

文章编号:1005-6947(2005)12-0914-04

· 实验研究 ·

EphA2 与 E-cadherin 在胰腺癌中的表达及其意义

冯延平, 黄涛, 高军, 常青, 秦仁义

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 胆胰外科, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 探讨 EphA2 和 E-cadherin 在胰腺癌组织及细胞中的表达及其临床意义。方法 采用免疫组织化学 SP 方法, 检测 56 例胰腺癌及 23 例癌旁非肿瘤胰腺组织中 EphA2 和 E-cadherin 的表达, 并分析其与临床病理因素的关系。采用 RT-PCR 方法检测 EphA2 在胰腺癌细胞株 BXPC-3, PC-3 及 PANC-1 中的表达。结果 胰腺癌组织中 EphA2 阳性和 E-cadherin 阴性的表达率分别为 66.07% 和 57.14%, 均显著高于癌旁非肿瘤胰腺组织 ($P < 0.05$); EphA2 表达与胰腺癌分化程度、TNM 分期和淋巴结转移有关, E-cadherin 表达与胰腺癌 TNM 分期和淋巴结有关。在胰腺癌组织中, EphA2 与 E-cadherin 的表达呈负相关; EphA2 在胰腺癌高侵袭力细胞株 BXPC-3 和 PANC-1 呈高表达, 在低侵袭力细胞 PC-3 呈低表达。结论 EphA2 与 E-cadherin 的表达和/或功能异常可能共同参与胰腺癌的发生发展与转移; 联合检测两种蛋白对于胰腺癌转移潜能的判断具有一定的参考价值。

关键词: 胰腺肿瘤/病理学; EphA2, E-cadherin; 癌基因蛋白质类

中图分类号: R735.9; R730.231.3

文献标识码: A

Expression and significance of EphA2 and E-cadherin in pancreatic carcinoma

FENG Yan-ping, HUANG Tao, GAO Jun, QIN Ren-yi

(Department of Pancreatic-Biliary Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: **Objective** To explore the expression and clinical significance of EphA2 and E-cadherin in pancreatic cancer tissue and cells. **Methods** The expression of EphA2 and E-cadherin in 56 pancreatic carcinomas and 23 adjacent noncancer tissues were studied by immunohistochemistry, and their relationship to clinicopathological characteristics were analyzed. RT-PCR was performed to explore the expression of EphA2, BXPC-3, PC-3 and PANC-1 in pancreatic carcinoma cell lines. **Results** In pancreatic carcinomas tissue showed increased EphA2 expression and reduced E-cad expression which compared with adjacent non-cancer tissues. The expression level of EphA2 had a significant positive relationship with tumor differentiation degree, lymphatic metastasis and clinical stage. However, the expression level of E-cadherin had negative relationship with both the tumor clinical stage and lymphatic invasion. Furthermore, a significant negative relationship between the expression of EphA2 and E-cadherin was observed. The expressions of EphA2 were higher in high-invasive cell lines PXPC-3 and Panc-1 than in low-invasive cell line PC-3. **Conclusions** The expression and/or abnormal function of EphA2 and E-cadherin may together be involved in the development and progression of pancreatic cancer; the combined measurement of these two proteins may be useful for determination of metastatic potency of pancreatic carcinoma.

