

文章编号:1005-6947(2007)07-0696-04

· 简要论著 ·

大肠癌组织中 EphA2, VEGF 和 MMP9 蛋白的表达及其相关性研究

蒋萍^{1,2}, 李景和¹, 罗庚求¹, 沈明¹, 刘洁¹, 李红玲¹

(1. 中南大学基础医学院 病理学系, 湖南 长沙 410078; 2. 黑龙江省哈尔滨市第一人民医院 病理科, 黑龙江 哈尔滨 150010)

摘要:为探讨大肠癌组织中 EphA2, VEGF 和 MMP9 蛋白的表达及其与大肠癌生物学行为的关系。笔者应用免疫组织化学 S-P 法检测 69 例大肠癌组织及 30 例远癌肠黏膜中 EphA2, VEGF, MMP9 蛋白的表达。结果显示, 大肠癌组织中 EphA2 蛋白(100%)表达显著高于远癌肠黏膜(80.0%)($P < 0.01$), 且与 Dukes 分期、肿瘤组织分化程度及肉眼类型有关($P < 0.05$), 而与年龄无关($P > 0.05$)。VEGF 蛋白及 MMP9 蛋白在大肠癌中的表达均显著高于远癌肠黏膜(均 $P < 0.01$), 与 Dukes 分期有关($P < 0.05$), 但与年龄、肿瘤组织分化程度及肉眼类型等无关(均 $P > 0.05$)。EphA2 蛋白在大肠癌中的表达与 VEGF, MMP9 呈正相关($r_1 = 0.404, P_1 = 0.000; r_2 = 0.282, P_2 = 0.000$)。提示联合检测 EphA2, VEGF 和 MMP9 有助于对大肠癌侵袭及转移能力的评估, 对大肠癌的预后判断可能具有一定的临床意义。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(7): 696-699]

关键词: 结直肠肿瘤/病理学; EphA2; VEGF; MMP9

中图分类号: R735.3

文献标识码: B

EphA2 (erythropoietin-producing hepatocellular A2) 是 Eph 家族 EphA 亚家族中的一个成员, 为跨膜酪氨酸蛋白激酶^[1]。EphA2 作为癌蛋白参与恶性肿瘤的发生发展, 在多种实体瘤中广泛高表达。侵袭及转移是恶性肿瘤的重要特征, 也是影响肿瘤患者预后的关键因素之一。而基膜的不完整, 肿瘤新生血管的形成是促进肿瘤发生侵袭及转移的关键环节。笔者联合检测了大肠癌组织中 EphA2、血管内皮生长因子(VEGF)和基质金属蛋白酶 9(MMP9)的表达情况, 并分析 EphA2 蛋白的表达与大肠癌的临床病理特征及生物学行为的关系, 旨在探讨 EphA2 在大肠癌的发生发展及侵袭转移中可能发挥的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大肠癌组织 69 例。均为中南大学湘雅医院病理科 2002—2004 年手术切除的大肠癌石蜡包埋组织。男 47 例, 女 22 例; 年龄 30~91 岁(平均 57.14 岁)。高分化 35 例, 中分化 27 例,

低分化 7 例; 淋巴结转移阳性 28 例, 阴性 41 例。1.1.2 远癌大肠黏膜 30 例。均取自大肠癌行肠切除的远侧断端肠黏膜。所有断端均距癌组织 5 cm 以上, 组织学检查为基本正常肠黏膜。

1.2 方法

所有手术切除标本均经 10% 甲醛固定, 常规石蜡包埋后行 4 μm 连续切片, 每例均行 HE 染色和免疫组织化学染色(S-P 法), 光镜观察。

免疫组织化学染色时用 3% H₂O₂ 阻断 20 min, 将切片置于 0.01 M 枸橼酸(pH = 6.0)修复液中, 用微波炉修复 2 次, 再将切片放入湿盒内。用正常山羊血清置 37℃ 恒温孵育箱中封闭 30 min, 甩干切片后滴加特异性抗体(EphA2 的工作浓度为 1:50, VEGF 为即用型抗体, MMP9 的工作浓度为 1:100), 置 37℃ 恒温孵育箱中孵育 30 min, 再放入湿盒内置 4℃ 冰箱中过夜。次日加生物素标记二抗 37℃ 恒温孵育 30 min, 链霉素抗生物素过氧化物酶溶液 37℃ 恒温孵育 30 min 后 PBS 溶液和蒸馏水洗, 再用 DAB 液显色, 苏木素复染。

