

文章编号:1005-6947(2007)08-0778-05

· 基础研究 ·

肝细胞癌中 Ephrin-A1 及其受体的表达与血管生成的关系

陈钢¹, 王怡², 易继林¹, 沈文状¹, 李兴睿¹, 刘谨文¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 普通外科, 湖北 武汉 430080; 2. 温州医学院环境与公共卫生学院 预防医学系, 浙江 温州 325000)

摘要:目的 探讨 Ephrin-A1 及其受体与肝细胞癌血管生成之间的关系。方法 采用免疫组织化学 SP 法和逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 52 例肝细胞癌 (肝癌组) 和癌旁组织 (癌旁组) 标本中 Ephrin-A1 及其受体 EphA1 和 EphA2 蛋白及 mRNA 的表达情况, 并分析其与肝细胞癌的临床病理因素及微血管密度 (microvessel density, MVD) 之间的关系。结果 在 52 例肝癌组中 Ephrin-A1 及其受体 EphA1, EphA2 的蛋白阳性表达率分别为 59.6% (31/52), 53.8% (28/52) 和 17.3% (9/52), 而癌旁组织中的蛋白阳性表达率分别为 23.1% (12/52), 28.9% (15/52) 以及 21.2% (11/52)。Ephrin-A1 及其受体 EphA1 在两组中的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 EphA2 在两组间的差异无显著性 ($P > 0.05$)。Ephrin-A1 及其受体 EphA1 mRNA 在肝癌组的阳性表达率为 67.3% (35/52) 和 73.7% (38/52), 明显高于癌旁组中的阳性表达 42.3% (22/52) 和 48.1% (25/52) ($P < 0.05$), 而 EphA2 mRNA 在两组间的差异无显著性 ($P > 0.05$)。Ephrin-A1 蛋白的高表达与患者的甲胎蛋白 (AFP) 水平及有无门静脉癌栓有关 ($P < 0.05$)。Spearman 等级相关分析显示, 在肝癌组中 Ephrin-A1 的表达与 EphA1 的表达呈正相关 ($r = 0.671, P < 0.01$); 而 Ephrin-A1 与 EphA2 的表达无相关性; 肝癌组中 Ephrin-A1 的表达与 MVD 呈正相关 ($r = 0.826, P < 0.01$)。结论 Ephrin-A1 通过与其受体 EphA1 相结合, 促进肝细胞癌的血管生成, 从而促进肝细胞癌的生长、浸润和转移; Ephrin-A1 及其受体 EphA1 有望成为肝癌抗血管生成治疗新的靶点。 [中国普通外科杂志, 2007, 16(8): 778-782]

关键词: 癌, 肝细胞; Ephrin-A1; EphA1; 血管生成

中图分类号: R 735.7 文献标识码: A

The relationship between the expression of Ephrin-A1 and its receptor to angiogenesis in HCC

CHEN Gang¹, Wang Yi², YI Ji-lin¹, SHEN Wen-zhuang¹, LI Xing-rui¹, LIU Jin-wen¹

(1. Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Department of Prevention Medicine, Environment and Public Health School, Wenzhou Medical College Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

Abstract: Objective To study the relationship between Ephrin-A1 and its receptor with angiogenesis in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Immunohistochemistry staining method (S P methods) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to determine the protein and mRNA expression of Ephrin-A1 and its receptor EphA1, EphA2 in tumor tissues and their corresponding adjacent liver tissues from 52 HCC patients; then, analyse of the relationship between Ephrin-A1 and clinicopathology factor and microvessel density (MVD) in HCC was made. **Results** The protein expression rate of Ephrin-A1 and EphA1, EphA2 in HCC was 59.6% (31/52), 53.8% (28/52) and 17.3% (9/52), respectively, but in the paired liver tissues adjacent to HCC the expression rate was 23.1% (12/52), and

