

EGFR 和 ErbB2 表达对肺腺癌纵隔淋巴结转移的预测作用*

蒋萱, 罗佳, 张晓月, 黄玉胜, 夏蕾, 余娴, 杨镇洲[△]

400010 重庆, 重庆医科大学附属第二医院 肿瘤中心(蒋萱、张晓月、黄玉胜、夏蕾、余娴、杨镇洲);
400042 重庆, 陆军特色医学中心 肿瘤中心(罗佳)

[摘要] 目的:探讨表皮因子生长受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、表皮生长因子受体2(ErbB2)表达水平对肺腺癌纵隔淋巴结转移的预测作用。方法:对30例术后病理确诊为腺癌、接受纵隔淋巴结清扫的EGFR突变患者原发灶标本进行免疫组化、PCR分析。了解EGFR及ErbB2在EGFR突变型肺腺癌患者原发灶中蛋白及mRNA水平表达情况,探索两者与纵隔淋巴结转移之间的关系。结果:EGFR蛋白水平在具有纵隔淋巴结转移组中的表达高于其在无纵隔淋巴结转移组中的表达($P=0.048$),EGFR强阳性表达率在纵隔淋巴结转移组中高于无纵隔淋巴结转移组($P=0.041$),ErbB2蛋白水平在具有纵隔淋巴结转移组中的表达高于其在无纵隔淋巴结转移组中的表达($P=0.002$),ErbB2阳性表达率在纵隔淋巴结转移组中显著高于无纵隔淋巴结转移组($P<0.001$)。EGFR与ErbB2蛋白表达及mRNA转录均具有相关性(r 值分别为0.975, 0.521)。结论:EGFR强阳性表达、ErbB2阳性表达可能可以作为EGFR突变型肺腺癌患者纵隔淋巴结转移的预测因子。

[关键词] 肺腺癌;表皮生长因子受体(EGFR);EGFR突变;ErbB2;纵隔淋巴结;差异表达基因

[中图分类号] R734.2;R730.4 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2019.09.010

引文格式:Jiang X, Luo J, Zhang XY, et al. Higher expression of EGFR and ErbB2 potentially predict mediastinal lymph node metastasis in lung adenocarcinoma[J]. J Cancer Control Treat, 2019, 32(9):816-822. [蒋萱, 罗佳, 张晓月, 等. EGFR 和 ErbB2 表达对肺腺癌纵隔淋巴结转移的预测作用[J]. 肿瘤预防与治疗, 2019, 32(9):816-822.]

Higher Expression of EGFR and ErbB2 Potentially Predict Mediastinal Lymph Node Metastasis in Lung Adenocarcinoma

Jiang Xuan, Luo Jia, Zhang Xiaoyue, Huang Yusheng, Xia Lei, Yu Xian, Yang Zhenzhou[△]

Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China (Jiang Xuan, Zhang Xiaoyue, Huang Yusheng, Xia Lei, Yu Xian, Yang Zhenzhou); Department of Oncology, the Third Affiliated Hospital (Daping Hospital) of the Third Military Medical University and the Research Institute of Surgery of the Academy of Military Medical Science, Chongqing 400042, China (Luo Jia)

Corresponding author: Yang Zhenzhou, E-mail: yangzz1970@163.com

This study was supported by grants from Chongqing science and Technology Bureau (NO. cstc2015jcyjBX0084).

[Abstract] **Objective:** To investigate the predictive value of epidermal growth factor receptor (EGFR) and ErbB2 expression on mediastinal lymph node (MLN) metastasis in lung adenocarcinoma with EGFR mutation. **Methods:** Immunohisto-

chemistry and polymerase chain reaction (PCR) were used to test the expression of EGFR and ErbB2 in 30 lung adenocarcinoma patients who received MLN dissection and demonstrated EGFR mutations. We studied the expression of EGFR and ErbB2 in protein and mRNA in primary foci in pa-

[收稿日期] 2019-05-09 **[修回日期]** 2019-09-09

[基金项目] *重庆市科委基础研究与前沿探索重点项目 (编号:cstc2015jcyjBX0084)