EphA2, VEGF 和 MMP9 均用已知阳性结肠癌切片作阳性对照; 用 0.01 M PBS 液(pH = 7.4)代替一抗作阴性对照。所用 EphA2 为兔抗人多克隆抗体、VEGF 为鼠抗人单克隆抗体, 羊抗兔、羊抗鼠 SP 试剂盒及 DAB 显色剂均购自北京中山生物技术公司。

收稿日期:2007-03-09; 修订日期:2007-06-25。

作者简介:蒋萍, 女, 湖南永州人, 中南大学基础医学院病理学系硕士研究生(现在哈尔滨市第一人民医院病理科工作), 主要从事消化道肿瘤病理方面的研究。

通讯作者:李景和 E-mail: Lijinghe0718@hotmail.com

1.3 结果判断

EphA2, VEGF, MMP9 蛋白染色阳性均为在细胞膜或胞质内出现棕黄色颗粒,且其着色强度高于背景非特异性染色者。每例切片随机选取5个高倍视野进行结果判定。按染色强度及阳性细胞数占肿瘤细胞总数的百分比综合计分。染色强度:无色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分;阳性细胞数:小于总数的5%为0分,5%~25%为1分,26%~50%为2分,大于50%为3分。染色强度得分与阳性细胞数得分相乘,0分为阴性(-),1~3分为弱阳性(+),4~5分为中度阳性(++),大于或等于6分为强阳性(+++)。

1.4 统计学方法

应用 SPSS11.0 统计软件进行分析,采用等级资料的秩和检验(Kruskal Wallis' of Nemenyis'), EphA2与 VEGF2 项指标阳性表达之间的关系采用 Spearman 等级相关性分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 EphA2, VEGF, MMP9 在大肠癌和远癌肠黏膜组织中的表达

大肠癌组织中 EphA2 蛋白阳性表达率为

100% (69/69), 显著高于远癌肠黏膜的表达 80.0% (24/30) ($P < 0.01$) (图1-2)。其中, EphA2强阳性表达率和中度阳性表达率分别为 47.8% (33/69) 及 42.0% (29/69), 均显著高于远癌肠黏膜的表达率[分别为 0% (0/30) 和 6.7% (2/30)] ($P < 0.01$)。VEGF 在大肠癌组织中的阳性表达率为 98.6% (68/69), 显著高于远癌肠黏膜的表达率 33.3% (10/30) ($P < 0.01$) (图3)。MMP9 蛋白在大肠癌中的表达率为 82.6% (57/69), 显著高于远癌肠黏膜的表达率 33.3% (10/30) ($P < 0.01$) (图4)(表1)。

2.2 EphA2, VEGF, MMP9 的表达与临床病理参数的关系

大肠癌组织中 EphA2 的表达与 Dukes 分期、组织分化程度及肉眼类型有关($P < 0.01$), 但与年龄无关($P > 0.05$)。大肠癌组织中 VEGF 和 MMP9 的表达均与 Dukes 分期有关($P < 0.05$), 但与年龄、组织分化程度及肉眼类型等无关($P > 0.05$) (表1)。

2.3 大肠癌组织中 EphA2, VEGF, MMP9 的相关性分析

EphA2 与 VEGF, MMP9 的蛋白表达均呈正相关, 相关系数 r 分别为 0.404 ($P = 0.000$) 和 0.282 ($P = 0.000$)。

