

血浆热休克蛋白 90 α 联合临床特征 对非小细胞肺癌 EGFR 突变的预测价值

许露 郭嘉 吴海波 高敏 徐方舟 张妍蓓

摘要 目的 探究非小细胞肺癌患者的血浆热休克蛋白 90 α (HSP90 α) 表达水平联合临床特征与表皮生长因子受体 (EGFR) 基因突变的相关性。方法 收集分析 89 例首次明确诊断为非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者的血浆 HSP90 α 及性别、临床分期及有无转移资料,探究其与 EGFR 基因突变间是否存在相关性。结果 女性、ⅢB~Ⅳ期、转移患者,EGFR 基因突变率 (58.97%、49.33% 和 54.55%) 高于男性、Ⅰ~ⅢA 期患者、无转移患者 (32.00%、14.29% 和 13.04%, $P < 0.05$); EGFR 基因突变组血浆 HSP90 α 水平较野生组升高 ($P < 0.05$); 联合检测 Hsp90 α 、性别、临床分期及转移比各项指标单独检测对 EGFR 突变的诊断敏感性提高 ($P < 0.001$)。结论 血浆 HSP90 α 水平联合患者性别、临床分期及转移对预测 EGFR 突变具有临床意义,联合检测可提高诊断效能。

关键词 非小细胞肺癌; 热休克蛋白 90 α ; 临床特征; 表皮生长因子受体

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)08-1280-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.08.026

在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 患者中,最为重要的分子靶向基因是表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) [1]。目前常用的基因突变检测方法: 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)、Sanger 测序法、下一代测序技术 (next-generation sequencing technology, NGS) 等,因受限于标本的来源、检测技术要求高及费用昂贵等因素的影响,目前难以普及开展。特异性血浆肿瘤标志物对恶性肿瘤患者的诊断具有重要作用,且取材方便、检测速度快、患者配合度高,更加适用于肺癌突变基因的早期筛检。热休克蛋白 90 (heat shock proteins 90, HSP90) 是一种

新发现的具有分子伴侣功能,腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 依赖的,高度保守的蛋白质,其在细胞内与多种细胞周期信号通路中的关键蛋白酶相互作用,调控细胞的生存、分化及代谢等重要生理过程 [2]。有研究表明,肺癌及其他实体肿瘤患者的血浆 HSP90 α 表达水平显著高于健康人群。说明血液 HSP90 α 在肺癌的早期筛检中有一定作用 [3]。

目前尚无血浆 HSP90 α 联合临床特征预测 NSCLC 患者 EGFR 基因突变的研究,因此,该文回顾性研究患者治疗前 HSP90 α 浓度联合性别、肿瘤分期及转移的接受者操作特性曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC),旨在探索四者联合对 NSCLC 患者 EGFR 基因突变的预测价值。

1 资料与方法

1.1 病例资料 收集 89 例于 2016 年 3 月 14 日~2019 年 10 月 1 日就诊于安徽医科大学第一附属医院行经支气管镜肺活检术 (transbronchial lung biopsy, TBLB) 或 CT 引导下经皮穿刺肺活检术 (percutaneous aspiration lung biopsy, PALB) 进行病理学确诊并行基因检测的 NSCLC 患者。其中男性 50 例,女性 39 例,年龄为 30~89 (64.12 $\pm$ 11.084) 岁; 腺癌 71 例,鳞癌 10 例,未分类 8 例; 临床分期为 Ⅰ~ⅢA 期 14 例,ⅢB~Ⅳ期 75 例; 发生远处转移为 66 例,23 例无远处转移; 患者中 39 例有 EGFR 突变,50 例无 EGFR 突变。所有入选患者均为首次诊断; 无其他肿瘤疾病史及肝、肾等重要脏器严重病变,无内分泌代谢紊乱史。