[通讯作者] [△]杨镇洲, E-mail: yangzz1970@163.com

tients with EGFR-mutant lung adenocarcinoma, and explored the relationship between them and MLN metastasis. **Results:** Expressions of EGFR was higher in the MLN metastasis (MLNM) group than that in the non-MLNM (NMLNM) group ($P = 0.048$). High expression rates of EGFR were higher in the former than that in the latter ($P = 0.041$). ErbB2 was higher in the MLNM group compared to the NMLNM group ($P = 0.002$). The positive expression of ErbB2 in the MLNM group was significant higher than that in the NMLNM group ($P < 0.001$). Besides, protein expression and mRNA transcription of EGFR were correlated to those of ErbB2 ($r = 0.975$ vs $r = 0.921$). **Conclusion:** High expression of EGFR and positive expression of ErbB2 can potentially predict MLNM in lung adenocarcinoma patients with EGFR mutation.

[**Key words**] Lung adenocarcinoma; Epidermal growth factor receptor (EGFR); EGFR mutation; ErbB2; Medistinal lymph nodes; Differentially expressed gene

肺癌在全世界范围内的男性及女性中,均是发病率最高(11.6%)且死亡率最高的肿瘤(18.4%)^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的治疗包括手术、化疗、放疗、靶向治疗、免疫治疗等。对于 NSCLC 患者需要采用局部及全身治疗相结合的综合治疗。对于 I ~ II 及 IIIA-N1 期患者,以手术为主的治疗模式已形成广泛共识^[2],对于 cN2 的 NSCLC 患者,诱导化疗 ± 放化疗或手术均是可供选择的方式^[3]。对于放疗患者,放射性肺损伤(radiation induced lung injury, RILI)仍是影响疗效及损害患者生存质量的并发症^[4]。确定纵隔淋巴结(medistinal lymph node, MLN)转移情况,不仅有助于制定治疗方案,也能提高靶区勾画的精确度,降低放射性肺损伤的发生。

近来的遗传学研究表明,原发肿瘤的基因表达谱微阵列预测分析(prediction analysis of microarray, PAM)可以预测非小细胞肺癌患者的淋巴结转移状态,NO 患者中,基因表达谱微阵列预测分析(prediction analysis of microarray, PAM)阳性的患者较 PAM 阴性的患者生存期更短,提示 PAM 可能比影像学更能准确地判断隐性淋巴结转移^[5-6]。此外,一项针对 NSCLC 的 cDNA 序列的研究表明,预测腺癌和鳞癌淋巴结转移的基因截然不同^[5]。这些研究揭示了差异表达基因(differentially expressed genen, DEG)对肿瘤相关生物学特性的预测功能及其与淋巴结转移之间的关系。通过生物预测因子来确认 MLN 转移状态将会是个体化治疗的一大重要进展。

为了探索表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)敏感突变的肺腺癌患者 MLN 转移的生物预测因子,我们前期的研究选取了 10 例 EGFR 突变肺腺癌患者[5 例纵隔淋巴结转移(medistinal lymph node metastasis, MLNM), 5 例无纵隔淋巴结转移(non-medistinal lymph node metastasis, NMLNM)]的石蜡切片,通过二代测序及生物信息

学分析,发现 EGFR 高突变频率与 ErbB2 基因扩增可能可以作为肺腺癌 MLN 转移的预测因子(未发表)。

为了明确 EGFR 及 ErbB2(表皮生长因子受体 2)表达与 EGFR 突变的肺腺癌患者的 MLNM 的相关性,我们选取了通过手术确诊为肺腺癌且接受了 MLN 切除的患者,对其原发病灶标本进行了蛋白表达及 mRNA 分析。

1 材料与方法

1.1 临床病例资料

本回顾性研究选取 2012 ~ 2018 年间,在陆军特色医学中心进行原发病灶手术切除及 MLN 清扫,病理结果为腺癌的患者。通过突变扩增阻滞系统(amplification refractory mutation system, ARMS)法或二代基因测序(next generation sequential, NGS)检测患者表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)突变情况。

