文章编号:1000-5404(2008)23-2183-04

论著

EphA2/EphrinA1在胃癌组织中的表达及与血管生成的关系

刘 辉,郭建文,刘江惠,左连富 (河北医科大学第四医院肿瘤研究所,石家庄 050011)

摘 要:目的 探讨EphA2与其配体EphrinA1在胃癌组织中的表达及与肿瘤血管生成的关系。**方法** 利用免疫组织化学法检测82例胃癌手术切除标本中癌组织、癌旁组织及正常胃黏膜中EphA2、EphrinA1的表达,并采用CD34抗体标记微血管内皮细胞,计算微血管密度(MVD)。分析EphA2、EphrinA1的表达与MVD之间的相关性及其与胃癌临床病理特征的关系。**结果** 胃癌组织中EphA2、EphrinA1的表达及MVD显著高于癌旁组织及正常胃黏膜($P<0.01$);EphA2、EphrinA1表达水平及MVD值与胃癌的分化程度、浸润深度及淋巴结转移有关($P<0.05$),MVD值还与肿瘤直径有关($P<0.05$);Spearman等级相关分析表明,EphA2、EphrinA1表达分别与MVD呈显著正相关($r=0.485$, $P<0.01$;$r=0.512$, $P<0.01$)。**结论** EphA2及其配体EphrinA1在胃癌组织中特异性高表达,可能参与肿瘤血管的生成,在胃癌的发病及恶性进展中发挥重要作用。

关键词: 胃癌;EphA2;EphrinA1;血管生成;免疫组织化学
中图法分类号: R392-33; R730.23; R735.2 **文献标识码:** A

EphA2/EphrinA1 expressions in human gastric carcinoma and their relationship with angiogenesis

LIU Hui, GUO Jian-wen, LIU Jiang-hui, ZUO Lian-fu (Hebei Provincial Tumor Institute, Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of EphA2 and its ligand EphrinA1 and their relationship with angiogenesis in gastric carcinoma. **Methods** Expressions of EphA2, EphrinA1 and CD34-stained microvessel density (MVD) were detected by immunohistochemical assay in gastric carcinoma tissues, adjacent tissues (1.5 to 2 cm from the mass) and normal gastric mucosa (5 to 10 cm from the mass) from 82 cases. The correlations among EphA2 and EphrinA1 expressions, MVD and clinic pathological features were analyzed. **Results** EphA2, EphrinA1 expressions and MVD in gastric carcinomas tissues were significantly higher than those in adjacent tissues and normal gastric tissues ($P<0.01$). They were related to histological differentiation, depth of invasion and lymphatic metastasis ($P<0.05$), while MVD had relationship with diameter of tumor ($P<0.05$). A significant positive correlation between EphA2 or EphrinA1 expression and MVD was observed by the Spearman rank correlation test ($r=0.485$, $P<0.01$, $r=0.512$, $P<0.01$). **Conclusion** EphA2 and its ligand EphrinA1 are specifically over-expressed in gastric cancer and may be involved in the angiogenesis and play an important role in the initiation and progression in gastric carcinoma.

Key words: gastric carcinoma; EphA2; EphrinA1; angiogenesis; immunohistochemistry

受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinases, RTKs)是外界刺激信息传递至细胞核,转化成细胞效应的信号转导通路中的关键分子组成。Eph基因家族是新发现的最大的RTKs家族成员,EphA2是该家族中被发现具有酪氨酸激酶活性的第一个基因。研究[1,2]表明,EphA2可在多种人体肿瘤组织中过表达,促进肿瘤向恶性表型发展。Brantley等[3]研究发现,EphA2能促进血管内皮细胞的迁移,与其配体EphrinA1结合可促进组织和内皮细胞形成毛细血管样结构,在肿瘤新生血管形成及侵袭转移中发挥重要作用。目前,有关胃癌组织中EphA2及其配体的表达以及二者与血管生成的关系研究尚少见文献报道。本实验采用免疫组

基金项目: 河北省普通高等学校强势特色学科肿瘤学建设经费([2005]52)
Supported by the Construction Funds for Outstanding Subjects of Common High-education Colleges of Hebei Province ([2005]52)
作者简介: 刘 辉,女,辽宁省抚顺市人,博士研究生,主要从事肿瘤病理学方面的研究。E-mail:liuyangmeimei@163.com
通信作者: 左连富,E-mail: zuolianfu4909@sina.com
收稿日期: 2008-04-24;**修回日期:** 2008-07-18

