

非小细胞肺癌组织芯片的 EGFR 免疫组化研究

区伟¹, 吴一龙², 戎铁华¹, 谢丹³, 乔贵宾², 王思愚¹, 杨学宁²

EGFR Immunohistochemical Study of Tissue Microarray in Non-small Cell Lung Cancer

Ou Wei¹, Wu Yi-long², Rong Tie-hua¹, Xie Dan³, Qiao Gui-bin², Wang Si-yu¹, Yang Xue-ning²

1. Thoracic Department, Cancer Center of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Tumor Centre of Guangdong People's Hospital; 3. Pathology Department of Sun Yat-sen University

Abstract: Objective To investigate the epidermal growth factor receptor (EGFR) immunohistochemical expression in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) using tissue microarray technique. **Methods** 303 NSCLC specimens were constructed into tissue microarray and stained with monoclonal antibodies against EGFR. **Results** EGFR overexpression was shown in 171 cases (56.4%). 62.7% cases with lymph node metastasis showed overexpression, while only 48.9% in without lymph node metastasis. 55.6% cases of squamous cell carcinoma were overexpression and 58.8% in adenocarcinoma. None of the tested parameters was significant in univariate survival analysis. **Conclusion** (1) With tissue microarray technique, investigation of EGFR immunohistochemical expression in NSCLC can be done in a large scale and finished in a short time. (2) EGFR overexpression is obviously higher in NSCLC with lymph node metastasis than without lymph node metastasis. (3) No significant difference in NSCLC survival with EGFR overexpression.

Keywords: Lung neoplasm; Tissue microarray; Immunohistochemistry; EGFR

摘要:目的 利用组织芯片技术,结合免疫组化方法,研究上皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在非小细胞肺癌的免疫组化表达及其对生存率的影响。方法 303例非小细胞肺癌石蜡标本制成组织芯片,采用链菌素亲生物素-过氧化物酶法(SP)进行免疫组化检测,并用SPSS 9.0统计软件进行²检验和生存分析。结果 EGFR阳性表达171例(56.4%),阴性表达132例(43.6%)。有淋巴结转移组的EGFR表达阳性率为62.7%,无淋巴结转移组的48.9% ($P < 0.05$)。鳞癌的EGFR表达阳性率55.6%,腺癌的EGFR表达阳性率58.8% ($P > 0.05$)。EGFR阳性表达组与阴性表达组的生存率比较没有显著性差异($P > 0.05$)。结论 (1)利用组织芯片技术,结合免疫组化可以大规模、快速高效地检测EGFR在非小细胞肺癌组织的表达。(2)非小细胞肺癌有淋巴结转移组的EGFR过表达明显高于没有淋巴结转移组。(3)EGFR过表达对非小细胞肺癌的预后没有影响。

关键词: 肺肿瘤;组织芯片;免疫组化;EGFR

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2004)11-0671-03

0 引言

由于肿瘤标记物的表达可以显示肺癌的生物学特性而日益受到重视。这些标记物可以提供有关肿瘤的增殖活性、转移能力、对治疗的反应及预后等各方面的信息。而且,特异性高的标记物还能帮助建立新的诊断和治疗手段。上皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)被发现在很多非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)病例中有过表达,一些研究显示EGFR对肺癌的淋巴结转移、病理分期甚至生存期有影响^[1,2]。

组织芯片(又称组织微阵列, Tissue microarray,

TMA)是将数十个、数百个乃至上千个小的组织片整齐地排列在某一载体上(通常是载玻片)而成的微缩组织切片。组织芯片可用于组织中的DNA、RNA和蛋白质的定位分析和检测。像普通组织切片一样,可做HE染色、特殊染色、免疫组织化学染色、DNA和RNA原位杂交、荧光原位杂交。组织芯片蜡块可做100~200张连续切片。这样用同一套组织芯片即可迅速的对上百种生物分子标记进行分析、检测。相对于传统的免疫组化技术,组织芯片具有体积小,高通量(high-throughput)的特点,是建立疾病,特别是肿瘤生物分子文库的强有力工具。

1 资料与方法

1.1 临床资料 1994~1997年中山大学附属肿瘤医院收治的303例非小细胞肺癌患者,均经手术得到病理确诊。其中男性212例,女性91例。年龄由22~76岁,中位年龄为59.4岁。肿瘤部位上叶179

收稿日期:2004-05-10;修回日期:2004-06-08

作者单位:广州市科技局重点攻关项目(2001-Z-044-01);广东省重点医学科技攻关专项课题(WSTJJ20030726440102560203401)

作者单位:1.510080 广州市中山大学肿瘤防治中心胸科;2. 广东省人民医院肿瘤中心;3. 中山大学病理教研室

例,中叶 25 例、下叶 93 例,其他 6 例。病理类型鳞癌 99 例、腺癌 160 例、腺鳞癌 37 例、大细胞癌 2 例,类癌 3 例,粘液性腺癌 2 例。所有病例都进行了随访,最长随访时间为 103 月,其中死亡 173 例。