1.2 免疫组化

检测肺部原发病灶 EGFR 以及 ErbB2 的表达。肿瘤组织在 4% 福尔马林中固定,室温过夜,脱水然后石蜡包埋。切片(RM2235, 莱卡, 德国)厚度 4 μm。实验步骤如下:1) 60℃ 烤箱烤片过夜;2) 脱水及脱蜡;3) 滴加一抗(中杉金桥 EGFR TA-801933, ErbB2 TA-505802), 4℃ 孵育过夜;4) 清洗后滴加二抗(SAP-9100 羊抗兔/鼠), 37℃ 孵育 25 min;5) 清洗后 DAB 显色;6) 水洗终止染色,苏木素复染;7) 分化及固定;8) 封片^[7]。用显微镜观察(10 倍目镜 × 10 倍物镜)依照细胞阳性着色程度(抗原含量),可分为弱阳性(+) 1 分,中等阳性(++) 2 分,强阳性(+++) 3 分,依照阳性细胞数量可分为:弱阳性 < 25% 记 1 分,中等阳性(25% ~ 49%) 记 2 分,强阳性 ≥ 50% 记 3 分;两者相乘 < 3 者为阴性,评 0 分;≥ 4 且 < 6 者为弱阳性,评 1 分;≥ 6 者为强阳性,评 2 分。至少随机观察 5 ~ 10 HPF,取其均值^[8]。EG-

FR 在细胞质及细胞膜上表达,光学显微镜下观察为棕黄色颗粒,定位好,不扩散,细胞形态清晰且着色显著高于背景色^[9]。ErbB2 表达位于细胞膜^[10]。

1.3 PCR

1.3.1 RNA 的提取 RNA 逆转录试剂盒提取石蜡组织中的 RNA (依照 thermofish K1622 试剂盒操作流程)。

1.3.2 Real Time-PCR 利用 Primerbank 设计引物, GAPDH 序列上游 5'-CTGGCTACACTGAGCACC-3', 下游 5'-AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3', EGFR 序列上游 5'-AGGCACGATAACAAGCTCAC-3', 下游 5'-ATGAGGACATAACCAGCCACC-3', HER2 序列上游 5'-TGGCCTGTGCCCCTATAAG-3', 下游 5'-AGGAGAGGTCAGGTTTCACAC-3'; 运行条件: 95℃ 预变性 5min, 95℃ 变性 10s, 60℃ 退火 15s, 72℃ 延伸, 20s × 44 个循环。

1.4 统计学分析

运用 SPSS18.0 软件对实验所得数据进行分析。EGFR 和 ErbB2 免疫组化强度与 MLN 转移率相关

表 1 入组患者的临床基线数据

Table 1. Characteristics of Patients

Variable	MLNM(<i>n</i> = 11) <i>n</i> (%)	NMLNM(<i>n</i> = 19) <i>n</i> (%)	χ^2	<i>P</i>
Age (median)	55	60		0.332
Gender			0.006	0.938
Male	5 (41.7)	7 (58.3)		
Female	6 (33.3)	12 (66.7)		
Cancer stage			28.229	<0.001
I	0 (0)	15 (100)		
II	0 (0)	4 (100)		
III	11 (100)	0 (0)		
IV	0 (0)	0 (0)		
Smoking history			2.522	0.373
No	8 (38.1)	13 (61.9)		
Yes (quited)	2 (25.0)	6 (75.0)		
Yes	1 (10.0)	0 (0)		
PS score			0.144	0.705
0	5 (33.3)	10 (66.7)		
1	6 (40.0)	9 (60.0)		

MLNM: Medistinal lymph node metastasis; NMLNM: Non-medistinal lymph node metastasis; PS: Performance status.

2.2 EGFR、ErbB2 的蛋白表达与纵隔淋巴结转移的关系

在 NMLNM 的 19 名患者中, EGFR 阴性表达占 13 例 (68.42%), 弱阳性表达占 6 例 (31.58%), 无

性采用卡方检验, 必要时用 Fisher 确切概率法。有无 MLN 转移两组间其他连续变量如免疫组化评分、mRNA 表达水平等比较采用 Kruskal-Wallis 检验。相关性采用 Pearson 相关性分析。所有检验均为双侧检验, 检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 临床数据

本研究共选取 30 例患者, 其中男性 12 例, 女性 18 例。I 期 15 例, II 期 4 例, III 期 11 例 [其中 III A 期 (N2) 9 例, III B 期 2 例]。其中 11 例为 MLNM, 19 例为 NMLNM。根据吸烟状态将患者分为 3 类: 从不吸烟组 (≤ 100 支/一生), 曾吸烟组 (> 100 支/一生且已戒烟 ≥ 1 年) 及吸烟组 (> 100 支/一生并且戒烟 < 1 年)^[11]。PS 评分 0 分、1 分各 15 例。所有患者通过 ARMS 法或 NGS 均检测到 EGFR 基因突变。除分期外, 其余基线数据在两组中差异均无统计学意义 (表 1)。