收稿日期: 2006-09-18; 修订日期: 2007-06-25。

作者简介: 陈钢, 男, 浙江温州人, 华中科技大学同济医学院附属同济医院博士研究生, 主要从事肝胆外科方面的研究。

通讯作者: 陈钢 E-mail: cg_2188@hotmail.com

21.2% (11/52), respectively. The protein expression rate of Ephrin-A1 and EphA1 was significantly higher than that in the paired liver tissues adjacent to HCC ($P < 0.05$), The protein expression rate of EphA2 was not significant in HCC compared to the paired liver tissues adjacent to HCC ($P > 0.05$). The mRNA express rate of Ephrin-A1 and EphA1 in HCC [67.3% (35/52) and 73.7% (38/52)] were prominently higher than those in the paired liver tissues adjacent to HCC [42.3% (22/52) and 48.1% (25/52)] ($P < 0.05$), The mRNA express rate of EphA2 was no significant in HCC compare to the paired liver tissues adjacent to HCC ($P > 0.05$). The higher expression of Ephrin-A1 was correlated with the AFP level and thrombus in the portal vein ($P < 0.05$) in patients with HCC. Spearman's rank correlation analysis indicated the expression of Ephrin-A1 was correlated with EphA1 ($r = 0.671, P < 0.01$), but was not correlated with EphA2 in HCC; and the expression of Ephrin-A1 was correlated with MVD in HCC ($r = 0.826, P < 0.01$). **Conclusions** Ephrin-A1 can be combination with its receptor EphA1 but not with EphA2 in HCC, and can improve angiogenesis of HCC, then enhanced its growth, invasiveness and metastasis. Ephrin-A1 and EphA1 can become the new targets for the antiangiogenesis treatment of HCC.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(8): 778 - 782]

Key words: Carcinoma, Hepatocellular; Ephrin-A1; EphA1; Angiogenesis

CLC number: R 735.7

Document code: A

受体酪氨酸激酶已被公认为血管生成的重要信号分子,它包括血管内皮生长因子(VEGF)及其受体、血管生成素1,2(angiotensin1,2)及其受体和新近发现的Ephrin及其受体Eph^[1]。Ephrin-A1在多种肿瘤及肿瘤相关的血管内皮细胞中存在着高表达^[2-5],但其与肝细胞癌血管生成之间的关系尚未见报道。本实验采用免疫组化方法和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测52例肝细胞癌(肝癌组)及其癌旁组织(癌旁组)中Ephrin-A1及其受体蛋白及mRNA的表达,探讨其在肝细胞癌发生、发展中的作用及其与血管生成之间的关系。

1 材料与方 法

1.1 标本及其一般资料

52例肝癌及癌旁组织标本均为2003—2005年武汉同济医院普外科手术切除的新鲜标本,癌旁组织距肿瘤边缘2cm以上;用于检测mRNA的标本在手术离体后立即去掉坏死组织、血块,于30min内以液氮冷冻,并置于-80℃冰箱中保存备用。其中男43例,女9例,年龄21~77岁。所有患者术前未接受放疗、化疗,具有完整的临床及病理资料。15例正常肝组织来源于同期手术切除的肝外伤患者(正常对照组)。男9例,女6例;年龄17~63岁。

1.2 试剂

兔抗人Ephrin-A1, EphA1, EphA2多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司,鼠抗人CD34单克隆抗体购自北京中山试剂公司,S-P试剂盒购自美国Zymed公司,RT-PCR试剂均为进口及国产分析纯产品,PCR扩增仪为Gene Amp2400等。

