文章编号:1000-5404(2005)18-1859-04

论著

人脑星形胶质细胞瘤 EphB4/ephrinB2 表达及与预后的关系

肖华亮[1],李增鹏[2],殷育松[1],张沁宏[2],蒋雪峰[1],卞修武[1] (第三军医大学:[1]西南医院病理科,重庆 400038,[2]大坪医院野战外科研究所肿瘤诊治中心病理科,重庆 400042)

提 要:目的 了解 EphB4 受体及 ephrinB2 配体在人脑星形细胞起源肿瘤组织中的表达规律,并探讨其临床病理学意义。**方法** 收集85例有随访资料的脑胶质瘤标本,免疫组化S-P法检测 EphB4 和 ephrinB2 蛋白表达。**结果** EphB4 及 ephrinB2 的蛋白表达定位于肿瘤细胞或血管内皮细胞胞质,呈异质性分布;两种蛋白在Ⅲ、Ⅳ级脑星形细胞肿瘤中的表达均明显高于Ⅰ、Ⅱ级肿瘤($P<0.05$);生存资料分析显示:EphB4 或 ephrinB2 阳性组患者的生存率均显著低于相应的阴性及弱阳性组($P<0.01$,$P<0.05$)。**结论** EphB4/ephrinB2 与脑星形胶质细胞瘤发生发展密切相关,并可作为判断预后的指标之一。

关键词:脑肿瘤;星形细胞;预后
中图法分类号:R392.11;R730.2;R739.41 **文献标识码**:A

Expressions of EphB4 receptor and its ligand ephrinB2 in brain astrocytoma and their value in prognosis

XIAO Hua-liang[1], LI Zeng-peng[2], YIN Yu-song[1], ZHANG Qin-hong[2], JIANG Xue-feng[1], BIAN Xiu-wu[1] ([1]Department of Pathology, Southwest Hospital, [2]Department of Pathology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the expression characteristic of EphB4 receptor and its ligand ephrinB2 in astrocytoma tissues and to evaluate their clinic-pathological significance. **Methods** A total of 85 cases of brain glioma of different grade with survival data were collected. SP immunohistochemical method was applied to detect the expression of ephrinB2 and EphB4 proteins. **Results** Both ephrinB2 and EphB4 proteins were localized in cytoplasm of tumor cells and endothelial cells, showing an obvious heterogeneous fashion. The protein level of the two genes in grade Ⅰ and Ⅱ astrocytomas were significantly lower than that of grade Ⅲ and Ⅳ astrocytoma specimens. Survival analysis showed that the survival rate of the cases with high EphB4 or ephrinB2 protein expression was lower than those with weak or negative staining. **Conclusion** Both EphB4 and ephrinB2 might be of importance in initiation and progression of astrocytomas and might be useful markers in the prognosis.

Key words: brain tumor; astrocyte; prognosis

Eph 受体及相应配体 ephrins 是新近认识的一类血管生成相关因子,其中以 ephrinB2 及其相应受体 EphB4 与血管生成的关系尤为引人关注。近期研究表明,以可溶性 ephrinB2Fc 激活内皮细胞 EphB4 受体表达,可促进内皮细胞增殖、迁移并形成管样结构[1];在多种肿瘤组织中亦可检测到 EphB4 受体及 ephrinB2 配体的扩增和/或过表达[2,3],但它们在脑肿瘤,尤其是在脑星形胶质细胞肿瘤中的表达特点及意义目前尚未阐明。

本研究通过检测 EphB4 受体及 ephrinB2 配体在脑星形细胞肿瘤中的原位表达,分析二者与脑星形胶质细胞瘤分级、预后等的关系,探讨其表达特点及临床病理学意义。

1 材料与方法

1.1 标本来源与分类和分级

收集大坪医院 1993 年 1 月至 1999 年 12 月脑星形细胞源性胶质瘤存档标本 85 例,参照 2000 年 WHO 神经肿瘤分类进行分类和分级。其中Ⅰ级 7 例,包括毛细胞性星形细胞瘤和室

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270526, 0370552)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270526, 0370552)