1.2 组织芯片的制备 本研究利用 303 例非小细胞肺癌石蜡标本,使用组织阵列仪(personaltissuearrayer,见图 1)来制作组织芯片。主要过程包括:设计并确定拟制作组织芯片的类别及组织样本的分类系列;形态学观察,核对组织或有关疾病的病理诊断;

选择目标组织并分别在组织切片和相应石蜡组织块上标记,即组织定位;阵列蜡块的制作,先做空白石蜡块,并打孔;再从已标记的石蜡组织块上钻取组织并转移到空白石蜡块的相应位置;切片。

1.3 免疫组织化学 免疫组化染色采用链菌素亲生物素-过氧化物酶法(SP)。SP 试剂盒及 EGFR 单抗均购自福州迈新生物技术开发公司。用 PBS 替代 EGFR 作为空白对照,用已知 EGFR 阳性的肺癌切片作为阳性对照。

免疫组化染色按以下标准逆行评估:阴性(-),无棕色颗粒;弱阳性(+),散在浅淡或细小棕色颗粒;中等阳性(++),可见大的棕黄颗粒;

强阳性(+++),淡染色的棕黄颗粒分布较密集(图略)。

1.4 数据统计 统计分析采用 SPSS 9.0 软件包,比较 EGFR 在有淋巴结转移和无淋巴结转移的表达差异和在鳞癌、腺癌中的表达差异用²检验,EGFR 表达阳性组和阴性组的生存分析用 Kaplan-Meier 法。

2 结果

303 例非小细胞肺癌标本的 EGFR 阳性表达为 171 例(占 56.4%),阴性表达为 132 例(占 43.6%)。在有淋巴结转移组,EGFR 表达阳性率为 62.7%,高于无淋巴结转移组的 48.9%,两者有显著性差异($P < 0.05$)。鳞癌的 EGFR 表达阳性率为 55.6%,腺癌的 EGFR 表达阳性率为 58.8%,两者未见显著性差异($P > 0.05$),见表 1。EGFR 阳性表达组的中位生存时间为 31.9 月,阴性表达组为 47.8 月,但两组的生存率比较没有显著性差异($P > 0.05$),见图 1。

表 1 EGFR 在不同病理类型和不同淋巴结转移情况的阳性表达差异

		EGFR 阳性表达	P
病理类型	鳞癌	55 (55.6)	0.70
	腺癌	94 (58.8)	
淋巴结转移	有	104 (62.7)	0.02
	无	67 (48.9)	

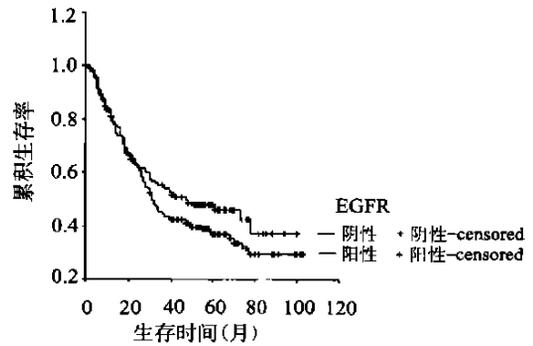


图 1 EGFR 的免疫组化表达与 303 例非小细胞肺癌的生存曲线

3 讨论

3.1 非小细胞肺癌组织芯片的制备

早在 1986 年 Battifora 等制作了多肿瘤组织块(multitumor tissue block)用于病理标本的免疫组织化学染色^[2]。1998 年美国国家人类基因组研究实验室的 Kononen 等首次提出了组织芯片的概念,并在 Nature Medicine 上发表了第一篇将组织芯片技术用于对乳腺癌组织进行 p53 基因扩增及其蛋白表达水平研究的文章^[3]。

本研究使用的组织芯片制作机主要由打孔针和距离调节器组成。组织芯片的制作过程是:通过组织芯片制作机细针打孔的方法,从众多的组织蜡块(供体蜡块,donor)中采集到数十至上千的圆柱形小组织(组织芯,tissnecore),并将其整齐排放到另一个空白蜡块(受体蜡块,recipient)中而制成组织芯片蜡块。然后,对组织芯片蜡块进行切片,再将切片转移到载玻片上而制成组织芯片。我们在每个供体蜡块上分别取 2 个肿瘤组织芯和 1 个正常组织芯,最后制成每张包括 450 个点的组织芯片。目前的技术已经可以在一张玻片上制作包括上千个标本的组织芯片。

