

ER α 、ER β 在非吸烟非小细胞肺癌患者中的表达与生存期和性别的相关性研究

简红¹ 朱雷² 邵晋辰² 赵艺¹ 李传佳¹ 虞永锋¹ 张杰²

1. 上海交通大学附属上海市胸科医院肺部肿瘤临床医学中心, 上海 200030;
2. 上海交通大学附属上海市胸科医院病理科, 上海 200030

[摘要] **背景与目的:** 雌激素信号传导在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中存在争议, 体外实验发现, 雌激素受体(estrogen receptor, ER)ER β 与肺内组织的异常增生相关, ER β 在正常组织和肺癌组织中的表达结果不同。本研究旨在探讨ER α 和ER β 在非吸烟NSCLC患者中的表达与临床病理特征和生存期的关系。**方法:** 收集有组织学病理诊断的144例非吸烟的NSCLC组织及其临床资料, 免疫组化方法检测ER α 和ER β 表达状况并分析与临床特点和生存期的关系。**结果:** ER α 阳性表达率为7.6%, 仅在腺癌中表达, ER α 表达状态与生存期无关。ER β 表达率为52.1%, I、II期患者的表达显著高于III、IV期, 差异有统计学意义($P=0.020$)。ER β 表达阳性和阴性的中位生存期(median survival time, MST)分别为43和38个月, 差异有统计学意义($P=0.028$), ER β 表达阳性和阴性的女性MST分别为45和37个月, 差异有统计学意义($P=0.033$)。在腺癌中ER β 阳性和阴性表达的MST分别为46和38个月, 差异有统计学意义($P=0.021$)。**结论:** ER β 在早期非吸烟NSCLC中表达增高, 是女性、腺癌生存期良好的标志。

[关键词] 非吸烟; 非小细胞肺癌; 雌激素受体

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2013.11.010

中图分类号: R734.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2013)11-0910-07

Relationships between survival and expressions of estrogen receptor α and β in non-smoking non-small cell lung cancer patients JIAN Hong¹, ZHU Lei², SHAO Jin-chen², ZHAO Yi¹, LI Chuan-jia¹, YU Yong-feng¹, ZHANG Jie² (1.Shanghai Lung Tumor Clinical Medical Center, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China; 2.Department of Pathology, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

Correspondence to: ZHANG Jie E-mail: jiezhang49@hotmail.com

[Abstract] **Background and purpose:** The involvement of estrogen signaling in lung cancer is controversial. But the findings showed that ER β might play an important role in neoplastic lung biology. Several studies have evaluated expression of ER β in both normal and neoplastic human lung tissues with variable conclusions. We aimed to evaluate the expressive of estrogen receptors (ER) α , β in non-smoking non-small cell lung cancer (NSCLC) and investigate the relationships between the survival and expressions of ER α , β . **Methods:** Immunohistochemical assay was used to detect the expression ER α and ER β in 144 NSCLC patients, and analyzed the expressions status of ER α , β and survival. **Results:** The positive rate of ER α was 7.6%, only in adenocarcinoma cancer. The positive rate of ER β was 52.1%, and the expressions of stage I and II was significantly higher than that of stage III and IV ($P=0.020$). The median survival time (MST) of ER β positive expression was better than that of negative expression (43 months vs 38 months, $P=0.028$). The MST of ER β positive expression of female patients was better than that of negative expression (45 months vs 37 months, $P=0.033$). The MST of ER β positive expression of adenocarcinoma were 46 months and better than negative 38 months ($P=0.021$). **Conclusion:** The expression of ER β was significantly higher in early-stage non-

smoking NSCLC. It indicated that the positive expression of ER β was related to the better MST, especially in female adenocarcinoma patients.

