



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.04.012  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2017.04.012  
Chinese Journal of General Surgery, 2017, 26(4):473-479.

· 基础研究 ·

# EphA2 与 VEGF-C 在胃癌中的表达及其与淋巴管生成的关系

朱振华<sup>1</sup>, 袁伟杰<sup>2</sup>, 黄昌浩<sup>2</sup>, 陈子华<sup>2</sup>

(1. 湖南省长沙市中心医院 普通外科, 湖南长沙 410004; 2. 中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南长沙 410008)

## 摘要

**目的:** 探讨胃癌组织中 EphA2 与 VEGF-C 的表达及临床意义。

**方法:** 用免疫组化法检测 82 例胃癌组织及其癌旁组织中 EphA2 与 VEGF-C 蛋白的表达, 以及淋巴管密度 (LVD); 用 real-time PCR 检测 20 例胃癌组织及其癌旁组织中 EphA2 与 VEGF-C mRNA 的表达。分析 EphA2 与 VEGF-C 表达与患者临床病理特点及淋巴管生成的关系。

**结果:** EphA2 与 VEGF-C 在胃癌组织中的阳性表达率均明显高于癌旁正常组织 (65.8% vs. 42.6%; 71.9% vs. 39.0%, 均  $P < 0.05$ )。EphA2 与 VEGF-C 的高表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移、TNM 分期有关 (均  $P < 0.001$ )。EphA2 蛋白与 VEGF-C 蛋白高表达的胃癌组织中 LVD 计数分别明显高于两者低表达胃癌组织 ( $15.25 \pm 5.41$  vs.  $10.95 \pm 5.41$ ,  $P = 0.001$ ;  $14.87 \pm 5.71$  vs.  $11.00 \pm 5.01$ ,  $P = 0.006$ )。胃癌组织中 EphA2 与 VEGF-C 蛋白以及 mRNA 表达均呈正相关 ( $r = 0.375$ ,  $P = 0.001$ ;  $r = 0.559$ ,  $P = 0.01$ )。

**结论:** EphA2 与 VEGF-C 在胃癌组织中均呈高表达, 且可能共同促进淋巴管生成与胃癌淋巴结转移。

## 关键词

胃肿瘤; 受体, Eph 家族; 血管内皮生长因子 C; 淋巴管生成

中图分类号: R735.2

## Expressions of EphA2 and VEGF-C in gastric cancer and their association with lymphangiogenesis

ZHU Zhenhua<sup>1</sup>, YUAN Weijie<sup>2</sup>, HUANG Changhao<sup>2</sup>, CHEN Zihua<sup>2</sup>

(1. Department of General Surgery, Changsha Central Hospital, Changsha 410004, China; 2. Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

## Abstract

**Objective:** To investigate the EphA2 and VEGF-C expressions in gastric cancer and their clinical significance.

**Methods:** The protein expressions of VEGF-C and EphA2 as well as the lymphatic vessel density (LVD) in 82 paired specimens of gastric cancer and adjacent gastric tissue were determined by immunohistochemical staining. The mRNA expressions of EphA2 and VEGF-C in 20 paired specimens of gastric cancer and adjacent gastric tissue were detected by real-time RT-PCR. The relations of EphA2 and VEGF-C expressions with the clinicopathologic characteristics of the patients and lymphangiogenesis were analyzed.

**Results:** The positive expression rates of both EphA2 and VEGF-C in gastric cancer tissue were significantly higher than those in adjacent gastric tissue (65.8% vs. 42.6%; 71.9% vs. 39.0%, both  $P < 0.05$ ). The high expressions

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20130162110026)。

收稿日期: 2016-03-22; 修订日期: 2017-02-17。

作者简介: 朱振华, 湖南省长沙市中心医院主治医师, 主要从事胃肠道疾病方面的研究。

通信作者: 陈子华, Email: chenzihua1@hotmail.com

of EphA2 and VEGF-C were significantly associated with the depth of tumor invasion, lymph node metastasis and TNM stage (all  $P < 0.001$ ). The LVD count in gastric cancer tissue with high EphA2 or VEGF-C expression was significantly higher than that in gastric cancer tissue with low EphA2 or VEGF-C expression ( $15.25 \pm 5.41$  vs.  $10.95 \pm 5.41$ ,  $P = 0.001$ ;  $14.87 \pm 5.71$  vs.  $11.00 \pm 5.01$ ,  $P = 0.006$ ). There was a significant correlation between EphA2 and VEGF-C in either protein or mRNA expression in gastric cancer tissue ( $r = 0.375$ ,  $P = 0.001$ ;  $r = 0.559$ ,  $P = 0.01$ ).

**Conclusion:** Both EphA2 and VEGF-C expressions are increased in gastric cancer tissue, and they may jointly promote lymphangiogenesis and lymph node metastasis in gastric cancer.