Key words: Pancreatic Neoplasms/pathol; EphA2, E-cadherin; Oncogene Proteins

CLC number: R735.9; R730.231.3

Document code: A

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271473)。

收稿日期:2005-07-21; **修订日期:**2005-10-18。

作者简介:冯延平(1964-),男,山东济宁人,华中科技大学同济医学院附属同济医院主治医师,主要从事肝胆胰肿瘤方面的研究。

通讯作者:冯延平 电话:027-61376488; E-mail:fyp_h@yahoo.com.cn。

受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinases, RTKs) 在肿瘤细胞生长、繁殖、转移中的作用近来成为研究热点。其中 EphA2 受体是已发现 14 种 Eph 受体中的一员, 其基因位于被认为是肿瘤“热点”的染色体 1p36.1^[1]。EphA2 受体在许多肿瘤中有高表达和高活性, 包括乳腺癌^[2]、大肠癌^[3]、前列腺癌^[4] 及非小细胞肺癌^[5]; 这些肿瘤细胞的生长、转化、转移与之有密切关系。在肿瘤组织中 EphA2 受体的表达水平与被测肿瘤的恶性程度之间似乎存在正相关。在上皮细胞, EphA2 与 E-cadherin 共同定位于细胞连接处。已有研究^[6] 表明, EphA2 在细胞中的亚定位依赖于 E-cadherin 调节。E-cadherin 是一种钙依赖性的具有细胞黏附特性的转膜糖蛋白, 是重要的肿瘤转移抑制基因, 其低表达和功能障碍与人体多种恶性肿瘤的侵袭转移有关^[7]。本研究采用免疫组化技术探讨 EphA2 和 E-cadherin 在胰腺癌组织中的表达、其与临床病理特征的关系以及两种蛋白表达的相关性; 检测 EphA2 在不同侵袭力胰腺癌细胞株 RNA 的表达水平, 旨在进一步说明其表达的高低与胰腺癌侵袭力的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 一般资料 采用河南省肿瘤医院病理科 2002~2003 年胰腺癌根治术后存档蜡块 56 例, 经组织病理学证实为导管腺癌。所有病例术前均未行放疗化疗。23 例癌旁非肿瘤胰腺组织作为对照组。男 36 例, 女 25 例; 年龄 35~72 (平均 56.05) 岁。高分化癌 13 例, 中分化癌 23 例, 低分化癌 20 例。临床病理分期按照国际抗癌联盟 (UICC) 联合制定的 TNM 分期方案进行, 其中 I 期 8 例, II 期 16 例, III 期 22 例, IV 期 10 例。

1.1.2 试剂与细胞 EphA2 受体和 E-cad 兔抗人多克隆抗体购自武汉博士德公司; SP 免疫组化试剂盒购于北京中山生物技术公司; 胰腺癌细胞株 BXPC-3 购于上海生物化学研究所; Panc-1 与 PC-3 购于北京协和医科大学; DMEM、胎牛血清 0.25% 胰蛋白酶购于美国 GIBCO 公司。

1.2 方法

1.2.1 胰腺癌组织的免疫组化 每一蜡块标本连续切片 2 张, 厚 4 μm 。切片脱蜡, 水化后行免疫组化染色, 严格按照说明书操作。抗体工作浓度为 1:100, 后用二氨基联苯氨 (DAB) 染色, 苏木素复染。以磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗设为阴性对照, 已知阳性标本作为阳性对照。阳性标本显色后, 立即全部终止反应。

1.2.2 细胞培养 胰腺癌细胞 BXPC-3 和 Panc-1 及 PC-3 接种于含 10% 胎牛血清、DMEM 培养液中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、95% 湿度及 5% CO_2 的培养箱中培养, 每 48h 胰酶消化传代 1 次, 取对数期的细胞用于实验。

1.2.3 逆转录-多聚酶链反应 (RT-PCR) 检测胰腺癌细胞的 EphA2 mRNA 表达 用 Trizol 试剂抽提总 RNA, 步骤按说明手册进行。用逆转录酶和 oligo (dT) 按 37 $^{\circ}\text{C}$ 60min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5min 条件进行 cDNA 的合成。SSTR2 mRNA 的检测: 取 1 μL 逆转录产物进行 PCR 扩增, 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 45s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 45s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45s, 32 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1min。反应体系以 β -actin 作为内参照, PCR 产物用含溴化乙定的 15% 琼脂糖凝胶分析。EphA2 的引物序列: 上游引物 5'-GCA ACA TCC TCG TCA ACA GC-3'; 下游引物 5'-TGG CTT TCA TCA CCT CGT GG-3 (260bp), β -actin 上游引物 5'-GTG CGT GAC ATT AAG GAG-3', 下游引物 5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT-3' (520bp)。

1.2.4 结果判断 每张切片在 400 倍光学显微镜下连续找 5 个视野, 每个视野计数 100 个上皮细胞。EphA2 染色阳性信号为细胞膜或细胞浆染成棕黄色。根据显色强度和阳性细胞数决定阳、阴性。阳性: 细胞棕黄色且阳性细胞数 > 40%。阴性: 细胞无棕色染色或阳性细胞数 < 40%。E-cad 表达分为阳性表达和阴性表达: 超过 90% 的肿瘤细胞呈现胞膜均质性着色视为阳性表达; 阳性细胞 < 90%、无阳性细胞和胞浆着色均视为阴性表达。

