

· 综 述 ·

受体酪氨酸激酶 Eph 基因表达与人类结直肠癌的研究进展

彭李博 综述, 王建东 审核

【摘要】 人类结直肠癌的发病是一个多因素、多步骤的渐进过程, 促红细胞生成素产生肝细胞激酶(erythropoietin producing hepatocyte kinase, Eph) 基因的异常表达在其中起着重要作用。Eph 及其配体 Ephrin 具有重要的生理功能, 近年来国内外的多项研究发现 Eph 家族的多个受体在大肠癌中具有异常表达, 其异常表达与结直肠癌的浸润深度、分化程度及存活率密切相关, 由此极大地扩展了对大肠癌发病机制的研究, 为大肠癌的诊断和治疗提供了新的思路 and 手段。

【关键词】 促红细胞生成素产生肝细胞激酶; 结直肠癌; 表达

【中图分类号】 R349.64; R735.37 【文献标志码】 A 【文章编号】 1672-271X(2013)01-0048-04

促红细胞生成素产生肝细胞激酶(erythropoietin producing hepatocyte kinase, Eph) 受体是受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK) 家族最大的亚族, 分为 Eph A 和 Eph B 受体。Eph 受体及其配体 Ephrin 之间的信号传递在生物体的胚胎发育、神经轴突导向和血管生成等方面发挥着重要作用。新近的研究发现 Eph 受体及其配体在大肠癌组织中的异常表达, 与结直肠癌的发生、发展、预后等密切相关。Eph 及其配体 Ephrin 有可能成为预防和治疗大肠癌的一个新靶标, 本文就近年来 Eph 基因与结直肠癌的相关研究综述如下。

1 Eph 基因家族组成

1.1 Eph 的发现与命名 1987 年 Hirai 等^[1] 发现 Eph 基因, 在克隆出该基因全部 cDNA 序列后, 发现该基因在一株产生红细胞生成素的人肝癌细胞系 ETL-1 中呈现高表达, 故命名该新基因为 Eph 基因。根据序列同源性、结构与配体结合特性的不同, Eph 受体被分为 Eph A 和 Eph B 两个亚族, 配体分 Ephrin A 和 Ephrin B 两个亚型。其中 Eph A 受体包括 Eph A1 ~ 10, 其配体为 Ephrin A1 ~ 6; Eph B 受体包括 Eph B1 ~ 6, 其配体为 Ephrin B1 ~ 3。

1.2 Eph 的结构 Eph 为跨膜 I 型糖蛋白, 分为 3 个结构域: 糖基化的胞外区、细胞内具有酪氨酸激酶活性的功能区(胞内区) 和连接二者的由疏水氨基酸组成的跨膜区。胞外区由免疫球蛋白样元件的配体结合域、1 个半胱氨酸富含区(有 20 个半胱氨酸

残基)、1 个 N 端球状结构域和 2 个纤维结合蛋白 III 型同源区组成, 其 N 端球状结构域决定了受体与配体结合的特性和亚族特异性; 胞内区包含近膜区、保守的酪氨酸激酶结构域、SAM 结构域(sterile α motif, SAM) 和 C 端的突出后密度蛋白-大盘-密闭小带(Post-synaptic density protein, Discs large, Zonula occludens, PDZ) 结构域结合基序。近膜区、激酶结构域、SAM 结构域包含多个酪氨酸残基, 它们的磷酸化可为包含 SH2/SH3 结构域(Src-Homology-2/3) 或磷酸化酪氨酸结合(phospho-tyrosine binding, PTB) 结构域的信号蛋白提供结合位点。高度保守的 SAM 结构域可通过同源或异型聚物的形成来介导蛋白间相互作用, 为启动下游反应及为结合小分子量磷酸酶提供适宜的接触部位。PDZ 结合基序与包含 PDZ 结构域的蛋白结合后可为膜上蛋白复合物的组装提供平台。

1.3 Ephrin 的结构 Ephrin A 通过糖基磷脂酰肌醇链锚定在细胞膜上, Ephrin B 为单次跨膜蛋白, 包括信号区、结合区、间隔区和疏水区。Ephrin B 的羧基末端由保守的酪氨酸残基和 PDZ 结构域结合基序组成, 可为包含 SH2/SH3 或 PTB 结构域的信号蛋白提供停泊位点(图 1)。

