

Her-2/Neu 在胃癌组织中的表达及其临床意义

张晶 孙秀华

【摘要】 目的 检测 Her-2/Neu 在不同胃癌组织中的表达, 分析 Her-2/Neu 的表达与临床病理特征的相关性及其对预后的影响。方法 应用免疫组化二步法, 检测 60 例胃癌患者术后标本中 Her-2/Neu 的表达情况, 并结合临床病理特征及该 60 例患者的随访资料进行综合分析, 具体为: 采用 χ^2 分析 Her-2/Neu 在不同组织类型胃癌中的表达是否有差异; 采用 Spearman 进行等级相关分析, 分析 Her-2/Neu 表达与临床病理特征的相关性, 采用 Kaplan-Meier 法进行生存期分析, 分析 Her-2/Neu 表达对胃癌术后患者无病生存期及总生存期的影响。结果 (1) 在 60 例胃癌组织中 Her-2/Neu 表达阳性者为 29 例 (48.3%), 在不同组织类型的胃癌中表达无差异。(2) Her-2/Neu 的表达与浸润深度、淋巴结转移、临床分期有关, Spearman 相关系数分别为 0.360、0.321、0.412 (P 均 < 0.05)。Her-2/Neu 表达阳性的患者无病生存期及中位生存期均显著低于表达阴性者。结论 (1) Her-2/Neu 的表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移情况及 TNM 分期相关。(2) 生存分析显示, Her-2/Neu 阳性表达者生存期劣于阴性表达者。

【关键词】 胃肿瘤; 受体, erbB-2; 预后

Expression and clinical significance of Her-2/Neu in gastric carcinoma Zhang Jing*, Sun Xiuhua.

*Department of Oncology, The Xijing Affiliated Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: Sun Xiuhua, Email: 3038668@vip.sina.com

【Abstract】 Objective To exam the expression of Her-2/Neu in different gastric carcinoma tissues and the correlation with clinicopathological features. To determine the effective prognostic factors of long-term survival of gastric carcinoma patients. **Methods** The immunohistochemical staining was used to detected the expression of Her-2/Neu in 60 cases of gastric carcinoma. Comprehensive analysis was carried out through combining with the clinicopathological features and the data from following up of the patients. The Chi-square test and Fisher exact propability had used to analyze whether the expression of Her-2/Neu is different in various types of gastric carcinoma tissues. The method of Spearman was used to analyze the correlation between the expression of Her-2/Neu and clinicopathological features. Kaplan-Meier method and Log-rank test were used to analyze the impact of Her-2/Neu expression on the survival time including disease-free survival time and overall survival time. **Results** In the 60 cases of gastric carcinoma, the positive expression rate of Her-2/Neu was 48.3%, no difference was observed in various types of gastric carcinoma tissues. The expression of Her-2/Neu was positively correlated with depth of invasion, lymph node metastasis and TNM stage. The coefficient correlation of Spearman are 0.360, 0.321, 0.412 ($P < 0.05$). Her-2/Neu positive patients had significantly lower survival time which include disease-free survival time and the median survival time than Her-2/Neu negative patients ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of Her-2/Neu is positively correlated with depth of invasion, lymph node metastasis and TNM stage. The survival analysis show that the patients with Her-2/Neu positive expression

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.16.006

基金项目: 大连市科技计划指导性项目 (2010E15SF00)

作者单位: 710032 西安, 第四军医大学西京医院肿瘤科 (张晶); 大连医科大学第二附属医院肿瘤内科 (孙秀华)

通讯作者: 孙秀华, Email: 3038668@vip.sina.com

had lower survival time than patients with negative expression.

【Key words】 Stomach neoplasm; Receptor, erbB-2; Prognosis

胃癌在我国是常见的恶性肿瘤之一,多数患者确诊时已是晚期,预后差,生存期短,严重影响我国人民身体健康,故与胃癌预后相关的因素一直以来就备受临床关注。胃癌的发生、发展涉及多基因、多蛋白水平的变化。Her-2/Neu 是原癌基因 c-erbB-2 (Her-2/Neu) 编码的具有受体酪氨酸酶 (receptor-tyrosine kinase, RTKs) 活性的跨膜糖蛋白,能启动酪氨酸激酶调控的信号转导系统。本研究旨在探讨 Her-2/Neu 在不同类型胃癌中的表达情况、与临床病理特征的关系及与预后的相关性,为临床治疗及评估预后提供参考。

