

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.14.004

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210521.1527.006.html\(2021-05-21\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210521.1527.006.html(2021-05-21))

## EphA2 蛋白在胃癌组织中的表达及与预后的关系\*

杨胜男<sup>1</sup>,李卓群<sup>1</sup>,徐海荣<sup>1</sup>,王云帅<sup>2</sup>,王皇建<sup>2</sup>,寇玉<sup>1△</sup>

(1.扬州大学医学院,江苏扬州 225000;2.郑州大学附属洛阳中心医院胃肠外科,河南洛阳 471000)

**[摘要]** **目的** 探讨 EphA2 在胃癌组织中的表达与临床病理因素及预后的关系,并分析胃癌患者预后的影响因素。**方法** 收集 2014 年 1 月至 2016 年 7 月入住郑州大学附属洛阳中心医院胃肠外科收治的胃癌手术治疗且术后病理确诊的 73 例胃癌患者标本,分别取患者的癌组织与癌旁正常组织,采用免疫组织化学的方法检测 EphA2 的表达,分析胃癌患者 EphA2 的表达与临床病理特征的关系,采用 Kaplan-Meier 分析 EphA2 的表达对患者术后总生存时间及无病生存时间的影响,应用 Kaplan-Meier 单因素分析和 COX 回归多因素分析分析患者预后相关的危险因素。**结果** 免疫组织化学结果显示,胃癌组织 EphA2 阳性率为 54.80%,而癌旁组织中无阳性表达。EphA2 在胃癌组织中的表达水平高于癌旁组织( $P < 0.05$ )。胃癌组织中 EphA2 的表达与肿瘤最大径相关( $P = 0.009$ )。Kaplan-Meier 生存曲线结果表明,EphA2 阳性表达组患者术后 3 年生存率及 5 年生存率低于 EphA2 阴性组( $P < 0.05$ )。Kaplan-Meier 单因素分析和 COX 回归多因素分析发现,肿瘤最大径、TNM 分期及 EphA2 高表达是影响胃癌患者预后无病生存时间的独立危险因素( $P < 0.05$ )。肿瘤最大径、分化程度、TNM 分期及 EphA2 高表达是影响胃癌患者预后总生存时间的独立危险因素( $P < 0.05$ )。**结论** EphA2 的表达与患者病理因素具有相关性,可作为临床医生评估患者预后的参考指标之一。

**[关键词]** 胃癌;EphA2;免疫组织化学;病理学;预后**[中图分类号]** R735.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2021)14-2357-05

## Expression of EphA2 protein in gastric cancer tissue and its relationship with prognosis\*

YANG Shengnan<sup>1</sup>, LI Zhuoqun<sup>1</sup>, XU Hairong<sup>1</sup>, WANG Yunshuai<sup>2</sup>, WANG Huangjian<sup>2</sup>, KOU Yu<sup>1△</sup>

(1. Medical College, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225000, China;

2. Department of Gastrointestinal Surgery, Affiliated Luoyang Central Hospital, Zhengzhou University, Luoyang, Henan 471000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the relationship between the expression of EphA2 in gastric cancer tissue with clinicopathological factors and prognosis, and to analyze the influence factors of the prognosis in the patients with gastric cancer. **Methods** The specimens of 73 patients with gastric cancer treated by operation and diagnosed by pathology in the gastrointestinal surgery department of Affiliated Luoyang Central Hospital of Zhengzhou University from January 2014 to July 2016 were collected. The cancer tissues and paracancerous normal tissues were taken, and the expression of EphA2 was detected by immunohistochemical method. The relationship between the expression of EphA2 and clinicopathological features in the patients with gastric cancer was analyzed. Kaplan-Meier was used to analyze the effect of EphA2 expression on postoperative overall survival time and disease-free survival time. The Kaplan-Meier univariate analysis and COX regression multivariate analysis were used to analyze the risk factors related to prognosis. **Results** The immunohistochemical results showed that the positive rate of EphA2 in gastric cancer tissue was 54.8%, but there was no positive expression in paracancerous tissues. The expression level of EphA2 in gastric cancer tissues was higher than that in paracancerous tissues. The expression of EphA2 in gastric cancer tissue was correlated with the maximum diameter of the tumor ( $P = 0.009$ ). The Kaplan-Meier survival curve results showed that the post

\* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81803780);江苏省科学基金青年基金项目(BK20180928);河南省医学科技攻关计划联合共建项目(2018020893、2018020898);河南省科技攻关项目(192102310395)。 作者简介:杨胜男(1995-),在读硕士研究生,主要从事胃癌侵袭转移方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: kouyuyui@sina.com。

operative 3-year survival rate and postoperative 5-year survival rate of the patients in the EphA2 positive expression group were lower than those of the patients in the EphA2 negative group ( $P < 0.05$ ). The Kaplan-Meier univariate analysis and COX regression multivariate analysis showed that the tumor maximum diameter, TNM stage and high expression of EphA2 were the independent risk factors affecting the disease-free survival time in the patients with gastric cancer ( $P < 0.05$ ). The maximum diameter of tumor, degree of differentiation, TNM stage and high expression of EphA2 were the independent risk factors affecting the overall survival time of the patients with gastric cancer ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression of EphA2 is correlated with the pathological factors of the patients, and can be used as one of the reference indexes for clinicians evaluating the prognosis of the patients.

**[Key words]** gastric cancer; EphA2; immunohistochemistry; pathology; prognosis;

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,2018 年全球胃癌新发病例中胃癌位于恶性肿瘤发病率第 5 位、病死率第 3 位<sup>[1]</sup>。EphA2 受体最初被称为 Eck(上皮细胞激酶),由 LINDBERG 等 1990 年筛选人类上皮(HeLa) cDNA 文库得出,高表达于上皮来源的细胞系,在肠、肺、皮肤、肾脏中的表达较高<sup>[2]</sup>。EphA2 受体与配体结合后产生的信号转导能直接参与各种生理活动,包括胚胎发育,特别是神经系统和血管系统,以及细胞与细胞之间的连接、细胞的迁移等<sup>[3]</sup>。EphA2 基因的过度表达常与不良预后相关。其参与了许多对恶性进展至关重要的过程,如迁移、侵袭、转移、增殖、存活和血管生成<sup>[4-5]</sup>。在宫颈癌中,EphA2 的表达与肿瘤分化程度、浸润肌层深度、淋巴结转移有关,且与宫颈癌患者分期预后相关,随着宫颈病变病理分级升高,EphA2 蛋白在相应组织中表达阳性率逐渐提高<sup>[6]</sup>。但是关系 EphA2 与胃癌之间的关系报道较少,本文通过检测 EphA2 在胃癌组织中的表达,分析 EphA2 表达与胃癌患者临床病理因素的关系及预后的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 资料来源

收集 2014 年 1 月至 2016 年 7 月郑州大学附属洛阳中心医院胃肠外科收治的胃癌手术治疗且术后病理确诊胃癌患者 73 例胃癌组织样本,随访至 2020 年 6 月。纳入标准:(1)术前未经放化疗治疗;(2)行胃癌根治性切除术,并经病理医师确诊;(3)有详细完整的病例及随访资料。排除标准:(1)临床病理资料不全者;(2)合并其他肿瘤疾病者;(3)术前经过放化疗者。

### 1.2 主要试剂

兔 IgG 免疫组织化学试剂盒 SABC 即用型 1 (SA1022)购自武汉博士德生物公司;DAB 染色试剂盒(AR1022)购自武汉博士德生物公司;EphA2 抗体(#6997)购自美国 Cell Signaling Technology 公司;苏木精染色试剂(E808F A0004)购自生工生物工程(上海)有限公司。