**Key words** Stomach Neoplasms; Receptors, Eph Family; Vascular Endothelial Growth Factor C; Lymphangiogenesis

**CLC number:** R735.2

胃癌是亚洲最常见的消化道恶性肿瘤，约占全球范围癌症死亡的10%以上，仅次于肺癌<sup>[1]</sup>。淋巴结转移是影响胃癌患者预后的重要因素<sup>[2]</sup>，但是促进胃癌淋巴道转移的淋巴管生成机制还不明了。EphA2已被证实在胃癌、乳腺癌等多种肿瘤组织中明显过表达，并且与肿瘤微血管密度及患者预后密切相关<sup>[3]</sup>。VEGF-C是近年来发现的淋巴管内皮生长因子，其与受体VEGFR-3结合后可发生淋巴管内皮扩张，促使淋巴管形成<sup>[4]</sup>。为探究EphA2和VEGF-C两种蛋白在胃癌淋巴道转移中关系，本实验利用免疫组化SP法和real-time PCR方法分别检测EphA2与VEGF-C蛋白和mRNA在胃癌组织中的表达及两者相关性，同时用特异性淋巴管内皮标记物D2-40对淋巴管进行染色后分析EphA2和VEGF-C的表达对淋巴管生成的影响，为进一步抗肿瘤淋巴管生成的分子靶向治疗提供临床研究依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

收集82例中南大学湘雅医院自2012年12月—2013年6月收治的胃癌患者的癌组织及其距肿瘤边缘约2 cm的癌旁正常组织。所有患者术前均未行任何治疗，其中女36例，男46例；年龄分布31~81岁，中位年龄5.5岁；淋巴结转移者52例，无淋巴结转移者30例；按照国际抗癌联盟UICC 1997年TNM分期标准分期：I~II期40例，III期42例。

### 1.2 试剂

兔抗人EphA2多克隆抗体购自美国Millipore公司；兔抗人VEGF-C多克隆抗体和小鼠抗人D2-40单克隆抗体英国Abcam公司；即用型SP免疫

组化染色试剂盒和DAB显色剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司；逆转录试剂盒（GoScript™ Reverse Transcription System）购自美国Promega公司；SYBR Green购自瑞士Roche公司；引物由上海生物生工公司合成。

### 1.3 方法

**1.3.1 标本处理** 82例标本均由10%福尔马林固定，常规石蜡包埋。蜡块切片，做免疫组织化学染色。所有石蜡标本（包括NK、RCCC）均连续切片，片厚约4 μm，共5张。其中1张作常规HE染色，3张作EphA2、VEGF-C、D2-40免疫组化染色，1张以PBS液代替一抗体作为阴性对照。随机抽取20例胃癌患者术后留取的新鲜标本进行real-time PCR。每例患者手术后30 min内取胃癌组织以及癌旁2 cm新鲜组织标本，同时随机选取2例患者远离肿瘤组织（>10 cm）的新鲜标本作为PCR阴性对照。所有标本放入已消毒的经1%DEPC水溶液处理过的EP管中，并迅速转移至-80℃低温冰箱中，供后续试验用。

**1.3.2 免疫组化染色（SP二步法）** 4 μm厚石蜡切片在65℃恒温箱中烘烤90 min后常规脱蜡以及水化，用3% $H_2O_2$ 室温下15 min消除内源性过氧化物酶，PBS漂洗3次，每次5 min；于0.01 mol/L pH6.0柠檬酸钠缓冲液中，用微波法进行抗原修复；PBS漂洗3次，每次5 min；滴加50 μL 3%BSA，37℃水浴箱孵育30 min；弃去封闭液，分别滴加1:100稀释的兔抗人EphA2多克隆抗体和兔抗人VEGF-C多克隆抗体以及1:150稀释的小鼠抗人D2-40单克隆抗体，37℃孵育1 h，用PBS代替一抗作阴性对照；PBS漂洗3次，每次5 min；分别滴加抗兔和抗鼠二抗，37℃孵育30 min。PBS漂洗3次，每次5 min。DAB显色1~5 min，显微镜下观察染色情况，自来水冲洗2 min终止染色；

苏木素复染细胞核 20 s, 常规脱水透明, 中性树脂封片。

**1.3.3 RNA 提取和 cDNA 分析** TRIzol 法提取总 RNA。取 100 mg 组织置于盛有液氮的研钵中碾碎后加入 1 mL TRIzol 于继续碾磨成粉状, 室温冷却后转移至 1.5 mL EP 管; 1 000 r/min 4 ℃离心 10 min 后取上清至新的 1.5 mL EP 管。每管加入 0.2 mL 氯仿, 震荡 15 s 混匀后室温放置 5 min, 11 000 r/min 4 ℃离心 15 min。吸取含总 RNA 的上层无色水相至一新的离心管中, 每管加入等体积异丙醇, 颠倒数次混匀, 冰上静置 10 min 后 11 000 r/min 4 ℃离心 10 min, 弃上清。加入 1 mL 75% 乙醇 (DEPC 水配制), 颠倒混匀后 6 000 r/min 4 ℃离心 5 min。弃尽上清。待乙醇挥发干净后, 加入适量 DEPC 水溶解, 10 μL 分装后, -70 ℃冻存。取 OD260/OD280 比值范围在 1.8~2.0 之间的 RNA 进行下一步实验。逆转录合成 cDNA: 1 μL Oligo dT 和 1 μL 总 RNA 加入到 PCR 小管中, 补充 DEPC 水至 10 μL, 混匀后, 70 ℃ 5 min。按照逆转录试剂盒说明配置 10 μL 反应体系, 混匀离心后 42 ℃ 反应 1 h, 然后 70 ℃ 10 min, 将所得的 cDNA 置于 -80 ℃ 保存备用。