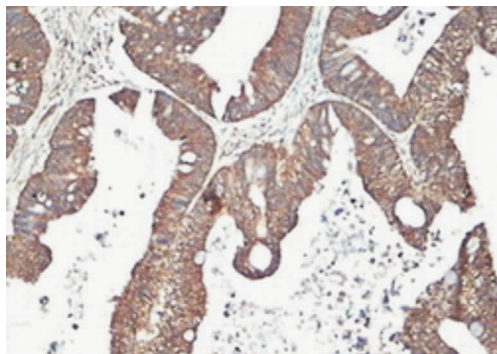


图1 结肠高分化腺癌 EphA2 强阳性表达(+++)(S-P×100)

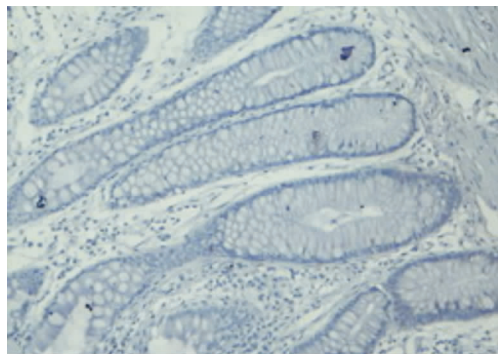


图2 远癌肠黏膜 EphA2 阴性表达(S-P×100)

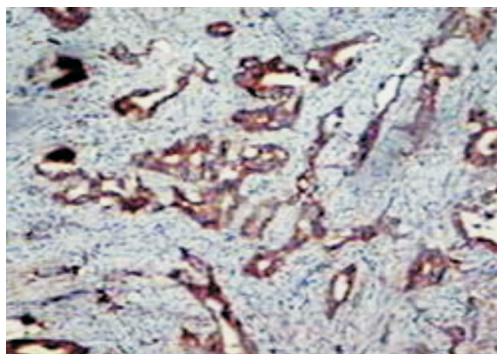


图3 结肠中分化腺癌 VEGF 强阳性表达(+++)(S-P×100)

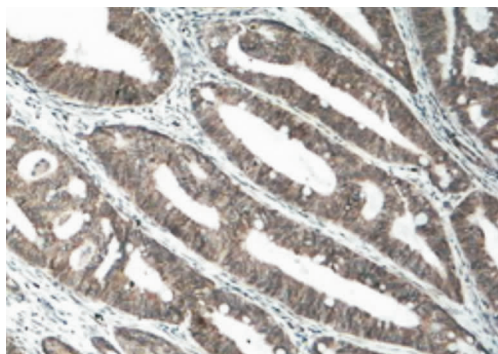


图4 结肠高分化腺癌 MMP9 强阳性表达(+++)(S-P×100)

表1 EphA2, VEGF, MMP9 与各临床病理参数之间的关系

临床病理特征	n	EphA2				VEGF						MMP9							
		(-)	(+)	(++)	(+++)	z	P	(-)	(+)	(++)	(+++)	z	P	(-)	(+)	(++)	(+++)	z	P
组别	99					-7.315	0.000					-7.106	0.000					-5.034	0.000
肿块	69	0	7	29	33			1	18	29	21			12	11	18	28		
远癌	30	6	22	2	0			20	9	1	0			20	6	2	2		
分化程度						6.127 [†]	0.047					0.552 [†]	0.759					1.822 [†]	0.402
高	35		4	20	11			0	8	19	8			5	8	11	11		
中	27		3	6	18			0	10	7	10			5	3	4	15		
低	7		0	3	4			1	0	3	3			2	0	3	2		
年龄(岁)						-0.390	0.586					-0.278	0.781					-0.815	0.415
>50	48		3	24	21			0	12	22	14			8	5	15	20		
<=50	21		4	5	12			1	6	7	7			4	6	3	8		
Dukes分期						-2.328	0.02					-2.982	0.003					-2.874	0.004
A+B	42		5	22	15			1	15	18	8			11	9	9	13		
C+D	27		2	7	18			0	3	11	13			1	2	9	15		
肉眼类型						13.91 [†]	0.001					4.318 [†]	0.115					0.256 [†]	0.880
浸润型	9		0	3	6			0	1	4	4			1	0	5	3		
溃疡型	42		3	14	25			1	8	20	13			8	8	7	19		
隆起型	18		4	12	2			0	9	5	4			3	3	6	6		

