *EGFR* 的 4 个位点（18～21 位点）进行检测[10]。应用 PCR 直接扩增 *EGFR* 18～21 位点的基因片段。2%琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增片段，通过凝胶成像系统观察 PCR 产物电泳结果。PCR 产物进行正反两个方向测序。分析测序图谱，判断 *EGFR* 基因 18～21 位点外显子区域是否存在突变。

1.3 p63 表达检测 主要试剂抗人 p63 单克隆抗体及 EnVision 两步法试剂盒均为丹麦 DAKO 公司产品。组织均经 4%中性甲醛溶液固定，常规脱水后石蜡包埋，切成 3～4 μm 厚的薄片，在乙二胺四乙酸溶液（EDTA，pH 8.0）中进行热诱导抗原修复。然后用 3%过氧化氢阻断内源性过氧化氢酶活性，加入抗人 p63 单克隆抗体（clone 4A4）作为标记，EnVision 两步法染色，显微镜下观察。结果判断：细胞表现出一种弥漫染色或者平均阳性染色面积≥10%定义为免疫反应阳性（+）；细胞染色面积介于 1%和 9%之间定义为免疫反应部分阳性（部分+）；细胞完全没有被染色定义为免疫反应阴性（−）[11]。

1.4 生存评价 以无疾病进展时间（progression-free survival，PFS）和总生存时间（overall survival，OS）作为生存评价指标。PFS：从确诊疾病到影像学上第 1 次发生疾病进展或其他任何原因导致死亡的时间；OS：从确诊开始到死亡或末次随访的时间。

1.5 统计学处理 用 Kaplan-Meier 法估计生存时间，log-rank 法分析生存差异。检验水准（α）为 0.05。

2 结 果

2.1 肺 SQC 患者 *EGFR* 突变率 共收取 267 例经病理组织学确诊的肺 SQC 样本，经 2 位富有经验的病理学专家复检，排除 5 例鳞腺混合样本，最终 262 例样本纳入研究。262 例样本中，16 例检测到 *EGFR* 基因突变，突变率为 6.1%。其中外显子 19 缺失 7 例（43.8%），外显子 21 点突变（L858R）9 例（56.2%），未检测到外显子 18 和 20 突变。

2.2 *EGFR* 突变肺 SQC 患者的临床病理特征 由表 1 可见，16 例 *EGFR* 突变肺 SQC 患者女性比例和非吸烟者比例较非突变患者高（$P<0.05$）。由表 2 可见，所有 16 例 *EGFR* 突变患者中，13 例（81.3%）为ⅢB 或 Ⅳ期肺 SQC，其中 3 例（23.1%）是女性，7 例（53.8%）是非吸烟者。

表 1 *EGFR* 突变与非突变肺 SQC 患者的临床特征比较

Tab 1 Comparison of clinical data between *EGFR* mutation and non-*EGFR* mutation in lung SQC patients

Characteristic	*EGFR* mutation ($N=16$)	Non-*EGFR* mutation ($N=246$)	P value
Age (year)[a]	58(40-72)	62(33-85)	>0.05
Female n(%)	6(37.5)	9(3.7)	<0.05
Smoking history n(%)			<0.05
0 pack-year	10(62.5)	64(26.0)	
1-50 pack-year	5(31.3)	119(48.4)	
51-100 pack-year	1(6.2)	59(24.0)	
≥101 pack-year	0(0)	4(1.6)	

SQC：Squamous carcinoma；EGFR：Epidermal growth factor receptor. [a]：Median (Q_1-Q_3)

2.3 肺 SQC 患者 p63 的表达 262 例样本中，p63 阳性（图 1A）247 例，p63 部分阳性（图 1B）10 例，p63 阴性 5 例。p63 部分阳性和阴性的 15 例均由病理学专家再次复核证实为肺 SQC。16 例 *EGFR* 突变样本的 p63 表达情况见表 2。

表 2　*EGFR* 突变肺 SQC 患者一般资料、突变类型、临床病理特征以及生存时间汇总

Tab 2　Clinical data, mutation types, pathologic findings, and survival time of *EGFR*-mutated lung SQC patients