作者简介:肖华亮(1973-),男,广东省大埔县人,硕士,主治医师,讲师,主要从事肿瘤病理方面的研究,现在大坪医院野战外科研究所肿瘤诊治中心病理科。电话:(023)68757384
通讯作者:卞修武,电话:(023)68752247,E-mail:Bianxiuwu@263.net

收稿日期:2005-04-02;修回日期:2005-07-12

管膜下巨细胞性星形细胞瘤分别为3和4例；Ⅱ级即交界性星形细胞瘤共18例；Ⅲ级即间变性星形细胞瘤共38例；Ⅳ级即胶质母细胞瘤和胶质肉瘤共为22例。所有患者在肿瘤切除前均未接受放疗和化疗。随访时间3～89个月，中位随访时间为33.5个月，术后1个月内死亡者不纳入本研究之列。

1.2 试剂

兔抗人EphB4、ephrinB2多克隆抗体购自Santa Cruz公司，稀释浓度为1∶200。鼠抗人CD34单克隆抗体购自北京中山，为工作液。

1.3 病理制片与免疫组织化学

标本经10%甲醛液固定，常规石蜡包埋，5 μm连续切片。按S-P法行免疫组化染色，EphB4及ephrinB2阳性对照均采用人大肠腺癌标本，以PBS替代一抗作为阴性对照。避开肿瘤边缘及坏死区域，根据瘤细胞阳性结果计数标记指数（Labeling Index，LI），即LI(%)＝阳性细胞数/计数的总细胞数×100%。按以下方法进行半定量：阴性：<10%，记为“－”；弱阳性：10%～25%，记为“＋”；阳性：25%以上，记为“＋＋”。

1.4 统计学处理

应用SPSS 10.0软件，不同临床病理因素之间EphB4及ephrinB2的蛋白表达的差异性比较采用χ^2检验；患者的生存率曲线采用Kaplan-Meier法绘制，进行Log rank检验。

2 结果

2.1 ephrinB2及EphB4蛋白表达

ephrinB2免疫组化阳性产物呈棕黄色细颗粒状，定位于肿瘤细胞胞质。ephrinB2蛋白在肿瘤组织中的表达呈现出明显的异质性，即在肿瘤的不同区域表现出不同的特色，或弥散分布，或呈小片状、灶性分布，染色的强度亦不一致，在坏死病灶周围的肿瘤细胞中ephrinB2往往呈强阳性着色（图1）。除了在肿瘤细胞中表达外，我们注意到在部分肿瘤的少数新生血管中也可出现ephrinB2表达，多为弱－中等强度，位于血管内皮细胞。ephrinB2阳性的血管多为大小不等的较厚壁的血管，或见于恶性胶质瘤中内皮细胞显著增殖的血管丛，如胶质母细胞瘤中的“肾小球样”血管（图2）。但肿瘤中多数血管为ephrinB2阴性。

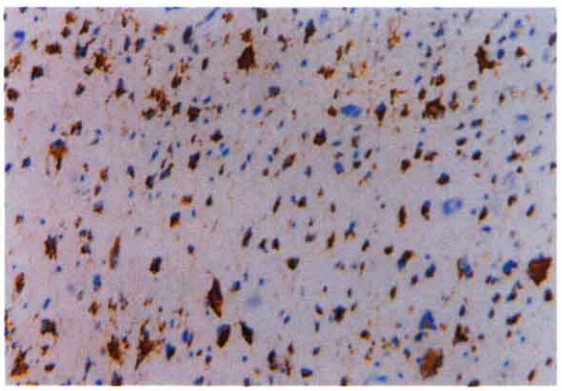


图1 ephrinB2蛋白阳性信号定位于胞质，呈异质性分布 （S-P×200）

Fig 1 ephrinB2 positive staining in cytoplasm of tumor cells in an obvious heterogenous fashion （S-P×200）

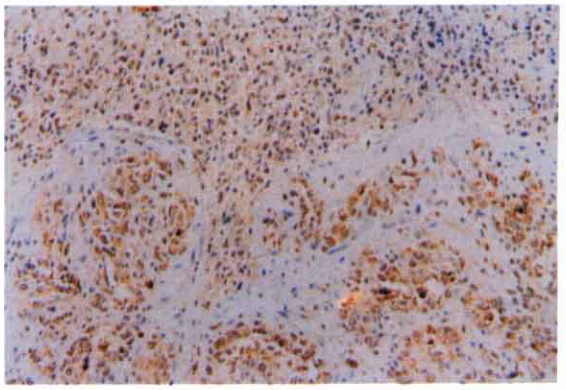


图2 胶质母细胞瘤“肾小球样”增生的血管内皮ephrinB2蛋白阳性 （S-P×100）

Fig 2 ephrinB2 positive staining in endothelium of glomerulus-like proliferating vessels in glioblastoma （S-P×100）