资料和方法

一、病例选择与标本

收集 2009 年 1 月至 2014 年 1 月在某医院普外科进行胃癌根治术、同时手术组织标本经病理科明确诊断为胃癌的 60 例患者的临床资料及其存档蜡块。该 60 例胃癌患者中,男 40 例,女 20 例;年龄 35~81 岁,平均 (61.6±10.8) 岁;肿瘤直径≤5 cm 的 29 例, >5 cm 的 31 例;肿瘤浸润深度 T1+T2 的 21 例, T3+T4 的 39 例;有淋巴结转移的 38 例,无淋巴结转移的 22 例;有远处转移的 3 例,无远处转移的 57 例;按美国癌症联合委员会 (American Joint Committee on Cancer, AJCC) 胃癌 TNM 分期标准 (第七版),其中 I 期+II 期的 25 例, III 期+IV 期 35 例;根治术后进行化疗的患者为 20 例,未行化疗的为 40 例;肿瘤发生部位位于胃底/贲门的 13 例,位于胃体的 22 例,位于胃窦/幽门部的 25 例;包括中分化腺癌 20 例,低分化腺癌 20 例,印戒细胞癌 20 例。上述 60 例患者术前未行化疗及放疗,手术术式均为胃癌根治术。

病例入选标准:(1) 病历资料详尽、手术后病理学资料完整者;(2) 手术前检查资料完备,包括全血常规、肝肾功能、心电图、胸片、腹部超声或 CT;(3) 排除胃的其他恶性肿瘤如淋巴瘤、平滑肌肉瘤等;(4) 排除合并其他原发恶性肿瘤,如结直肠癌等。

二、病例随访及计算

采用查询住院病例与电话随访相结合,随访日期截止至 2013 年 3 月。无病生存期 (DFS) 即由确

诊之日直到肿瘤复发或转移的时间。总生存期 (OS) 即由确诊之日起至死亡或者末次随访的时间,时间以月为单位计算。

三、免疫组化试剂

浓缩液鼠抗人 Her-2/Neu 单克隆抗体,购自英国 Abcam 公司;SP 检测试剂盒、DAB 显色液购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

四、实验方法及步骤

Her-2/Neu 的检测均采用免疫组化的方法测定,具体步骤如下所示:组织标本均由甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μm 厚连续切片。采用免疫组化二步法:65 °C 烤片 4 h,石蜡切片脱蜡至水,自来水冲洗 10 min;进行抗原修复:标本浸泡于枸橼酸盐缓冲液 (pH=6.0),在 850 W 的微波炉中 (3 min 加热+2 min 冷却)×3 次后,室温下自然冷却至 20 °C;3% H₂O₂ 冲洗 10 min,以消除内源性过氧化物酶活性;双蒸水冲洗 5 min×3 次,0.5% Trion X-100 冲洗 5 min, PBS (pH=7.4) 冲洗 5 min×3 次,除去 PBS,滴加羊血清,室温下孵育 45 min,弃去羊血清,滴加一抗 (c-erbB-2 单克隆抗体按 1:50 的比例稀释),并在 37 °C 保温箱中孵育 30 min 后,4 °C 过夜;复温 1 h, PBS 冲洗 5 min×3 次,滴加二抗,室温下孵育 45 min, PBS 冲洗 5 min×3 次,滴加 SP,室温下 45 min, PBS 冲洗 5 min×3 次, DAB 显色 15 min 左右;自来水冲洗;复染,脱水透明,封片。

五、免疫组化结果判定

每批实验均设阳性和阴性对照。以 PBS 代替一抗进行阴性对照。

Her-2/Neu 评分参考 HercepTest 的标准,以细胞膜出现棕黄色染色为阳性染色。评分标准:(-),无阳性结果表达或者非特异性着色;(+),大于 10% 的区域有阳性表达,胞膜显色不连续;(++),大于 10% 的区域有阳性表达,胞膜显色连续,强度中等;(+++),大于 10% 的区域有阳性表达,胞膜呈连续强阳性表达。对于异质性明显的肿瘤,如同一切片中同时存在+、++、+++的情况,以高级别评分。最终分为以下等级:(-~+) 合并为阴性,(++~+++) 合并为阳性。