No.	Age (year)	Sex	Smoking (pack-year)	*EGFR* mutation	Differentiation	p63	TNM stage	PFS *t*/month	OS *t*/month
1	70	Male	0	L858R	Poor	−	ⅢB	1.37	2.23
2	61	Male	0	Del-19	Poor	Partly +	Ⅳ	7.37	9.56
3	58	Female	0	Del-19	Well	Partly +	ⅡA	10.17	10.20
4	45	Female	0	Del-19	Poor	Partly +	Ⅳ	0.27	5.97
5	47	Female	0	L858R	Well	Partly +	ⅡB	11.70	12.53
6	70	Male	50	L858R	Poor	+	Ⅳ	2.20	2.20
7	66	Male	4	Del-19	Moderate	+	ⅢB	5.67	8.37
8	40	Female	0	L858R	Poor	+	Ⅳ	0.90	6.87
9	58	Male	30	Del-19	Moderate	+	Ⅳ	3.23	4.97
10	58	Male	40	Del-19	Moderate	+	ⅢB	2.80	5.53
11	72	Male	50	L858R	Moderate	+	ⅢB	1.43	2.90
12	53	Male	0	L858R	Well	+	ⅢB	1.97	2.70
13	49	Female	0	L858R	Well	+	ⅢB	6.70	9.77
14	56	Female	0	L858R	Well	+	ⅡB	10.70	12.90
15	63	Male	0	L858R	Well	+	Ⅳ	4.20	5.93
16	60	Male	60	Del-19	Moderate	+	ⅢB	6.73	9.73

EGFR：Epidermal growth factor receptor；SQC：Squamous carcinoma；TNM：Tumor node metastasis；PFS：Progression free survival；OS：Overall survival；Del-19：Deletion of exon 19；L858R：Point mutation in exon 21

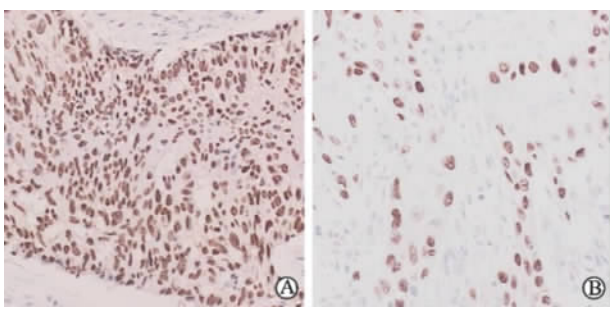

图 1　p63 在肺 SQC 中不同免疫活性的表达

Fig 1　Different immunoreactivities of p63 in lung SQC patients

SQC：Squamous carcinoma. A：p63 positive sample；B：p63 partially positive sample. Original magnification：×400

2.4　生存分析　截至 2013 年 5 月 20 日，16 例 *EGFR* 突变患者无一例失访。随访时间 5.23～35.93 个月，中位随访时间 13.90（95% CI：8.76～19.04）个月。16 例 *EGFR* 突变患者中 15 例（93.8%）疾病进展，进展患者中 11 例（68.8%）已死亡。16 例 *EGFR* 突变患者的 PFS 和 OS 见表 2。

根据 p63 免疫反应活性，把 16 例 *EGFR* 突变患者分成 3 组：p63 阴性组 1 例，p63 部分阳性组 4 例，p63 阳性组 11 例。p63 阴性组因只有 1 例而未进行统计学分析。4 例 p63 部分阳性患者中位 PFS 为 7.76（95% CI：3.12～12.34）个月，中位 OS 为 11.28（95%CI：9.33～15.23）个月。11 例 p63 阳性患者中位 PFS 为 4.43（95% CI：2.65～6.22）个月，与 p63 部分阳性患者相比差异无统计学意义（P=0.256）；中位 OS 为 5.93（95%CI：1.75～8.39）个月，与 p63 部分阳性患者相比差异有统计学意义（P=0.039，图 2）。

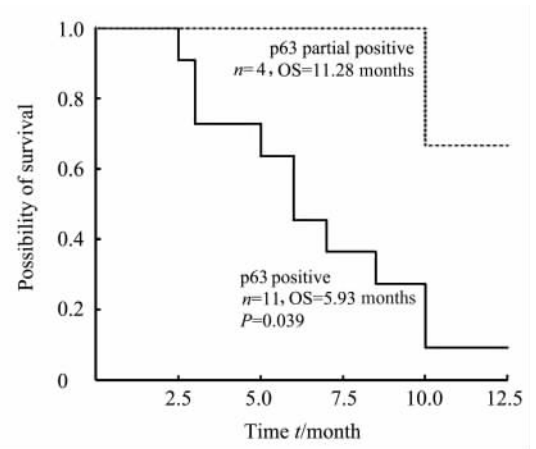

图 2　p63 免疫活性与肺 SQC *EGFR* 突变患者生存的关系

Fig 2　Relationship between p63 immunoreactivity and survival of SQC patients with *EGFR* mutation

SQC：Squamous cell carcinoma；EGFR：Epidermal growth factor receptor；OS：Overall survival