1.3 检测项目及方法

采用免疫组化及RT-PCR检测EphrinA1及其受体EphA1和EphA2的蛋白和mRNA的表达。

1.3.1 免疫组化检测 4μm厚石蜡切片65℃烘烤脱蜡,3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶5min,微波修复抗原,加一抗4℃湿盒中过夜,加生物素化二抗37℃反应30min,以辣根过氧化物酶标记链霉亲和素37℃处理30min,冲洗后加二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精复染,脱水封片后在光镜下观察,已知阳性组织切片作阳性对照,以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。结果判定:光镜下观察Ephrin-A1蛋白的表达主要见于肿瘤细胞的胞质或胞膜,在肿瘤血管内皮细胞及肝窦血管内皮上也有弱阳性表达,EphA1和EphA2蛋白的表达见于肿瘤细胞的胞质或胞膜,在肿瘤血管内皮细胞及一些巨噬细胞中也有表达。CD34标记的血管内皮细胞染色呈棕黄色,细胞膜着色较深。参照Weidner等^[6]的方法进行微血管计数,先在低倍镜下全面观察整张切片,确定组织中CD34标记的血管内皮细胞密集的区域(热点,hotspot),选定5个热点,分别在高倍视野下计数微血管数,求其平均值为MVD计数值。

1.3.2 RT-PCR检测 按Trizol试剂盒说明书抽提组织总RNA,以1μg RNA为模板,按照M-MLV逆转录试剂盒说明书合成cDNA,并进行聚合酶链反应(PCR)(GAPDH为内参照)。参照GenBank登录的人Ephrin-A1, EphA1和EphA2基因及GAPDH基因碱基序列,应用Primer Premier 5.0软件,于基因不同外显子上设计正反义引物。引物

序列 Ephrin-A1 (产物 230bp): 正义 5' - AA-CAAGCTGTGCAGGCATGG - 3', 反义 5' - CTCCACA-GATGAGGTCTTGC - 3'。EphA1 (产物 237bp): 正义 5' - TTCTACCAGCGCTGTCCTGAGAC - 3', 反义 5' - CAACACATGCTTCGCCACTG - 3'。EphA2 (产物 221bp): 正义 5' - TCAGCAGCAGCGACTTCGAGGCA - 3', 反义 5' - CAGTGGCCAGGGAAGGTGCA - 3'。GAPDH (产物 315bp): 正义 5' - GTCAACGGATTT-GGTCTGTATT - 3', 反义 5' - AGTCTTCTGGGTG-GCAGTGAT - 3'。扩增体系: 10 × PCR 缓冲液 5 μL, 氯化镁 4 μL, dNTP 2 μL, cDNA 2 μL, 引物 (1 mmol/L) 各 1 μL, Taq DNA 聚合酶 2 μL, 加双蒸水补充至总体积 50 μL。选个 PCR 的最适反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 变性 60 s, 58℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 90 s, 共 35 个循环, 之后 72℃ 延伸 10 min。8 μL PCR 产物扩增产物加入 2% 琼脂糖凝胶中, 以 7.5 V/cm 电压电泳 30 min, 用溴乙锭染色, 可见相应 bp 的目的基因和 GAPDH 扩增条带, 应用英国 UVP 公司 GDS8000 凝胶成像分析系统 (Complete Gel Documentation & Analysis System) 分析并照相。用目的基因/内参 GAPDH 两电泳条带的单位面积内的灰度比值来反映目的基因的相对表达水平。

1.4 统计学处理

采用 SPSS12.0 统计学软件对数据进行 χ^2 检验。P < 0.05 为差异有显著性; 相关性分析采用 Spearman 等级相关分析。

2 结果

2.1 Ephrin-A1 及 EphA1, EphA2 蛋白的表达

肝癌组中 Ephrin-A1 阳性率明显高于癌旁组和正常组, 其差异均有统计学意义 (P < 0.05); 肝癌组中 EphA1 的表达亦显著高于癌旁组和正常组, 差异有统计学意义 (P < 0.05) (表 1) (图 1)。EphA2 在肝癌组及癌旁组和正常组中的表达率分别为 17.3% (9/52), 21.2% (11/52) 和 13.3% (2/15), 差异均无统计学意义。

表 1 肝癌组及其癌旁组中 EphrinA1 及 EphA1 蛋白的表达情况

分组	例数	EphrinA1 蛋白的表达			EphA1 蛋白的表达		
		阳性数	阴性数	阳性率 (%)	阳性数	阴性数	阳性率 (%)
肝癌	52	31	21	59.6	28	24	53.8
癌旁	52	12	40	23.1 [†]	15	37	28.9 [†]
正常	15	2	13	13.3 [†]	3	12	20.0 [†]