### 1.3 免疫组织化学

石蜡切片于 60 °C 烤片 2 h,二甲苯和乙醇按梯度脱蜡复水,3%过氧化氢避光室温 10 min 灭活内源

酶,PBS 漂洗 3 次,0.1% TritonX-100 室温透膜 15 min,PBS 漂洗 3 次,0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液微波煮沸热修复 3 min,2 次,PBS 漂洗 3 次,5% BSA 室温封闭 30 min,除去多余液体,滴加一抗(1:1 000),放置湿盒内 4 °C 孵育过夜,PBS 漂洗 3 次,滴加二抗,37 °C 孵育 30 min,PBS 漂洗 3 次,滴加链霉亲和素-生物素复合物(SABC),室温孵育 1 h,PBS 漂洗 3 次,DAB 显色约 2 min,出现棕黄色蒸馏水终止显色,用含乙醇的苏木精染色约 2 min,显微镜下观察染色情况,脱水透明,中性树脂封片。为了量化 EphA2 的免疫染色,将载玻片在相等的曝光量下进行数字成像,并通过数字化的 Image J 软件评估免疫阳性细胞百分比。细胞染色强度分为:0 为不显色;1 为浅黄色;2 为棕黄色;3 为深褐色。免疫染色结果由免疫阳性细胞百分比(0~100)乘以染色强度得分(0、1、2 和 3)得出 0~300 分。以患者生存状态作为状态变量绘制 ROC 曲线图,根据曲线图形,EphA2 表达评分在 27.49 分时对应的约登指数最大,选取 27.49 分为最佳截点(图 1),根据 EphA2 表达水平分为阴性组( $< 27.49$  分, $n = 33$ )和阳性组( $\geq 27.49$  分, $n = 40$ )。

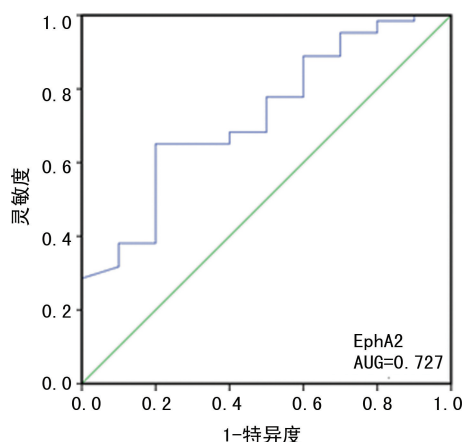


图 1 ROC 曲线选取最佳截点

### 1.4 统计学处理

采用 SPSS23.0 统计软件进行数据分析。组间比较采用  $t$  检验,计数资料采用  $\chi^2$  检验。采用 ROC 曲线确定 EphA2 阳性阴性表达的截点。生存分析采用 Kaplan-Meier 分析和 Log-rank 检验,单因素分析采

用 Kaplan-Meier 分析,多因素分析采用 Cox 回归模型,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

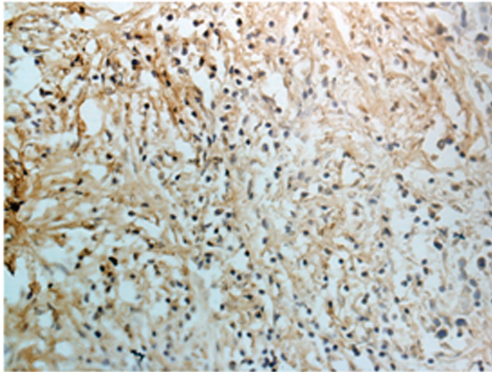
## 2 结果

### 2.1 EphA2 在胃癌组织中的表达

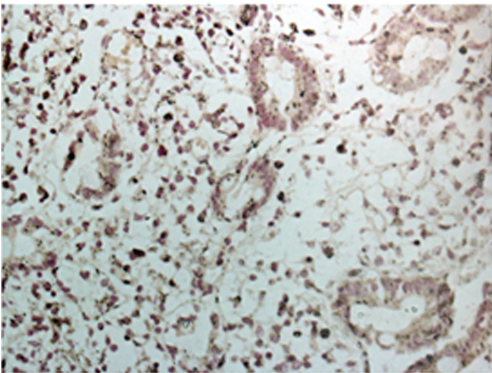
73 例胃癌组织中,胃癌组织 EphA2 阳性率为 54.8%,而癌旁组织中无阳性表达( $P < 0.05$ ),见表 1。EphA2 高表达于胃癌组织,染色较深;于癌旁组织低表达,染色较浅,见图 2。

表 1 EphA2 在胃癌组织和癌旁组织中的表达[n(%)]

组别	阳性	阴性
胃癌组	40(54.80)	33(45.20)
癌旁组	0	73(100.00)
<i>t</i>	12.789	
<i>P</i>	0.000	



胃癌组织



癌旁组织

图 2 EphA2 在胃癌组织与癌旁组织的表达(SABC,×400)

### 2.2 EphA2 表达与临床病理特征之间的相关性

EphA2 的表达与肿瘤最大径相关( $P = 0.009$ ),与患者性别、年龄及浸润深度、TNM 分期、远处转移、分化程度、淋巴结转移相关性不显著( $P > 0.05$ ),见表 2。

