

EphA1 基因在结直肠癌中的表达及临床意义

王建东^{1,2}, 董迎春^{1,3}, 周晓军¹, 盛 蓁^{1,3}, 章如松¹, 马恒辉¹, 陆珍凤¹, 卢光明²

Expression of EphA1 Gene in colorectal Cancers and Its Clinical Significance

WANG Jian-dong^{1,2}, DONG Ying-chun^{1,3}, ZHOU Xiao-jun¹, SHENG Zhen^{1,3}, ZHANG Ru-song¹,
MA Heng-hui¹, LU Zhen-feng¹, LU Guang-ming²

1. Department of Pathology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, China, 2. The Center for Molecular Imaging Research, Department of Radiology, 3. Clinical School of Medical College of Nanjing University

Corresponding Author: ZHOU Xiao-jun, E-mail: nanjing_81@yahoo.com

Abstract: Objective To investigate the expression of EphA1 in colorectal cancers and its clinical significance. **Methods** Quantitative real-time RT-PCR and immunohistostaining were employed to detect the expression level of EphA1 in colon cancer cell lines and CRC specimens. Methylation specific PCR (MSP) was also performed. **Results** The expression of EphA1 transcript, methylated DNA of EphA1 was detected in cell lines. EphA1 mRNA expression in the corresponding normal mucosae is not significantly different from that in tumor tissues ($P = 0.496$). In adenomas, the immunostaining for EphA1 was positive diffusely and strongly. However, in CRCs, the expression of EphA1 protein was predominately down-regulated. Reduced or lost expression of the EphA1 protein was significantly associated with poor differentiation ($P = 0.027$), greater depth of wall invasion ($P = 0.002$) and advanced TNM stage ($P = 0.002$), and preferentially occurred in patients with lymph node metastasis ($P = 0.019$). Patients with reduced EphA1 expression had a tendency of poorer prognosis than those with EphA1 upregulation. **Conclusion** EphA1 may have tumor suppressor roles in CRCs and may be an important biomarker by which malignancy, biological behavior and prognosis are evaluated.

Key words: EphA1; Receptor tyrosine kinase; Colorectal neoplasm; Real-time RT-PCR; Methylation

摘 要: 目的 探讨 EphA1 在结直肠癌中的表达及其临床意义。**方法** 利用荧光实时定量 RT-PCR 检测 EphA1 在肠癌细胞系和组织中的表达,并分析甲基化状态。免疫组织化学染色分析 EphA1 蛋白在肠癌组织中的表达及其临床意义。**结果** EphA1 在肠癌细胞中不同程度表达,并存在甲基化。EphA1 mRNA 在癌旁正常黏膜和肿瘤组织中表达差异无统计学意义($P = 0.496$)。EphA1 蛋白在肠腺瘤中弥漫强阳性,在癌组织中主要为低或缺失表达,低表达多见于低分化腺癌($P = 0.027$)、伴有更深的肠壁浸润深度($P = 0.002$)和淋巴结转移患者($P = 0.019$)。EphA1 下调多见于中晚期病例($P = 0.002$),下调较上调患者预后不良。**结论** EphA1 在结直肠癌的发生发展中可能具有一定肿瘤抑制作用,有可能成为预测结直肠癌恶性程度和预后的新指标。

关键词: EphA1; 受体酪氨酸激酶; 结直肠癌; 实时定量 RT-PCR; 甲基化

中图分类号: R735.3⁺5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2010)07-0813-05

0 引言

EphA1 基因是受体酪氨酸激酶 Eph 家族中第一个成员,因 Hirai 等首次发现其在人产生促红细

胞生成素的肝细胞癌细胞株(erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma cell line)中呈现高表达,故取前三个词的首字母将该基因命名为 Eph,后重新命名为 EphA1。Eph 基因不仅参与胚胎发育、血管形成和神经分化,而且在肿瘤发生、发展和转移中的作用亦日益受到重视^[1-4]。本研究检测了 EphA1 基因 mRNA 和蛋白在结直肠癌细胞株和结直肠癌组织中的表达水平,探讨了该基因表达的临床病理学意义。