[Key words] Non-smoking; NSCLC; Estrogen receptor

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)至今仍是恶性肿瘤致死的主要原因, 吸烟已被证实为NSCLC发病的主要原因, 但近20年的流行病学研究显示, 随着烟草控制的深入, 与吸烟相关的男性肺癌发病率从90年代起在缓慢下降, 女性肺癌的发病率和病死率在持续上升^[1-2], 其中腺癌的比例明显增高。驱动基因研究显示在非吸烟、腺癌中EGFR突变的比例比正常肺癌人群显著增高, 且女性的比例明显高于男性, 并对EGFR的酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKI)敏感^[3]。研究显示, 女性肺癌的临床特征和生存期与男性肺癌不同^[4], 体外研究显示雌激素受体(estrogen receptor, ER)与肿瘤的增殖有关, 但在临床研究中ER与NSCLC患者的生存期的关系尚无明确的结论, 且是否与研究的人群过于宽泛有关尚不清楚。本研究旨在分析非吸烟NSCLC患者ER α 、ER β 的表达与生存期和性别的关系, 以期为临床治疗提供依据。

1 资料和方法

1.1 研究对象

收集上海胸科医院2009年7月—2010年7月手术切除的原发性初治非吸烟的NSCLC患者, 共144例。患者术前均行胸部CT、头颅CT、骨ECT、腹部B超或全身PET检查; 术式为肺叶或全肺切除术加系统淋巴结清扫术; 术后分期依照国际肺癌研究协会(IASLC)2009年的标准, 病理分型按WHO/IASLC组织学分类(2004)标准, 随访生存期至2013年7月。将治疗分为单纯手术、手术联合化疗、手术联合化疗及TKI治疗3组。

1.2 ER α 、ER β 免疫组化分析

手术标本经4%甲醛溶液固定, 常规石蜡

包埋。选取肿瘤组织丰富的石蜡块连续切片(4 μ m)。其中1张行常规HE染色, 证实为NSCLC; 另取2张分别用ER α 、ER β 单克隆抗体进行免疫组化染色, 1张备用。此外, 还包括ER α 兔抗人多克隆抗体(1:50, clone 6F11; Novocastra laboratories)、ER β (1:50, clone 14C8; GeneTex Inc)、EnVision试剂(美国DAKO公司)。

组织切片经二甲苯脱蜡3次, 每次20 min, 梯度乙醇水化后蒸馏水冲洗3次。PBS冲洗, 3%过氧化氢甲醇溶液处理。加1滴或50 μ L非免疫性动物血清10 min, 按照产品指南的方法及要求加入单克隆抗体作为一抗, 室温下温育24 h。PBS冲洗, 加100 μ L二抗, 室温下温育1 h。PBS冲洗, 每次5 min, 共冲洗3次。滴显色剂, 室温下温育10 min。苏木精套色5 min, 冲洗20 min。1%盐酸酒精分化, 冲洗20 min。切片经95%, 100%乙醇各两档脱水, 二甲苯透明中性树胶封片。ER用乳腺癌标本作为阳性对照。

采用免疫组化二步法EnVision System方法检测ER的表达, 采用Olympus光学显微镜以200倍观察切片。ER蛋白阳性细胞为细胞核呈棕黄色, 细胞质和细胞膜不着色, 高倍镜下随机选择5个视野, 每个视野记数100个细胞, 计算阳性细胞百分比 $\geq 10\%$ 者为蛋白表达阳性。

1.3 统计学处理

统计软件为SPSS 19.0, 应用描述性统计, χ^2 检验, Kaplan-Meier分析ER α 、ER β 的表达、性别、临床特点、治疗方法等因素与中位生存期(median survival time, MST)的关系, COX多因素分析生存期。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 非吸烟NSCLC患者的基本情况及ER α 、ER β 表达状况

144例非吸烟NSCLC患者中男性49例, 女性95例, 年龄28~75岁, 平均57.6岁, 中位年龄59岁。腺癌109例, 鳞癌24例, 鳞腺癌10例, 大细胞癌1例。I期64例, II期24例, III期41例, IV期15例。单纯手术34例, 手术联合化疗40例, 手术联合化疗及TKI治疗的共70例, 随访至2013年7月。ER α 、ER β 阳性表达分别为7.6%和52.1%。全组患者的MST为42个月, 男性为38(32.80~43.20)个月, 女性44(39.3~47.4)个月, 差异无统计学意义($P=0.434$)。