### 2.3 EphA2 表达与胃癌术后患者 3 年、5 年生存率的关系

生存分析显示,EphA2 蛋白表达阳性与阴性患者之间的生存率差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 3。EphA2 阳性组 3 年生存率为 50.00%,5 年生存率为 0。EphA2 阴性组 3 年生存率为 69.69%,5 年生存率

为 30.30%。EphA2 阳性组 3 年生存率及 5 年生存率低于阴性组( $P < 0.05$ )。

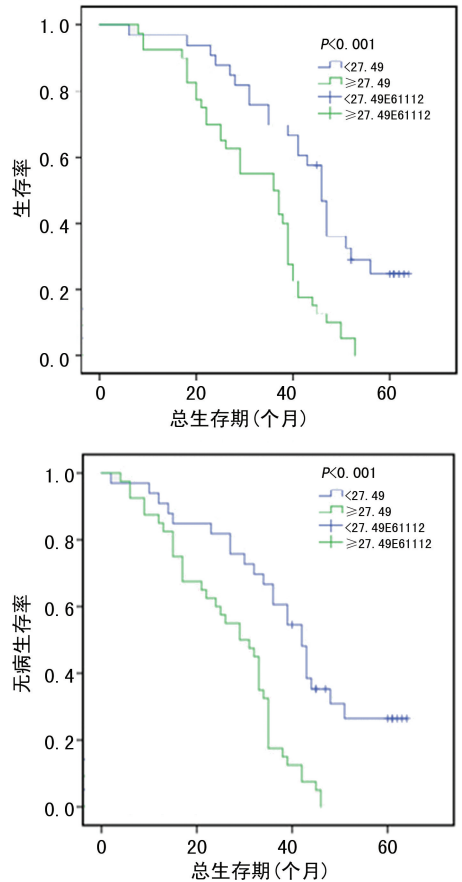


图 3 EphA2 阴性组与阳性组生存曲线

表 2 EphA2 与临床病理特征的关系[n(%)]

影响因素	阳性组(n=40)	阴性组(n=33)	<i>P</i>
年龄			0.711
≤60 岁	15(37.5)	11(33.3)	
>60 岁	25(62.5)	22(66.7)	
性别			0.628
男	27(67.5)	24(72.7)	
女	13(32.5)	9(27.3)	
肿瘤最大径			0.009
<4 cm	10(25.0)	1(3.0)	
≥4 cm	30(75.0)	32(97.0)	
分化程度			0.834
高分化/中分化	16(40.0)	14(42.4)	
低分化/未分化	24(60.0)	19(57.6)	
浸润深度			0.499
T1~T2	5(12.5)	6(18.2)	
T3~T4	35(87.5)	27(81.8)	
淋巴结转移			0.196
无	6(15.0)	9(27.3)	
有	34(85.0)	24(72.7)	
远处转移			0.673
无	38(95.0)	32(97.0)	
有	2(5.0)	1(3.0)	



续表 2 EphA2 与临床病理特征的关系[n(%)]

影响因素	阳性组(n=40)	阴性组(n=33)	P
TNM 分期			0.417
I	0	0	
II	6(15.0)	9(27.3)	
III	32(80.0)	23(69.7)	
IV	2(5.0)	1(3.0)	

#### 2.4 影响患者无病生存时间的危险因素分析

单因素分析示,肿瘤最大径、TNM 分期、淋巴结转移、远处转移及 EphA2 表达与胃癌患者无病生存时间相关( $P < 0.05$ ),见表 3。多因素分析示,肿瘤最大径、TNM 分期及 EphA2 表达是影响胃癌患者预后无病生存时间的独立危险因素( $P < 0.05$ ),见表 4。

表 3 Kaplan-Meier 单因素分析患者无病生存时间及总生存时间影响因素

临床特征	无病生存时间		总生存时间	
	$\chi^2$	P	$\chi^2$	P
年龄	0.103	0.748	0.090	0.764
性别	1.092	0.296	1.210	0.271
肿瘤最大径	16.586	0.000	16.244	0.000
分化程度	3.679	0.055	4.369	0.037
浸润深度	1.786	0.181	1.912	0.167
TNM 分期	29.431	0.000	43.369	0.000
淋巴结转移	9.343	0.002	9.585	0.002
远处转移	21.133	0.000	34.835	0.000
EphA2 表达	18.667	0.000	16.689	0.000