**1.3.4 real-time PCR** 采用 SYBR Green 法进行 real-time PCR。采用 primer 5.0 软件设计引物, VEGF-C 正向: AAG GAG GCT GGC AAC ATA AC; VEGF-C 反向: CCA CAT CTG TAG ACG GAC AC; EphA2 正向: GTG TAC AAG GGC ATG CTG AA; EphA2 反向: AAC TTG TCC AGG GCC CCA TT; β-actin 正向: ACA GAG CCT CGC CTT TGC; β-actin 反向: ATC CTT CTG ACC CAT GCC CAC。按照 10 μL SYBR Green、5 μL 稀释 5 倍的 cDNA、0.4 μL 正反向引物混合液和 4.6 μL DEPC 水配置反应体系。按照 95 ℃ 5 min 预变性; 95 ℃ 10 s; 60 ℃ 1 min 进行 40 个循环; 95 ℃ 5 s 后, 60 ℃ 1 min 的程序在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增。

**1.3.5 结果判断** (1) 免疫组化染色结果判定: EphA2 与 VEGF-C 均为细胞浆表达的蛋白, 因此阳性染色为胞浆内出现棕黄色染色, 低倍镜下观察整个切片, 分散选取 5 个不同的视野, 高倍镜下观察细胞染色情况; 综合阳性细胞百分率和染色强度进行结果判定。结果判定参照文献<sup>[5]</sup>报道, 阳性细胞百分数 ≤ 5% 为 0 分; 6%~25% 为 1 分, 26~50% 为 2 分; >50% 为 3 分。染色强弱计分,

阴性为 0 分; 淡黄色染色为 1 分; 中度黄色染色为 2 分; 棕黄色染色为 3 分。按“阳性细胞+染色强弱”计总分, 0~1 分为阴性 (-), 2 分为弱阳性 (+), 3~4 分为中度阳性 (++) , 5~6 分为强阳性 (+++)。阴性和弱阳性为低表达组, 中度阳性和强阳性为高表达组。所有染色结果的判定均采用统一评分标准和双盲法, 在完全不知样本临床资料的情况下, 由两名研究者分别对实验结果进行评判、打分, 所有评分过程均重复 3 次以上。(2) 淋巴管密度 (LVD) 计数: 对 D2-40 染色阳性淋巴管进行 LVD 计数。参照 MEIDNER 计数标准, 每个标本先在光镜低倍视野下 (10×4) 确定组织中淋巴管最密集区及热点, 再在高倍镜下 (10×20) 下观察着色腔, 以此作为一个淋巴管, 计数 5 个视野淋巴管数目并取其均数为肿瘤 LVD 的数量。

#### 1.4 统计学处理

采用 SPSS 18.0 版统计软件对实验数据进行统计分析。比较 EphA2 蛋白和 VEGF-C 蛋白在胃癌、癌旁组织组间差异的显著性采用  $\chi^2$  检验, EphA2 蛋白和 VEGF-C 蛋白在胃癌中表达的免疫组化结果与临床病理特征比较采用  $\chi^2$  检验, LVD 在胃癌、癌旁组织组间以及在 EphA2 蛋白、VEGF-C 蛋白高低表达组之间的差异性采用秩和检验, EphA2 与 VEGF-C 蛋白的相关性检验采用 Spearman 等级相关分析, VEGF-C mRNA、EphA2 mRNA 在癌、癌旁的比较采用秩和检验 (经正态性检验,  $P < 0.05$ , 不符合正态分布), 相关性检验采用 Pearson 相关分析。  $P < 0.05$  认为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 EphA2 与 VEGF-C 蛋白在胃癌组织中的表达

EphA2 和 VEGF-C 蛋白在胃癌组织中的阳性表达率分别为 65.8% (54/82) 和 71.9% (59/82) (图 1), 而两者在癌旁组织中阳性表达率分别为 42.6%、39%, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。

### 2.2 EphA2 和 VEGF-C 蛋白高表达与胃癌临床病理特征之间的关系

分析结果显示, EphA2 与 VEGF-C 蛋白表达与患者年龄、性别、肿瘤的大小以及肿瘤分化程度无明显关系 (均  $P > 0.05$ ), 但两种蛋白的表达与肿瘤浸润深度, 有无淋巴结转移, TNM 分期相关 (均  $P < 0.05$ ) (表 1)。