2.2 非吸烟NSCLC患者ER α 、ER β 表达与临床病理特征的关系

144例非吸烟NSCLC患者中ER α 阳性表达11例, 仅为7.6%, 表现为细胞核呈棕黄色染色(图1A)。男性和女性的表达率差异无统计学意义($P=0.623$)。ER α 仅在腺癌中表达(10.1%),

鳞癌、鳞腺癌、大细胞癌未见阳性表达。

I~IV期患者中ER α 的表达率差异无统计学意义($P=0.800$, 表1)。

144例非吸烟NSCLC患者中75例(52.1%)患者ER β 呈阳性表达, 细胞核内呈棕黄色染色(图1B)。男性和女性的表达率差异无统计学意义($P=0.593$)。ER β 在腺癌中表达率为51.4%, 鳞癌为54.2%, 鳞腺癌为50%, 大细胞癌为100%, 差异无统计学意义($P=0.801$)。I~IV期患者中ER β 表达差异有统计学意义($P=0.020$, 表1)。

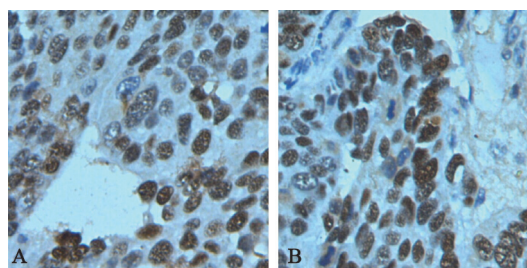


图1 ER α 及ER β 患者在非吸烟NSCLC中的表达

Fig. 1 Expression of ER α in non-smoking NSCLC patients (DAB, $\times 200$)

A: ER α ; B: ER β ; Both expression in nucleus of A and B were brown.

表1 非吸烟NSCLC患者ER α 、ER β 表达与不同性别、病理分型及分期的关系

Tab. 1 The relationship between the expressions of ER α and ER β in non-smoking NSCLC and different gender, pathological types and

	stage			
	ER α		ER β	
	Case	<i>P</i>	Case	<i>P</i>
Gender		0.623		0.592
Male	3		24	
Female	8		51	
Pathological types		0.281		0.801
Adenocarcinoma	11		56	
Squamous carcinoma	0		13	
Adeno squamous carcinoma	0		5	
Large cell	0		0	
Stage		0.800		0.020
I	4		40	
II	3		15	
III	3		15	
IV	1		5	

2.3 ER α 、ER β 表达与非吸烟肺癌生存期和性别的关系

随访至2013年7月, 随访期为48个月,

144例非吸烟NSCLC患者的MST为42个月, 男性为38个月, 女性44个月, 差异无统计学意义($P=0.434$)。病理类型差异无统计学意义

($P>0.05$), 分期显示 I 期和 II 期的生存期明显优于 III 期和 IV 期, 差异有统计学意义($P<0.05$)。单纯手术组生存期优于手术联合化疗及 TKI 组, 而手术联合化疗及 TKI 组生存期优于手术联合化疗组, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图 2)。ER α 阴性表达的 MST 为 41 个月(95% CI: 36.34~45.66), ER α 阳性表达的 MST 为 45 个月(95% CI: 30.33~59.66), 尽管 ER α 阳性表达的生存期优于 ER α 阴性表达, 但差异无统计学意义($P=0.671$)。进一步分析 ER α 表达阳性的患者生存期与性别、病理类型和分期的关系, 因阳性表达率低, SPSS 无法给出 MST。

144 例非吸烟 NSCLC 患者中 ER β 阳性表达为 52.1%, 其阳性表达的 MST 为 43(38.74~44.06) 个

月, 明显高于阴性表达的 38(35.33~40.67) 个月, 差异有统计学意义($P=0.028$)。男性患者 ER β 表达阳性和阴性的 MST 分别均为 45 和 38 个月, 差异无统计学意义($P>0.05$), 而女性患者 ER β 表达阳性和阴性的 MST 分别均为 45 和 37 个月, 差异有统计学意义($P=0.033$)。在腺癌患者中, ER β 表达为阳性和阴性的 MST 分别为 46 和 38 个月, 差异有统计学意义($P=0.021$); 鳞癌、腺鳞癌患者的 MST 与 ER β 的表达状态之间差异无统计学意义($P>0.05$)。ER β 表达状态在不同的治疗组中差异无统计学意义($P>0.05$, 表 2)。多因素分析生存期仅与分期相关, I 期、II 期是生存期延长的主要因素(表 3, 图 2)。

