文章编号:1000-5404(2012)20-2039-04

论著

非小细胞肺癌的肿瘤干细胞与非肿瘤干细胞中表皮生长因子受体基因异质性的研究

蒋　娟[1],易亭伍[1],张　瑜[1],兰　洁[1],卢　铀[1,2]　(610041 成都,四川大学华西医院:肿瘤中心胸部肿瘤科[1],生物治疗国家重点实验室[2])

[摘要]　**目的**　研究非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的肿瘤干细胞和非肿瘤干细胞中表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)基因状态。**方法**　收集2010年6月至2011年8月四川省肿瘤医院及四川大学华西医院胸外科NSCLC新鲜手术标本35例,流式细胞术分选出CD133$^+$细胞和CD133$^-$细胞,采用扩增阻滞突变系统(amplification refractory mutation system,ARMS)分别检测EGFR基因突变,观察其有无差异。**结果**　35例NSCLC样本中均检测到CD133的表达。35例CD133$^+$细胞中EGFR基因突变检出率为28.6%,腺癌突变率高于鳞癌($P<0.05$),而在不同性别、年龄、有无吸烟史中无统计学差异($P>0.05$);CD133$^-$细胞中EGFR基因突变检出率为42.9%,腺癌、无或少吸烟史者突变率高($P<0.05$),而不同性别、年龄的突变率无统计学差异($P>0.05$)。11例患者标本的CD133$^+$/$^-$细胞存在EGFR基因异质性,占31.4%(11/35)。24例患者标本CD133$^+$/$^-$细胞的EGFR基因状态相同(18例患者中CD133$^+$和CD133$^-$细胞EGFR基因均为野生型,6例患者中CD133$^+$和CD133$^-$细胞EGFR基因为相同的敏感性突变)。**结论**　NSCLC患者中CD133$^+$细胞和CD133$^-$细胞中存在EGFR基因异质性。

[关键词]　非小细胞肺癌;受体,表皮生长因子;突变;干细胞;CD133;异质性
[中图法分类号]　R329.2;R394.3;R734.2　　[文献标志码]　A

Genetic heterogeneity of EGFR in cancer and non-cancer stem cells from non-small cell lung cancer

Jiang Juan[1], Yi Tingwu[1], Zhang Yu[1], Lan Jie[1], Lu You[1,2] ([1]Department of Thoracic Oncology, Cancer Center, [2]State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, 610041, China)

[**Abstract**]　Objective　To investigate the genetic status of epidermal growth factor receptor (EGFR) in cancer stem cells (CSCs) and non-cancer stem cells from non-small cell lung cancer (NSCLC). Methods　Thirty-five NSCLC surgical fresh specimens were collected in our department and the Second Peoples' Hospital of Sichuan Province from June 2010 to August 2011. CD133-positive cells and CD133-negative cells were sorted by flow cytometry after CD133 staining. Amplification refractory mutation system (ARMS) was employed to detect the presence of EGFR mutations in the 2 types of cells. The correlation of the EGFR mutations in different cells was analyzed. Results　CD133-positive cells were detected in all collected specimens. The EGFR mutation rate was 28.6% in CD133-positive cells, which was higher in adenocarcinomas than in squamous cell carcinomas ($P<0.05$). But there was no significant difference among different gender, age or smoking history ($P>0.05$). The EGFR mutation rate was 42.9% in CD133-negative cells, which was higher in adenocarcinomas, and non- or slight-smokers ($P<0.05$). There was no significant difference between different gender, or age ($P>0.05$). There were 11 specimens out of 35 which had EGFR gene heterogeneity in both CD133-positive cells and CD133-negative cells (11/35, 31.4%). The remaining 24 specimens had the same EGFR gene status in both CD133-positive cells and CD133-negative cells (18 cases exhibited EGFR wild type in both CD133-positive and -negative cells, and 6 cases displayed activating EGFR mutations regardless of CD133 expression). Conclusion　There are EGFR genetic heterogeneity existing between CD133-positive cells and CD133-negative cells in NSCLC.

