

· 临床研究 ·

EphA2 在肝细胞癌中的表达及临床意义

靳文剑, 张焜和[△], 陈火国, 罗庆丰

(江西省肿瘤医院老年肿瘤科, 南昌 330029)

摘要:目的 检测 Eph 受体酪氨酸激酶 A2(EphA2)蛋白在肝细胞癌(HCC)中的表达情况,分析其与 HCC 临床病理特征和预后之间的相关性。方法 收集 52 例 HCC 及对应癌旁组织,运用免疫组化技术检测 EphA2 蛋白在 HCC 及对应癌旁组织中的表达情况,研究 EphA2 蛋白表达与 HCC 临床病理特征及肿瘤术后复发之间的相关性。结果 EphA2 蛋白在 HCC 组织中的表达显著高于对应的癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.05$);EphA2 蛋白在 HCC 中的高表达与肿瘤数目大于 1、肿瘤包膜缺失、门脉侵犯和高 TNM 分期显著相关($P < 0.05$);多变量 Cox 比例风险分析提示 EphA2 蛋白表达与 HCC 术后复发显著相关($P < 0.05$)。结论 HCC 组织中 EphA2 蛋白表达上调,且其表达上调与 HCC 的恶性病理特征及术后复发相关,提示 EphA2 蛋白可能在 HCC 进展和转移中发挥重要作用。

关键词:癌,肝细胞;Eph 受体酪氨酸激酶 A2;侵袭转移

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.20.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)20-2361-03

Expression and clinical significance of EphA2 in hepatocellular carcinoma

Jin Wenjian, Zhang Kunhe[△], Chen Huoguo, Luo Qingfeng

(Department of Geriatric Oncology, Jiangxi Provincial Tumor Hospital, Nanchang, Jiangxi 330029, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of EphA2 and its correlation with the clinicopathological features in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** We collected 52 samples of surgically resected paired HCC and normal tumor-adjacent tissues. EphA2 expression was detected in the samples using immunohistochemical staining. The correlation between EphA2 protein expression and clinicopathological feature and tumor recurrence was analyzed. **Results** The protein expression of EphA2 in HCC tissues was significantly increased compared to those of the normal tumor-adjacent tissues ($P < 0.05$). Clinicopathological analysis suggested that EphA2 protein high-expression was associated with more tumor number, tumor capsule absence, invasion of portal vein (PV) and advanced TNM stage ($P < 0.05$). Multivariate analyses using Cox's proportional hazards model suggested that EphA2 expression was significantly associated with HCC postoperative recurrence. **Conclusion** The expression of EphA2 is up-regulated in HCC tissues, and the high-expression of EphA2 is correlated with poor clinicopathological characteristics and recurrence of HCC, suggesting that EphA2 may play an important role in the progression and metastasis of HCC.

Key words: carcinoma, hepatocellular; EphA2; invasion and metastasis

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC, 简称肝癌)是中国肿瘤相关死亡最常见的原因之一^[1]。近年来基于手术的综合治疗能够降低肿瘤复发并提高患者生存率,但是患者确诊时就已经出现了肝内转移或肝外转移使得治愈性切除不再可行^[2]。因此,越来越多的临床和组织学分子标志物如 Eph 受体酪氨酸激酶 A2(EphA2)蛋白、E 钙黏蛋白(E-cadherin)和 N 钙黏蛋白(N-cadherin)被作为 HCC 诊断和预后相关因子。EphA2 蛋白属于促红细胞生成素产生肝细胞受体家族成员之一,参与肿瘤形成、进展、血管生成和侵袭转移等一系列生物学行为^[3-4]。为了评估 EphA2 蛋白在 HCC 中的意义,本研究通过检测 EphA2 蛋白在 HCC 及对应癌旁组织中的表达,并分析其与 HCC 临床病理特征和肿瘤术复发的相关性,初步探讨 EphA2 蛋白在 HCC 发生、发展、侵袭转移中的作用,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 52 例 HCC 患者手术切除的癌组织及对应癌旁组织标本 52 例,其中,男 45 例,女 7 例,年龄 30~75 岁,平均(55.0±4.5)岁。所有患者术前均未行放射、化疗及射频消融治疗,所有组织标本经术后病理学证实。所有标本于术中离体 30 min 内取材,经 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋、