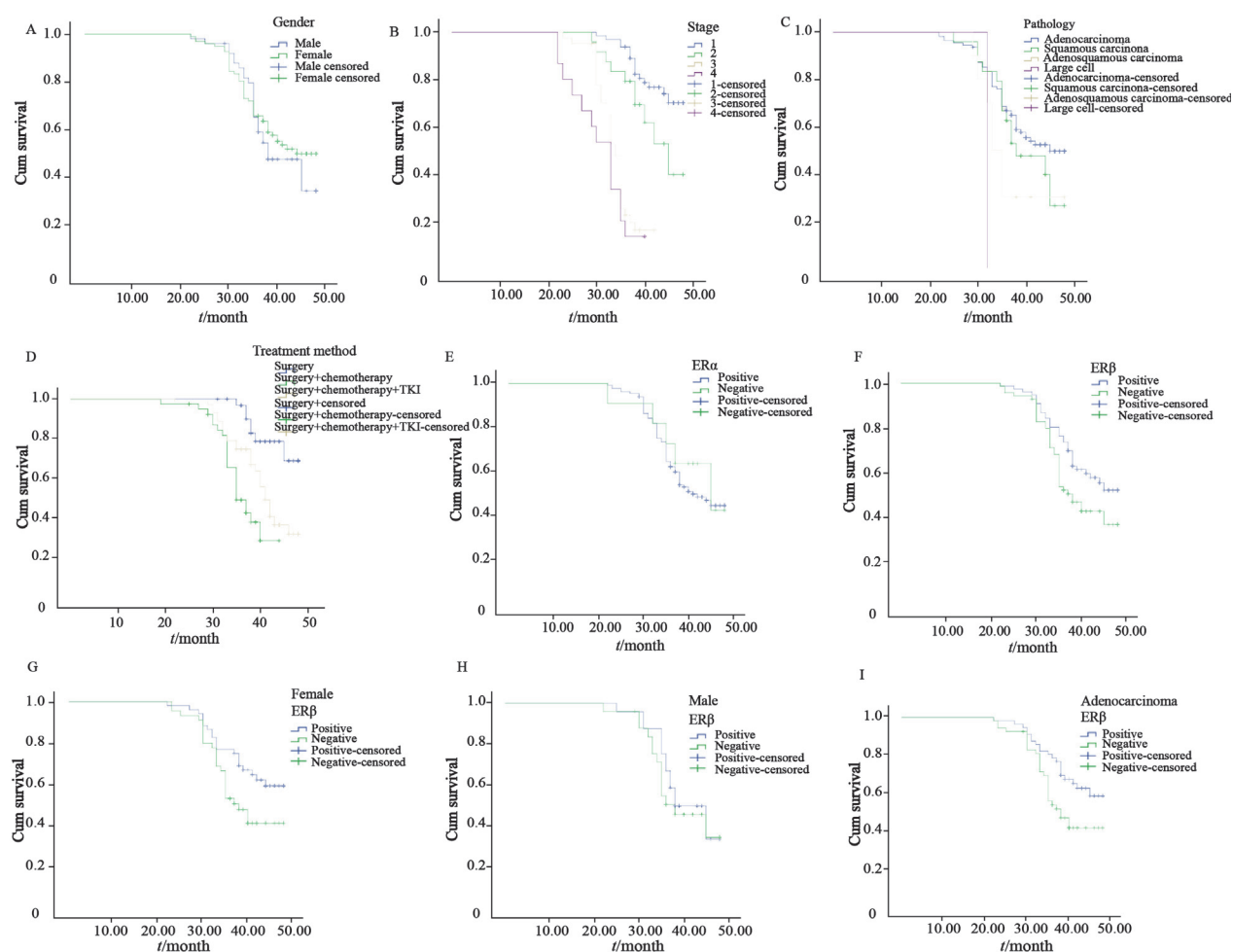


图 2 144 例患者不同因素影响下的生存期分析

Fig. 2 The survival curves of 144 patients by different factors

A: Gender, $P=0.434$; B: Pathology, $P=0.058$; C: Stage, $P=0.000$; D: Treatment methods, $P=0.000$; E: The expression of ER α and MST, $P=0.671$; F: The expression of ER β and MST, $P=0.028$; G: The expression of ER β and the MST of female patients, $P=0.033$; H: The expression of ER β and the MST of male patients, $P=0.547$; I: The expression of ER β and MST of adenocarcinoma, $P=0.021$.

表2 非吸烟NSCLC患者ER β 表达与生存期的关系Tab. 2 Expressions of ER β in non-smoking NSCLC and the correlation with median survival time (MST)

	Total		ER β (+/-)	
	MST	P	MST(+/-)	P
Total	42		43/38	0.028
Gender				
Male	38	0.434	45/38	0.547
Female	44		45/37	0.033
Pathology				
Adenocarcinoma	45		46/38	0.021
Squamous carcinoma	38	0.058	44/35	0.434
Adenosquamous carcinoma	33		35/33	0.934
Large cell	32		32/32	/
Stage				
I	46	0.000	45/43	0.308
II	45		45/40	0.850
III	34		35/33	0.606
IV	32		33/27	0.312
Treatment method				
Surgery	46	0.000	46/45	0.945
Surgery+chemotherapy	35		38/35	0.829