织化学法检测胃癌组织、癌旁组织及正常胃黏膜中EphA2、EphrinA1 的表达，用 CD34 标记血管内皮细胞，测定微血管密度（microvessel density，MVD），通过分析 EphA2、EphrinA1 表达与 MVD 之间的相关性及其与临床病理特征的关系，探讨 EphA2 及其配体 EphrinA1 对胃癌中血管生成的作用及临床意义。

1 材料与方法

1.1 标本

收集河北医科大学第四医院 2007 年 1－7 月胃癌手术切除标本 82 例，其中男性 70 例，女性 12 例，年龄 22～80 岁，平均年龄 59 岁，术前均未经过放、化疗。其组织学类型均为胃腺癌，每例标本分别取癌组织、癌旁组织（距癌边缘 1.5～2 cm）及正常胃黏膜（距癌肿边缘 5～10 cm）。标本固定于 10% 中性福尔马林溶液，石蜡包埋，病理切片供免疫组化染色。

1.2 主要试剂

EphA2（clone C-20）、EphrinA1（clone v-18）兔抗人多克隆抗体购于 Santa Cruz 公司，CD34（ZM-0046）鼠抗人单克隆抗体购于北京中杉生物技术有限公司，免疫组化二抗试剂盒（SP9000）购于北京中杉生物技术有限公司。

1.3 免疫组织化学法

采用链霉素－生物素过氧化物酶（S-P）染色法，具体操作步骤按 S-P 试剂盒说明进行。EphA2 一抗、EphrinA1 一抗和 CD34 一抗稀释浓度均为 1∶100，设立阳性对照，以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 EphA2、EphrinA1 表达结果判断

EphA2 和 EphrinA1 为细胞质/膜着色，根据显色强度分为 0～3 级[4]。0 级：阴性（－），细胞无棕黄色染色；1 级：弱阳性（＋），细胞染色较淡；2 级：阳性（＋＋），细胞中度染色；3 级：强阳性（＋＋＋），细胞染色较深。

1.5 CD34 表达结果判定及 MVD 计算

CD34 结果判断：每一个染成棕黄色的、可与周围血管、肿瘤细胞和其他结缔组织区分开来的内皮细胞或内皮细胞簇，不论管腔和红细胞出现与否，均作为一个单一的、可计数的微血管；管腔面积＞8 个红细胞直径，或带有较厚肌层的微血管不计数。

MVD 计数方法：先于低倍光镜（×40 和×100）下确定 3 个血管着色最密集区域，然后在高倍视野（×400）内计数微血管的数目，取 3 个视野的均值作为 MVD。结果判定在双盲法下进行，每张切片由两位病理医师分别判定、计数。两人计数相差 10% 以上重新计数[5]。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 11.5 统计软件，MVD 以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 χ^2 检验、方差分析及 Spearman 等级相关分析。

2 结果

2.1 EphA2、EphrinA1 的表达及其与胃癌临床病理特征的关系

EphA2、EphrinA1 蛋白阳性表达于细胞质/细胞膜，呈棕黄色颗粒。在胃癌组织中，EphA2、EphrinA1 蛋白的表达明显高于癌旁组织和正常胃黏膜（$P<0.01$），而癌旁组织与正常胃黏膜之间无显著性差异（$P>0.05$）。见表 1、图 1。

表 1 EphA2 和 EphrinA1 蛋白在各组织中的表达（$n=82$）

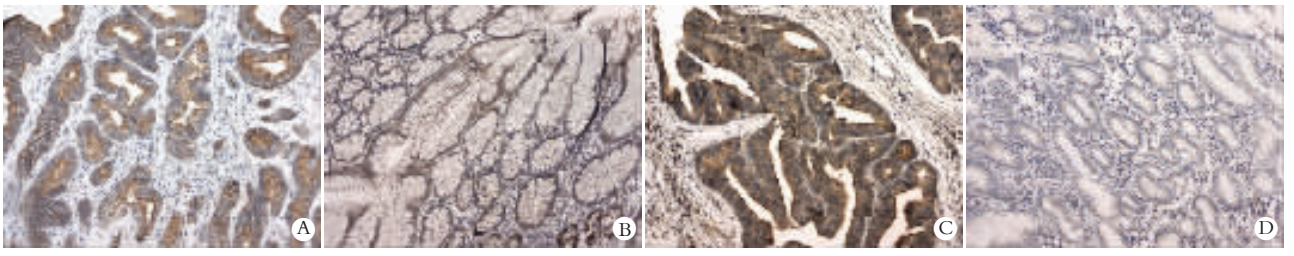
组织类型	EphA2				EphrinA1			
	－	＋	＋＋	＋＋＋	－	＋	＋＋	＋＋＋
癌组织	6	16	28	32	10	20	25	27
癌旁组织	35	26	19	2[a]	39	25	15	3[a]
正常胃黏膜	49	22	11	0[a]	43	31	8	0[a]