收稿日期:2009-02-18;修回日期:2009-09-14
基金项目:973 计划资助项目(2006,CB 705707);南京军区医学科学技术研究“十一五”计划重点课题资助项目(06Z37)
作者单位:1. 210002 南京军区南京总医院病理科,2. 影像科分子影像中心,3. 南京大学医学院临床学院
通信作者:周晓军, E-mail: nanjing_81@yahoo.com
作者简介:王建东(1963-),男,博士,副教授,主要从事分子病理学和分子影像学研究

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 本研究采用的结肠癌细胞株包括 DLD1、HT29、HCT116、SW480 和 SW620。细胞培养于含 1mmol/L L-谷氨酰胺、10%胎牛血清(美国生命科学有限公司)、100 u/ml 青霉素 G 和 100 g/ml 链霉素的改进的 Eagle 培养液中,置于 37℃、5%CO₂ 的湿化培养箱中培养。

1.1.2 组织标本 收集南京军区总医院病理科 2004 年 12 月—2006 年 6 月结直肠癌根治术的新鲜标本 66 例,另增加 2005 年 4 月—2005 年 11 月的石蜡标本 36 例,共 102 例。其中男 60 例,女 42 例,年龄 23~84 岁,中位年龄 59 岁;高分化腺癌 16 例,中分化腺癌 57 例,低分化腺癌 17 例,黏液腺癌 12 例;TNM I 期 26 例,II 期 33 例,III 期 42 例和IV 期

1 例;有淋巴结转移 42 例,无转移 60 例。具体资料见表 1。所有患者术前均未行放疗或化疗。诊断由两位病理专家确诊。66 例标本切除后立即采集癌组织和癌旁 5cm 以外的癌旁正常黏膜组织速冻于液氮中,然后贮存于-80℃冰箱中,备用。组织标本用 10%中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,连续切片。另选取石蜡包埋的结肠腺瘤组织 10 例。

1.1.3 主要试剂 Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,M-MLV 逆转录酶购自美国 Promega 公司。热启动酶购自大连 TaKaRa 公司。所有引物和探针都由大连宝生物公司合成。亚硫酸氢钠购自 Sigma 公司。兔抗人 EphA1 多克隆抗体购自美国 ABGENT 公司。

1.1.4 主要仪器 荧光实时定量 PCR 仪为 ABI Prism® 7000 型,美国应用生物系统公司产品。

表 1 EphA1 蛋白表达与临床病理学参数关系
Table 1 Correlation between expression of EphA1protein and clinicopathologic parameters

Parameters	Case number	Up-regualtion	No change	Down-regulation	P Value
Overall	102	31	15	56	
Gender					
Male	60	15	11	34	
Female	42	16	4	22	0.249
Age(y)					
≤55	46	10	8	28	
>55	56	21	7	28	0.221
Location					
Rectum + sigmoid colon	74	26	11	37	
Colon	28	5	4	19	0.204
Tumor size (cm)					
≤5	75	23	13	39	
>5	27	8	2	17	0.412
Depth of wall invasion					
Mucosa + submucosa	9	4	3	2	
Muscularis propria	22	12	3	7	0.002
Subserosa + serosa	71	15	9	47	
Tumor differentiation					
Well + moderate	73	26	13	34	
Poor + mucinous	29	5	2	22	0.027
Lymph node metastasis					
Negative	46	18	9	19	
Positive	29	10	8	11	0.72
Clinical stage (TNM)					
I	26	15	5	6	
II	33	7	6	20	0.002
III + IV	43	9	4	30	
Lymph node metastasis					
No	60	23	11	26	
Yes	42	8	4	30	0.019

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 逆转录 采用 Trizol 试剂提取总 RNA,具体操作按说明书进行。利用甲醛变性琼脂糖电泳和紫外分光光度计对提取的总 RNA 进行纯度和含量鉴定。1 g 总 RNA 在 M-MLV 逆转录酶作用下,通过 Oligo (dT)引物逆转录为 cDNA,具体操作按试剂盒说明书进行。