注: † 与肝癌组比较, P < 0.05

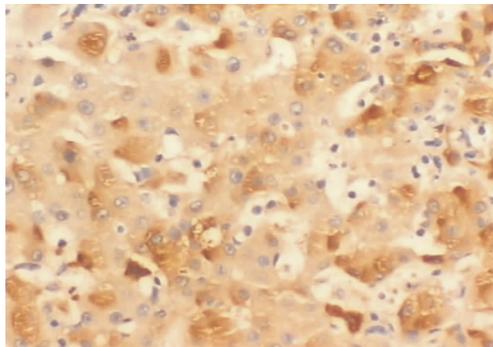


图 1 Ephrin-A1 蛋白在肝细胞癌中的阳性表达 (S-P × 200)

2.2 Ephrin-A1 及 EphA1, EphA2 mRNA 的表达

67.3% (35/52) 的肝细胞癌组织中可检测到 Ephrin-A1 mRNA 的表达, 其表达水平为 1.142 ± 0.670 , 在癌旁肝组织及正常肝组织中有 42.3% (22/52) 和 46.7% (7/15) 检测到 Ephrin-A1 mRNA 表达, 其表达水平为 0.602 ± 0.303 和 0.732 ± 0.182 。其表达均存在显著差异 (P < 0.05) (图 2)。EphA1 mRNA 的表达率在肝细胞癌组织中为 73.7% (38/52), 明显高于癌旁肝组织 48.1% (25/52) 和正常肝组织 53.3% (8/15) 的表达 (P < 0.05), 而 EphA2 mRNA 的表达在三者中均无显著性差异 (P > 0.05)。

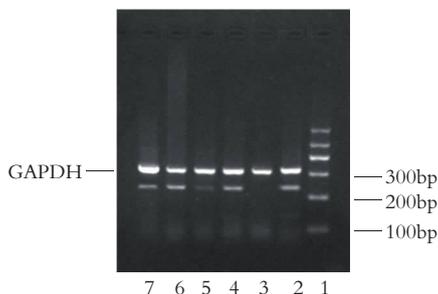


图 2 Ephrin-A1 及 EphA1, EphA2 mRNA 在肝细胞癌及癌旁组织中的表达 1: Marker; 2, 4, 6: Ephrin-A1, EphA1, EphA2 mRNA 肝细胞癌组织标本中的表达; 3, 5, 7: 对应的癌旁组织中的表达

2.3 肝癌组中 Ephrin-A1 与 EphA1, Ephrin-A1 与 EphA2 表达的相关性

Spearman 等级相关分析显示, 在肝细胞癌中 Ephrin-A1 与 EphA1 的蛋白表达呈正相关 ($r = 0.671, P < 0.01$); 而 Ephrin-A1 与 EphA2 的蛋白表达无相关性。

2.4 Ephrin-A1 在肝癌组中的表达与 MVD 的相关性

Spearman 等级相关分析显示,肝癌组中 Ephrin-A1 蛋白表达阴性组的 MVD 值 (12.38 ± 6.25) 低于 Ephrin-A1 蛋白表达阳性组的 MVD (16.46 ± 5.97) 值,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);肝癌组中 Ephrin-A1 与 MVD 呈正相关 ($r = 0.826, P < 0.01$) (图 3)。

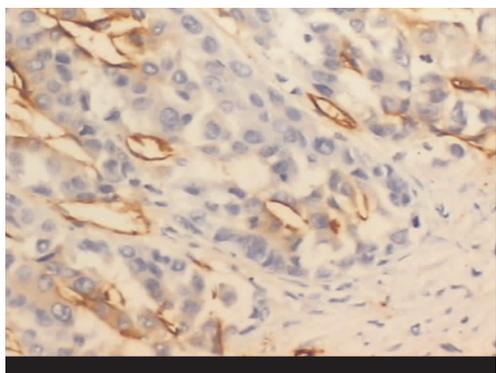


图 3 CD34 在肝细胞癌中的表达 (S-P × 200)