1.2 HSP90 α 浓度测定 患者均在入院第 2 天空腹使用 EDTA 抗凝管采集静脉血 2 ml,于 4 $^{\circ}\text{C}$, 3 000 r/min,离心 10 min,分离血浆,并于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。所有标本统一解冻后,应用 ELISA 检测血浆 HSP90 α 浓度,具体检测方法严格按说明书进行。其定量检测试剂盒、酶免分析仪均由烟台普罗吉生物科技发展有限公司提供。HSP90 α 正常参考值范围为: 0~82.06 ng/ml。

2020-05-15 接收

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目 (编号: KJ2018A0208)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院老年呼吸与危重症学科,合肥 230022

作者简介: 许露,女,硕士研究生;

张妍蓓,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,

E-mail: zhangyanbei1963@126.com

1.3 EGFR 基因检测 血液/组织基因组按照 DNA 提取试剂盒提取,由天根生化科技(北京)有限公司提供。利用天津诺禾致源生物科技有限公司提供的实体瘤靶向用药基因建库试剂盒(仅供科研使用)构建文库。使用美国 Illumina 公司的测序高通量测序上机测序试剂盒对多位点文库进行测序。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计数据处理和分析,所有实验结果中计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料采用频数(n)和率(%)形式表示。采用两样本独立 t 检验分析 EGFR 突变组和野生组与 HSP90 α 表达水平之间的关系,采用 χ^2 检验分析比较 EGFR 基因突变率在 HSP90 α 及各临床特征间差异。ROC 曲线分析 HSP90 α 浓度与性别、转移和肿瘤分期预测 NSCLC EGFR 基因的突变。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床特征与 EGFR 基因突变分析 将患者的不同临床病理特征分组,进而比较 EGFR 基因检测结果发现,EGFR 突变率与患者的性别、肿瘤转移及分期均有相关性,差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见表 1。

表 1 EGFR 突变与临床病理特征的关系 [n (%)]

临床特征	n	EGFR 基因		χ^2	P 值
		突变($n=39$)	野生($n=50$)		
年龄(岁)				0.432	0.511
≥60	64	27(42.19)	37(57.81)		
<60	25	12(48.00)	13(52.00)		
性别				6.476	0.011
男	50	16(32.00)	34(68.00)		
女	39	23(58.97)	16(41.03)		
转移				11.933	0.001
无	23	3(13.04)	20(86.96)		
有	66	36(54.55)	30(45.45)		
肿瘤类型				2.200	0.138
腺癌	71	36(50.70)	35(49.30)		
鳞癌	10	2(20.00)	8(80.00)		
临床分期				5.887	0.015
I~III A	14	2(14.29)	12(85.71)		
III B~IV	75	37(49.33)	38(50.67)		

2.2 HSP90 α 与 EGFR 突变的关系分析 将 HSP90 α 表达水平与正常参考值范围比较,分为正常组及异常组,分析两组 HSP90 α 不同表达水平与 EGFR 基因的关系。数据分析发现 EGFR 突变与 HSP90 α 的水平升高有关。详见表 2。

表 2 EGFR 与 HSP90 α 异常表达水平的关系 [n (%)]

HSP90 α 浓度(ng/mL)	n	EGFR 基因		t 值	P 值
		突变($n=39$)	野生($n=50$)		
≤82.06	61	54.73 ± 16.49	50.23 ± 16.08	-1.018	0.313
>82.06	28	126.61 ± 48.81	98.04 ± 11.84	-2.406	0.025
总计	89	89.75 ± 50.88	58.84 ± 24.042	-3.501	0.001

按不同 HSP90 α 浓度梯度分组进行统计分析,结果显示不同浓度的 HSP90 α 与 EGFR 突变有统计学意义,且 HSP90 α 表达水平越高,EGFR 基因突变率越高。详见表 3。

表 3 不同 HSP90 α 浓度与 EGFR 检测结果的比较 [n (%)]