Surgery+chemotherapy +TKI	41		42/41	0.634

表3 多因素分析总生存期相关数据

Tab. 3 Multivariate analysis of overall survival

Stage	B	SE	Wald	Sig.	Exp(B)	95%CI	
						Lower	Upper
1	-1.852	0.375	24.340	0.000	0.157	0.075	0.328
2	-1.238	0.422	8.613	0.003	0.290	0.127	0.663
3	-0.199	0.329	0.368	0.544	0.819	0.430	1.560

3 讨 论

Chaudhuri等^[5]研究发现,肺癌组织中存在ER, 现已知ER有ER α 、ER β 两种亚型;通过体外实验发现,雌二醇对肺癌细胞株和正常肺纤维细胞有增殖效应,用雌二醇进行温育,肺癌传代细胞株增殖增加17倍,而正常肺纤维细胞增殖增加仅3.8倍,提示恶性细胞对雌激素的反应更敏感。有研究发现,早期绝经的妇女患肺腺癌的风险下降,而雌激素替代治疗的患者肺癌发病风险明显升高,女性绝经前较绝经后更易患广泛性的病变和腺癌,绝经前肺癌患者相关病死率与年轻男性相似,而绝经后女性患者的病死率低于老年男性^[6-8]。雌激素的致癌作用与雌激素代谢过程中产生的中间产物有关,这些产物可使DNA损伤、断裂,导致基因突变。雌激素在生理浓度下并不产生致癌结果,但在较高的浓度下,在具有儿茶酚雌激素

合成酶系和(或)灭活儿茶酚雌激素的酶系活性低下的器官则可能发生肿瘤。其促进雌激素依赖性肿瘤的增殖可通过以下机制:①调节与细胞分裂有关的早期基因,如c-myc、c-jun和c-fos的表达,促进DNA合成和细胞分裂;②调节与细胞周期有关的调节蛋白,如cyclin B2的表达而影响细胞的增殖;③刺激生长因子如表皮生长因子、胰岛素样生长因子II、转化生长因子- α 的表达而促使细胞增殖^[9-12]。

本研究结果提示,在非吸烟NSCLC中,ER α 和ER β 的表达状况是不同的,ER α 阳性表达率为7.6%,仅在腺癌中表达,在鳞癌、鳞腺癌、大细胞癌中无表达。尽管ER α 阳性表达的患者生存期优于阴性患者,然而其由于表达率低,差异无统计学意义($P>0.05$)。而ER β 表达率为52.1%,I、II期患者表达明显高于III、IV期。ER β 阳性表达为预后良好,ER β 阳性和阴性表达患者的MST分别为43和38个月,差异有