[基金项目]　吴阶平医学基金(H09-035)
[通信作者]　卢　铀,电话:(028)85423571,E-mail:radyoulu@hotmail.com

[**Key words**] non-small cell lung cancer; receptor, epidermal growth factor; mutation; stem cells; CD133; heterogeneity

Supported by the Wu Jieping Medical Foundation(H09-035). Corresponding author: Lu You, Tel: 86-28-85423571, E-mail: radyoulu@hotmail.com

肺癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占全部肺癌的75% ~80%[1]。NSCLC患者就诊时大多为中晚期,因此,除手术之外的个体化治疗就显得尤为重要。现阶段,小分子靶向药物的广泛应用更为肿瘤个体化治疗提供了新的方向。其中,根据表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor,EGFR)突变状态选择NSCLC患者接受EGFR酪氨酸激酶抑制剂(EGFR tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKIs)治疗是最受瞩目的治疗模式[2]。IPASS研究显示,EGFR基因药物敏感性突变患者使用吉非替尼(Iressa)的有效率为71.2%,而EGFR基因野生型患者使用吉非替尼治疗则增加了死亡风险($HR=2.85, P<0.01$),有效率仅1.1%[3]。因此,准确检测EGFR基因突变状态关系到能否正确制订EGFR-TKIs治疗计划。最近研究发现由于肿瘤细胞间存在高度异质性,同一肺癌患者中,相同病灶的不同部位[4]、相同病灶不同组织学类型[5]的肿瘤细胞之间,或是原发灶和转移灶之间[6],EGFR基因状态都存在着差异。因而目前主要针对手术标本或活检肿瘤组织的基因检测并不能完全反映NSCLC患者体内肿瘤EGFR基因的整体状态。选择何种瘤灶或肿瘤细胞检测EGFR基因突变进而指导EGFR-TKIs的用药,是目前亟需解决的问题。

1959年Makino等首次提出肿瘤干细胞学说,该学说认为在肿瘤组织中存在一类含量较少的未分化细胞亚群,具有强致瘤性、自我更新能力、无限增殖以及多向分化潜能,并表现出对放化疗的耐受,被称为肿瘤干细胞。肿瘤干细胞被认为是肿瘤发生、发展、转移的主要原因,是肿瘤复发与耐药的根源[7-8]。Eramo等[9]研究发现,在小细胞肺癌(SCLC)和NSCLC中同样存在这样的未分化细胞亚群,这群细胞具有肿瘤干细胞特性,细胞膜表面特征性表达CD133抗原,被认为是肺癌的肿瘤干细胞。

根据肿瘤干细胞学说,肺癌肿瘤干细胞是导致肺癌发生、进展、治疗抵抗的根本原因。因而推测肺癌肿瘤干细胞的EGFR基因状态对EGFR-TKIs用药更具指导意义。而肿瘤干细胞的特殊生物学特性会不会导致肿瘤干细胞与非肿瘤干细胞在EGFR基因状态上存在差异进而影响EGFR-TKIs的选择和疗效,目前尚少见相关报道。本研究收集35例NSCLC手术标本,采用流式细胞仪特异性分离CD133$^{+/-}$细胞,分别检测其EGFR基因状态,探讨NSCLC肿瘤干细胞的EGFR基因状态对EGFR-TKIs疗效的潜在影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究经华西医院伦理委员会批准,收集2010年6月至2011年8月在四川省肿瘤医院胸外科及四川大学华西医院胸外科术前诊断为NSCLC或周围性包块的新鲜手术标本38例,经四川大学华西医院或四川省肿瘤医院病理科HE及免疫组化染色确诊为NSCLC 35例,并明确其病理类型。35例NSCLC患者均为住院患者,其中女性9例,男性26例;有吸烟史者21例,无或少吸烟史(<400支/年)者14例;年龄38~72岁,中位年龄57.7岁。病理组织学类型参照2004年WHO肺癌国际组织学分类标准,腺癌22例,鳞癌13例。所有患者术前未接受过新辅助化疗、放疗或分子靶向治疗,签署了本研究的知情同意书。

1.2 标本处理及检测方法

1.2.1 肺癌肿瘤干细胞的分选　所有标本在4 ℃存放及运送,取得单细胞悬液后应用Lineage系列标记抗体CD2、CD3、CD64和白细胞共同抗原抗体CD45(BD公司)染色,二抗为PECy7标记造血系统及内皮细胞,核酸染料7-AAD标记非存活细胞,抗-CD133抗体(Abcam公司)标记肺癌的肿瘤干细胞和非肿瘤干细胞,采用流式细胞仪(FACSAria™,BD公司)分选CD133$^{+/-}$细胞,FlowJo软件分析结果。