六、统计学分析

应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,采用 χ^2 检

验分析 Her-2/Neu 在不同组织类型胃癌中的表达是否有差异; 采用 Spearman 进行等级相关分析, 分析 Her-2/Neu 表达与临床病理特征的相关性, 采用 Kaplan-Meier 法进行生存期分析, 分析 Her-2/Neu 表达对胃癌术后患者无病生存期及总生存期的影响, 以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

结 果

一、Her-2/Neu 在不同胃癌组织学类型中的表达情况

Her-2/Neu 的阳性表达主要位于细胞膜, 呈棕黄色染色, 在 60 例胃癌组织中 Her-2/Neu 表达阳性者 29 例 (48.3%), 其中 20 例中分化腺癌中阳性者 10 例 (50%), 20 例低分化腺癌中阳性者 9 例 (45%), 20 例印戒细胞癌中阳性者 10 例 (50%), Her-2/Neu 在不同类型的胃癌中表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1, 图 1。

表 1 Her-2/Neu 在不同胃癌组织学类型中的表达情况及其差异 (例)

组织学类型	例数	Her-2/Neu		χ^2 值	P 值
		阴性	阳性		
中分化腺癌	20	10	10	0.133	0.935
低分化腺癌	20	11	9		
印戒细胞癌	20	10	10		
合计	60	31	29		

二、胃癌 Her-2/Neu 的表达与临床病理特征及与生存时间的关系

1. 胃癌 Her-2/Neu 的表达与临床病理特征的关系: Her-2/Neu 的表达与浸润深度、淋巴结转移、临床分期有关, Spearman 相关系数分别为 0.360 ($P=0.005$)、0.321 ($P=0.012$)、0.412 ($P=0.001$), 而与性别、年龄、肿瘤大小、远处转移、肿瘤部位无关 ($P > 0.05$)。见表 2。

2. 胃癌 Her-2/Neu 表达与生存时间的关系: Her-2/Neu 阳性患者 DFS 为 (12 ± 1.7) 个月, 显著低于阴性者 [(25 ± 2.6) 个月, $P=0.036$]; OS 为 (14 ± 1.4) 个月, 显著低于阴性者 [(25 ± 2.6) 个月, $P=0.039$]。见图 2, 3。

讨 论

胃癌是世界上常见恶性肿瘤之一, 据统计每年约有 70 万患者死于胃癌, 我国是胃癌高发区, 胃癌发生率及死亡率均为世界平均水平的 2 倍左右, 严

表 2 Her-2/Neu 在胃癌组织中的表达与临床病理特征的关系 (例)

临床病理特征	例数	Her-2/Neu		χ^2 值	P 值
		阴性	阳性		
性别				1.635	0.201
男	40	23	17		
女	20	8	12		
年龄				2.379	0.123
≤60 岁	29	12	17		
>60 岁	31	19	12		
肿瘤大小				0.276	0.599
≤5 cm	29	16	13		
>5 cm	31	15	16		
浸润深度(T)				7.781	0.005
T1+T2	21	16	5		
T3+T4	39	15	24		
淋巴结转移(N)				6.170	0.013
是	38	15	23		
否	22	16	6		
远处转移				3.376	0.066
是	3	1	2		
否	57	30	27		
TNM 分期				10.162	0.001
I + II	25	19	6		
III + IV	35	12	23		
肿瘤部位				2.009	0.130
胃底	13	6	7		
胃体	22	14	8		
胃窦	25	11	14		

重影响我国人民的健康。尽管针对胃癌的治疗手段不断改进, 但由于大多数胃癌患者就诊时已为进展期, 因而其总体预后仍没有明显改善。如何更好地评估胃癌患者预后, 进行更有针对性的临床治疗, 是医务工作者面临的重大挑战。近年来, 随着分子生物学的进展, 对肿瘤的认识进一步深入, 肿瘤预后指标也由简单的病理分期、组织学类型等增加了针对性更强的组织生物学指标。本试验是某医院对 2009 年 1 月至 2014 年 1 月期间收治的 60 例胃癌患者进行了回顾性分析, 研究了近年来比较关注的分子病理因素 Her-2/Neu 与胃癌的临床病理特征及其预后的相关性, 以下将对结果中有意义的指标进行讨论。