注:† 标记代表 χ^2 值,其余均为 Z 值

3 讨论

人类 EphA2 基因定位于染色体 1p36.1^[2], 此区在人体的多种肿瘤中常有缺失,被认为是肿瘤的遗传热点。Eph 家族属于受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)的 VIII 家族,共有 14 个成员,是 RTK 中最大的亚家族,其配体是 Ephrin。在成年人, Eph RTKs 和其配体 Ephrins 在一系列的肿瘤和肿瘤细胞株中均过度表达,包括乳腺癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、结肠癌、恶性黑色素瘤等^[3]。EphA2 在正常上皮细胞中与配体结合,激酶位点磷酸化,通过信号放大促进胚胎发育、调节细胞的增殖和分化。EphA2 受体在正常上皮细胞中位于细胞连接处,在恶性肿瘤细胞中, EphA2 受体定位异常,由细胞连接处转变为广泛分布在肿瘤细胞表面,不能与其膜附着形式的配体相结合,从而发生降解,导致 EphA2 呈过度表达状态。同时 EphA2 功能也会发生变化,成为功能强大的癌蛋白,启动其它的信号转导途径,调节细胞黏附、肿瘤侵袭与转移^[4]。大多数肿瘤的远处转移及复发有 EphA2 的过度表达。在肺癌中, EphA2 高表达可以作为肿瘤脑转移的参考指标之一^[5]。

本组研究结果显示,大肠癌组织中 EphA2 蛋白表达显著高于远癌肠黏膜的表达,且与肿瘤的 Dukes 分期、肉眼类型和组织分化程度密切相关,提示该基因可能在大肠癌发生发展及侵袭转移过程中起重要作用。

肿瘤的生长与转移是一个多因素多步骤的复杂过程,而肿瘤的血管形成在肿瘤生长、浸润及转移过程中发挥了极其重要的作用。VEGF 是一种重要的促血管生成因子,在肿瘤细胞中和血管内皮细胞中有明显的阳性表达。本研究表明,大肠癌组织中 VEGF 阳性表达显著高于远癌肠黏膜 ($P < 0.05$),且与 Dukes 分期有关,提示大肠癌的发生发展可能与癌细胞大量表达 VEGF 及 VEGF 促进血管生成关系密切。Ojima^[6]在视网膜内皮细胞中,用可溶性的 Ephrin 刺激 EphA2 受体,可抑制 VEGF 诱导的 VEGFR2 的磷酸化及下游信号转导途径。Brantley - Sieders^[7]发现,用转移性的乳腺癌肿瘤细胞接种 EphA2 缺陷雌鼠,同对照组相比,肿块微血管密度有所下降,且其内皮细胞出芽能力减弱。本研究中, EphA2 蛋白表达与 VEGF 蛋白呈正相关 ($P < 0.05$),提示在大肠癌中 EphA2 可能通过影响 VEGF 而促进肿瘤

侵袭及转移。

除了肿瘤的血管形成外,基膜的完整与否也是影响肿瘤发生侵袭与转移的关键环节, MMPs 是一组与锌结合的主要分解细胞外基质的蛋白酶,与肿瘤的侵袭和转移关系十分密切。激素、生长因子和细胞因子等可通过多种信号传导途径,直接或间接作用于 MMPs,从而促进肿瘤的转移。Duxbury^[8]发现在胰腺癌细胞株中, EphA2 过表达可通过 FAK 依赖方式诱导 MMP2 的生成。本实验结果表明,大肠癌中 MMP9 的表达水平明显高于远癌肠黏膜,且其高表达与 Dukes 分期密切相关。MMP9 和 MMP2 都属于明胶酶,由此笔者推测 EphA2 过表达可能影响 MMP9 的表达。

本研究结果提示,联合检测 EphA2, VEGF, MMP9 蛋白可作为判定大肠癌侵袭转移能力的客观参考指标,对大肠癌的预后判断具有一定的临床意义。

参考文献:

[1] Lindberg RA, Hunter T. cDNA cloning and characterization of Eck, an epithelial cell receptor protein - tyrosine kinase in eph/Elk family of protein kinases [J]. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(12): 6316 - 6324.