EphB4在肿瘤细胞中的表达呈现出与ephrinB2表达基本相似的特点，但部分肿瘤细胞可出现胞膜着色，多见于肥胖型和原浆型星形瘤细胞（图3）；在大部分病例，EphB4与ephrinB2蛋白在瘤细胞中的表达呈现一致性，但在少数肿瘤或某一肿瘤的不同区域两种蛋白表达显示出一定的差异，如有3例ephrinB2阳性的病例，其EphB4表达仅为弱阳性，甚至为阴性，而有2例EphB4蛋白阳性者其ephrinB2仅为弱阳性；此外，肿瘤内多数间质血管为EphB4阳性，但在部分厚壁血管或内皮增生显著的血管未见EphB4表达，表现出与ephrinB2血管表达的互补性（图4）。

EphB4及ephrinB2蛋白表达与该组病例临床病理各因素之间的关系见表1。EphB4及ephrinB2蛋白在Ⅲ、Ⅳ级胶质瘤中的表达显著高于Ⅰ、Ⅱ级肿瘤（$P<0.05$），但与年龄、性别、肿瘤大小、部位以及是否复发均无密切关系。

表1 不同病例EphB4、ephrinB2蛋白表达检测结果

Tab 1 EphB4 or ephrinB2 expression in all cases

Items		n	EphB4			P	ephrinB2			P
			－	＋	＋＋		－	＋	＋＋	
Age (Year)	<34	37	4	13	20		3	15	19	
	≥34	48	7	16	25	>0.05	6	18	24	>0.05
Sex	Male	52	6	17	29		6	21	25	
	Female	33	5	12	16	>0.05	3	12	18	>0.05
Size(cm)	<2.8	44	6	14	26		5	17	22	
	≥2.8	41	5	15	19	>0.05	4	16	21	>0.05
Location	Beyond	67	8	20	39		7	25	35	
	Below	18	3	8	7	>0.05	2	8	8	>0.05
Grade	Ⅰ, Ⅱ	25	9	12	4		7	14	4	
	Ⅲ, Ⅳ	60	2	17	41	<0.05	2	19	39	<0.05
Recurrence	Yes	33	5	8	20		3	13	17	
	No	52	6	21	25	>0.05	6	20	26	<0.05

2.2 ephrinB2及EphB4蛋白表达与患者预后

生存资料分析显示：EphB4阳性组患者的平均生存时间为29.45个月，阴性及弱阳性组患者的平均生存时间分别为43.14个月和51.92个月，经Log rank检验，EphB4阳性组与阴性组患者的累计生存率有非常显著性差异（$P<0.01$），EphB4

阳性组与弱阳性组相比累计生存率亦显著性降低（$P<0.05$）；ephrinB2 阳性患者的平均生存时间为 29.86 个月，而弱阳性及阴性表达的患者平均生存时间为 42.95 个月和 57.25 个月，ephrinB2 阳性组患者的生存率与弱阳性组及阴性组相比亦有显著性差异（$P<0.05$，$P<0.01$）（图 5，6）。

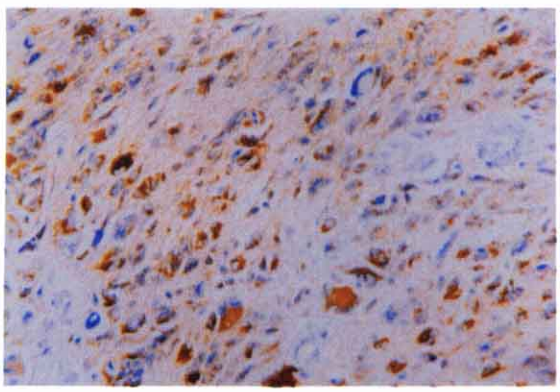


图 3　EphB4 蛋白阳性表达见于多数肿瘤细胞，定位于胞质　（S-P×200）

Fig 3　EphB4 expression in most cells of glioblastoma and mainly localized in cytoplasm　（S-P×200）