表 4 COX 回归多因素分析患者无病生存时间影响因素

临床特征	SE	Wald	df	HR(95%CI)	P
肿瘤最大径	0.370	4.537	1	2.197(1.065~4.532)	0.033
TNM 分期	0.648	9.074	1	0.142(0.040~0.505)	0.003
EphA2 表达	0.298	8.814	1	0.413(0.231~0.741)	0.003

#### 2.5 影响患者总生存时间的危险因素分析

单因素分析示,肿瘤最大径、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移、远处转移及 EphA2 表达与胃癌患者总生存时间相关( $P < 0.05$ ),见表 3。多因素分析示:肿瘤最大径、分化程度、TNM 分期及 EphA2 表达是影响胃癌患者术后总生存时间的独立危险因素( $P < 0.05$ ),见表 5。

表 5 COX 回归多因素分析患者总生存时间影响因素

临床特征	SE	Wald	df	HR(95%CI)	P
肿瘤最大径	0.423	8.686	1	3.479(1.518~7.970)	0.003
分化程度	0.317	6.514	1	0.445(0.239~0.829)	0.011
TNM 分期	0.722	9.157	1	0.113(0.027~0.463)	0.002
EphA2 表达	0.295	8.266	1	0.429(0.240~0.764)	0.004

### 3 讨论

有研究报道,EphA2 在肿瘤中不仅扮演着促癌因子的角色,还有作为抑癌因子的发现<sup>[7]</sup>。配体 EphrinA1 依赖的 EphA2 的激活主要发挥抑制肿瘤细胞生长、增殖和迁移的作用。然而 EphrinA1 蛋白水平与肿瘤分期密切相关,晚期肿瘤患者中 EphrinA1 蛋白表达较低<sup>[8-9]</sup>。过表达的 EphA2 在多种肿瘤中都有发现,如黑色素瘤、乳腺癌<sup>[10]</sup>、结肠<sup>[11]</sup>、肺癌<sup>[12]</sup>等。EphA2 是肿瘤转移的关键驱动因子和不良预后的关键预测因子<sup>[13-14]</sup>。本研究中,过表达的 EphA2 与胃癌的进展及不良预后相关。在肾细胞癌中,EphA2 肾癌组织中过表达且与肿瘤大小、核分级、肿瘤分期、患者预后具有显著相关性<sup>[15]</sup>。本研究中,EphA2 在胃癌组织中的表达水平高于癌旁组织,EphA2 表达与肿瘤最大径相关,且肿瘤最大径大于或等于 4 cm,EphA2 蛋白阳性表达率越高。

前列腺癌中,高表达 EphA2 组生化复发率高于低表达 EphA2 组,多因素分析显示,高表达 EphA2 是生化复发的独立预后因素<sup>[16]</sup>。在喉鳞状细胞癌中,癌组织中 EphA2 阳性表达率明显高于癌旁组织。EphA2 表达与喉癌组织学分级、T 分期、临床分期、淋巴结转移、复发及预后相关,EphA2 表达是影响喉癌预后的独立因素,在喉鳞状细胞癌的发生、发展和预后不良中可能起重要作用<sup>[17]</sup>。EphA2 表达阳性与阴性患者之间的生存率差异有统计学意义,与上述讨论一致。Cox 多因素分析结果显示,EphA2 高表达是影响胃癌患者预后无病生存时间及总生存时间的独立危险因素( $P < 0.05$ )。

胃癌的发生、发展是多因素综合的复杂过程,其预后与多重因素相关<sup>[18]</sup>。研究报道,肿瘤最大径<sup>[19]</sup>、TNM 分期<sup>[20]</sup>、肿瘤分化程度<sup>[21]</sup>、淋巴结转移<sup>[22]</sup>都是影响胃癌预后的重要因素。本研究中,Cox 回归模型多因素分析还发现肿瘤最大径、TNM 分期、EphA2 表达是患者影响患者无病生存时间的独立危险因素。肿瘤最大径、分化程度、TNM 分期及 EphA2 高表达是影响患者总生存时间的独立危险因素。肿瘤最大径越大、分化程度越差、TNM 分期越差,患者预后越差。

综上所述,EphA2 在胃癌组织中的表达水平高于癌旁组织,且与患者病理特征及预后相关,可作为临床医生评估患者预后的参考指标之一。但本研究样本量较少,下一步需扩大样本量,进一步研究 EphA2 在胃癌发生发展中的意义。