[2] Sulman EP, Tang XX, Allen C, *et al.* a human eph - related gene, maps to 1p36.1, a common region of alteration in human cancers [J]. *Genomics*, 1997, 40(2): 371 - 374.

[3] Brantley - Sieders D, Parker M, Chen J. Eph receptor tyrosine kinases in tumor and tumor microenvironment [J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(27): 3431 - 3442.

[4] Kinch MS, Carles - Kinch, K. Overexpression and functional alterations of the EphA2 tyrosine kinase in cancer [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2003, 20(1): 59 - 68.

[5] Kinch MS, Mary - Beth M, David H, *et al.* Predictive Value of the EphA2 Receptor Tyrosine Kinase in Lung Cancer Recurrence and Survival [J]. *Advances in Brief*, 2003, 9(2): 613 - 618.

[6] Ojima T, Takagi H, Suzuma K, *et al.* EphrinA1 Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor - Induced Intracellular Signaling and Suppresses Retinal Neovascularization and Blood - Retinal Barrier Breakdown [J]. *Am J Pathol*, 2006, 168(1): 331 - 339.

[7] Brantley - Sieders DM, Fang WB, Hicks DJ, *et al.* Impaired tumor microenvironment in EphA2 - deficient mice inhibits tumor angiogenesis and metastatic progression [J]. *FASEB J*, 2005, 19(13): 1884 - 1886.

[8] Duxbury MS, Ito H, Zinner MJ, *et al.* EphA2: a determinant of malignant cellular behavior and a potential therapeutic target in pancreatic adenocarcinoma [J]. *Oncogene*, 2004, 23(7), 1448 - 1456.

2007 年全国器官移植学术会议征文通知

由中华医学会器官移植学分会主办,中山大学附属第三医院、中山大学器官移植研究所承办的“2007 年全国器官移植学术会议”定于 2007 年 11 月 9 日~11 日在美丽的花城广州召开。经报中华医学会批准,参加会议者可获得国家一类继续医学教育学分,会议交流的论文颁发中华医学会论文证书。

1. 征文内容:(1)各种器官、组织、细胞移植的基础与临床研究;(2)与移植有关的器官切取、保存、运输及分配问题;(3)器官移植术后感染、肿瘤复发、血管、胆管等并发症的防治;(4)新型免疫抑制剂的临床应用和基础研究;(5)移植免疫学的问题;(6)影响移植长期存活、改善受者生活质量以及器官移植术后的中长期管理的相关问题;(7)器官移植的相关学科研究,如麻醉、ICU、护理、心理学等基础与临床研究;(8)异种移植;(9)与移植有关的组织工程学;(10)与移植有关的伦理学、社会学和经济学等。

2. 征文要求:(1)报送会议的论文请寄全文及 800 字以内摘要各一份(请自留底稿)。请尽量以电子邮件投稿。无电子版(软盘及电子邮件)论文摘要者恕不录入论文汇编。稿件请用 A4 纸打印,并寄软盘(word 格式)。(2)凡在国内外公开发行人物上发表过的论文,不予受理。(3)截稿日期:2007 年 8 月 31 日(以邮戳及电子邮件收到日期为准)。

来稿请寄:广州市天河路 600 号中山大学附属第三医院肝移植中心 张俊峰收 邮编:510630,请在信封右上角注明:会议征文;电话/传真号:020 - 87595523;电子邮件:qgyz2007@126.com;联系人:张俊峰