a：$P<0.01$，与癌组织比较

在胃癌组织中，随分化程度的降低，EphA2、EphrinA1 蛋白的表达均显著升高（$P<0.05$）；随浸润深度的增加，EphA2、EphrinA1 蛋白的表达均显著升高（$P<0.05$）；淋巴结转移组中 EphA2、EphrinA1 蛋白的表达显著高于无淋巴结转移组（$P<0.05$）；在肿瘤直径＜5 cm 与≥5 cm 两组间，＜60 岁和≥60 岁两组间 EphA2、EphrinA1 蛋白表达均无显著性差异（$P>0.05$）。见表 2。

2.2 CD34 的表达及 MVD 测定

CD34 主要表达于血管内皮细胞膜。微血管染色呈棕黄色，最密集染色区域即“热点”主要位于癌灶边缘，癌巢及癌细胞密集区 CD34 表达明显少于癌周及增生活跃区域，癌巢与坏死组织间血管生成较多，坏死区血管完全破坏。癌组织中 MVD（23.32±13.54）显著高于癌旁组织（13.93±7.44）（$P<0.01$）及正常胃黏膜（13.86±7.10）（$P<0.01$），而癌旁组织与正常胃黏膜 MVD 比较无显著性差异（$P>0.05$）。MVD 与胃癌的分化程度、浸润深度、淋巴结转移及肿瘤直径密切相关（$P<0.05$）。见表 2、图 2。



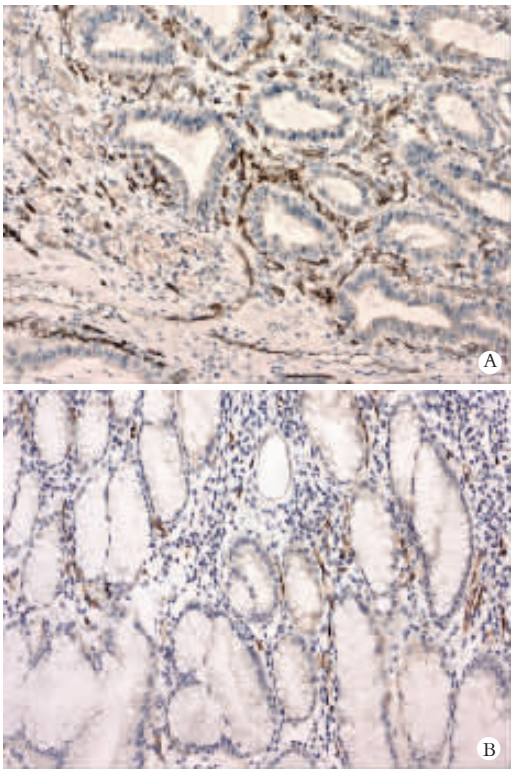
A：EphA2 在胃癌组织中的阳性表达，细胞质/膜呈棕黄色；B：EphA2 在正常胃黏膜中的阴性表达；C：EphrinA1 胃癌组织中的阳性表达，细胞质/膜呈棕黄色；D：EphrinA1 在正常胃黏膜中的阴性表达