切片备用。对所有患者术后进行随访,记录发生肝内或远处转移的时间。

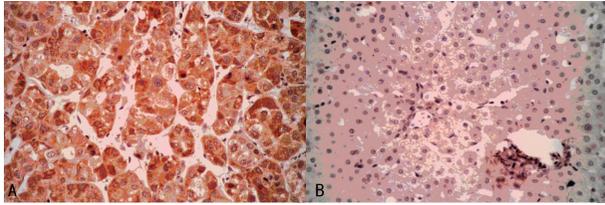
1.2 方法 兔抗人 EphA2 蛋白多克隆抗体(sc-924, Santa Cruz 公司),免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。对石蜡块进行 4 μm 连续切片制片。经过脱蜡过程后,枸橼酸盐缓冲液进行热抗原修复,30 mL/L H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶,100 mL/L 山羊血清封闭,将以 1:100 比例稀释的兔抗人 EphA2 蛋白加于标本后,置于湿盒内 4 ℃ 过夜。以磷酸盐缓冲液(PBS)取代一抗为阴性对照。滴加生物素标记的山羊抗兔工作液,37 ℃ 温箱孵育 20 min。滴加辣根酶标记的链霉卵白素工作液,孵育 30 min。滴加 DAB 显色,苏木精轻度复染,梯度脱水至透明。显微镜下观察、成像系统拍照,统计分析实验结果。用染色强度联合阳性细胞百分比进行评分:染色强度分为 4 等级:0 分,阴性;1 分,弱阳性;2 分,中度;3 分,强阳性;阳性细胞百分比分级:阳性细胞小于或等于 5%,0 分;>5%~25%,1 分;>25%~50%,2 分;>50%~75%,3 分;>75%,4 分。染色强度和阳性细胞百分比评分相乘大于或等于 1 分则认为 EphA2 蛋白阳性表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,采用 χ^2 检验分析 EphA2 蛋白在 HCC 及对应癌旁组织中的表达差

异及其与 HCC 临床病理特征之间的相关性,采用多变量 Cox 比例风险分析研究 EphA2 蛋白表达与 HCC 术后复发的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HCC 及对应癌旁组织中 EphA2 蛋白的表达 对收集的 52 份 HCC 组织和对应的癌旁组织进行 EphA2 蛋白免疫组化染色,EphA2 蛋白阳性染色为黄色或棕色,主要定位在细胞质和细胞膜(图 1)。EphA2 蛋白在 HCC 组织中的阳性表达率 67.3%(35/52)显著高于对应癌旁组织 25.0%(13/52),差异有统计学意义($\chi^2 = 18.726, P < 0.05$)。



A: HCC 组织; B: 癌旁组织。

图 1 EphA2 蛋白在 HCC 组织及癌旁组织中的表达(SP, $\times 400$)

表 1 EphA2 蛋白表达水平与 HCC 临床病理特征的关系

特征	n	EphA2 蛋白表达情况			χ^2	P
		-	+			
年龄(岁)						
<60	36	11	25	0.243	0.622	
≥ 60	16	6	10			
性别						
男	45	14	31	0.380	0.538	
女	7	3	4			
HBsAg						
-	6	1	5	0.792	0.374	
+	46	16	30			
AFP($\mu\text{g/L}$)						
≤ 400	11	4	7	0.085	0.770	
> 400	41	13	28			
肝硬化						
不存在	17	6	11	0.078	0.780	
存在	35	11	24			
肿瘤大小(cm)						
< 5	32	13	19	2.379	0.123	
≥ 5	20	4	16			
肿瘤数量(n)						
1	22	11	11	5.191	0.023	
> 1	30	6	24			
肿瘤包膜						
不存在	31	14	17	5.424	0.020	
存在	21	3	18			
门脉侵犯						
不存在	33	14	19	3.887	0.049	
存在	19	3	16			
Edmonson 分期						
I + II	20	9	11	2.237	0.135	
III + IV	32	8	24			
TNM 分期						
I + II	23	11	12	4.293	0.038	
III + IV	29	6	23			

2.2 EphA2 蛋白的表达与 HCC 临床病理特征的关系 E-

phA2 蛋白表达与 HCC 临床病理特征的相关性分析结果,见表 1。EphA2 蛋白在 HCC 组织中的高表达与较多肿瘤数目、肿瘤包膜缺失、门脉侵犯和高 TNM 分期显著相关($P < 0.05$),与性别、年龄、HBV 感染、血清 AFP 水平、肝硬化、肿瘤大小、肿瘤 Edmonson 分级等无显著相关性。

2.3 EphA2 蛋白表达与 HCC 术后复发的关系 多变量 Cox 比例风险分析提示高 TNM 分期、门脉侵犯、肿瘤包膜缺失、肿瘤体积($> 5 \text{ cm}$)和 EphA2 蛋白阳性表达是与肿瘤术后高复发率相关的独立因子,见表 2。