一、Her-2/Neu 在不同类型胃癌中的表达及其与临床病理特征的相关性

Her-2/Neu 的阳性表达不仅存在于乳腺癌中, 也广泛存在于胃癌、结肠癌^[1]、膀胱癌^[2]、卵巢癌^[3]、肺癌^[4]等多种肿瘤中, 并且发现其异常扩增或者过度表达均与各项肿瘤预后不良有着明显的相关性。1986 年, Sakai 等^[5]采用免疫组化法 (IHC) 最早检

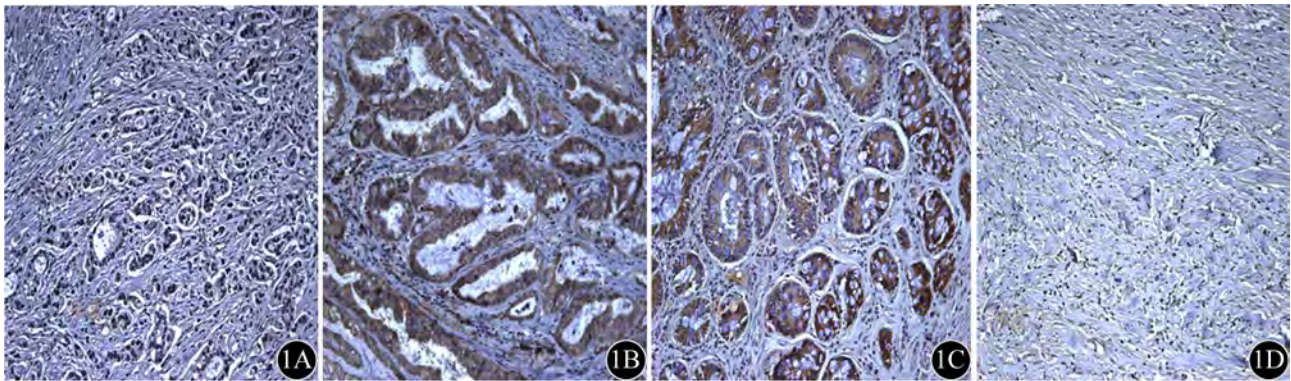


图1 免疫组化法检测Her-2/Neu蛋白在胃癌组织中的表达。1A: 低分化腺癌Her-2/Neu(+++) (×400); 1B: 中分化腺癌Her-2/Neu(+++) (×400); 1C: 印戒细胞癌Her-2/Neu(+++) (×400); 1D: 阴性对照PBS代替Neu单抗(×400)