强阳性表达的病例; 在 MLNM 的 11 名患者中, 7 例 (63.64%) EGFR 阴性表达, 1 例 (9.09%) EGFR 弱阳性表达, 3 例 (27.27%) EGFR 强阳性表达, EGFR 在两组中的表达差异有统计学意义 ($P = 0.048$), 其

中,MLNM 组中 EGFG 强阳性表达率高于 NMLNM 组,差异有统计学意义 ($P=0.041$)。在 NMLNM 的 19 名患者中,17 例(89.47%)ErbB2 阴性表达,弱阳性表达和强阳性表达分别为 1 例(分别为 5.26%),在 11 例 MLNM 患者中,4 例(36.36%)ErbB2 阴性

表达,6 例(54.55%)弱阳性表达,1 例(9.09%)强阳性表达,ErbB2 的表达在两组间存在差异有统计学意义($P=0.002$),MLNM 组中 ErbB2 阳性表达率高于 NMLNM 组,差异有统计学意义 ($P<0.001$) (表 2)。EGFR、ErbB2 代表性表达情况见图 1。

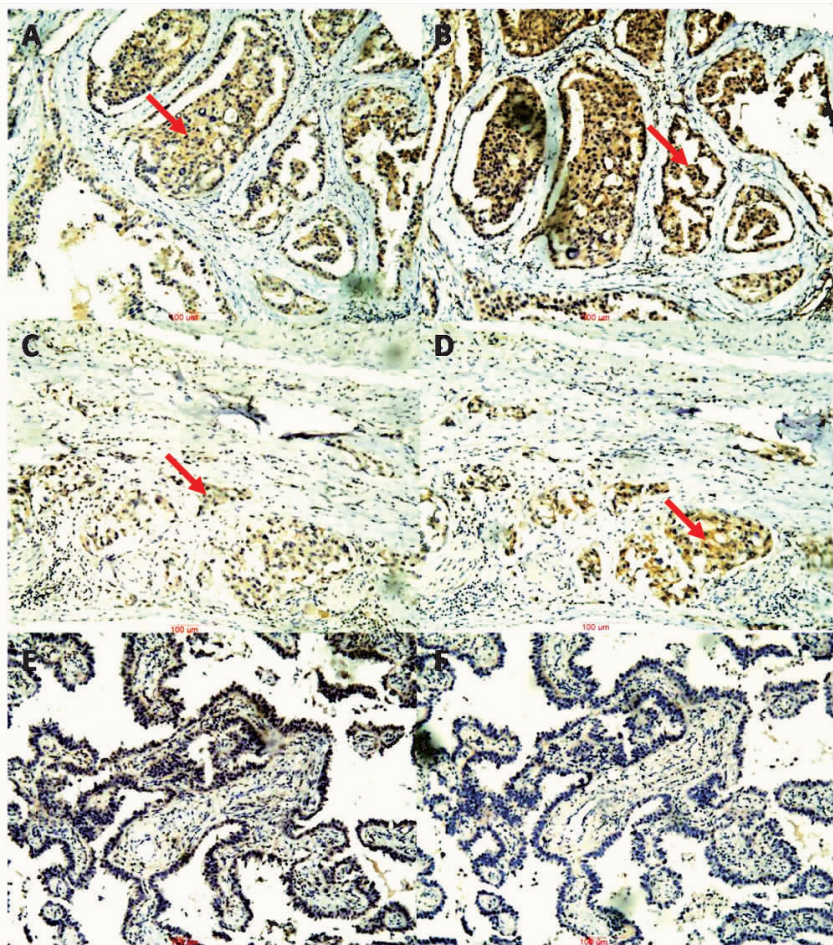


图 1 EGFR、ErbB2 蛋白在 EGFR 突变的肺腺癌中的表达情况 (10 ×40) :

Figure 1. Protein Expression of EGFR and ErbB2 in EGFR-Mutated Lung Adenocarcinoma (10 ×40)

Panel A and B show the high expression of EGFR and ErbB2 in primary lesion (as indicated by the arrow) ; Panel C and D show the low expression of EGFR and ErbB2 in primary lesion (as indicated by the arrow) ; Panel E and F show the negative expression of EGFR and ErbB2 in primary lesion.