3　讨　论

EGFR 在 SQC 中的突变率文献报道各不相同。

Mu 等[12]报道肺 SQC 的 *EGFR* 突变率为 5.9%(6/102)，而 Lai 等[13]报道 282 例肺 SQC 中有 41 例 *EGFR* 突变，突变率为 14.5%。然而 Hata 等[14]研究认为，纯 SQC 无 *EFGR* 突变。他们对原有测得的 33 例 *EGFR* 突变的肺 SQC(33/249)进行复检并结合 p63、TTF-1 等免疫组化指标检测，结果显示这 33 例 *EGFR* 突变肺 SQC 都混有不同程度 ADC 成分，因此认为 *EGFR* 在肺 SQC 中的突变是由于肺 SQC 中混有 ADC 成分所致。但大多数学者都认为肺 SQC 确实存在 *EGFR* 突变，本研究结果也与此一致。本研究发现，在 262 例初治肺 SQC 样本中有 16 例 *EGFR* 基因敏感突变，突变率为 6.1%。根据现有结果，我们认为 *EGFR* 突变确实发生在肺 SQC 患者中，*EGFR* 是肺 SQC 的驱动基因之一。

与传统意义上的肺 SQC 患者相比，*EGFR* 突变患者的临床特征显示有更多的女性(37.5% vs 3.7%)和非吸烟者(62.5% vs 26.0%)，提示 *EGFR* 突变的肺 SQC 患者可能与传统的肺 SQC 患者有着不同的遗传背景。本研究中 *EGFR* 突变类型以及各类型百分比(外显子 19 缺失，43.8%；L858R，56.2%)，与其他作者[3,12-13]研究结果大致相同。有文献报道 *EGFR* 基因在 SQC 中存在非敏感位点突变，包括外显子 21 N826S、A859T、L861Q、V843I、K860E 等[15-19]，但报道呈现单个、非重复性。因此，对于检测敏感位点 L858R 和外显子 19 缺失以外的非敏感位点，是不必要和不经济的。

p63 是免疫组化诊断肺 SQC 的常用指标，本研究发现 p63 与 *EGFR* 之间似乎对肺 SQC 患者生存有影响：p63 部分阳性 *EGFR* 突变患者的 OS 为 11.28(95% CI：9.33～15.23)个月，比 p63 阳性 *EGFR* 突变患者的 OS (5.93 个月，95% CI：1.75～8.39 个月)更长($P=0.039$)。p63 和 *EGFR* 两者的关系可能与胰岛素样生长因子结合蛋白 3(IGFBP-3)相关。IGFBP-3 是 EGFR 和 p63 下游信号转导的共同产物。EGFR 能够活化下游信号转导通路，其中包括磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt)通路，它能够刺激细胞增殖以及阻止肿瘤细胞凋亡[20]。IGFBP-3 作为 PI3K/Akt 的转录产物，主要起到阻止肿瘤细胞凋亡的作用，从而促进肿瘤的生长繁殖[21]。而 p63 亚基之一的 ΔNp63α 同样能激活下游信号转导通路 PI3K/Akt，ΔNp63α 介导的转录产物 IGFBP-3 可使过度表达 p63 的肿瘤细胞免于凋亡[6]。由此推测，检测 SQC 细胞中 IGFBP-3 的含量可以评估 EGFR 和 p63 的表达活性，进而更好地评价患者的生存状况。

p63 免疫活性与肺 SQC 患者生存关系的报道较少，结论不一。Pelosi 等[22]报道 p63 的免疫活性与患者 OS 和 PFS 无关，而 Massion 等[23]指出肺 SQC 患者中 p63 的免疫强度与患者生存时间呈正相关，免疫染色强度越高越有利于患者的生存。我们对 *EGFR* 突变肺 SQC 患者进行生存分析，结果发现 p63 部分阳性的 *EGFR* 突变患者比 p63 阳性 *EGFR* 突变患者生存期更长，提示 p63 免疫强度与 *EGFR* 突变肺 SQC 患者生存时间呈负相关。由于 *EGFR* 突变样本例数较少，且生存分析结果受其他多重因素综合影响，本研究结果还需要更大样本来进行验证。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参 考 文 献]

[1] Lee V W, Schwander B, Lee V H. Effectiveness and cost-effectiveness of erlotinib versus gefitinib in first-line treatment of epidermal growth factor receptor-activating mutation-positive non-small-cell lung cancer patients in Hong Kong[J]. Hong Kong Med J, 2013, 10: 2129-2139.

[2] Keam B, Kim D W, Park J H, Lee J O, Kim T M, Lee S H, et al. How molecular understanding affects to prescribing patterns and clinical outcome of gefitinib in non-small cell lung cancer? 10 year experience of single institution[J]. Cancer Res Treat, 2013, 45: 178-185.

[3] Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Seto T, et al. Updated overall survival results of WJTOG 3405, a randomized phase Ⅲ trial comparing gefitinib (G) with cisplatin plus docetaxel (CD) as the first-line treatment for patients with non-small cell lung cancer harboring mutations of the epidermal growth factor receptor (*EGFR*)[J]. J Clin Oncol, 2012, 30 (Suppl): Abstr 7521.