1.2.2 荧光实时定量 RT-PCR 采用荧光标记 TaqMan 探针进行实时定量 RT-PCR 以检测 EphA1 mRNA 在 66 例结直肠癌标本中的表达。根据基因库 mRNA 序列 (GenBank 序列号: NM_005232)设计 EphA1 引物和探针:上游引物为 5'-ATC TTT GGG CTG CTG CTT GG-3',下游引物为 5'-GCT TGT CCT CTC GAT CCA CAT C-3'。PCR 产物长度为 127 bp。EphA1 探针为 5'(FAM) - CGG TCA CGC TGC CTC TGC TGC C (Eclipse) -3'。利用管家基因 3'-GAPDH 作为内参照标准化 EphA1 表达。GAPDH 上游引物为 5'-CCA GGT GGT CTC CTC TGA CTT-3',下游引物为 5'-GTT GCT GTA GCC AAA TTC GTT GT-3'。PCR 产物长度为 130 bp。GAPDH 的探针为 5'-(FAM) AAC AGC GAC ACC CAC TCC TCC ACC (Eclipse) -3'。所有引物和探针都由大连宝生物公司合成。反应体系包括 3μl 10 × Buffer、3μl dNTPs (2mmol/L)、3μl 上游引物 (3μmol/L)、3μl 下游引物 (3μmol/L)、1μl 探针 (3μmol/L)、1 u 热启动酶、2μl cDNA 和三蒸水,共 30μl。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 120s,94℃ 变性 30s,59℃ 退火 30s,72℃ 延伸 60s,共 40 个循环。在 ABI Prism® 7000 型荧光定量 PCR 仪上进行扩增反应。

1.2.3 甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 用酚-氯仿法提取 5 株结肠癌细胞系 DNA。对提取 DNA 进行亚硫酸氢钠处理,具体处理方法见参考文献^[5]。利用甲基化特异性 PCR 引物设计软件设计甲基化上游引物: 5'- ATT CGG GTT ATT GTT TTA GGT TTC -3';甲基化下游引物:5'- GAA AAT CGA TAC CTT CCT TAA CG -3';非甲基化上游引物: 5'- ATT TGG GTT ATT GTT TTA GGT TTT G -3',非甲基化下游引物:5'-ACA AAA ATC AAT ACC TTC CTT AAC AC-3'。反应体系包括 3μl 1 × buffer (10 mM Tris-HCl,2.0 mM MgCl₂,50 mM KCl,pH 8.3)、3μl dNTPs (260μmol/L,Invitrogen)、3μl 上游引物 (3μmol/L)、3μl 下游引物 (3μmol/L)、1 u 热启动酶、2μl 亚硫酸氢钠处理过的 DNA 和三蒸水,共

30μl。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 120s,然后 94℃ 变性 30s,53℃ 退火 30s,72℃ 延伸 60s,35 个循环后,72℃ 延伸 10min。PCR 产物用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,长度为 131 bp。

1.2.4 免疫组织化学染色 采用 EnVision 二步法兔抗人 EphA1 多克隆抗体工作浓度 1:100。用已知阳性胃腺癌切片作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

结果判定依赖于着色细胞的阳性率和染色强度的综合评分。着色细胞阳性率评分标准:≤5%:0 分; >5%~25%:1 分; >25%~50%:2 分; >50%:3 分。染色强度评分标准:未染色:0 分;轻度染色:1 分;中度染色:2 分;重度染色:3 分。着色细胞的阳性率和染色强度的评分相加为综合评分。肿瘤组织综合评分若大于相对应的癌旁正常组织则为 EphA1 蛋白表达上调,反之为下调,两者相等时为无变化。

1.2.5 随访情况 共 73 例患者获得随访,随访时间 2~50 月,中位时间 25 月。

1.3 统计学方法

选用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析。计量资料采用 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验,并进行 Kaplan-Meier 生存曲线分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EphA1 mRNA 在结肠癌细胞株中的表达

检测提取的总 RNA A260/280 比值在 1.80~2.05 之间,变性琼脂糖凝胶电泳显示清晰的 28S 和 18S 条带,证实提取的总 RNA 具有良好的完整性。EphA1 mRNA 在 DLD1、HT29、HCT116 和 SW480 细胞株中均有不同程度的表达,见图 1。