表 2 EGFR、ErbB2 蛋白表达与纵隔淋巴结转移之间的关系

Table 2. Correlation between Protein Expression of EGFR or ErbB2 and MLNM

Variable	EGFR (%)			χ^2	<i>P</i>	ErbB2 (%)			χ^2	<i>P</i>
IHC score	Negative	Weakly positive	Highly positive			Negative	Weakly positive	Highly positive		
NMLNM (<i>n</i> = 19)	13 (68. 42)	6 (31. 58)	0	5. 829	0. 048	17 (89. 47)	1 (5. 26)	1 (5. 26)	9. 922	0. 002
MLNM (<i>n</i> = 11)	7 (63. 64)	1 (9. 09)	3 (27. 27)			4 (36. 36)	6 (54. 55)	1 (9. 09)		
IHC score	Negative + Weakly positive	Highly positive				Negative	Positive			
NMLNM (<i>n</i> = 19)	19 (100)	0		6. 614	0. 041	17 (89. 47)	2 (10. 52)		12. 539	<0. 001
MLNM (<i>n</i> = 11)	8 (72. 73)	3 (27. 27)				4 (36. 36)	7 (63. 64)			

EGFR;Epidermal growth factor receptor; MLNM; Medistinal lymph node metastasis; IHC; Immunohistochemistry; NMLNM; Non-medistinal lymph node metastasis.

2.3 EGFR、ErbB2 PCR 表达与纵隔淋巴结转移的关系

EGFR 及 ErbB2 mRNA 扩增倍数在 NMLNM 组

中表达均较 MLNM 组高,但两者在 NMLNM 组与 MLNM 组中扩增倍数差异无统计学意义($P = 0.108, 0.510$)(图 2)

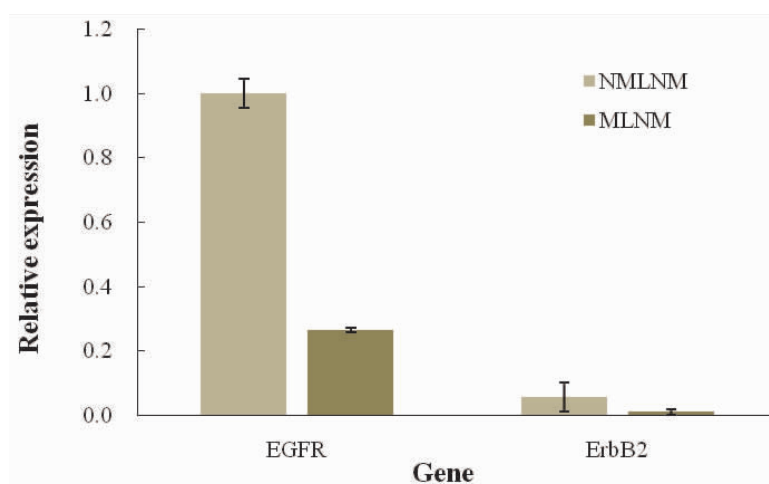


图2 EGFR、ErbB2 在 MLNM 及 NMLNM 中的转录水平

Figure 2. mRNA Level of EGFR and ErbB2 in the MLNM Group and the NMLNM Group

MLNM; Medistinal lymph node metastasis; NMLNM; Non-medistinal lymph node metastasis.

2.4 EGFR 与 ErbB2 之间的相关性

EGFR 蛋白与 ErbB2 蛋白表达之间存在相关性

($r = 0.975$), EGFR mRNA 与 ErbB2 mRNA 扩增水平之间相关性较强($r = 0.521$)(表 3)

表3 EGFR 与 ErbB2 之间的相关性

Table 3. Correlation between EGFR and ErbB2

R (P)	EGFR	ErbB2	EGFR mRNA	ErbB2 mRNA
EGFR	1	0.521 (0.003)	-0.279 (0.135)	-0.244 (0.193)
ErbB2	0.521 (0.003)	1	-0.308 (0.097)	-0.230 (0.222)
EGFR mRNA	-0.279 (0.135)	-0.308 (0.097)	1	0.975 (<0.001)
ErbB2 mRNA	-0.244 (0.193)	-0.230 (0.222)	0.975 (<0.001)	1

EGFR; Epidermal growth factor receptor.