[4] Mok T S, Wu Y L, Yu C J, Zhou C, Chen Y M, Zhang L, et al. A randomized placebo-controlled phase Ⅲ study of intercalated erlotinib with gemcitabine/platinum in first-line advanced non-small cell lung cancer

(NSCLC): FASTACT-Ⅱ [J]. J Clin Oncol, 2012, 30 (Suppl): Abstr. 7520.

[5] Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba I I, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers[J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97: 339-346.

[6] Chen X. The p53 family: same response, different signals? [J]. Mol Med Today, 1999, 5: 387-392.

[7] Flores E R, Tsai K Y, Crowley D, Sengupta S, Yang A, McKeon F, et al. p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage[J]. Nature, 2002, 416: 560-564.

[8] Di Como C J, Urist M J, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat C V, Teruya-Feldstein J, et al. p63 expression profiles in human normal and tumor tissues[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8: 494-501.

[9] Wang B, Han Y, Zang J. Expression of p63 in squamous cell carcinoma of the lung and its diagnostic significance: a meta-analysis[J]. J Cancer Res Updates, 2012, 1: 228-238.

[10] Lynch T J, Bell D W, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto R A, Brannigan B W, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non small-cell lung cancer to gefitinib [J]. N Engl J Med, 2004, 350: 2129-2139.

[11] Yanagita E, Imagawa N, Ohbayashi C, Itoh T. Rapid multiplex immunohistochemistry using the 4-antibody cocktail YANA-4 in differentiating primary adenocarcinoma from squamous cell carcinoma of the lung[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2011, 19: 509-513.

[12] Mu X L, Li L Y, Zhang X T, Wang M Z, Feng R E, Cui Q C, et al. Gefitinib-sensitive mutations of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain in Chinese patients with non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11: 4289-4294.

[13] Lai Y, Zhang Z, Li J, Sun D, Zhou Y, Jiang T, et al. *EGFR* mutations in surgically resected fresh specimens from 697 consecutive Chinese patients with non-small cell lung cancer and their relationships with clinical features[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14: 24549-24559.

[14] Hata A, Katakami N, Yoshioka H, Kunimasa K, Fujita S, Kaji R, et al. How sensitive are epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors for squamous cell carcinoma of the lung harboring *EGFR* gene-sensitive mutations? [J]. J Thorac Oncol, 2013, 8: 89-95.

[15] Sugio K, Uramoto H, Ono K, Oyama T, Hanagiri T, Sugaya M, et al. Mutations within the tyrosine kinase domain of *EGFR* gene specifically occur in lung adenocarcinoma patients with a low exposure of tobacco smoking[J]. Br J Cancer, 2006, 94: 896-903.

[16] Mitsudomi T, Yatabe Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer[J]. Cancer Sci, 2007, 98: 1817-1824.

[17] Chou T Y, Chiu C H, Li L H, Hsiao C Y, Tzen C Y, Chang K T, et al. Mutation in the tyrosine kinase domain of epidermal growth factor receptor is a predictive and prognostic factor for gefitinib treatment in patients with non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11: 3750-3757.

[18] Han S W, Kim T Y, Hwang P G, Jeong S, Kim J, Choi I S, et al. Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib[J]. J Clin Oncol, 2005, 23: 2493-2501.

[19] Pallis A G, Voutsina A, Kalikaki A, Souglakos J, Briasoulis E, Murray S, et al. 'Classical' but not 'other' mutations of EGFR kinase domain are associated with clinical outcome in gefitinib-treated patients with non-small cell lung cancer [J]. Br J Cancer, 2007, 97: 1560-1566.

[20] Lopez-Chavez A, Carter C A, Giaccone G. The role of *KRAS* mutations in resistance to EGFR inhibition in the treatment of cancer[J]. Curt Opin Investig Drugs, 2009, 10: 1305-1314.

[21] Barbieri C E, Perez C A, Johnson K N, Ely K A, Billheimer D, Pietenpol J A. IGFBP-3 is a direct target of transcriptional regulation by DeltaNp63alpha in squamous epithelium[J]. Cancer Res, 2005, 65: 2314-2320.

[22] Pelosi G, Pasini F, Olsen Stenholm C, Pastorino U, Maisonneuve P, Sonzogni A, et al. p63 immunoreactivity in lung cancer: yet another player in the development of squamous cell carcinomas? [J]. J Pathol, 2002, 198: 100-109.

[23] Massion P P, Taflan P M, Jamshedur Rahman S M, Yildiz P, Shyr Y, Edgerton M E, et al. Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis [J]. Cancer Res, 2003, 63: 7113-7121.

[本文编辑] 孙　岩