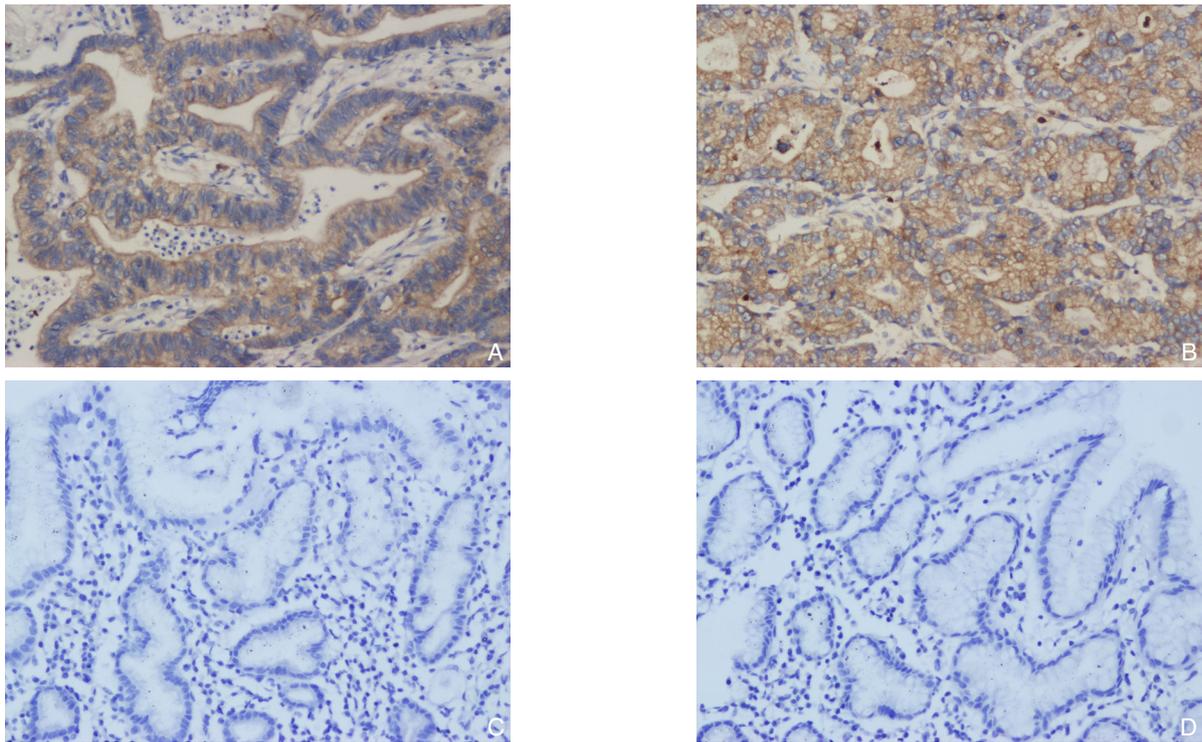


图 1 胃癌组织 EphA2 与 VEGF-C 免疫组化检测 ( × 400 ) A: EphA2 阳性表达; B: VEGF-C 阳性表达; C: EphA2 阴性表达; D: VEGF-C 阴性表达

Figure 1 Immunohistochemical staining for EphA2 and VEGF-C in gastric cancer tissues ( × 400 ) A: Positive EphA2 expression; B: Positive VEGF-C expression; C: Negative EphA2 expression; D: Negative VEGF-C expression

表 1 EphA2 与 VEGF-C 表达与胃癌临床病理特征的关系 [ n ( % ) ]

Table 1 Relations of EphA2 and VEGF-C expression with clinical factors of gastric cancer [ n ( % ) ]