1.3 统计学处理

结果以 SPSS11.5 软件进行 χ^2 检验以及 Spearman 等级相关分析。显著性水准 $\alpha < 0.05$ 。

2 结果

2.1 EphA2 和 E-cad 的表达

EphA2 在胰腺癌组织中的表达率为 66.07% (37/56), 在癌旁非肿瘤胰腺组织中的表达率为 17.39% (4/23); 两者差异有显著性 ($P < 0.05$)。E-cad 在胰腺癌组织中阴性表达率为 57.14% (32/56), 癌旁非肿瘤胰腺组织中均呈阳性表达, 阴性表达率为 0%; 两者差异有显著性 ($P < 0.05$)。

2.2 EphA2 和 E-cad 的表达与胰腺癌临床病理因素的关系

低分化组的 EphA2 表达率远高于高、中分化组 ($P < 0.05$)。EphA2 高表达率随着 TNM 分期而增高 ($P < 0.05$); I, II 期远低于 III, IV 期 ($P < 0.05$)。有淋巴结转移组 EphA2 高表达率远高于无淋巴结转移组 ($P < 0.05$)。E-cad 阴性表达率在低分化组和高中分化组之间差异无显著性 ($P > 0.05$)。E-cad 阴性表达率随着 TNM 分期而增高; III, IV 期远高于 I, II 期 ($P < 0.05$); 有淋巴结转移组 E-cad 阴性表达率远高于无淋巴结转移组 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 EphA2, E-cad 的表达与胰腺癌临床病理因素的关系

病理因素	例数	EphA2		E-cad	
		阳性表达 (%)	P 值	阴性表达 (%)	P 值
分化程度					
高、中分化	36	19(52.78)	<0.05	20(55.56)	>0.05
低分化	20	18(90.00)		12(60.00)	
TNM 分期					
I+II 期	24	12(50.00)	<0.05	9(37.50)	<0.05
III+IV 期	32	25(87.50)		23(71.90)	
淋巴结转移					
有	32	23(71.88)	<0.05	21(65.63)	<0.05
无	24	14(58.33)		11(45.83)	

2.3 EphA2 和 E-cad 表达的相关性

EphA2 阳性表达同时 E-cad 阳性表达的 7 例, EphA2 阳性表达而 E-cad 阴性表达的 30 例, EphA2 阴性表达而 E-cad 阳性表达的 19 例, EphA2 阴性表达同时 E-cad 阴性表达的 2 例。EphA2 和 E-cad 表

达呈负相关 ($\chi^2 = 31.111, r = -0.745, P < 0.05$) (表 2)。

表 2 EphA2, E-cad 表达的相关性 (n)

EphA2	E-cad	
	(+)	(-)
(+)	7	30
(-)	30	2

注: $\chi^2 = 31.111, r = -0.745, P < 0.05$

2.4 EphA2 RNA 在细胞株 BXPC-3, Panc-1 和 PC-3 的表达

在高侵袭力细胞 BXPC-3 和 Panc-1 表达较高, 而在低侵袭力细胞 PC-3 表达较低 (附图)。

图 1 EphA2 在胰腺癌细胞 BXPC-3, Panc-1 和 PC-3 中的表达

3 讨论

本实验研究了 EphA2 分别在胰腺癌组织、细胞中的表达, 结果显示 EphA2 与胰腺癌的发展、转移有关。RTKs (receptor tyrosine kinases) 在控制细胞形状、繁殖、分化和运动中信号传导具有重要作用。EphA2 是 RTKs 中 Eph 家族中的一员, 在成年人上皮细胞含量较多的组织如肺、皮肤、肠道与卵巢中有高表达^[2]。与其他受体酪氨酸激酶不同的是, EphA2 并不需要其配体的激活而可以单独发挥作用^[2,3]。虽然有报道^[2,4]显示 EphA2 在胃癌、食管癌、结肠癌以及前列腺癌中有高表达, 但在肿瘤组织中的 EphA2 以及其他 Eph 成员的作用还没有完全界定。本研究结果显示, 在胰腺癌组织中, EphA2 的高表达与胰腺癌分期、转移有关, 在相对侵袭力较高的细胞株 BXPC-3 和 Panc-1 中表达较