图 1 EphA2 和 EphrinA1 在胃癌组织及正常胃黏膜中的表达 （S-P×200）

表 2　EphA2、EphrinA1 表达和 MVD 与胃癌临床病理特征的关系

类别	例数	EphA2					EphrinA1					MVD($\bar{x}\pm s$)	P
		−	+	++	+++	P	−	+	++	+++	P		
分化程度													
高分化	30	3	9	12	6	0.019	7	10	8	5	0.016	18.38 ± 7.27	0.003
中低分化	52	3	7	16	26		3	10	17	22		26.17 ± 12.77	
浸润深度													
浅层	20	4	8	3	5	0.017	4	8	7	1	0.015	17.46 ± 10.84	0.038
深层	62	12	20	29	1		6	12	18	26		25.21 ± 13.52	
淋巴结转移													
有	51	4	5	16	26	0.009	5	9	14	23	0.022	25.72 ± 11.99	0.017
无	31	2	11	12	6		5	11	11	4		19.38 ± 10.18	
肿瘤直径(cm)													
<5	51	3	11	18	19	0.914	5	13	15	18	0.806	20.94 ± 10.75	0.034
≥5	31	3	5	10	13		5	7	10	9		27.25 ± 14.65	
年龄(岁)													
<60	43	3	9	14	17	0.946	2	11	14	16	0.179	22.91 ± 13.89	0.775
≥60	39	3	7	14	15		8	9	11	11		23.77 ± 13.31	
性别													
男	70	6	16	21	27		10	17	20	23		23.21 ± 14.13	0.869
女	12	0	0	7	5▲		0	3	5	4▲		23.92 ± 9.86	

▲:部分类别组理论数小于 5,无法统计,舍弃



A: CD34 在胃癌组织中表达较强;B: CD34 在正常胃黏膜内表达较弱

图 2　CD34 在胃癌组织及正常胃黏膜中的表达　(S-P ×200)

2.3　EphA2、EphrinA1 表达与 MVD 的相关性

在 82 例胃癌组织中,EphA2 表达阴性(−)、弱阳性(+)、阳性(++)及强阳性(+++)胃癌组织的 MVD 分别为(12.33 ± 8.48)、(19.96 ± 13.24)、(20.87 ± 8.88)和(29.53 ± 14.14),EphrinA1 各表达级胃癌组织的 MVD 分别为(10.60 ± 3.06)、(17.65 ± 6.08)、(22.89 ± 8.65)、(32.63 ± 14.27)。经方差分析,EphA2、EphrinA1 表达各级别组间 MVD 均有显著性差异($P<0.01$);经 Spearman 等级相关分析,EphA2 表达与 MVD 呈显著正相关($r=0.485$, $P<0.01$),EphrinA1 表达与 MVD 呈显著正相关($r=0.512$, $P<0.01$)。

3　讨论

胃癌是十大最常见的恶性肿瘤之一,其早期诊断和治疗一直是困扰医疗界的难题。侵袭转移是恶性肿瘤的重要特征,也是导致死亡的重要原因。因此,针对胃癌浸润和转移的相关基因和蛋白的研究,可以为胃癌侵袭转移的早期诊断和靶向治疗提供帮助和依据。目前,通过利用对细胞因子或受体的促进、拮抗作用和对相关基因的干预达到对肿瘤浸润转移的抑制,已成为国内外研究的主要方向[6-8]。

受体酪氨酸激酶(RTKs)是外界刺激信息传递至细胞核,转化成细胞效应的信号转导通路中的关键分子组成。Eph 受体家族是 RTKs 家族成员之一,EphA2 是该家族中被发现具有酪氨酸激酶活性的第一个基因,它可以通过细胞外配体结合区与其配体 EphrinAl 结合,形成受体-配体复合物,激活细胞质的酪氨酸磷酸酶而活化,导致自身磷酸化及下游大量细胞内底物

蛋白分子的酪氨酸磷酸化,启动不同的信号传导通路,从而引起一系列生物效应:参与细胞的生长、迁徙和分化活动,在胚胎发育、血管的发生、肿瘤的形成等方面发挥重要作用。研究[9,10]表明,EphA2 与其配体 EphrinAl 可高表达于许多恶性肿瘤组织中,包括乳腺癌、结肠癌、食管癌及前列腺癌等,但在胃癌中 EphA2 与其配体的表达情况及其与临床病理特征的关系还不十分清楚。本实验结果显示胃癌组织中 EphA2、EphrinA1 的表达明显高于癌旁组织及正常胃黏膜,且其表达水平随胃癌分化程度的降低,浸润深度的增加,淋巴结转移而升高。以上结果表明 EphA2 及配体 EphrinA1 在胃癌组织中特异性高表达,其表达水平的升高与肿瘤恶性程度的增加及转移的发生密切相关。研究显示,肿瘤恶性程度的增加可导致细胞间黏附性的下降,使EphA2与其配体的结合及后续降解受阻,从而大量堆积于肿瘤细胞表面,无法发挥正常生理作用,反而促进恶性细胞的生长、迁徙和浸润。因此,我们认为联合检测 EphA2、EphrinA1 对预测胃癌预后及临床胃癌恶性发展的监控都具有重要意义。