因素	n	EphA2				P	VEGFC				P
		(-)	(+)	(++)	(+++)		(-)	(+)	(++)	(+++)	
年龄 (岁)											
< 60	53	14 (26.41)	7 (13.21)	14 (26.41)	18 (33.97)	0.078	9 (16.98)	6 (11.32)	20 (37.74)	18 (33.96)	0.122
≥ 60	29	4 (13.80)	3 (10.34)	16 (55.17)	6 (20.69)		1 (3.45)	7 (24.14)	8 (27.59)	13 (44.82)	
肿瘤大小 (cm)											
< 5	53	16 (30.19)	5 (9.43)	18 (33.96)	14 (26.42)	0.099	6 (11.32)	12 (22.64)	18 (33.96)	17 (32.08)	0.108
≥ 5	29	2 (6.90)	5 (17.24)	12 (41.38)	10 (34.48)		4 (13.79)	1 (3.45)	10 (34.48)	14 (48.28)	
性别											
男	46	10 (21.74)	7 (15.22)	20 (43.48)	9 (19.56)	0.138	5 (10.87)	6 (13.04)	13 (28.26)	22 (47.83)	0.211
女	36	8 (22.22)	3 (8.33)	10 (27.78)	15 (41.67)		5 (13.89)	7 (19.44)	15 (41.67)	9 (25.00)	
病理分型											
低分化	42	10 (23.81)	7 (16.67)	11 (26.19)	14 (33.33)	0.206	7 (16.67)	5 (11.91)	15 (35.71)	15 (35.71)	0.490
中高分化	40	8 (20.00)	3 (7.50)	19 (47.50)	10 (25.00)		3 (7.50)	8 (20.00)	13 (32.50)	16 (40.00)	
TNM 分期											
I/II	40	14 (35.00)	8 (20.00)	12 (30.00)	6 (15.00)	0.001	8 (20.00)	11 (27.50)	12 (30.00)	9 (22.50)	0.001
III	42	4 (9.52)	2 (4.76)	18 (42.86)	18 (42.86)		2 (4.76)	2 (4.76)	16 (38.10)	22 (52.38)	
淋巴结转移											
无	30	9 (30.00)	7 (23.33)	8 (26.67)	6 (20.00)	0.031	7 (23.33)	10 (33.34)	6 (20.00)	7 (23.33)	0.000
有	52	9 (17.31)	3 (5.77)	22 (42.31)	18 (34.61)		3 (5.77)	3 (5.77)	22 (42.31)	24 (46.15)	
浸润深度											
T <sub>1</sub> /T <sub>2</sub>	24	10 (41.67)	3 (12.50)	6 (25.00)	5 (20.83)	0.044	5 (20.83)	8 (33.33)	6 (25.00)	5 (20.84)	0.007
T <sub>3</sub> /T <sub>4</sub>	58	8 (13.80)	7 (12.07)	24 (41.38)	19 (32.75)		5 (8.62)	5 (8.62)	22 (37.93)	26 (44.83)	

### 2.3 EphA2 和 VEGF-C 蛋白表达与 LVD 关系的分析

D2-40标记的淋巴管呈褐色染色(图2), EphA2和VEGF-C蛋白高表达组LVD计数分别为

15.25 ± 5.41、14.87 ± 5.71, 分别高于EphA2和VEGF-C蛋白低表达组(10.95 ± 5.41、11.00 ± 5.01)。秩和检验显示两者差异均有统计学意义(P=0.001、P=0.006)。

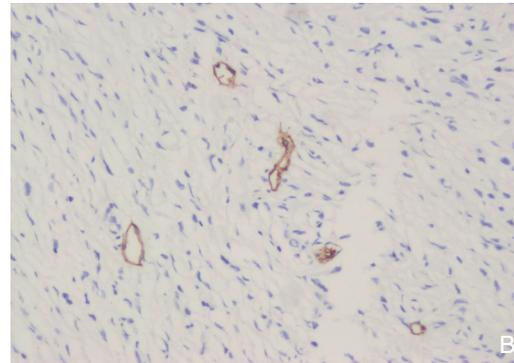
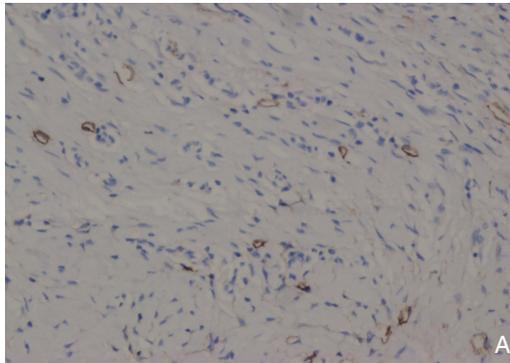


图2 D2-40免疫组化染色(×200) A: 癌组织中(LVD计数14); B: 癌旁组织(LVD计数4)

Figure 2 Immunohistochemical staining for D2-40(×200) A: Gastric cancer tissue (LVD count of 14); B: Adjacent gastric tissue (LVD count of 4)

### 2.4 EphA2 与 VEGF-C 蛋白表达的相关性

EphA2蛋白与VEGF-C蛋白同为高表达者47例, 同为低表达者16例, EphA2蛋白低表达而VEGF-C蛋白高表达者12例, EphA2蛋白高表达而VEGF-C蛋白低表达者7例, 经Sperman等级相关分析显示EphA2和VEGF-C蛋白表达呈正相关(r=0.375, P=0.001), (表2)。

表3 EphA2、VEGF-C mRNA 癌组织与癌旁组织中的相对表达量(̄x ± s, n=20)

Table 3 Relative mRNA expression levels of EphA2 and VEGF-C in gastric cancer and adjacent tissues (̄x ± s, n=20)

组织	EphA2	VEGF-C
胃癌组织	3.00 ± 1.48	3.33 ± 1.76
癌旁组织	1.57 ± 0.70	1.86 ± 0.94
P	0.002	0.008