1.2.2 标本DNA的提取　采用TaKaRa DNA抽提试剂盒(大连宝生物工程有限公司),提取各标本CD133$^{+/-}$细胞DNA,操作按说明书进行。用分光光度计(3100pro型,AB公司)检测并评价DNA纯度及含量。

1.2.3 EGFR基因突变的检测　采用双环探针和特异引物相结合的扩增阻滞突变系统(amplification refractory mutation system,ARMS)法(ADx_ARMS)检测EGFR基因第18~21号外显子上已知的29个热点突变。

1.3 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件,采用Fisher精确检验比较不同性别、年龄、吸烟与否、病理类型间EGFR基因突变的差异,并分析CD133$^{+/-}$细胞中EGFR基因突变差异。

2 结果

2.1 CD133的表达和分选

收集NSCLC新鲜手术标本35例,所有样本中检测到CD133的表达,CD133^{+}细胞所占比例约为0.87%(0.1% ~6.0%)。见表1。

表1 11例存在EGFR基因异质性的NSCLC患者CD133+细胞及CD133-细胞的突变状态

编号	病理类型	CD133+细胞比例(%)	EGFR基因突变类型	
			CD133+细胞	CD133-细胞
3	鳞癌	0.4	野生型	L858R
4	腺癌	0.4	野生型	L858R
13	腺癌	0.7	野生型	L861Q
14	鳞癌	0.7	野生型	L861Q
17	腺癌	0.7	野生型	L858R
35	腺癌	0.7	野生型	L858R
15	腺癌	0.4	野生型	T790M
9	鳞癌	6.0	L858R	野生型
34	腺癌	0.2	L858R	野生型
11	腺癌	0.2	L861Q	L861Q,L858R
21	腺癌	1.1	L861Q	L861Q,L858R

2.2 EGFR基因突变与样本临床特征的关系

在35例NSCLC样本的CD133+细胞中,突变检出率为28.6%(10/35),均为EGFR基因药物敏感性突变;其中,腺癌突变率高于鳞癌($P=0.036$),但在有吸烟史和无或少吸烟史患者之间、男性和女性之间以及老年患者(年龄>70岁)和非老年患者之间无统计学差异($P>0.05$)。

在35例NSCLC样本的CD133-细胞中,突变检出率为42.9%(15/35),EGFR基因药物敏感性突变14例,以L858R和19号外显子缺失突变(19-del)多见,T790M耐药性突变1例。其中,腺癌突变率高于鳞癌($P=0.012$),无或少吸烟史患者高于有吸烟史患者($P=0.005$),而在男性和女性患者之间以及老年患者和非老年患者之间突变率无统计学差异($P>0.05$)。

在35例NSCLC样本中,CD133+细胞中EGFR基因突变率(28.6%,10/35)与CD133-细胞中突变率(42.9%,15/35)无统计学差异($P=0.052$)。

2.3 EGFR基因突变在同一样本的CD133+/-细胞中的差异

在35例NSCLC标本中,11例NSCLC的CD133+细胞和CD133-细胞存在EGFR基因突变差异,占31.4%(11/35);24例标本CD133+和CD133-细胞EGFR基因状态相同(18例NSCLC中CD133+和CD133-细胞EGFR基因为野生型,3例NSCLC中CD133+和CD133-细胞EGFR基因为相同的19号外显子缺失突变,3例NSCLC中CD133+和CD133-细胞EGFR基因为相同的L858R敏感性突变)。

EGFR基因突变存在差异的11例患者标本中,同一标本的CD133+细胞EGFR基因为野生型,CD133-细胞EGFR基因为敏感性突变有6例(3、4、13、14、17、35号标本);CD133+细胞EGFR基因野生型,CD133-细胞EGFR基因为耐药性突变1例(15号标本);CD133+细胞存在敏感性突变,CD133-细胞EGFR基因为野生型2例(9、34号标本);CD133+细胞和CD133-细胞同时存在EGFR基因突变,但突变类型存在差异2例(11、21号标本)。见表1。