### 参考文献

- [1] BRAY 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] LONDON M, GALLO E. The EphA2 and cancer connection: potential for immune-based interventions[J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(10):8037-8048.
- [3] IEGUCHI K, MARU Y. Roles of EphA1/A2 and ephrin-A1 in cancer[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(3):841-848.
- [4] XIANG Y P, XIAO T, LI Q G, et al. Y772 phosphorylation of EphA2 is responsible for EphA2-dependent NPC nasopharyngeal carcinoma growth by Shp2/Erk-1/2 signaling pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(8):709.
- [5] XIAO T, XIAO Y, WANG W, et al. Targeting EphA2 in cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1):114.
- [6] 叶俊良, 陈晓宇, 赵卫东, 等. EphA2 和 Twist 蛋白在宫颈病变中的表达及与宫颈癌患者预后的关系[J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(15):2424-2428.
- [7] ZHOU Y, SAKURAI H. Emerging and diverse functions of the EphA2 noncanonical pathway in cancer progression[J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40(10):1616-1624.
- [8] LI X, WANG L, GU J W, et al. Up-regulation of EphA2 and down-regulation of EphrinA1 are associated with the aggressive phenotype and poor prognosis of malignant glioma [J]. *Tumour Biol*, 2010, 31(5):477-488.
- [9] TOMA M I, ERDMANN K, DIEZEL M, et al. Lack of ephrin receptor A1 is a favorable independent prognostic factor in clear cell renal cell carcinoma[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7):e102262.
- [10] MITRA D, BHATTACHARYYA S, ALAM N, et al. Phosphorylation of EphA2 receptor and vasculogenic mimicry is an indicator of poor prognosis in invasive carcinoma of the breast[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2020, 179(2):359-370.
- [11] DUNNE P D, DASGUPTA S, BLAYNEY J K, et al. EphA2 expression is a key driver of migration and invasion and a poor prognostic marker in colorectal cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(1):230-242.
- [12] TAN Y C, SRIVASTAVA S, WON B M, et al. EPHA2 mutations with oncogenic characteristics in squamous cell lung cancer and malignant pleural mesothelioma[J]. *Oncogenesis*, 2019, 8(9):49.
- [13] GARCIA-MONCLUS S, LÓPEZ-ALEMANY R, ALMACELLAS-RABAIGET O, et al. EphA2 receptor is a key player in the metastatic onset of Ewing sarcoma[J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(5):1188-1201.
- [14] FENG J, LU S S, XIAO T, et al. ANXA1 binds and stabilizes EphA2 to promote nasopharyngeal carcinoma growth and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2020, 80(20):4386-4398.
- [15] TALAAT I M, OKAP I S, YOUSSEF T M A, et al. The prognostic value of ephrin type-A2 receptor and Ki-67 in renal cell carcinoma patients: an immunohistochemical and bioinformatical approach; A STROBE-compliant article [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(19):e20191.
- [16] KUROSE H, UEDA K, KONDO R, et al. Elevated expression of EPHA2 is associated with poor prognosis after radical prostatectomy in prostate cancer [J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(11):6249-6257.
- [17] 苏娟, 吉晓滨, 谢景华, 等. 肿瘤血管生成相关因子 CD105、EphA2 及其配体 EphrinA1 在喉鳞状细胞癌中的表达及意义[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2016, 51(12):929-936
- [18] 王艺璇, 路宁, 张晓庆, 等. 影响胃腺癌远处转移患者预后的相关因素分析[J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(15):2644-2649.
- [19] LIANG Y, LIU L, XIE X, et al. Tumor size improves the accuracy of the prognostic prediction of lymph node-negative gastric cancer [J]. *J Surg Res*, 2019, 240:89-96.
- [20] LIU L, BAI Y, GU H Z, et al. The prognostic efficacy of the 8th edition UICC TNM classifications for gastric cancer in Chinese patients: a study based on follow-up system of nursing department[J]. *Medicine*, 2018, 97(36):e12284.
- [21] FENG F, LIU J, WANG F, et al. Prognostic value of differentiation status in gastric cancer [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):865.
- [22] 周志伟, 文刚, 何磊. 不同淋巴结分期方法预测胃癌预后的能力[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(4):759-765.