表2 EphA2 与 VEGF-C 蛋白表达的相关性

Table 2 Correlation between EphA2 and VEGF-C protein expressions

	VEGF-C 蛋白				r	P
	(-)	(+)	(++)	(+++)		
EphA2 蛋白						
(-)	3	6	5	4	0.375	0.001
(+)	4	3	1	2		
(++)	2	3	13	12		
(+++)	1	1	9	13		

### 2.5 20例胃癌患者中 VEGF-C、EphA2 mRNA 表达情况及其两者的相关性分析

20例胃癌癌组织EphA2 mRNA相对表达量为3.00 ± 1.48, 而癌旁组织为1.57 ± 0.70, 差异有统计学意义(P=0.002); 与EphA2 mRNA表达类似, 20例胃癌患者癌组织VEGF-C mRNA相对表达量也明显高于癌旁组织[(3.33 ± 1.76) vs. (1.86 ± 0.94), P=0.009](表3)。采用Pearson相关分析结果显示EphA2 mRNA和VEGF-C mRNA表达量呈正相关(r=0.559, P=0.01)(图3)。

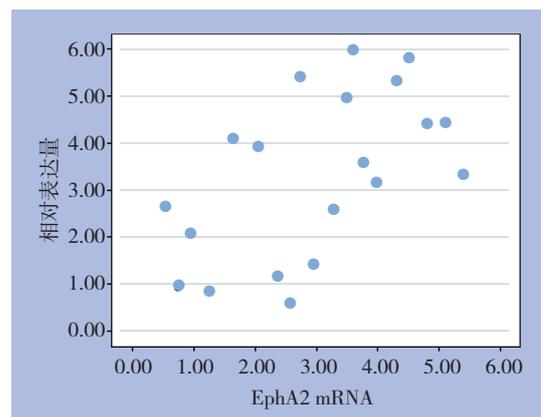


图3 20例胃癌组织中 EphA2 与 VEGF-C mRNA 相关性散点图

Figure 3 Scatter plot for correlation between EphA2 and VEGF-C mRNA expressions in 20 specimens of gastric cancer tissue

## 3 讨论

胃癌是中国发病率和病死率都位居前三的肿瘤<sup>[6]</sup>。虽然近年来随着D<sub>2</sub>为主的规范手术的推广以

及术后合理的化疗,胃癌患者的生存率有所提高,但相较于结直肠癌这类术后生存率较高的恶性肿瘤,其治疗效果仍不满意<sup>[7]</sup>。癌细胞的扩散和转移是导致癌症患者死亡的主要原因,且大多经血道和淋巴道转移,其中胃癌以淋巴道转移为主<sup>[8]</sup>。新生淋巴管的生成是肿瘤转移的必然条件,EphA2和VEGF-C是近年来恶性肿瘤淋巴道转移的热点研究分子。

Eph受体酪氨酸激酶通过与糖基磷脂酰肌醇(GPI)样或跨膜的ephrin配体结合调解细胞的黏附、迁移和血管生成<sup>[9]</sup>。作为Eph家族的重要成员,ephrin-A1/EphA2已被证实在胃癌、乳腺癌、Kaposi肉瘤、舌癌等多种肿瘤组织中明显过表达,并且EphA2高表达与胃癌患者肿瘤TNM分期、浸润深度、淋巴结是否转移以及预后密切相关,与本文结果一致<sup>[3]</sup>。而D2-40作为恶性肿瘤淋巴管转移的重要参考指标,本研究中由D2-40所得的LVD计数与EphA2的高表达存在相关性,更加进一步提示EphA2的表达与胃癌淋巴结转移存在正相关,故考虑EphA2可能通过某个途径促进胃癌淋巴结转移。

目前研究<sup>[10-11]</sup>表明ephrin-A1/EphA2复合体可通过参与E-cadherin、 $\beta$ -catenin、VEGF<sup>[12]</sup>、Ras和MAPK信号通路<sup>[13]</sup>、RAF/MEK/ERK<sup>[14]</sup>等信号通道调控肿瘤细胞之间黏附性,破坏细胞间连接以及诱导EMT(上皮细胞-间充质转化)发生,进而导致肿瘤浸润和转移。本研究中real time-PCR结果显示癌组织中EphA2 mRNA表达水平显著高于癌旁组织,表明EphA2蛋白的高表达是受到转录水平调控。目前研究表明EphA2表达与乳腺癌<sup>[15]</sup>、非小细胞肺癌<sup>[16]</sup>、脑胶质瘤<sup>[4]</sup>等患者的预后相关。Yuan等<sup>[17]</sup>有研究提示高表达EphA2蛋白的胃癌患者预后较低表达者差,故可推测EphA2或可成为与预后有价值的判断指标。但是仅有EphA2单个指标,缺乏足够的特异性和敏感性,不足以评估胃癌患者的复发及转移风险。有必要进一步寻找特异性的促淋巴管生成因子及与EphA2的关系,为肿瘤淋巴转移提供特异性的检测指标。