表 2 EphA2 蛋白表达与 HCC 术后复发的关系

变量	HR	95%CI	P
包膜(存在 vs. 缺失)	1.567	1.092~4.153	0.044
体积($< 5 \text{ cm}$ vs. $> 5 \text{ cm}$)	2.712	1.221~5.923	0.012
门脉侵犯(缺失 vs. 存在)	3.916	1.245~3.672	0.003
TNM 分期(I, II vs. III, IV)	3.238	1.125~4.129	0.004
EphA2 蛋白(阳性 vs. 阴性)	1.333	1.439~3.221	0.019

3 讨 论

已经有很多临床和组织学指标被用来预测 HCC 患者术后的复发和存活率^[5]。近年来,越来越多的分子标志物作为肿瘤侵袭、转移和预后因子引起人们的关注,多种恶性肿瘤如胃癌、结肠癌、前列腺癌、胰腺癌和 HCC 已经被证实存在 EphA2 蛋白的表达上调并与肿瘤恶性临床病理特征相关^[6-10]。EphA2 蛋白 mRNA 在 HCC 及癌旁组织中的表达趋势尚有争议^[11-12],但本研究及之前研究提示,EphA2 蛋白在 HCC 组织中表达显著上调($P < 0.05$)^[11-13];之前有报道称 EphA2 蛋白过表达与 HCC 患者的门脉癌栓、卫星灶及淋巴结转移相关^[11-13]。本研究也发现,EphA2 蛋白的高表达与 HCC 恶性临床病理特征密切相关,如较多的肿瘤数目、肿瘤包膜缺乏、门脉侵犯和高 TNM 分期,进一步结合随访资料,多变量 Cox 比例风险分析提示高 TNM 分期、门脉侵犯、肿瘤包膜缺失、肿瘤体积($> 5 \text{ cm}$)和 EphA2 蛋白表达是与肿瘤术后高复发率相关的独立因子,预示 EphA2 蛋白可能在肿瘤进展和侵袭中发挥重要作用。

EphA2 及其配体 ephrin-A1 在肿瘤形成和进展中发挥的作用依赖于不同的肿瘤细胞和机制^[14]。而且,efhrin-A1 的缺失可能引起非磷酸化的 EphA2 聚集,从而通过 EphA2/efhrin-A1 系统消除其抑制活性。已知 EphA2 蛋白/efhrin-A1 参与肿瘤的发病机制,但其复杂的机制尚未研究清楚。EphA2 蛋白在各种成人上皮组织中普遍表达,并且参与到细胞形态形成过程中(如细胞迁移和血管形成)。有研究提示,EphA2 蛋白的高表达与 E-cadherin 的高表达有关联性,提示 EphA2 蛋白和 E-cadherin 蛋白可能联合作用参与调节 HCC 细胞的侵袭和转移^[13]。有报道证实,HCC 侵袭转移与上皮间质转化(EMT)相关,EMT 表现为细胞失去有极性的上皮表型并获得间质表型,分子水平表现为 E-cadherin 表达降低伴 N-cadherin 表达上调,在肿瘤侵袭转移过程中发挥了关键作用^[15]。进一步的研究表明,在肿瘤细胞中 E-cadherin 表达下调可以通过作用于 EphA2 蛋白减少细胞与细胞外基质的黏附^[16]。

因此,EphA2 蛋白的正常功能依赖于 E-cadherin,E-cadherin 的异常表达可能是通过影响 EphA2 蛋白的功能而改变 HCC 细胞的生长和黏附性能。这些分子的相互作用是一个非

常复杂的过程,涉及很多的信号通路,因此,未来的研究有必要涉及 EphA2 蛋白和 E-N-cadherin 转化相关调节机制。

参考文献:

- [1] 邱世云,周婧,董浦江,等. Ezrin 及 CD44 蛋白在肝癌组织中的表达与意义[J]. 重庆医学,2012,41(30):3162-3166.
- [2] 周振宇,涂康生,张竞,等. Fbxw7 在肝癌中的表达及与肝癌细胞增殖相关性研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2012,28(12):1303-1306.
- [3] Yuan W, Chen Z, Wu S, et al. Silencing of EphA2 inhibits invasion of human gastric cancer SGC-7901 cells in vitro and in vivo[J]. Neoplasia, 2012, 59(1):105-113.
- [4] Udayakumar D, Zhang G, Ji Z, et al. EphA2 is a critical oncogene in melanoma[J]. Oncogene, 2011, 30(50):4921-4929.
- [5] Gao ZH. Predictive markers for postsurgical recurrence of hepatocellular carcinoma[J]. J Surg Oncol, 2005, 92(4):274-275.
- [6] Hou F, Yuan W, Huang J, et al. Overexpression of EphA2 correlates with epithelial mesenchymal transition related proteins in gastric cancer and their prognostic importance for postoperative patients[J]. Med Oncol, 2012, 29(4):2691-2700.
- [7] Yuan WJ, Ge J, Chen ZK, et al. Over-expression of EphA2 and EphrinA-1 in human gastric adenocarcinoma and its prognostic value for postoperative patients[J]. Dig Dis Sci, 2009, 54(11):2410-2417.
- [8] Kataoka H, Igarashi H, Kanamori M, et al. Correlation of EphA2 overexpression with high microvessel count in human primary colorectal cancer[J]. Cancer Sci, 2004, 95(2):136-141.
- [9] Nakajima S, Doi R, Toyoda E, et al. N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(12Pt1):4125-4133.
- [10] Yang P, Yuan W, He J, et al. Overexpression of EphA2, MMP-9, and MVD-CD34 in hepatocellular carcinoma: Implications for tumor progression and prognosis[J]. Hepatol Res, 2009, 39(12):1169-1177.
- [11] 张水军,张弓,赵永福,等. EphA2 在原发性肝细胞癌中的表达及临床意义[J]. 中华实验外科杂志,2006,23(3):269-270.
- [12] 吕西,李徐生,张有成,等. EphA2 mRNA 和 VEGF 在肝癌细胞中的表达及其关系[J]. 中华肝胆外科杂志,2006,12(10):680-683.
- [13] 张弓,朱长举,宋燕,等. 原发性肝细胞癌组织中 EphA2 和 E-钙黏素蛋白的表达[J]. 郑州大学学报:医学版,2010,45(1):93-96.
- [14] Wykosky J, Debinski W. The EphA2 receptor and ephrinA1 ligand in solid tumors: function and therapeutic targeting[J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(12):1795-1806.
- [15] van Zijl F, Zulehner G, Petz M, et al. Epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma[J]. Future Oncol, 2009, 5(8):1169-1179.
- [16] Hess AR, Seftor EA, Gruman LM, et al. VE-cadherin regulates EphA2 in aggressive melanoma cells through a novel signaling pathway: implications for vasculogenic mimicry[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(2):228-233.

(收稿日期:2013-01-19 修回日期:2013-03-18)

(上接第 2360 页)

- [4] 王心吉,熊勇,黄新全,等. 腹腔镜联合纤维胆道镜治疗胆囊结石合并胆总管结石疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志,2012,21(22):2462-2463.
- [5] 刘均贞,范在龙. 腹腔镜联合胆道镜在胆囊结石合并胆总管结石中的临床应用研究[J]. 中国医药指南,2012,10(17):164-166.
- [6] 张建莹. 胆管镜联合腹腔镜在胆囊并胆总管结石中应用[J]. 当代医学,2012,18(24):87.
- [7] Joshi RM, Shetty TS, Adhikari DR, et al. Choledocholithiasis: endotherapy versus surgery[J]. Int Surg, 2010, 92(2):95-99.
- [8] Sanchez A, Rodriguez O, Bellorin O, et al. Laparoscopic common bile duct exploration in patients with gallstones and choledocholithiasis[J]. JSLS, 2010, 14(2):246-250.
- [9] Tekin A, Ogetman Z. Laparoscopic exploration of the common bile duct with a rigid scope in patients with problematic choledocholithiasis[J]. World J Surg, 2010, 34(8):1894-1899.
- [10] Rogers SJ, Cello JP, Horn JK, et al. Prospective randomized trial of LC+LCBDE vs ERCP/S+LC for common bile duct stone disease[J]. Arch Surg, 2010, 145(1):28-33.
- [11] 李红阳,周世骥,王薇,等. 微创治疗胆囊结石合并胆总管结石 60 例[J]. 中国现代普通外科进展,2012,15(7):573-575.
- [12] 陆峻逵,刘芳君. 双镜联合微创手术与开腹手术对胆囊结石合并胆总管结石疗效对比研究[J]. 安徽医药,2012,16(6):810-812.
- [13] 陆建龙. 腹腔镜治疗胆囊及胆总管结石 50 例[J]. 浙江中西医结合杂志,2012,22(6):463-464.
- [14] Fujimoto T, Tsuyuguchi T, Sakai Y, et al. Long-term outcome of endoscopic papillotomy for choledocholithiasis with cholecystolithiasis[J]. Dig Endosc, 2010, 22(2):95-100.
- [15] Folkers MT, Disario JA, Adler DG. Long-term complications of endoscopic biliary sphincterotomy for cholecystolithiasis: a North-American perspective[J]. AM J Gastroenterol, 2009, 104(11):2868-2869.

(收稿日期:2013-01-11 修回日期:2013-03-21)