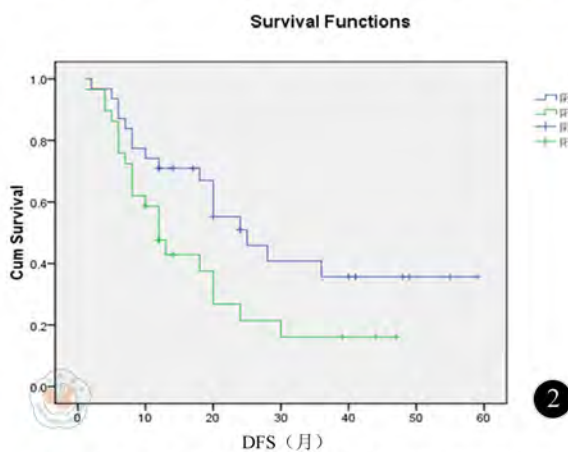


图2 胃癌患者Her-2/Neu表达情况与DFS的Kaplan-Meier曲线

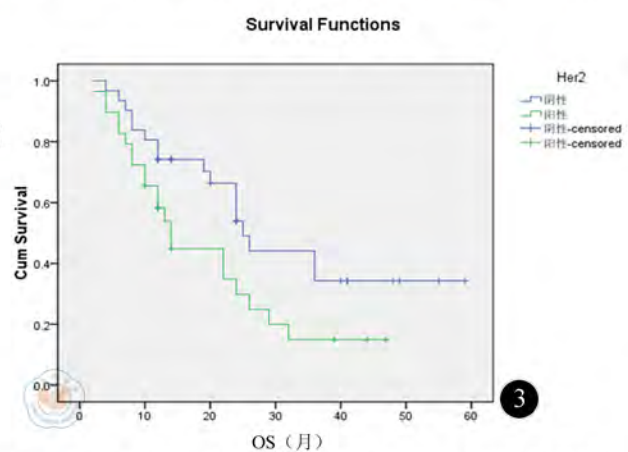


图3 胃癌患者Her-2/Neu表达情况与OS的Kaplan-Meier曲线

测到胃癌中 Her-2/Neu 的过表达。1990 年, 多项研究报道胃癌中 Her-2/Neu 的阳性率为 9%~38%。Gravalos 等^[6]报道胃癌组织活检和手术切除标本中 Her-2/neu 的表达阳性率为 13%。另外据文献报道, Her-2/Neu 的阳性表达与 Lauren 分型有关。ToGA 实验进一步证实了上述结论。本试验组中共 60 例胃癌患者, 其 Her-2/Neu 阳性表达者共 29 例 (48.3%), 高于文献报道的比例。其中 20 例中分化腺癌中的阳性者为 10 例 (50%), 20 例低分化腺癌中阳性者为 9 例 (45%), 20 例印戒细胞癌中阳性者为 10 例 (50%), 进行卡方检验, $P>0.05$, 无统计学意义, 即 Her-2/Neu 在不同类型的胃癌组织中表达无差异, 仅与部分文献报道一致, 可能与标本量较少有关, 有待于进一步扩大样本量进行回顾性分析。

恶性肿瘤具有侵袭和转移的重要特点, 这两个重要的生物学行为也是影响临床疗效和患者预后的关键因素。从以下两方面来分析 Her-2/Neu 过表达与胃癌的发生相关。首先, Her-2/Neu 的表达使配体的解离速率减慢从而使 Her-2/neu 异二聚体具

有了长效性和其维持传导通路的有效性; 其次, Her-2/Neu 异二聚体可以使正常细胞的内吞作用减慢^[7], 以上两点均可以使 Her-2/neu 转录水平增加, 进而促进细胞有丝分裂, 增加细胞的增殖、分化、迁移, 最终促进了恶性肿瘤的侵袭和转移。本研究对 60 例胃癌患者进行 Her-2/Neu 表达的检测, 并且探讨了 Her-2/Neu 的表达与胃癌临床病理特征的相关性。结果显示, Her-2/Neu 的表达与浸润深度、临床分期有关, Spearman 相关系数分别为 0.360 ($P=0.005$)、0.412 ($P=0.001$), 而与性别、年龄、肿瘤大小、远处转移、肿瘤部位无关 ($P>0.05$), 进一步提示 Her-2/Neu 在胃癌中的阳性表达可能促进肿瘤局部侵袭的发生, 在胃癌由早期向中晚期发展过程中起到了重要的生物学作用。同时, 试验结果也提示有淋巴结转移者的 Her-2/Neu 的表达阳性率显著高于未发生淋巴结转移者, 二者有相关性, Spearman 相关系数为 0.321 ($P=0.012$), 有统计学意义。这与 Dang 等^[8-9]的研究结果一致。故可以推测, Her-2/Neu 可能参与淋巴结转移的过程, 胃癌组织中 Her-2/Neu 的过表达可能对淋巴结转移

产生了一定的促进作用,使其更容易出现转移,导致分期晚,预后差。**Her-2/Neu**将来有可能成为检测胃癌淋巴结是否转移的分子病理学标记之一,抑制**Her-2/Neu**的过表达亦可能会减少淋巴结转移的发生,降低分期,改善预后。

二、**Her-2/Neu**与胃癌预后的相关性

目前,越来越多的实验表明,**Her-2/Neu**的表达与胃癌的预后有着直接的关系。韩国的一项研究^[10]表明,**Her-2/Neu**阳性患者的中位生存期和5年生存率均低于**Her-2/Neu**阴性患者。**Garcia**等^[11]前瞻性分析了63例可切除的胃癌患者组织样本,结果发现的**Her-2/Neu**过表达与生存期短相关。**Yu**等^[12]采用免疫组化法检测1143例患者,**Her-2/Neu**过表达占到28%,并且在单因素和多因素分析中均证实**Her-2/Neu**过表达与生存率低相关。现已将**Her-2/Neu**的表达情况看做是判断胃癌预后的一个独立因素。本实验结果显示,60例胃癌患者中,**Her-2/Neu**阳性患者DFS为(12±1.7)个月,显著低于阴性者(25±2.6)个月的DFS($P=0.036$)。并且**Her-2/Neu**阳性表达的患者中位OS(14±1.4)个月,亦显著低于表达阴性者(25±2.6)个月的中位OS($P=0.039$),与文献报道一致。