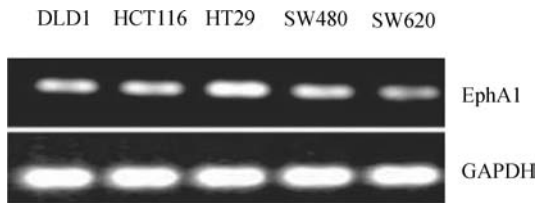
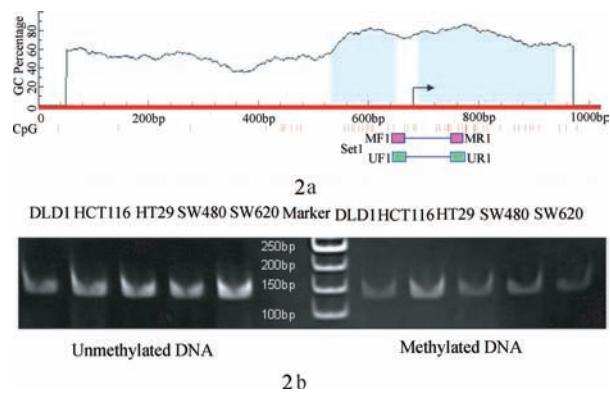


图 1 EphA1 mRNA 在结肠癌细胞系中的表达
Figure 1 Expression of EphA1 mRNA in colon cancer cell lines

2.2 EphA1 甲基化 DNA 的检测

在 DLD1、HT29、HCT116、SW480 和 SW620 细胞株中均检测到不同程度的甲基化 DNA,见图 2。



2a: Schematic show of the promoter-associated CpG island in EphA1 and the location of PCR primer sets for specific detection of methylation and unmethylation EphA1 DNA. The arrow showed the translation start site of EphA1. 2b: Methylated and unmethylated DNAs of EphA1 were detected in colon cancer cell lines

图 2 直肠癌细胞 EphA1 的甲基化检测
Figure 2 Detection of hypermethylation of EphA1 in colon cancer cell lines

2.3 EphA1 mRNA 在结直肠癌标本中的表达

用同一标本癌旁正常黏膜和肿瘤组织所测得的 EphA1 荧光强度值分别除以相应的 GAPDH 荧光强度值,分别得出二者的 *t* 值。正常黏膜的 *t* 值是 -3.548164 ± 1.0667083 , 肿瘤组织的 *t* 值是 -3.419678 ± 1.4061841 , 两者相比差异无统计学意义 ($P = 0.496$)。

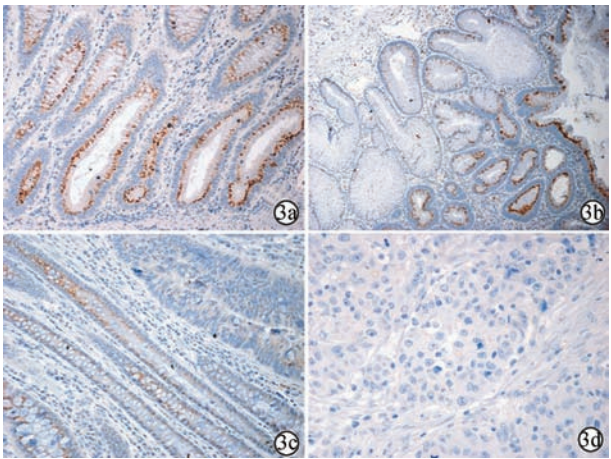
2.4 EphA1 蛋白在结直肠腺瘤和结直肠癌组织中的表达

EphA1 蛋白弥漫表达于正常的肠上皮,在隐窝基底部分干细胞部位染色最强,见图 3a。10 个腺瘤组织中 EphA1 均广泛强阳性表达,见图 3b,但在结直肠癌组织中表现为下调表达见图 3c、3d。该蛋白亚细胞定位为高尔基氏体着色或弥漫胞质着色。

102 例结直肠癌标本中, EphA1 蛋白在 55% (56/102) 癌组织中表达下调, 30% (31/102) 表达上调。其表达与肿瘤分化 ($P = 0.027$)、肠壁浸润深度 ($P = 0.002$) 和临床 TNM 分期 ($P = 0.002$) 有显著相关性, 低表达或缺失表达更多见于低分化腺瘤患者、伴有更深的肠壁浸润深度患者和 II 期以上的中晚期病例。同时 EphA1 下调患者更易伴发淋巴结转移 ($P = 0.019$), 见表 1。

2.5 随访结果

EphA1 下调的患者 (46 例) 较 EphA1 上调的患者 (27 例) 预后不良 (log-rank test, $P = 0.059$), 特别是大于 55 岁 ($P = 0.034$) 和肿瘤位于直肠和乙状结肠的患者 ($P = 0.015$)。