统计学意义($P=0.028$)。ER β 表达与性别相关,其表达阳性和阴性的女性患者MST分别为45和37个月,差异有统计学意义($P=0.033$),ER β 表达阳性和阴性的腺癌患者MST分别为46和38个月,差异有统计学意义($P=0.021$)。由此可见,非吸烟NSCLC患者ER β 阳性表达主要发生在肺癌早期,是女性腺癌预后良好的标志。ER β 表达状况在不同的治疗组中生存期差异无统计学意义,预示其并不是一个预测疗效的指标。多因素分析结果显示,影响生存期的因素仅为分期。

Siegfried等^[13]的研究结果显示,ER β 在肺癌组织中的表达率为40%~69%,Mohit等^[14]报道为87.5%,Li等^[15]报道为89.0%,均显著高于本研究的结果,究其原因为本组患者为非吸烟NSCLC,女性占66%,I、II期患者占61.7%,为相对预后良好的人群。Navaranam等^[16]报道了一项75%为早期患者的研究,其ER β 阳性率为51%,而在相对晚期的BR18的人群中为49%,对于ER的表达是否与性别、病理类型呈正相关,目前尚无统一的观点。Wu等^[17]采用免疫组化方法研究301例I~III期NSCLC患者手术切除标本的ER β 表达,结果显示,女性患者的阳性率为53%,高于男性的39.7%($P=0.012$),并发现ER β 表达与患者的生存期明显相关,是预后良好的标志。然而这一结果并没有被广泛验证,大量的研究仍局限在ER的表达水平。Navaratnam等^[16]的研究结果显示,在早期和晚期NSCLC患者中,ER β 的表达情况对应着不同的生存期,早期肺癌中无论单因素还是多因素分析结果均显示,ER β 是预后良好的标志,而在晚期患者中,ER β 是预后不良的标志,可能是因为肿瘤在不同期别信号传导因子的活性和通路不同,如TGF β 家族在乳腺癌进展中会出现不同亚基的表达,导致ER β 在功能上担任不同信号传导机制的活性分子。ER调节多种信号因子,在肺腺癌中调节MK蛋白的表达从而调控EMT促进转移,而ER β 与芳香化酶有高度一致的协同表达,与肺癌性别依赖的

生存优势密切相关。鉴于ER的复杂性,有必要按不同人群、期别进行研究。

[参 考 文 献]

- [1] JEMAL A, SIEGEL R, XU J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. *Cancer J Clin*, 2010, 60: 277-300.
- [2] JEMAL A, THUN M J, RIES L A, et al: Annual report to the nation on the status of cancer, tobacco use, and tobacco control [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2008, 100: 1672-94.
- [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: 947-957.
- [4] JIAN H, ZHAO Y, LIAO M L, et al. The analysis of clinic characteristic and survival by gender in resected NSCLC [J]. *China Oncol*, 2012, 22(11): 825-830.
- [5] CHAUDHURI P K, THOMAS P A, WALKER M J, et al. Steroid receptors in human lung cancer cytosols [J]. *Cancer Lett*, 1982, 16(3): 327-332.
- [6] ADAMI HO, PERSSON I, HOOVER R, et al. Risk of cancer in women receiving hormone replacement therapy [J]. *Int J Cancer*, 1989, 44: 833-839.
- [7] SCHWAARTZ A G, WENZLAFF A S, PRYSAK G M, et al. Reproductive factors, hormone use, estrogen receptor expression and risk of non-small cell lung cancer in women [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(36): 5785-5792.
- [8] GRIDELLI C, LANGER C, MAIONE P, et al. Lung cancer in the elderly [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25: 1898-1907.
- [9] TANG H, LIAO Y, CHEN G, et al. Estrogen upregulates the IGF-1 signaling pathway in lung cancer through estrogen receptor- β [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(4): 2640-2648.
- [10] ZHAO G, NIE Y, LV M, et al. ER β -mediated estradiol enhances epithelial mesenchymal transition of lung adenocarcinoma through increasing transcription of midkine [J]. *Mol Endocrinol*, 2012, 26(8): 1304-1315.
- [11] GARON E B, PIETRAS R J, FINN R S, et al. Antiestrogen fulvestrant enhances the antiproliferative effects of epidermal growth factor receptor inhibitors in human non-small-cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2013, 8(3): 270-278.
- [12] TANG H, LIAO Y, XU L, et al. Estrogen and insulin-like growth factor 1 synergistically promote the development of lung adenocarcinoma in mice [J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(10): 2473-2482.
- [13] SIEGFRIED J M, HERSHBERGER P A, STABILE L P. Estrogen receptor signaling in lung cancer [J]. *Semin Oncol*, 2009, 36(6): 524-531.
- [14] MOHIT K V, YASUHIRO M, KEIKO A, et al. Co-expression of estrogen receptor beta and aromatase in Japanese lung cancer patients: gender-dependent clinical outcome [J]. *Life Sci*, 2012, 91(15-16): 800-808.
- [15] LI L, WANG H, DU J, et al. Expressions and clinicopathological characteristics of estrogen receptor α , β