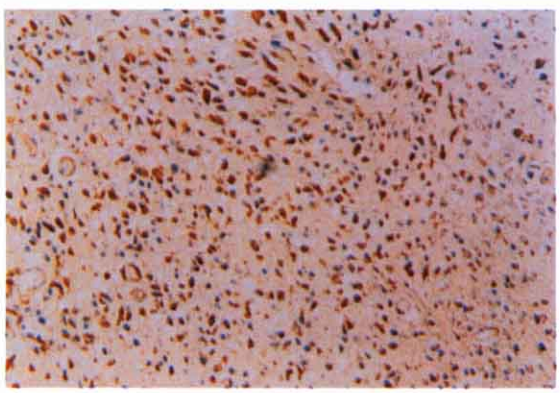


图 4　EphB4 在肿瘤间质多数薄壁新生血管壁呈阳性着色　（S-P×100）

Fig 4　EphB4 positive staining in majority of newly-formed, thin-walled vessels in tumor stromal　（S-P×100）

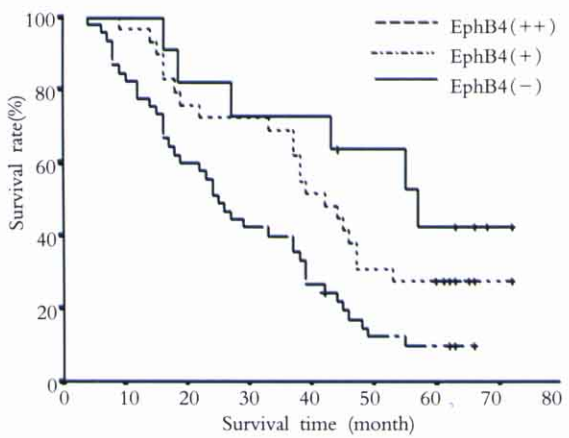


图 5　EphB4 表达与该组脑星形细胞肿瘤预后的关系

Fig 5　Correlation between EphB4 protein expression and prognosis in 85 cases of brain astrocytoma

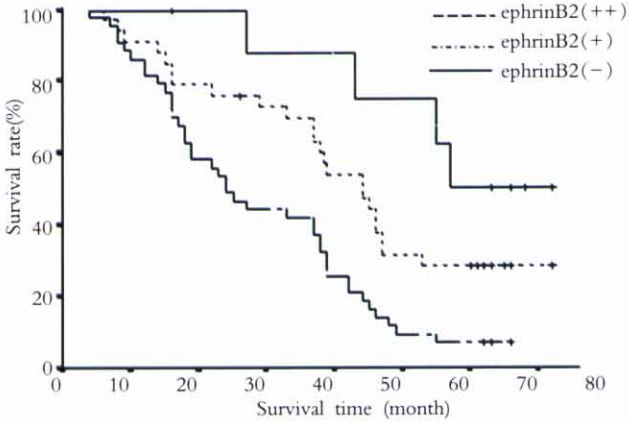


图 6　ephrinB2 表达与该组脑星形细胞肿瘤预后的关系

Fig 6　Correlation between ephrinB2 expression and prognosis in 85 cases of brain astrocytoma

3　讨论

作为蛋白酪氨酸激酶受体家族，中最大的一个亚家族 Eph 受体及其配体 ephrin 在肿瘤发生和演进中可能起着重要的作用。近年研究表明，在多种实体肿瘤中存在着 Eph 受体及其配体的扩增和/或过表达。Tang 等[2]研究发现在小细胞肺癌及神经母细胞瘤存在着多种 EphB 受体及其配体的共同表达，并影响肿瘤生物学行为；Berclaz 等[3]研究证实，EphB4 在正常乳腺分泌型上皮低表达，而在浸润性乳腺癌其表达明显增强；另有研究表明，在未分化及表达 H-Ras 癌基因的浸润性乳腺癌中 EphA2 和 EphB4 高表达，而在分化较好的以及表达 c-Myc 的非转移性乳腺癌中不表达或低表达[4]。EphB4 受体及其配体 ephrinB2 与神经系统胚胎发育密切相关，在胚胎期，脑组织中富含这两种分子，而在成人脑组织，ephrinB2 仍有一定水平的表达，EphB4 则难以检测到。但 EphB4/ephrinB2 在脑肿瘤，尤其是脑星形细胞来源肿瘤中的原位表达特点及其在肿瘤发生、进展中的意义目前少见报道。我们的研究结果证实，在脑星形胶质细胞瘤组织中 EphB4/ephrinB2 蛋白呈高表达，并与肿瘤病理学分级及患者预后密切相关，结合我们既往的研究已表明 EphB4/ephrinB2 表达与肿瘤血管生成密切相关，以上结果提示它们在脑星形胶质细胞瘤的发生及演进过程中可能起着重要作用。