综上所述,**Her-2/Neu**过表达与胃癌的浸润深度、淋巴结转移、临床分期相关,其表达阳性提示胃癌患者预后不良,可作为评价预后的独立指标之一。大多数胃癌患者确诊时已处于不能手术阶段,但目前却还没有国际公认的标准化疗方案,尤其是对接受姑息性化疗的晚期胃癌患者而言,其生存期很短,急需新的治疗手段。前瞻性的**ToGA**试验属于国际性多中心的III期临床试验,其研究结果表明,胃癌患者中存在**Her-2/Neu**过表达,并对**Her-2/Neu**表达阳性的晚期胃癌患者在标准化疗方案(氟尿嘧啶类药物+顺铂)中加用曲妥珠单抗,最终使总生存期延长了2.4个月(11.1个月 vs. 13.5个月),这是第一次表明了曲妥珠单抗可延长乳腺癌之外的其他癌症患者的生存期,并且使患者的无进展生存期、总体生存率、应答持续时间、药物安

全性和患者的生活质量得到提高。晚期胃癌对人体破坏性极大,治疗困难,生存期短,曲妥珠单抗应用于**Her-2/Neu**表达阳性的中晚期胃癌患者的治疗无疑又为其带来了新的希望。

参 考 文 献

- [1] Li C, Liu DR, Ye LY, et al. HER-2 overexpression and survival in colorectal cancer: a meta-analysis[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2014, 15(6): 582-589.
- [2] Bongiovanni L, Arena V, Vecchio FM, et al. HER-2 immunohistochemical expression as prognostic marker in high-grade T1 bladder cancer (T1G3)[J]. Arch Ital Urol Androl, 2013, 85(2): 73-77.
- [3] Chao WR, Lee MY, Lin WL, et al. HER2 amplification and overexpression are significantly correlated in mucinous epithelial ovarian cancer[J]. Hum Pathol, 2014, 45(4): 810-816.
- [4] Landi L, Cappuzzo F. HER2 and lung cancer[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2013, 13(10): 1219-1228.
- [5] Sakai K, Mori S, Kawamoto T, et al. Expression of epidermal growth factor receptors on normal human gastric epithelia and gastric carcinoma[J]. Cancer Research, 1986, 46(5): 1047-1052.
- [6] Gravalos C, Mafirquez A, Garcia Carbonero R, et al. Correlation between Her2/neu overexpression/amplification and clinicopathological parameters in advanced gastric cancer patients: A prospective study[J]. 2007 Gastrointestinal Cancers Symposium, 2007, Abstract No: 89.
- [7] Ben-Kasus T, Schechter B, Lavi S, et al. Persistent elimination of ErbB-2/HER2-overexpressing tumors using combinations of monoclonal antibodies: relevance of receptor endocytosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(9): 3294-3299.
- [8] Dang HZ, Yu Y, Jiao SC. Prognosis of HER2 over-expressing gastric cancer patients with liver metastasis[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(19): 2402-2407.
- [9] 陈斌, 罗荣城, 崔斐, 等. 胃癌 **Her-2/Neu** 基因表达与预后相关性[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(3): 265-267.
- [10] Nicholas G, Cripps C, Au HP, et al. Early results of a trial of trastuzumab, cisplatin and docetaxel for the treatment of metastatic gastric cancer overexpressing HER-2[J]. ESMO, 2006, 17(9): 316.
- [11] Garcia I, Vizoso F, Martin A, et al. Clinical significance of the epidermal growth factor receptor and HER-2 receptor in resectable gastric cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2003, 10(3): 234-241.
- [12] Yu GZ, Chen Y, Wang JJ. Overexpression of Grb2/HER2 signaling in Chinese gastric cancer: their relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135(10): 1331-1339.

(收稿日期: 2014-05-20)

(本文编辑: 马超)