- and epidermal growth factor in non-small cell lung cancer [J]. *Modern Oncol*, 2013, 21(3): 539-543.
- [16] NAVARATNAM S, SKLIRIS G, QING G, et al. Differential role of estrogen receptor beta in early versus metastatic non-small cell lung cancer [J]. *Horm Cancer*, 2012, 3: 93-100.
- [17] WU C, CHANG Y, SHIH J, et al. The significance of estrogen receptor beta in 301 surgically treated non-small cell lung cancers [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2005, 130(4): 979-986.

(收稿日期: 2013-08-10 修回日期: 2013-10-15)

欢迎订阅2013年《循证医学》杂志

《循证医学》是经国家新闻出版署批准, 广东省卫生厅主管, 由广东省循证医学研究中心、广东省人民医院和中山大学附属第三医院主办的医学学术期刊。现为“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”, 《CNKI中国期刊全文数据库》、“万方数据—数字化期刊群”全文收录期刊, “中国学术期刊综合评价数据库”统计源期刊, 《中国科学引文数据库》、《中国生物医学文献数据库》、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中文生物医学期刊文献数据库》、《中文科技期刊数据库》来源期刊, 荣获首届《CAJ-CD规范》执行优秀期刊奖。

主编吴一龙(广东省人民医院副院长、广东省人民医院肿瘤中心主任、广东省肺癌研究所所长、广东省循证医学研究中心主任, 中山大学、南方医科大学、汕头大学、广东省心血管病研究所肿瘤学教授, 博士生导师)。本刊以广大医药卫生技术人员和医疗、教学、科研管理工作者为读者对象, 立足临床医学, 介绍循证医学(evidence-based medicine, EBM)的理念、方法及相关知识, 探讨符合中国国情的循证医学实践, 促进国内外医学学术交流和医学科学发展。

本刊以临床实践指导性为特色, 设置的主要栏目有: 先睹为快、述评、特别报告、循证评价、论著(包括诊断性研究、疗效研究、病因学研究、疾病的预后研究等)、证据的寻求与评价、循证医学中的医学统计学问题、循证医学理论与方法研究、综述与讲座、教育与争鸣、循证医学在线、循证病例讨论、临床指引与共识等。诚挚欢迎投稿。

《循证医学》杂志的国际标准刊号: ISSN 1671-5144, 国内统一刊号: CN 44-1548, 双月刊、大16开本、64页, 国内定价每期10元, 全年60元。欲订阅者请从全国各地邮局订购, 邮发代号 46-326, 也可直接从本刊编辑部邮购。欢迎新老朋友订阅本刊。

地址: 广州市中山二路106号广东省人民医院《循证医学》编辑部(510080)。

电话: 020-83844620, 020-83827812-51482;

传真: 020-83844620

网址: www.jebm.cn

E-mail: xzyxzz@163.net

《循证医学编辑部》