3 讨论

放疗在 N2 及局部晚期 NSCLC 患者治疗中扮演着重要的角色^[12],放射性肺损伤是其常见的副反应,其发生与肺受照射体积等相关^[13]。对于 MLN 是否转移及转移模式的评判不仅有助于治疗方案的制定,也对准确靶区勾画、减少放射性肺炎的发生、提高局控率及总生存率具有重要意义^[14-15]。影像学检查是评估肺癌 TMN 分期的主要手段,而 CT 检查是评估纵膈淋巴结转移的主要非侵入方式。随着影像学的发展,越来越多的其他影像学手段也被用来评估淋巴结转移。一项针对 122 例非小细胞肺癌患者术前进行 PET/CT 及增强 CT 扫描对 MLNM 的前瞻性研究表明, PET/CT 诊断 MLNM 的敏感性、特异性(分别为 86%、85%)均显著高于 CT(分别为 69%、71%),但对于 NSCLC 患者,直径小于 10mm 的伴有微小肿瘤侵犯的局部淋巴结,或者直径超过

10mm 的伴有增生或者其他炎性良性病变的局部淋巴结仍是 PET/CT 及增强 CT 的盲区^[16]。弥散加权成像(DWI)可以在细胞学水平,通过表观扩散系数(ADC)来探测水分子在组织中受限扩散,近年来,被用于易于产生运动伪影的部位,例如纵膈。研究发现, DWI 对于 MLN 检测与 PET/CT 相比,有助于淋巴结转移的诊断,但其假阴性结果仍影响其准确性^[17]。而运用生物标志物预测淋巴结转移状态的研究早在 90 年代就已开始,虽然意大利科学家通过利用 CEA 与 CT 比较发现,前者对诊断 MLNM 的特异性与敏感性均无优势,但是随着分子水平标志物的推广, cDNA 序列技术检测基因表达的效率提高,使得通过 cDNA 从杂乱无章的序列中筛选出有诊断价值的信息成为可能^[18]。我团队致力于通过生物标志物预测 MLN 转移状态的研究,曾针对 94 例肺癌术后患者进行影像学及生物信息学研究,发现术前 1 月进行 PET/CT 及 64 排增强 CT 检查,其对

MLNM 的敏感性、特异性、准确率及阳性预测率均不高,而通过差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG) 进行高内涵筛选 (high content screening, HCS) 得出的增殖和转移相关基因,可以作为影像学无法判断 MLN 有无转移时的补充^[19]。而早在 2004 年, Takada 等^[5]已经从与鳞癌及腺癌都相关的 1 289 种基因中,发现了可以预测淋巴结转移的与鳞癌相关的 23 种基因 (*MSH6*、*HIF1A*、*MLH1*、*MMP8* 等) 及与腺癌相关的 43 种基因 (*IL10RA*、*MAPK10*、*TP53*、*XRCC3* 等),其准确率分别为 100% 和 94%。我国的多项研究也表明, *Beclin1*、*MUC4 mRNA*、*IGF2* 等多个基因的表达对 MLNM 有预测作用^[20-22]。由此可见,随着高通量测序的兴起,利用表达谱寻找与肿瘤发生、转移相关的基因,确定 MLN 转移预测因子的研究正在大力推广。基因检测通过对 MLN 转移状态的推测,来确认患者淋巴结的转移状态,从而可能制定更合理的治疗方案。

多个研究也报道 EGFR 强阳性表达可促进肿瘤增殖、血管生成、转移等,尤其是在乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌等癌症中,EGFR 的强阳性表达与肿瘤转移相关。在非小细胞肺癌中,研究报道 EGFR 可能与 Ki-67 发挥协同作用,对 MLNM 转移产生影响^[23]。另有报道发现:EGFR 在原发灶中的表达在有淋巴结转移患者中高于无淋巴结转移的患者,这也体现了 EGFR 在肿瘤淋巴结转移中的作用^[24]。我团队前期研究发现,EGFR 高突变频率与 *ErbB2* 基因扩增可能可以作为肺腺癌 MLN 转移的预测因子,在此基础上,本研究进一步证实 EGFR 及 *ErbB2* 在蛋白水平阳性表达与 NSCLC 的 MLN 转移呈正相关,原发灶中 EGFR 强阳性表达及 *ErbB2* 阳性表达可能对肺腺癌 MLN 转移有预测作用 (*P* 值分别为 0.041 与 <0.001)。