血管生成(angiogenesis)是指从已有的毛细血管或毛细血管后静脉发展而成新生血管的过程。肿瘤组织的增殖依赖血液供应,血管生成在肿瘤的生长、侵袭和转移中发挥重要作用。研究表明,EphA2 及其配体 EphrinA1 在许多恶性肿瘤的血管内皮细胞中共表达[11],二者的结合可促进肿瘤血管内皮细胞的迁移,并通过影响细胞骨架、基质黏附和(或)细胞黏附而促进组织和内皮细胞形成毛细血管样结构,而抑制EphA2的活化可以削弱肿瘤的血管形成[10],提示 EphA2 在肿瘤新生血管形成及侵袭转移中发挥重要作用。MVD 是用 CD34 标记肿瘤血管,对肿瘤的血管生成进行直接观察并量化的方法,是反映肿瘤侵袭转移等生物学行为的一个重要指标。本实验结果显示,胃癌组织中 MVD 显著高于癌旁组织及正常胃黏膜,并随胃癌分化程度的降低,浸润深度的增加,淋巴结转移及肿瘤直径增加而升高,且与 EphA2 及其配体 EphrinA1 的表达呈显著正相关,表明 EphA2 可能发挥了血管促进剂的作用,在胃癌血管形成过程中扮演了重要角色。肿瘤血管的新生受多种因子的调节,是促血管因子和血管生成抑制因子间失衡的结果,EphA2 促血管生成机制可能是通过与其配体结合,激活下游的一系列信号传导,从而刺激血管内皮细胞生长因子(VEGF)等促血管因子的表达而实现的。我们认为EphA2可能通过促进肿瘤新生血管形成机制参与胃癌的发生和发展过程,不仅促进了胃癌原发瘤的生长,还为其血性转移提供了更多机会,与肿瘤的预后密切相关。因此,在胃癌的临床治疗中,抑制 EphA2 的活化可削弱肿瘤的血管形成,从而抑制肿瘤的生长和转移。深入开发和应用选择性 EphA2 抑制剂有望为胃癌的预防和治疗开辟新的途径。

参考文献:

[1] Fang W B, Brantley-Sieders D M, Parker M A, *et al*. A kinase-dependent role for EphA2 receptor in promoting tumor growth and metastasis[J]. Oncogene, 2005, 24(53): 7859-7868.

[2] Miyazaki T, Kato H, Fukuchi M, *et al*. EphA2 overexpression correlates with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Cancer, 2003, 103(5): 657-663.

[3] Brantley-Sieders D M, Fang W B, Hicks D J, *et al*. Impaired tumor microenvironment in EphA2-deficient mice inhibits tumor angiogenesis and metastatic progression[J]. FASEB J, 2005, 19(13): 1884-1886.

[4] Zeng G, Hu Z, Kinch M S, *et al*. High-level expression of EphA2 receptor tyrosine kinase in prostatic intraepithelial neoplasia[J]. Am J Pathol, 2003, 163(6): 2271-2276.

[5] Weidner N. Current pathologic methods of measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. Breast Cancer Res Treat, 1995, 36(2): 169-180.

[6] 张真真, 张 声, 林建银, 等. 促血管生成素及其受体的异常表达与胃癌血管生成的关系[J]. 中华肿瘤杂志, 2006, 28(4): 280-284.

[7] 周慧聪,张 艳,李继昌. 胃癌组织中环氧合酶-2、血管内皮生长因子-C 与微淋巴管密度检测[J]. 郑州大学学报:医学版,2006,41(6):1131-1133.

[8] Kamiyama M, Ichikawa Y, Ishikawa T, *et al*. VEGF receptor antisense therapy inhibits angiogenesis and peritoneal dissemination of human gastric cancer in nude mice[J]. Cancer Gene Ther, 2002, 9(2): 197-201.

[9] Thaker P H, Deavers M, Celestino J, *et al*. EphA2 expression is associated with aggressive features in ovarian carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(15): 5145-5150.

[10] Cheng N, Brantley D M, Liu H, *et al*. Blockade of EphA receptor tyrosine kinase activation inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced angiogenesis[J]. Mol Cancer Res, 2002, 1(1): 2-11.

[11] Pandey A, Shao H, Marks R M, *et al*. Role of B61, the ligand for the Eck receptor tyrosine kinase, in TNF-alpha-induced angiogenesis[J]. Science, 1995, 268(5210): 567-569.

(编辑 王 红)