3a: the expression of EphA1 in normal mucosa (Envision $\times 200$); 3b: Up-regulation of EphA1 in adenoma cells (right lower) compared with normal mucosae (left upper) (Envision $\times 100$); 3c: down-regulation of EphA1 in carcinoma cells (right upper) compared with normal mucosae (left lower) (Envision $\times 200$); 3d: cost expression of EphA1 in poorly-differentiated carcinoma cells (Envision $\times 400$)

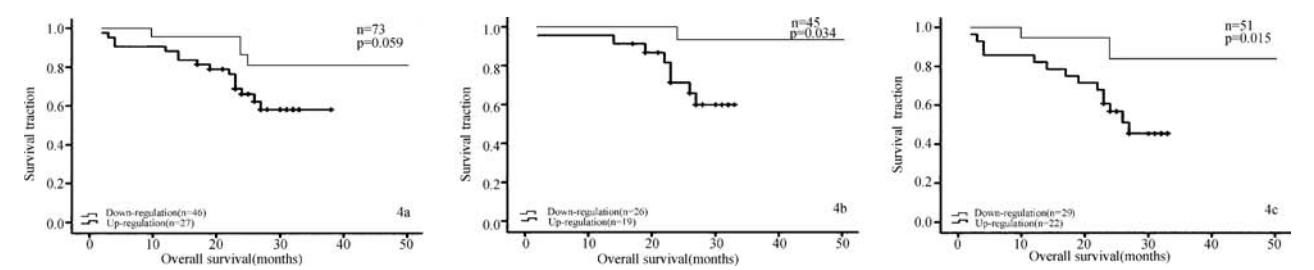
图 3 EphA1 蛋白在结直肠癌和腺瘤组织中的表达
Figure 3 Expression of EphA1 protein in colorectal cancer and adenoma tissues Immunohistochemical staining of EphA1 in colorectal carcinomas

3 讨论

Eph 是受体酪氨酸激酶家族中最大的一族, 不仅参与胚胎发育, 而且调节细胞增殖和分化, 在肿瘤发生发展中起着重要作用^[6-10]。研究表明, EphA1 在前列腺癌、乳腺癌细胞系中低表达或缺失表达, 并且与癌的侵袭性和进展有关。

本研究发现 EphA1 mRNA 在肠癌细胞系 DLD1、HT29、HCT116、SW620 和 SW480 中不同程度表达。在结直肠癌组织中, EphA1 mRNA 表达与在正常黏膜中的表达无显著性差异, 可能与检测的样本数量小有关。最近研究发现某些 Eph 基因在结直肠癌中存在甲基化导致 mRNA 的下调表达^[5, 11-13]。我们对 5 株结直肠癌细胞系的 EphA1 启动子区的 CG 岛进行甲基化特异性 PCR 检测, 结果发现在结直肠癌细胞株中均存在不同程度的甲基化 DNA, 这是首次报道 EphA1 基因在肿瘤研究中的甲基化。结直肠癌组织中 EphA1 甲基化状态和其在结直肠癌发生发展中的具体作用机制还有待进一步研究。

EphA1 蛋白在肠上皮弥漫表达, 但在肠隐窝底部即干细胞部位表达水平最高, 与 EphB 族如 EphB2 和 EphB4 在正常肠黏膜的表达方式相似。对 EphA1 在肠腺瘤和结直肠癌中的表达做进一步



4a: Kaplan-Meier plots of overall survival showed patients with EphA1 down-regulation had a shorter survival than those with EphA1 up-regulation ($P = 0.059$). 4b~4c: Kaplan-Meier plots of overall survival showed reduced EphA1 expression in patients over 55 years or with rectal cancers and sigmoid colon cancers is associated with a poor overall survival ($P = 0.034$ and 0.015 , respectively)