2.5 肝癌组中 Ephrin-A1 的蛋白表达与临床病理指标的关系

Ephrin-A1 在肝癌组中的表达与患者的性别, HbsAg, Edmondson 分级及有无肝硬化无关 ($P > 0.05$)。而与肿瘤的 AFP 水平及有无门静脉癌栓有关 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 Ephrin-A1 蛋白的表达与肝细胞癌临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	Ephrin-A1 蛋白的表达			P
		阳性数	阴性数	阳性率 (%)	
性别					
男	43	33	10	76.7	0.525
女	9	6	3	66.7	
AFP (μg/L)					
≤400	13	4	9	30.8	0.002
>400	39	30	9	76.9	
HBsAg 标记					
阴性	8	2	6	25.0	0.461
阳性	44	17	27	16.1	
Edmondson 分级					
I ~ II 级	30	14	16	46.7	0.680
III ~ IV 级	22	9	13	40.9	
肝硬化					
合并	21	6	15	28.6	0.451
未合并	31	12	19	38.7	
门静脉癌栓					
有	36	12	24	33.3	0.018
无	16	11	5	68.8	

3 讨论

血管生成是实体瘤生长的基础,又是转移的重要途径。肝细胞癌为典型的多血管型肿瘤,故抗血管生成治疗具有重要意义。肿瘤的血管生成是一个涉及内皮细胞分裂、增殖、血管基底膜及血管周围基质的选择性降解以及内皮细胞趋化移动的复杂过程,其调控主要受肿瘤细胞及其周围的基质所分泌的一些特殊性的促血管生长因子。受体酪氨酸激酶已经被公认为血管生成的重要信号分子,它包括 VEGF 及其受体、血管生成素 1,2 (angiopoietin1, 2) 及其受体和 Ephrin 及其受体 Eph^[1]。Eph 受体是新发现的酪氨酸蛋白激酶受体 (RTK) 家族中最大的分支,其分布广泛,结构高度保守,参与神经系统细胞间的相互作用,并与轴突发育路径有关。最近研究表明,Eph 系统的信号传导通路不仅对神经系统发育,而且对细胞的形态发生、组织结构形成、血管生成以及神经系统的可塑性具有重要的意义。Eph 家族在干细胞生物学中的作用、Eph 受体的免疫功能以及对血液凝固的影响等多方面的研究方兴未艾^[7]。

Ephrin-A1 及其受体 EphA1 和 EphA2 是 Eph/Ephrin 受体酪氨酸激酶系统的成员,近来研究表明 Ephrin-A1 与肿瘤的血管生成有着密切的联系; Ephrin-A1 通过与其受体结合,激活下游的信号传导通路,从而调控内皮细胞的激活、黏附、转移以及渗透,最终影响肿瘤的血管生成。然而,以往的研究显示 Ephrin-A1 在结肠癌^[8]、胃癌^[9]、乳腺癌^[10]、卵巢癌^[11]等多种肿瘤中的促血管生成作用是通过与 EphA2 受体的结合而实现的,且以 EphA2 受体为靶点的抗血管生成的基因治疗也取得了令人鼓舞的成果^[12-13]。近期有日本学者用 cDNA 微列阵分析显示 Ephrin-A1 在 AFP 产生的肝细胞癌中是最多过度表达的基因,且通过进一步实验证实多种肝癌细胞中外源性地增加 Ephrin-A1 的表达量可诱导 EphA1 受体表达增加^[14]。本研究在国内外首次通过免疫组化方法和逆转录聚合酶链反应对肝细胞癌及癌旁组织中的 Ephrin-A1 及其受体 EphA1, EphA2 蛋白和 mRNA 的表达进行测定,并对其与肝细胞癌临床病理因素及血管生成之间的关系进行了分析。结果显示, Ephrin-A1 及其受体 EphA1 在肝细胞癌中的表达明显高于癌旁组织以及正常肝组织; Ephrin-A1 在肝细胞癌中的表达与患者的 AFP 水平及有无门静脉癌栓有关; Spearman 等级相关分析显示,肝细胞癌