HSP90 α 浓度 (ng/mL)	n	EGFR 基因	
		突变($n=39$)	野生($n=50$)
≤82.06	61	20(32.79)	41(67.21)
>82.06~150	23	14(60.87)	9(39.13)
>150~200	3	3(100.00)	0(0.00)
>200	2	2(100.00)	0(0.00)
χ^2 值			12.142
P 值			0.007

2.3 HSP90 α 联合临床特征预测 EGFR 突变 采用 ROC 曲线分析比较 89 例 NSCLC 患者的 HSP90 α 浓度及性别、临床分期及转移单独或联合诊断 EGFR 突变的效能。见图 1。

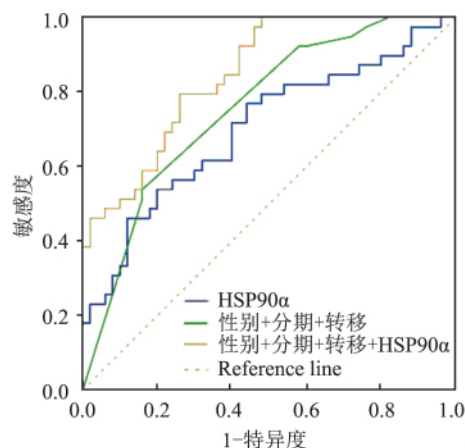


图 1 血清中 HSP90 α 及临床特征
单一或联合对 EGFR 突变诊断的 ROC 曲线

HSP90 α 浓度及性别、临床分期及转移联合诊断的 ROC 曲线 AUC 为 0.848,在临界值时的敏感度为 0.795 特异度为 0.740。可见 HSP90 α 浓度及性别、临床分期及转移四项联合检测可以提高 EGFR 突变诊断的效能。见表 4。

2.4 HSP90 α 水平与各临床特征之间的关系 比较不同临床特征的患者 HSP90 α 表达水平的差异,

表4 临床特征与血浆 HSP90 α 浓度对 EGFR 突变的诊断价值比较

指标	AUC(95% CI)	敏感度	特异度	约登指数	P 值
HSP90 α	0.701(0.589 ~ 0.812)	0.462	0.880	0.342	0.001
性别 + 分期 + 转移	0.756(0.657 ~ 0.856)	0.538	0.840	0.378	<0.001
性别 + 分期 + 转移 + HSP90 α	0.848(0.771 ~ 0.924)	0.795	0.740	0.535	<0.001

结果显示仅患者是否转移组别间 HSP90 α 的表达水平存在差异,有转移者 HSP90 α 表达水平异常率较高,其他不同临床特征的患者 HSP90 α 表达水平无差异。详见表 5。

表5 临床特征与血浆 HSP90 α 浓度表达水平差异的比较[n(%)]

临床特征	n	HSP90 α		χ^2 值	P 值
		正常(n=61)	异常(n=28)		
年龄				0.005	0.945
≥60	64	44(68.75)	20(31.25)		
<60	25	17(68.00)	8(32.00)		
性别				2.263	0.133
男	50	31(62.00)	19(38.00)		
女	39	30(76.92)	9(23.08)		
转移				4.879	0.027
无	23	20(86.96)	3(13.04)		
有	66	41(62.12)	25(37.88)		
肿瘤类型				0.158	0.691
腺癌	71	51(71.83)	20(28.17)		
鳞癌	10	6(60.00)	4(40.00)		
临床分期				2.300	0.129
I ~ IIIA	14	12(85.71)	2(14.29)		
III B ~ IV	75	39(52.00)	26(34.67)		