可见,相对于传统的组织切片,组织芯片有着无可比拟的优点:(1)高产出(high-throughput):一次实验可得到大量结果;(2)实验误差小:组织芯片中的众多组织都处在相同条件下进行实验,因此较传统的一个病例一张切片的实验误差小;(3)省时、省力、节约开支;(4)对原始组织蜡块损坏小:由于制作组织芯片钻取的组织很小(直径 0.6mm),对原组织蜡块损坏不大。根据不同的研究目的,可制作各种类型的组织芯片,包括:(1)多肿瘤组织芯片(multitumor TMA):由多种类型肿瘤组成,用于肿瘤基因筛选;(2)肿瘤进展组织芯片(progression TMA):由不同发展阶段的肿瘤组织组成,用于研究肿瘤不同发展阶段的基因变化情况;(3)预后组织芯片(progression TMA):由治疗前后的肿瘤组织组成,用于

寻找与治疗 and 预后有关的指标。

当然,组织芯片技术也有其局限性。因为从供体腊块上取的组织芯直径只有0.6mm,这么少的组织能否代表整个肿瘤的疑问从开始就被提了出来^[4]。目前看来,多数研究结果显示从组织芯片上得出的实验结果与以前在普通切片上得到的结果还是相符的。Moch 等^[5]认为,组织芯片是用于检查肿瘤群体,而不是个体。他们还组织异源性的影响进行了组织芯片与普通切片对比性研究,结果显示两者的差异并不影响到相关参数的确定。Camp 等^[6]根据对乳腺癌预后相关标记物(ER、PR 和 HER2)的对比分析表明,从组织块获取 1 个点与常规组织切片的符合率超过 90%,而 2 个点即可达到 95% 以上的精确性。

目前多数的组织芯片都是从石蜡切片提取标本,但由于石蜡标本来自不同时期,标本的制作、固定、染色都有差别,导致不少结果的分析出现矛盾。最近有一些研究采用冰冻切片(cryostatsection)制作冰冻组织芯片,以尽量避免实验的技术误差^[7,8]。

3.2 检测 EGFR 表达在临床上的应用

EGFR 是 ErbB 家族里的一个酪氨酸激酶受体。在许多上皮性肿瘤中其活性有异常的升高,导致下游细胞内底物的磷酸化,从而发出有丝分裂和其他促进肿瘤细胞活动的信号。研究发现 EGFR 在多数非小细胞肺癌标本中有高表达(32% ~ 81%)^[1],有些在鳞癌的表达高于腺癌,可能是淋巴结转移、病理分期的一个有用的指标。

本研究利用组织芯片技术快速地检测出 EGFR 在 303 例肺癌标本的表达,阳性表达率为 56.4%,有淋巴结转移组的阳性表达率为 62.7%,明显高于无淋巴结转移组的 48.9% ($P < 0.05$)。但鳞癌和腺癌的阳性表达率则未见明显差异。从生存曲线上看,EGFR 阳性组要低于阴性组,但生存率未能显示差异。2002 年 Meert 等^[9]对 EGFR 表达对肺癌生存率影响的 16 个临床研究作了 meta 分析,共有 2185

例数据可作生存分析。结果表明,EGFR 表达不能作为非小细胞肺癌的一个预后因子。

从目前的情况来看,关于肿瘤标记物的研究很多,但是结果有很大争议,甚至是截然相反。其中的原因比较多,诸如实验的条件不同,采用的标本不同,免疫组化的试剂和抗体不同等都可能对研究结果产生影响。但本研究的样本量比较大,而且采用了高通量的组织芯片技术,使大规模的研究在相同的条件下进行,受上述因素的影响比单个标本逐一检测要小得多,因而研究结果的可信度是比较高的。

参考文献:

- [1] Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, et al. Immunohistochemical typing of non-small cell lung cancer: correlation with clinical parameters and prognosis [J]. J Clin Pathol, 2003, 56 (10): 736-741.
- [2] Battifora H. The multistep tumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody staining [J]. Lab Invest, 1986, 55 (2): 244-248.
- [3] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens [J]. Nat Med, 1998, 4 (7): 844-847.
- [4] Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarrays and profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations [J]. Lab Invest, 2001, 81 (10): 1331-1338.
- [5] Moch H, Kononen T, Kallioniemi O P, et al. Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? [J]. Adv Anat Pathol, 2001, 8 (1): 14-20.
- [6] Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma [J]. Lab Invest, 2000, 80 (12): 1943-1949.
- [7] Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarrays and profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations [J]. Lab Invest, 2001, 81 (10): 1331-1338.
- [8] Fejzo MS, Slamon DJ. Frozen tumor tissue microarray technology for analysis of tumor RNA, DNA, and proteins [J]. Am J Pathol, 2001, 159 (5): 1645-1650.
- [9] Meert AP, Martin B, Delmotte P, et al. The role of EGFR expression on patient survival in lung cancer: a systematic review with meta-analysis [J]. Eur Respir J, 2002, 20 (4): 975-981.

[编辑:张麟;校对:贺文]