EGFR 是第一个被发现其突变、过表达与肿瘤相关的基因家族,它共有四个结构相关因子,EGFR (*HER1*)、*ErbB2* (*HER2/neu*)、*ErbB3* (*HER3*) 和 *ErbB4* (*HER4*),它们相互结合形成二聚体或异二聚体发挥作用,其中 *ErbB2* 不能结合 EGFR 的受体,因此不能形成二聚体,但两者激酶催化区域具有高度同源性和相似的生化动力学特性,因此两者的信号通路可以相互作用,在肿瘤发生中发挥协同作用;并且 *ErbB2* 基因的突变导致 *ErbB2* 胞外结构域缺失或者形成 *ErbB2*/EGFR 异二聚体,进而促进细胞增殖^[25-26]。EGFR 突变可以选择性激活下游 PI3K/Akt 和 JAK/STAT 通路,抵抗肿瘤细胞凋亡。EGFR 激

活突变可以积累 EGFR-TKI 结构域 (TKD),进一步选择性激活下游信号通路导致 EGFR 表达上调,从而导致细胞增殖等。EGFR 激活还可通过促进 VEGF 的释放作用于肿瘤和内皮细胞,导致血管生成增加,促进肿瘤转移^[27-29]。而 EGFR 突变的肺腺癌患者接受 EGFR-TKI 或化疗,预后均较野生型患者好,体现了 EGFR 突变情况对肺腺癌患者预后的预测价值^[30],而突变情况不能代替 EGFR 蛋白表达情况,因此,本研究对 EGFR 突变的肺腺癌原发灶中 EGFR、*ErbB2* 蛋白的表达与 MLN 转移状态之间的关系进行研究,发现 EGFR 强阳性表达及 *ErbB2* 阳性表达在蛋白水平与 MLN 转移存在相关性,为 EGFR、*ErbB2* 作用生物信息学的靶点预测 EGFR 突变的肺腺癌纵隔淋巴结状态提供了理论依据,鉴于本研究样本数量,EGFR 及 *ErbB2* 的敏感性和特异性还需大样本进一步验证。

通过相关研究我们推测,EGFR 和 *ErbB2* 通过被配体激活,且持续介导下游信号通路传导,使两者在肿瘤发展及转移中发挥协同作用。EGFR 与 *ErbB2* 如何影响下游信号通路介导纵隔淋巴结转移还有待进一步研究。

作者声明:本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

学术不端:本文在初审、返修及出版前均通过中国知网 (CNKI) 科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

同行评议:经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

文章版权:本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

[参考文献]

- [1] Brav F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68 (6): 394-424.
- [2] Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang YW, et al. Lung cancer: Biology and treatment options[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1856(2): 189-210.
- [3] Watanabe SI, Nakagawa K, Suzuki K, et al. Neoadjuvant and adjuvant therapy for Stage III non-small cell lung cancer[J]. Jpn J Clin Oncol, 2017, 47(12): 1112-1118.