3 讨论

随着基因检测手段的发展和精准医疗概念的推广,肺癌的治疗模式已转向靶向特定信号通路中的相关异常分子。EGFR 是一种分布于上皮细胞表面的跨膜糖蛋白,由胞外配体结合区、跨膜区和胞内酪氨酸激酶结合区组成。据统计^[4],EGFR 基因敏感突变在晚期 NSCLC 患者中的发生率约为 10% ~ 20%。近年来,针对 EGFR 基因的治疗在临床取得了显著的疗效,比传统的化疗方案更能够显著延长患者的中位生存期,引领了肺癌靶向治疗的前行步伐。有研究^[5]表明,EGFR 基因突变在亚洲、女性、不吸烟及腺癌的患者中发生率更高,EGFR 基因突变患者相对更易出现转移,最常见的是骨转移与脑转移^[6],亦说明肿瘤分期越晚 EGFR 基因突变的机率越大。本研究数据表明 EGFR 基因突变率在女性、III B ~ IV 期、转移的患者(58.97%、49.33% 和 54.55%) 高于男性、I ~ IIIA 期患者、无转移患者(32.00%、14.29% 和 13.04% $P < 0.05$) ,与以往研

究结果一致。

HSP90 是一类分子质量约为 90 ku 的同二聚体蛋白,在 NSCLC 患者中高表达,其升高与年龄、既往吸烟史、淋巴结转移呈正相关^[7],可以预测患者的预后。HSP90 α 是 HSP90 亚型中唯一可以在血浆中被检测到的。我们的研究显示 HSP90 α 高表达与 NSCLC 患者发生转移有关($P = 0.027$),已有的研究^[8-9]表明在胃癌、肝癌、乳腺癌患者中,将无转移灶患者和发生转移患者的血浆 HSP90 α 水平进行比较,在发生转移的患者中血浆 HSP90 α 明显增高。

已知 HSP90 α 的底物蛋白有 200 多种,其中包括 EGFR、人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)、血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)、蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt) 等,在细胞中充当细胞因子,参与细胞的各种生命活动^[10]。HSP90 α 在肿瘤发生发展过程中起到了维持 EGFR 功能稳定的作用,在多种肿瘤组织中表达增高,参与肿瘤进展的许多关键环节^[11]。在本研究中,当 HSP90 α 表达水平异常升高(HSP90 α > 82.06 ng/ml 提示异常) 情况下,患者 EGFR 突变风险高于正常值($P = 0.025$),说明 HSP90 α 升高与 EGFR 的突变正相关。本研究数据分析还发现,随着浓度的升高,EGFR 基因突变率呈上升趋势($P = 0.007$)。

有研究^[12]显示检测 HSP90 α 有助于评估 NSCLC 患者化疗疗效并指导治疗。亦有研究^[13]证实 HSP90 抑制剂与 EGFR-TKI 联合使用,可使抑制肺癌细胞增殖及诱导细胞死亡的作用加强。故 HSP90 α 高水平表达与 EGFR 突变之间存在关联。因基因检测操作技术有创且费用昂贵,在我国基因检测率尚不高。因此,研究 HSP90 α 及临床特征来预测 EGFR 基因突变也是有意义。本研究分析,发现 HSP90 α 对于预测 EGFR 基因突变的敏感度尚可,但特异度欠佳,可能与 HSP90 α 异常高水平表达时,才与 EGFR 突变正相关,同时本研究的病例中 HSP90 α 异常比例相对较低,不排除存在选择偏移的影响。如果综合性别、肿瘤分期、转移和 HSP90 α 来预测 EGFR 基因突变情况,可见敏感度提高(79.5%) ($P < 0.001$),这说明综合临床特征预测

EGFR 基因突变中血浆 HSP90 α 起很重要的作用。

临床中患者为女性,分期为ⅢB~Ⅳ期,有局部转移,且 HSP90 α 超过 82.06 ng/ml,根据研究的预测模型,可指导疑似突变患者进一步行病理检测确诊,对于难行病理活检的患者可考虑应用靶向治疗。因 EGFR 基因突变检测也存在异质性,部分检测阴性的患者,也能从靶向治疗中获益。因此,如果符合该预测模型中的各个因素,考虑 EGFR 突变可能性较大,可指导进一步确诊或靶向治疗。