传统的观念认为，各种肿瘤间质血管均起源于毛细血管后微静脉或微静脉，为静脉属性。近年来，随着几种动脉或静脉相对特异性分子，特别是 EphB4/ephrinB2 的发现，传统的关于肿瘤血管属性的观念受到了严峻的挑战。研究表明，ephrinB2 及其受体 EphB4 分别是原始动脉和原始静脉相对特异的标记分子[5]。

在多种肿瘤的间质血管中亦可检测到 EphB4 受体或 ephrinB2 配体表达，提示在肿瘤血管中亦存在着动静脉属性的差异，这就从根本上否定了传统观念认为的肿瘤血管均为静脉属性的观点[6,7]。我们的研究结果发现，在脑胶质瘤间质血管中不仅存在 EphB4(+)的血管，同时也可以观察到少数 ephrinB2(+)的血管，多为厚壁微血管，或为内皮细胞增殖显著的血管，如胶质母细胞瘤中的具有诊断意义的“肾小球样”血管，证实在脑胶质瘤中可能存在动脉属性的微血管，这与国外在其他肿瘤中的研究结果是一致的。但这些动脉属性的微血管从何而来？其发生的分子生物学基础是什么？这些问题尚有待我们去探讨。

肿瘤恶性程度、血管生成活性以及侵袭性的增强势必影响肿瘤患者的预后，缩短患者存活期。由于大部分研究难以得到完整的随访资料，因此关于 Eph/ephrin 与肿瘤预后的关系很少见到报道，在脑胶质瘤更是如此。我们获得了 85 例脑星形胶质细胞瘤的随访资料，并首次评价 EphB4/ephrinB2 与脑胶质瘤预后的关系，结果显示 EphB4 及 ephrinB2 表达与患者的累计生存率有密切关系，EphB4 及 ephrinB2 蛋白表达的上调伴随着患者的总体生存时间的缩短，提示它们可能对预测脑胶质瘤预后有一定价值。

参考文献：

[1] Adams R H, Wilkinson G A, Weiss C, *et al*. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis[J]. Genes Dev, 1999, 13(3): 295-306.

[2] Tang X X, Brodeur G M, Campling B G, *et al*. Coexpression of transcripts encoding EPHB receptor protein tyrosine kinases and their ephrin-B ligands in human small cell lung carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(2): 455-460.

[3] Berclaz G, Flutsch B, Altermatt H J, *et al*. Loss of EphB4 receptor tyrosine kinase protein expression during carcinogenesis of the human breast[J]. Oncol Rep, 2002, 9(5): 985-989.

[4] Andres A C, Reid H H, Zurcher G, *et al*. Expression of two novel ephrelated receptor protein tyrosine kinases in mammary gland development and carcinogenesis[J]. Oncogene, 1994, 9(5): 1461-1467.

[5] Wang H U, Chen Z F, Anderson D J. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4[J]. Cell, 1998, 93(5): 741-753.

[6] Shin D, Garcia Cardena G, Hayashi S, *et al*. Expression of ephrinB2 identifies a stable genetic difference between arterial and venous vascular smooth muscle as well as endothelial cells, and marks subsets of microvessels at sites of adult neovascularization[J]. Dev Biol, 2001, 230(2): 139-150.

[7] Adams R H. Molecular control of arterial-venous blood vessel identity [J]. J Anat, 2003, 202(1): 105-112.