图 4 EphA1 表达与生存的关系
Figure 4 The relation between EphA1 expression and survival

检测后发现肠腺瘤组织中 EphA1 弥漫强阳性表达，但在结直肠癌组织中表达降低，约 55% 低表达或表达缺失，并且随着分级增高而降低，提示 EphA1 在阻止腺瘤向癌转化的过程中可能起着一定作用。而且，EphA1 蛋白水平与肿瘤的肠壁浸润深度有关，浸润浆膜和浆膜外层的肿瘤患者表达显著低于浸润肌层患者，表明该基因可能是结直肠癌的一个保护性基因，参与阻止癌的进展和降低癌侵袭性，但有待进一步深入研究证实。另外，中晚期患者的表达显著低于早期患者，有淋巴结转移的 EphA1 蛋白表达低于无淋巴结转移 EphA1 蛋白表达。我们推测 EphA1 蛋白表达可能与预后有关，表达低的患者可能具有不良预后，因此对随访到的 73 例患者进行了 EphA1 蛋白表达和预后关系检测分析（Kaplan-Meier 生存曲线分析，图 4），发现 EphA1 蛋白下调患者的预后生存时间低于上调患者，特别是在大于 55 岁患者和肿瘤位于直肠和乙状结肠的患者中。由此可见，EphA1 在大于 55 岁的老年患者和直肠癌和乙状结肠癌患者中更具保护作用。

本研究 EphA1 蛋白和 mRNA 表达不完全一致，这种情况也见于 EphB4 在乳腺癌、EphA2 在膀胱癌中的表达，两者被认为是由转录后调控引起的，从而引起 mRNA 和蛋白表达结果不一致。也可能是由于肿瘤细胞中 EphA1 蛋白不稳定很快降解造成了下调表达。

EphA1 在结直肠癌中下调表达与肿瘤分化、肠壁浸润深度、临床 TNM 分期和淋巴结转移密切相关，同时 EphA1 下调的患者预后不良，提示 EphA1 在结直肠癌发生发展中可能发挥肿瘤抑制性作用。

参考文献：

[1] Taddei ML, Parri M, Angelucci A, et al. Kinase-dependent and -independent roles of EphA2 in the regulation of prostate

cancer invasion and metastasis[J]. *Am J Pathol*, 2009, 174 (4):1492-1503.

[2] Scehnet JS, Ley EJ, Krasnoperov V, et al. The role of Ephs, Ephrins, and growth factors in Kaposi sarcoma and implications of EphrinB2 blockade[J]. *Blood*, 2009, 113 (1): 254-263.

[3] Parri M, Taddei ML, Bianchini F, et al. EphA2 reexpression prompts invasion of melanoma cells shifting from mesenchymal to amoeboid-like motility style[J]. *Cancer Res*, 2009, 69 (5):2072-2081.

[4] Herath NI, Doecke J, Spanevello MD, et al. Epigenetic silencing of EphA1 expression in colorectal cancer is correlated with poor survival[J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(7):1095-1102.

[5] Wang J, Li G, Ma H, et al. Differential expression of EphA7 receptor tyrosine kinase in gastric carcinoma[J]. *Hum Pathol*, 2007, 38(11):1649-1656.

[6] Bae HJ, Song JH, Noh JH, et al. Low frequency mutation of the Ephrin receptor A3 gene in hepatocellular carcinoma[J]. *Neoplasia*, 2009, 56(4):331-334.

[7] Alam SM, Fujimoto J, Jahan I, et al. Coexpression of EphB4 and ephrinB2 in tumor advancement of uterine cervical cancers [J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 114(1):84-88.

[8] 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.

[9] Vaught D, Brantley-Sieders DM, Chen J. Eph receptors in breast cancer: roles in tumor promotion and tumor suppression[J]. *Breast Cancer Res*, 2008, 10(6):217.

[10] Sheng Z, Wang J, Dong Y, et al. EphB1 is underexpressed in poorly differentiated colorectal cancers [J]. *Pathobiology*, 2008, 75(5):274-280.

[11] Guan M, Xu C, Zhang F, et al. Aberrant methylation of EphA7 in human prostate cancer and its relation to clinicopathologic features[J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(1):88-94.

[12] Dawson DW, Hong JS, Shen RR, et al. Global DNA methylation profiling reveals silencing of a secreted form of EphA7 in mouse and human germinal center B-cell lymphomas[J]. *Oncogene*, 2007, 26(29):4243-4252.

[13] Wang J, Kataoka H, Suzuki M, et al. Downregulation of EphA7 by hypermethylation in colorectal cancer[J]. *Oncogene*, 2005, 24(36):5637-5647.