参考文献

- [1] Remon J, Ahn M J, Girard N, et al. Advanced-stage non-small cell lung cancer: Advances in thoracic oncology 2018 [J]. *J Thorac Oncol*, 2019, 14(7): 1134–55.
- [2] Ciocca D R, Calderwood S K. Heat-shock proteins in cancer: Diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2005, 10(2): 86–103.
- [3] 张翠红,夏云亚,胡佩,等.血清肿瘤标志物联合 Ki-67、HSP90 α 检测肺癌的诊断价值及临床意义 [J]. *国际检验医学杂志* 2019, 40(8): 987–90.
- [4] Tokumo M, Toyooka S, Kiura K, et al. The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3): 1167–73.
- [5] Paez J G, Jänne P A, Lee J C, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy [J]. *Science*, 2004, 304(5676): 1497–500.
- [6] Guan J, Chen M, Xiao N, et al. EGFR mutations are associated with higher incidence of distant metastases and smaller tumor size in patients with non-small-cell lung cancer based on PET/CT scan [J]. *Med Oncol*, 2016, 33(1): 1.
- [7] Su J M, Hsu Y Y, Lin P, et al. Nuclear Accumulation of Heat-shock Protein 90 Is Associated with Poor Survival and Metastasis in Patients with Non-small Cell Lung Cancer [J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(5): 2197–203.
- [8] 程伟才,汪立鑫,宫红彦,等.热休克蛋白 90- α 在胃癌诊断中的意义 [J]. *当代医学* 2019, 25(18): 47–9.
- [9] Wang X, Song X, Zhuo W, et al. The regulatory mechanism of Hsp90 α secretion and its function in tumor malignancy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(50): 21288–93.
- [10] Li J, Buchner J. Structure, function and regulation of the Hsp90 machinery [J]. *Biomed J*, 2013, 36(3): 106–17.
- [11] Ferrarini M, Heltai S, Zocchi M R, et al. Unusual expression and localization of heat shock proteins in human tumor cells [J]. *Int J Cancer*, 1992, 51(4): 613–9.
- [12] 刘若男,江倩,柯张延,等.血浆热休克蛋白 90 α 评估非小细胞肺癌化疗疗效的意义 [J]. *实用医学杂志* 2018, 34(13): 2115–8.
- [13] Smith D L, Acquaviva J, Sequeira M, et al. The HSP90 inhibitor ganetespib potentiates the antitumor activity of EGFR tyrosine kinase inhibition in mutant and wild-type non-small cell lung cancer [J]. *Target Oncol*, 2015, 10(2): 235–45.

Predictive value of plasma HSP90 α combined with clinicopathologic features for EGFR mutations in non – small cell lung cancer

Xu Lu, Guo Jia, Wu Haibo, et al

(Dept of Geriatric Respiratory and Critical Care, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the predictive value of plasma heat shock protein 90 α (HSP90 α) and clinicopathologic features on epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutation in patients with non-small cell lung cancer. **Methods** The data of plasma Hsp90 α , gender, clinical stage and the presence of metastasis in 89 newly diagnosed patients of non-small cell lung cancer (NSCLC) were collected, and the predictive value of those data on EGFR gene mutation was retrospectively analyzed. **Results** The mutation rate of EGFR gene in female, stage ⅢB~Ⅳ and metastasis patients (58.97%, 49.33% and 54.55%) was significantly higher than that in male, stage I~ⅢA and non-metastasis patients (32.00%, 14.29% and 13.04%, $P < 0.05$). The level of HSP90 α in the EGFR mutant group was higher than that in the wild group ($P < 0.05$). Combined detection of HSP90 α , gender, clinical stage and metastasis increased the diagnostic sensitivity of EGFR mutations compared with each indicator alone ($P < 0.001$). **Conclusion** The level of Plasma HSP90 α combined with patients' gender, clinical stage and metastasis has a high clinical value in predicting EGFR mutation, and the combined detection can improve the diagnostic efficacy.

Key words non-small cell lung cancer; heat shock protein 90 α ; clinicopathologic features; epidermal growth factor receptor