VEGF-C是淋巴管生成特异性因子,能与位于淋巴管内皮细胞上的受体VEGFR-3结合,通过激活一系列反应,促进淋巴管内皮细胞增殖、迁移并抑制其凋亡,诱导毛细淋巴管的生成及发展,进而促进肿瘤内及肿瘤周围淋巴管生成,从而使恶性肿瘤细胞进入淋巴系统发生远处转移,严重影响癌症患者的预后<sup>[18]</sup>。此外,实验中所见高表达VEGF-C蛋白的胃癌肿瘤组织中心区域较少

看到开放性的淋巴管,但肿瘤边缘的组织中存在增生、扩张的淋巴管,与先前Saharinen等<sup>[19]</sup>研究结果基本一致,表明癌组织边缘新的淋巴管和毛细淋巴管形成对于恶性肿瘤的浸润、转移具有更加重要的意义和作用。RT-PCR结果表明胃癌组织VEGF-C的mRNA表达水平显著高于癌旁组织,进一步提示了胃癌与VEGF-C的mRNA表达相关。目前对VEGF-C参与肿瘤淋巴管生成机制的研究表明除肿瘤细胞本身能够分泌VEGF-C使癌组织中的VEGF-C水平升高外<sup>[20]</sup>,VEGF-C还可通过胰岛素样生长因子受体(IGFIR)<sup>[21]</sup>、纤连蛋白1(FN1)<sup>[22]</sup>等多种途径上调其表达。当VEGF-C结合并激活其受体VEGFR-3,随后VEGFR-3胞内区与糖基磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)形成复合物并活化PI3K和Akt,引起下游分子Erk1/2磷酸化,从而发挥调节淋巴管生成的作用<sup>[18]</sup>。有研究<sup>[23]</sup>提示高水平的VEGF-C不仅可以增加了肿瘤附近淋巴管的生成,也增强肿瘤细胞的迁徙运动功能。VEGF-C通过多种途径来促进肿瘤的浸润及转移,从而促进肿瘤进展,缩短患者的生存时间。但VEGF-C目前还有许多调节机制不清,需要进一步研究。

本研究中EphA2与VEGF-C两种蛋白的相关性分析结果显示两者无论在蛋白水平还是mRNA表达水平都存在正相关趋势,提示在胃癌细胞中EphA2与VEGF-C在蛋白和mRNA水平上可能共同协调新生淋巴管生成,从而导致肿瘤的浸润和转移。有研究<sup>[24]</sup>表明,EphA2可能通过PI3K/Akt信号通路调节VEGF-C表达。EphA2缺陷的小鼠中重新表达EphA2后,后者可通过激活下游信号分子PI3K恢复内皮细胞重塑脉管的能力。而肿瘤细胞中的EphA2可引起下游PI3K磷酸化和Akt的473位丝氨酸磷酸化,通过抑制肿瘤细胞的凋亡来促进肿瘤细胞的转移<sup>[25]</sup>,提示Akt是EphA2下游的重要分子。与此同时,细胞外基质蛋白Fibronectin的裂解体EDA可PI3K/Akt信号通路促进VEGF-C表达,而抑制PI3K/Akt信号通路后VEGF-C表达明显降低<sup>[5]</sup>,说明VEGF-C也是PI3K/Akt信号通路的靶分子之一。