3 讨论

EGFR-TKIs的出现使NSCLC的治疗取得了突破性的进展。已有研究证实,EGFR-TKIs的疗效与EGFR基因状态密切相关[10]。EGFR基因突变主要发生在酪氨酸激酶编码区第18~21号外显子上,目前研究发现有30余种。与EGFR-TKIs治疗效果相关的EGFR基因药物敏感性突变最常见的是19号外显子缺失突变(exon19 deletion)和21号外显子替代突变(L858R);20号外显子上T790M替代突变为最常见的EGFR基因耐药性突变[11]。

IPASS研究显示,EGFR基因药物敏感性突变患者使用吉非替尼的有效率为71.2%,而EGFR基因野生型患者EGFR-TKIs使用也有1.1%有效[4]。这种EGFR-TKIs疗效差异的产生机制目前尚不清楚。

肿瘤的异质性是肿瘤在生长过程中,肿瘤细胞发生分子生物学或基因遗传学等方面的改变,从而使同一肿瘤组织内不同细胞存在的增殖能力、侵袭能力、药物敏感性等方面的差异[12]。越来越多的研究证实,在NSCLC中存在EGFR基因异质性,这种异质性存在于同一患者不同病灶,也存在于同一病灶不同部分或不同组织学类型中[4-6,13]。Taniguchi等[4]分析了21例存在EGFR基因突变的NSCLC患者,利用显微切割技术对每例标本选取了50~60个瘤灶,采用直接测序法进行EGFR基因突变检测,结果显示15例标本的所有瘤灶为EGFR基因突变(全部突变组),另外6例标本一部分瘤灶EGFR基因为野生型(部分突变组)。进一步研究发现,部分突变组患者使用EGFR-TKIs的无疾病进展生存期和总生存期均明显短于全部突变组。Park等[6]分析了101例NSCLC患者,发现原发灶和转移灶EGFR基因突变的不一致性为12%;Sun等[13]发现,原发灶与转移灶之间存在EGFR基因的异质性,不一致率为8.75%。对EGFR-TKIs疗效观察发现,原发灶与转移灶同时存在敏感性突变的患者使用EGFR-TKIs治疗有效,表现为原发灶与转移灶同时缩小,而原发灶为EGFR基因野生型,转移灶EGFR基因为突变型患者使用EGFR-TKIs治疗无效,显示为原发灶的增大并出现胸腔积液。该研究提示,NSCLC中EGFR基因异质性可能是影响EGFR-TKIs疗效的因素之一。

尽管既往研究显示在NSCLC中存在EGFR基因异质性,但目前对EGFR基因异质性的探索都是从组织上进行探讨,并没有深入到具体的细胞亚群。本研究从细胞亚群着手,分析NSCLC的CD133+/-细胞的EGFR基因状态,结果显示,在35例NSCLC中,11例患者存在EGFR基因状态的不一致性,占31.4%(11/35)。其中,CD133+细胞的EGFR基因为野生型,CD133-细胞存在21号外显子药物敏感性突变6例;CD133+细胞的EGFR基因为野生型,CD133-细胞存在T790M耐药性突变1例;CD133+细胞存在L858R药物敏感

性突变，CD133⁻细胞的EGFR基因为野生型2例；CD133⁺细胞和CD133⁻细胞同时存在EGFR基因突变，但是突变类型不一致2例。本研究结果提示，同一NSCLC标本中，CD133⁺/⁻细胞中的EGFR基因状态存在异质性。

自Eramo等[9]提出CD133⁺细胞是肺癌的肿瘤干细胞以来，陆续有多个研究均提示NSCLC中CD133⁺细胞具有肿瘤干细胞的特性。尽管存在争议，CD133仍旧是目前研究者应用较多的肺癌的肿瘤干细胞膜表面标记物[14]。本研究亦采用CD133作为肺癌肿瘤干细胞的标记物。由此，本研究结果显示，在NSCLC中，肿瘤干细胞和非肿瘤干细胞存在EGFR基因状态的异质性(31.4%)。根据肿瘤干细胞学说，肺癌的肿瘤干细胞是肺癌发生、进展的根源，推测肺癌肿瘤干细胞的EGFR基因状态才能有效预测患者对EGFR-TKIs的疗效。因此，有效检测肺癌肿瘤干细胞的EGFR基因状态对于准确预测EGFR-TKIs疗效从而指导用药有着重要的意义。