中 Ephrin-A1 的表达与 EphA1 的表达呈正相关,而与 EphA2 的表达无相关性,肝细胞癌中组织中 Ephrin-A1 的表达与 MVD 呈正相关。

本研究结果表明在肝细胞癌中 Ephrin-A1 并非与 EphA2 受体结合而是通过与 EphA1 受体结合以调控下游的信号传导,进一步影响肿瘤的生物特性;且 Ephrin-A1 在肝细胞癌中的表达与其血管生成明显相关,其高表达与肿瘤的转移侵袭能力密切相关。然而,Ephrin-A1 在肝细胞癌中是如何与 EphA1 受体结合,通过何种信号传导通路来促进肝细胞癌的血管生成以及转移侵袭,Ephrin-A1 与其他的一些促血管生成因子(VEGF, angiopoietin 等)有无协同作用尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Nicholas W. Gale1. George D. Growth factors acting via endothelial cell - specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, Angiopoietins, and Ephrins in vascular development [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(9):1055 - 1066.
- [2] Ogawa K, Pasqualini R, Lindberg RA, *et al.* The Ephrin-A1 ligand and its receptor, EphA2, are expressed during tumor neovascularization [J]. *Oncogene*, 2000, 19(52): 6043 - 6052.
- [3] Easty DJ, Guthrie BA, Maung K, *et al.* Protein B61 as a new growth factor: expression of B61 and up - regulation of its receptor epithelial cell kinase during melanoma progression [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(12):2528 - 2532.
- [4] Easty DJ, Hill SP, Hsu MY, *et al.* Up - regulation of Ephrin-A1 during melanoma progression [J]. *Int J Cancer*, 1999, 84(5):494 - 501.
- [5] Straume O, Akslen LA. Importance of vascular phenotype by basic fibroblast growth factor, and influence of the angiogenic factors basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor - 1 and Ephrin-A1/EphA2 on melanoma progression [J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(3):1009 - 1019.
- [6] Weidner N, Semple JP, Welch WR, *et al.* Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(1):1 - 8.
- [7] Elena BP. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour [J]. *Molecular cell biology*, 2005, 6(6):462 - 475.
- [8] Lyka Potla, Erwin R, Boghaert, *et al.* Reduced expression of EphrinA1 (EFNA1) inhibits three dimensional growth of HT29 colon carcinoma cells [J]. *Cancer Let*, 2002, 175(2): 187 - 195.
- [9] Ritsuko Nakamura, Hideki Kataoka, Naomi Sato, *et al.* E-PHA2/EFNA1 expression in human gastric cancer [J]. *Cancer Sci*, 2005, 96(1):42 - 47.
- [10] Karen T, Coffman L, Min Hu, *et al.* Differential EphA2 epitope display on normal versus malignant cells [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(22):7907 - 7912.
- [11] Mark S, Duxbury, Hiromichi I, *et al.* Ligation of EphA2 by Ephrin A1 - Fc inhibits pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320(4):1096 - 1102.
- [12] Kelly CK, Katherine E, Kilpatrick, *et al.* Antibody targeting of the EphA2 tyrosine kinase inhibits malignant cell behavior [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(10):2840 - 2847.
- [13] Fang WB, Dana M BS, Monica A P, *et al.* A kinase - dependent role for EphA2 receptor in promoting tumor growth and metastasis [J]. *Oncogene*, 2005, 24(53):7859 - 7868.
- [14] Iida H, Honda M, Kawai HF, *et al.* Ephrin-A1 expression contributes to the malignant characteristics of a - fetoprotein producing hepatocellular carcinoma [J]. *GUT*, 2005, 54(6):843 - 851.

本刊 2007 年下半年各期重点内容安排

本刊 2007 年下半年各期重点内容安排如下,欢迎赐稿。

第 7 期	胆道外科	第 10 期	胰腺外科
第 8 期	肝脏外科	第 11 期	甲状腺、乳腺外科
第 9 期	胃肠道外科	第 12 期	腔镜外科及其他