值得肯定的是,在胃癌的浸润转移中,EphA2与VEGF-C相互介导,促进胃癌的淋巴转移。但是具体的介导通路机制,待进一步研究证实。

#### 参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90. doi: 10.3322/caac.20107.

- [2] 欧阳喜, 郝腾飞. 胃癌淋巴结微转移的研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(4):589-592. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.023.
- Ouyang X, Hao TF. Lymph node micrometastasis in gastric cancer: research advances[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(4):589-592. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.023.
- [3] 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. doi: 10.1158/1541-7786.
- [4] Puttick S, Stringer BW, Day BW, et al. EphA2 as a diagnostic imaging target in glioblastoma: a positron emission tomography/magnetic resonance imaging study[J]. Mol Imaging, 2015, 14:385-399.
- [5] Zhang X, Ding L, Diao Z, et al. CYR61 modulates the vascular endothelial growth factor C expression of decidual NK cells via PI3K/AKT pathway[J]. Am J Reprod Immunol, 2012, 67(3):216-223. doi: 10.1111/j.1600-0897.2011.01080.x.
- [6] 陈万青, 张思维, 曾红梅, 等. 中国2010年恶性肿瘤发病与死亡[J]. 中国肿瘤, 2014, 23(1):1-10. doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2014.01.A001.
- Chen WQ, Zhang SW, Zeng HM, et al. Report of cancer incidence and mortality in China (2010)[J]. China Cancer, 2014, 23(1):1-10. doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2014.01.A001.
- [7] Hacker U, Lordick F. Current standards in the treatment of gastric cancer[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2015, 140(19):1417. doi: 10.1055/s-0041-106868.
- [8] Mocellin S, Nitti D. Lymphadenectomy extent and survival of patients with gastric carcinoma: a systematic review and meta-analysis of time-to-event data from randomized trials[J]. Cancer Treat Rev, 2015, 41(5):448-454. doi: 10.1016/j.ctrv.2015.03.003.
- [9] Park I, Lee HS. EphB/ephrinB signaling in cell adhesion and migration[J]. Mol Cells, 2015, 38(1):14-19. doi: 10.14348/molcells.2015.2116.
- [10] Huang J, Xiao D, Li G, et al. EphA2 promotes epithelial-mesenchymal transition through the Wnt/beta-catenin pathway in gastric cancer cells[J]. Oncogene, 2014, 33(21):2737-2747. doi: 10.1038/ncr.2013.238.
- [11] Thomson S, Petti F, Sujka-Kwok I, et al. A systems view of epithelial-mesenchymal transition signaling states[J]. Clin Exp Metastasis, 2011, 28(2):137-155. doi: 10.1007/s10585-010-9367-3.
- [12] Cheng N, Brantley DM, Liu H, et al. Blockade of EphA receptor tyrosine kinase activation inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced angiogenesis[J]. Mol Cancer Res, 2002, 1(1):2-11.
- [13] Tandon M, Vemula SV, Mittal SK. Emerging strategies for EphA2 receptor targeting for cancer therapeutics[J]. Expert Opin Ther Targets, 2011, 15(1):31-51. doi: 10.1517/14728222.2011.538682.
- [14] Hamaoka Y, Negishi M, Katoh H. EphA2 is a key effector of the MEK/ERK/RSK pathway regulating glioblastoma cell proliferation[J]. Cell Signal, 2016, 28(8):937-945. doi: 10.1016/j.cellsig.2016.04.009.
- [15] Husa AM, Magić Ž, Larsson M, et al. Eph/ephrin profile and EPHB2 expression predicts patient survival in breast cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(16):21362-21380. doi: 10.18632/oncotarget.7246.
- [16] Amato KR, Wang S, Hastings AK, et al. Genetic and pharmacologic inhibition of EPHA2 promotes apoptosis in NSCLC[J]. J Clin Invest, 2014, 124(5):2037-2049. doi: 10.1172/JCI72522.
- [17] 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. doi: 10.1007/s10620-008-0649-4.
- [18] Coso S, Zeng Y, Opeskin K, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-3 directly interacts with phosphatidylinositol 3-kinase to regulate lymphangiogenesis[J]. PLoS One, 2012, 7(6):e39558. doi: 10.1371/journal.pone.0039558.
- [19] Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, et al. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation[J]. Trends Immunol, 2004, 25(7):387-395.
- [20] Chen JC, Chang YW, Hong CC, et al. The role of the VEGF-C/VEGFRs axis in tumor progression and therapy[J]. Int J Mol Sci, 2012, 14(1):88-107. doi: 10.3390/ijms14010088.
- [21] Zhang C, Hao L, Wang L, et al. Elevated IGFIR expression regulating VEGF and VEGF-C predicts lymph node metastasis in human colorectal cancer[J]. BMC Cancer, 2010, 10:184. doi: 10.1186/1471-2407-10-184.
- [22] Morita Y, Hata K, Nakanishi M, et al. Cellular fibronectin 1 promotes VEGF-C expression, lymphangiogenesis and lymph node metastasis associated with human oral squamous cell carcinoma[J]. Clin Exp Metastasis, 2015, 32(7):739-753. doi: 10.1007/s10585-015-9741-2.
- [23] Lim J, Ryu JH, Kim EJ, et al. Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 Reduces Migration of Gastric Cancer Cells[J]. Cancer Invest, 2015, 33(8):398-404. doi: 10.3109/07357907.2015.1047509.
- [24] Brantley-Sieders DM, Caughron J, Hicks D, et al. EphA2 receptor tyrosine kinase regulates endothelial cell migration and vascular assembly through phosphoinositide 3-kinase-mediated Rac1 GTPase activation[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 10):2037-2049.
- [25] Harada K, Hiramoto-Yamaki N, Negishi M, et al. Ephexin4 and EphA2 mediate resistance to anoikis through RhoG and phosphatidylinositol 3-kinase[J]. Exp Cell Res, 2011, 317(12):1701-1713. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.05.014.

( 本文编辑 姜晖 )

本文引用格式: 朱振华, 袁伟杰, 黄昌浩, 等. EphA2与VEGF-C在胃癌中的表达及其与淋巴管生成的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2017, 26(4):473-479. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.04.012

Cite this article as: Zhu ZH, Yuan WJ, Huang CH, et al. Expressions of EphA2 and VEGF-C in gastric cancer and their association with lymphangiogenesis[J]. Chin J Gen Surg, 2017, 26(4):473-479. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.04.012