高,而在侵袭力较弱的PC-3中表达较低。Zelinski等^[2]报道,将EphA2转染至乳腺癌细胞,显示可提高此细胞的转移能力。Duxbury^[8]等利用RNAi技术阻断EphA2的表达可以明显抑制胰腺癌细胞的增殖与侵袭转移。Kinch等^[9]利用EphA2的单克隆抗体可抑制乳腺癌的转移。还有报道认为活化的EphA2可以抑制整合素的功能^[10],从而参与调节多种与肿瘤细胞黏附、转移有关的细胞内传导途径。因此,笔者认为EphA2在胰腺癌组织中的异常表达与其高转移特性有关,但其详细机制有待阐明。

本研究还检测了E-cadherin在胰腺癌组织中的表达情况,结果显示E-cadherin的低表达与胰腺癌的分化、分期及淋巴结转移有关。E-cad介导的黏附系统是肿瘤侵袭转移的抑制性因素^[11]。多种机制可导致肿瘤细胞E-cad表达下调或其黏附系统功能障碍,使肿瘤细胞的同型细胞间黏附力降低,从而容易脱落形成转移^[12]。但E-cadherin在胰腺癌中的表达以及与癌侵袭转移关系的研究目前结论尚不一致。有报道^[6]显示,E-cadherin可调节EphA2的功能。本研究证明EphA2与E-cadherin在胰腺癌组织中呈负相关。提示在胰腺癌细胞中由于E-cadherin的下调,影响了受体的酪氨酸磷酸化,从而使信号转导发生异常。E-cadherin的异常表达,是使肿瘤细胞失去黏附、易发生转移、侵袭的机制之一^[6,11],可能系通过影响EphA2的功能而发挥作用^[6]。故认为,临床上联合检测胰腺癌组织中EphA2与E-cadherin的表达可能成为判断胰腺癌恶性程度的新指标,且EphA2可望成为临床治疗胰腺癌新的靶点。

参考文献:

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

[2] Zelinski DP, Zantek ND, Stewart JC, *et al.* EphA2 overex-

pression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61 (5): 2301 - 2306.

[3] Walker-Daniels J, Coffman K, Azimi M, *et al.* Overexpression of the EphA2 tyrosine kinase in prostate cancer [J]. *Prostate*, 1999, 41 (4): 275 - 280.

[4] Amico TA, Aloia TA, Moore MB, *et al.* Predicting the sites of metastases from lung cancer using molecular biologic markers [J]. *Ann Thorac Surg*, 2001, 72 (4): 1144 - 1148.

[5] Dodelet VC, Pasquale EB. Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis to tumorigenesis [J]. *Oncogene*, 2000, 19 (49): 5614 - 6519.

[6] Zantek ND, Azimi M, Fedor-Chaiken M, *et al.* E-cadherin regulates the function of the EphA2 receptor tyrosine kinase [J]. *Cell Growth Differ*, 1999, 10 (9): 629 - 638.

[7] Ghadimi BM, Behrens J, Hoffmann I, *et al.* Immunohistological analysis of E-cadherin, alpha-, beta- and gamma-catenin expression in colorectal cancer: implications for cell adhesion and signaling [J]. *Eur J Cancer*, 1999, 35 (1): 60 - 65.

[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 - 14456.

[9] Carles-Kinch K, Kilpatrick KE, Stewart JC, *et al.* Antibody targeting of the EphA2 tyrosine kinase inhibits malignant cell behavior [J]. *Cancer Res*, 2002, 62 (10): 2840 - 2847.

[10] Miao H, Burnett E, Kinch M, *et al.* Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal adhesion-kinase dephosphorylation [J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2 (2): 62 - 69.

[11] 谷化平, 尚培中, 周翠玲. CD44v6和e-上皮钙黏附素在胃癌的表达与预后的关系 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13 (4): 303 - 305.

[12] Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, *et al.* Methylation patterns of the E-cadherin 59 CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (4): 2727 - 2732.