目前，EGFR基因检测主要针对检测样本的全部细胞，检测方法主要采用敏感性低(15%~20%)的直接测序法，而特异性相当，敏感性较高的检测方法，如ARMS，其敏感性也仅为1%[15-19]，检测结果不能准确地反映肿瘤的基因状态。而本研究发现，在NSCLC中，CD133⁺细胞比例极低(<1%)，与文献[9]报道相符。由此可见，现有的针对检测标本全部细胞的检测手段很难准确检测肺癌肿瘤干细胞的EGFR基因状态。因此，肺癌肿瘤干细胞的分离纯化后EGFR基因状态的单独检测就显得很有必要。

本研究将EGFR基因状态与肿瘤干细胞相结合，探索了NSCLC中不同细胞亚群中EGFR基因状态差异，结果显示，在NSCLC的肿瘤干细胞和非肿瘤干细胞中存在EGFR基因异质性。根据肿瘤干细胞学说，这种EGFR基因异质性的存在很可能是影响EGFR-TKIs疗效的因素之一。因此，将肿瘤干细胞分离纯化后单独检测其EGFR基因状态以指导EGFR-TKIs的用药选择十分必要，但仍需进一步研究肿瘤干细胞的EGFR基因状态与EGFR-TKIs临床疗效的相关性。

参考文献：

[1] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al*. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[2] Green M R. Targeting targeted therapy[J]. N Engl J Med, 2004, 350(21): 2191-2193.

[3] Mok T S, Wu Y L, Thongprasert S. *et al*. Gefitinib or carboplatin- paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma[J]. N Engl J Med, 2009, 361(10): 947-957.

[4] Taniguchi K, Okami J, Kodama K, *et al*. Intratumor heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer and its correlation to the response to gefitinib[J]. Cancer Sci, 2008, 99(5): 929-935.

[5] Nakano H, Soda H, Takasu M, *et al*. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations within a mixed adenocarcinoma lung nodule[J]. Lung Cancer, 2008, 60(1): 136-140.

[6] Park S, Holmes-Tisch A J, Cho E Y, *et al*. Discordance of molecular biomarkers associated with epidermal growth factor receptor pathway between primary tumors and lymph node metastasis in non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2009, 4(7): 809-815.

[7] Makino S. The role of tumor stem-cells in regrowth of the tumor following drastic applications[J]. Acta Unio Int Contra Cancrum, 1959, 15(Suppl 1): 196-198.

[8] Lobo N A, Shimono Y, Qian D, *et al*. The biology of cancer stem cells[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007, 23: 675-699.

[9] Eramo A, Lotti F, Sette G, *et al*. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(3): 504-514.

[10] Paez J G, Janne P A, Lee J C, *et al*. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. Science, 2004, 304(5676): 1497-1500.

[11] Yatabe Y. EGFR mutations and the terminal respiratory unit[J]. Cancer Metastasis Rev, 2010, 29 (1): 23-36.

[12] Henson D E. Heterogeneity in tumors[J]. Arch Pathol Lab Med, 1982, 106(12): 597-598.

[13] Sun L, Zhang Q, Luan H, *et al*. Comparison of KRAS and EGFR gene status between primary non-small cell lung cancer and local lymph node metastases: implications for clinical practice[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30: 30.

[14] Bertolini G, Roz L, Perego P, *et al*. Highly tumorigenic lung cancer CD133⁺ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(38): 16281-16286.

[15] Pan Q, Pao W, Ladanyi M. Rapid polymerase chain reaction-based detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in lung adenocarcinomas[J]. J Mol Diagn, 2005, 7 (3): 396-403.

[16] Horiike A, Kimura H, Nishio K, *et al*. Detection of epidermal growth factor receptor mutation in transbronchial needle aspirates of non-small cell lung cancer[J]. Chest, 2007, 131(6): 1628-1634.

[17] Taron M, Ichinose Y, Rosell R, *et al*. Activating mutations in the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor are associated with improved survival in geftinib-treated chemorefractory lung adenocarcinoas[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(16): 5878-5885.

[18] Guo J, Zhou S W, Zhang L, *et al*. Prediction of epidermal growth factor receptor mutations in the plasma/pleural effusion to efficacy of gefitinib treatment in advanced non-small cell lung cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010,136(9): 1341-1347.

[19] Kimura H, Suminoe M, Kasahara K, *et al*. Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA)[J]. Br J Cancer, 2007, 97(6): 778-784.

(收稿:2012-05-16;修回:2012-07-27)

(编辑　王　红)