- [4] Han S, Gu F, Lin G, et al. Analysis of clinical and dosimetric factors influencing radiation-induced lung injury in patients with lung cancer [J]. J Cancer, 2015, 6(11):1172-1178.
- [5] Takada M, Tada M, Tamoto E, et al. Prediction of lymph node metastasis by analysis of gene expression profiles in non-small cell lung cancer [J]. J Surg Res, 2004, 122(1):61-69.
- [6] Xi L, Lyons-Weiler J, Coello MC, et al. Prediction of lymph node metastasis by analysis of gene expression profiles in primary lung adenocarcinomas [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(11):4128-4135.
- [7] Jiang X, Shan J, Dai N, et al. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 regulates angiogenesis in a transforming growth factor β -dependent manner in human osteosarcoma [J]. Cancer Sci, 2015, 106(10):1394-1401.
- [8] 雷世熊,李燕,王映梅,等. SGLT1 在肝癌组织中的表达及意义 [J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(3):354-356.
- [9] Mukohara T, Kudoh S, Yamauchi S, et al. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and downstream activated peptides in surgically excised non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. Lung Cancer, 2003, 41(2):123-130.
- [10] Cebollero Presmanes M, Sánchez-Mora N, García-Gómez R. Prognostic value of ERBB2 amplification and protein expression in small cell lung cancer [J]. Arch Bronconeumol, 2008, 44(3):122-126.
- [11] Marston L, Carpenter JR, Walters KR, et al. Smoker, ex-smoker or non-smoker? The validity of routinely recorded smoking status in UK primary care: a cross-sectional study [J]. BMJ Open, 2014, 4(4):e004958.
- [12] 赵振华. 纵隔淋巴结包膜外软组织受侵对ⅢA-N2 期 NSCLC 术后放疗效果的预测作用 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2017, 5(32):37-37, 40.
- [13] 吴敬波. 局部晚期周围型非小细胞肺癌后装插植放疗 [J]. 肿瘤预防与治疗, 2017, 30(3):153-157.
- [14] Rajan RR, Chandrasekharan G. Pulmonary injury associated with radiation therapy-assessment, complications and therapeutic targets [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89:1092-1104.
- [15] 邢祥菊. 应用 PET/CT 分析 NSCLC 纵隔淋巴结转移规律及其对放疗靶区设计的意义 [D]. 重庆:第三军医大学, 2016:27-29.
- [16] Yang W, Fu Z, Yu J. Value of PET/CT versus enhanced CT for locoregional lymph nodes in non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2008, 61(1):35-43.
- [17] Shen G, Lan Y, Zhang K. Comparison of 18F-FDG PET/CT and DWI for detection of mediastinal nodal metastasis in non-small cell lung cancer: A meta-analysis [J]. PLoS One, 2017, 12(3):e0173104.
- [18] Buccheri G, Biggi A, Ferrigno D, et al. Anti-CEA immunoscintigraphy and computed tomographic scanning in the preoperative evaluation of mediastinal lymph nodes in lung cancer [J]. Thorax, 1996, 51(4):359-363.
- [19] 蓝保华. EGFR 敏感突变肺腺癌患者纵隔淋巴结转移相关基因的检测与分析 [D]. 重庆:第三军医大学, 2016:28-39.
- [20] 熊健, 吴蕾, 皮御阳, 等. 非小细胞肺癌淋巴结 Beclin1 表达与淋巴结转移的关系 [J]. 中国胸心血管外科, 2019, 26:1-4.
- [21] 王洲, 殷洪年. RT-PCR 法检测 MUC1 mRNA 诊断纵隔淋巴结隐匿转移 [J]. 中国肺癌杂志, 2002, 5(3):191-193.
- [22] 张连民. 纵隔淋巴结转移站数对 N2 期肺小细胞肺癌患者预后的影响及其分子机制 [D]. 天津:天津医科大学, 2011:39-47.
- [23] 张锦锦, 唐慧. 表皮生长因子受体在肿瘤发生、发展中的研究进展 [J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 31(4):425-430.
- [24] 夏露花, 宗平, 王新华, 等. EGFR、VEGF 和 nm23 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义 [J]. 实用临床医学, 2019, 20(5):6-9.
- [25] Roskoski R Jr. Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein-tyrosine kinases in human cancers [J]. Pharmacological Res, 2019, 139:395-411.
- [26] Maher M, Kassab AE, Zaher AF, et al. Novel pyrazolo[3,4-d]pyrimidines: design, synthesis, anticancer activity, dual EGFR/ErbB2 receptor tyrosine kinases inhibitory activity, effects on cell cycle profile and caspase-3-mediated apoptosis [J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2019, 34(1):532-546.
- [27] Sordella R, Bell DW, Haber DA, et al. Gefitinib-sensitizing EGFR in lung cancer active anti-apoptotic pathways [J]. Science, 2004, 305(5687):1163-1167.
- [28] Ryan AJ, Wedge SR. ZD6474-a novel inhibitor of VEGFR and EGFR tyrosine kinase activity [J]. Br J Cancer, 2005, 92(S1):S6-S13.
- [29] Sini P, Wyder L, Schnell C, et al. The antitumor and antiangiogenic activity of vascular endothelial growth factor receptor inhibition is potentiated by ErbB1 blockade [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(12):4521-4532.
- [30] 李晨光. 非小细胞肺癌癌基因突变和相关分子标记物的研究 [D]. 上海:复旦大学, 2012:62.