（编辑 刘洪娥）

（上接 1858 页）

叶切除，肿瘤位于深叶时将肿瘤及全腮腺切除。经典手术创伤大，术后面部凹陷畸形明显，疤痕长；因结扎腮腺导管，使残留腺体分泌的浆液不能排出，进入口腔，容易发生术后积液，易形成腮腺瘘，需要术后反复抽刺加压包扎，甚至采用小剂量放疗来解决积液问题。但这一措施麻烦费事，延长治疗过程；有学者[4]利用影像学手段，分析保留主导管和结扎主导管，腮腺浅叶切除术后剩余腺体变化，证实了保留主导管的剩余腮腺功能是正常的，而未保留主导管者则无功能。最终剩余腺体发生萎缩分泌功能逐渐丧失。术后出现味觉出汗综合征 15 例(50%)，症状较重。陆葛大等[5]研究证实肿瘤细胞极少在包膜外浸润，在肿瘤外 1 cm 腺叶切除可以提供足够的安全边缘，不致以引起复发。郑光勇等[6]观察大鼠保留腮腺主导管腮腺浅叶切除术后腮腺变化情况，虽然术后 1～2 周剩余腺体体积缩小，这主要是因为腺泡数目减少，部分细胞凋亡。但术后 4～7 周腺泡体积恢复术前水平，腺泡面积也增大腮腺恢复正常功能。这具有重要的临床意义：①恢复腮腺分泌功能，不会出现术后口干症状。②极少出现腮腺区凹陷畸形。③减少术后味觉出汗综合征的发生率。观察组病例为 4 例(12.5%)，症状较轻。腮腺区域性切除术，不是单纯剜除肿瘤，而是将腮腺肿瘤及周围部分正常腺体切除，该术式只适用于腮腺浅叶的多行性腺瘤和其它良性肿瘤。对腮腺复发性多行性腺瘤、深叶肿瘤和恶性肿瘤的病例不适用。区域性腮腺切除术，保留了主导管，可使剩余腺体分泌的很大部分涎液经导管流入口腔，保存了剩余腺体的正常分泌功能。面部凹陷畸形轻，疤痕短。优点是在不影响肿瘤切除彻底的前提下，又尽可能保留了术侧剩余腮腺分泌功能及主导管，缩短了手术时间。腺体面积增大功能恢复，挤压腮腺区有清亮涎液自导管口溢出。这样使术后积液涎瘘并发症明显减少，有利于创口的愈合，给术后护理带来极大方便，也减少病人各方面的心理压力。

综上所述，在保守性腮腺外科手术中，术后腮腺功能的损伤和恢复与手术术式、疾病性质是密切相关的。良性肿瘤位于腮腺浅叶时，可以通过术式的选择，在减少肿瘤复发的基础上尽力保留腮腺功能；肿瘤位于腮腺深叶时，体积较大，分布散在，与面神经关系密切时，为了减少肿瘤复发，保留面神经的全腮腺切除术即经典的手术方式仍应为治疗腮腺病损的首选术式，而保留腮腺的功能应放在次要位置。

关键词：腮腺；功能损伤；腮腺切除术
中图法分类号：R782.7 文献标识码：B

参考文献：

[1] 刘 华，李龙江，温玉明，等. 涎腺肿瘤 3 461 例临床病例分析[J]. 实用口腔医学杂志，2004，20(4)：475-477.

[2] 王 熙，朱彤好，郑顺友，等. 腮腺肿瘤 301 例发病情况统计分析[J]. 口腔医学，2004，24(3)：184-186.

[3] 李瑞春，刘 峰. 141 例腮腺包块临床分析[J]. 临床口腔医学杂志，2003，19(5)：309-310.

[4] Zhao K, Qi D Y, Wang L M. Functional superficial parotidectomy [J]. J Oral Maxillofac Surg, 1994, 52(10): 1038-1041.

[5] 陆葛大，方云鹤，平金良，等. 腮腺多形性腺瘤包膜状况与临床的关系[J]. 口腔医学，1999，19(1)：41-42.

[6] 郑光勇，李 扬，卢 勇. 腮腺部分切除保留导管的术后剩余腺体变化的体视学研究[J]. 华西口腔医学杂志，1998，16(1)：17-19.

（编辑 汪勤俭）