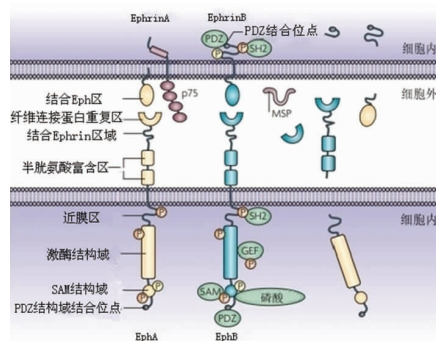


图 1 Eph 和 Ephrin 结构模式图

基金项目: 国家自然科学基金资助(30970813; 81171391)

作者单位: 210002 江苏南京, 南方医科大学南京临床医学院(南京军区南京总医院) 病理科

通讯作者: 王建东, E-mail: jdwang1216@163.com

2 Eph 基因的生理功能

Eph 受体与其配体 Ephrin 之间相互作用,通过细胞信号通路介导对胚胎发育、神经轴突导向、血管生成等方面起到了重要的作用^[2]。

在维持生物体胚胎发育方面,在胚胎发育过程中 Eph B2 受体和 Ephrin B 配体系统对后脑的形成发挥了重要作用,Eph B2 受体与邻近细胞表面的 Ephrin B 配体的结合启动双向细胞信号通道传递,导致两个细胞之间的排斥,限制了邻近细胞群的混杂,从而调控细胞的迁徙和黏附,以维持组织和细胞正常的空间排列和形态。Battle^[3]的研究进一步肯定了这种作用,在 Eph B2 受体表达缺陷的小鼠肠道黏膜中,观察到具有增殖和分化能力的各种前体细胞迁移定位导向错乱,不能到达正确的位置,吸收细胞、杯状细胞以及潘式细胞的前体细胞沿着隐窝—鞭毛轴混乱排列,同种细胞相互聚集。Eph B2 表达缺失导致肠道黏膜细胞排列紊乱,改变了各种细胞的生存内环境,对细胞代谢亦产生一定的影响。

在调节神经系统轴突导向方面,中枢神经系统中中线结构表达 Ephrin 的细胞,与其他轴突竞争投射部位,并在已穿过中线结构的周围有 Eph 的代偿性表达,以避免轴突再次穿过中线。由此,轴突可以发现正确投射路径,形成完整的神经功能网络^[4]。利用基因敲除实验证实,Ephrin B 配体在表达轴突中传导信号,通过 Ephrin B 配体与 Eph B 受体胞外结合域的相互作用,显示出介导轴突生长形成大脑前连合,或者形成视网膜神经节细胞轴突。事实上,当小鼠缺乏某一特定的 Eph B 基因,就出现轴突投射异常,但这种介导错误会被以表达缺乏激酶结合域但含有胞外结合域的 Eph B2 的修整形式所纠正。Eph B2 的内在信号传导功能作为介导轴突并非必须,而其胞外结合域却扮演着重要角色,推测是通过激活 Ephrin B 配体的信号传导通路而发挥作用。

在控制血管生成方面,Eph 受体作为受体酪氨酸激酶家族之一,与其配体结合能控制血管生成。Ephrin A1 是 Eph 受体第一个被明确的配体,为一种被肿瘤坏死因子 α 诱导的基因,已从人脐静脉内皮细胞克隆出。在非成人组织早期器官形成的胚胎内皮细胞中已可检测 Ephrin A1 转录,这预示着 Ephrin A1 配体在血管形态发生中发挥生理功能。Eph B2 受体与配体 Ephrin B2 结合活化,在动脉形成中调控内皮细胞和间叶细胞相互间的联系,促进血管平滑肌细胞的增殖。Ephrin B2 羧基端缺乏 PDZ 模序可扰乱淋巴管内皮细胞的生长,阻止末梢毛细淋巴

管床的形成,而 Ephrin B2 中的 PDZ 模序对于血管的发育并不是必须的。据此推测,Ephrin B2 可能是通过不同的信号机制来控制血管和淋巴管生长。

3 Eph A 亚群在结直肠癌中的表达及意义

Saito 等^[5]运用免疫组化方法对 194 例原发性结直肠癌进行 Eph A2 的表达研究,他们发现 Eph A2 的高表达与肿瘤肝转移、淋巴管侵袭以及临床分期有关;与淋巴结转移的关系也非常明显。Eph A2 和 Ephrin A1 有助于诱导肿瘤新生血管的形成,Eph A2 在结直肠癌中的表达高于正常黏膜,在 I、II 期肿瘤中的表达高于 III、IV 期;在直径 ≤ 5 cm 肿瘤中的表达高于直径 > 5 cm 者,由此推断 Eph A 主要在结直肠癌早期阶段发挥重要作用。Dong 等^[6]研究发现 Eph A1 在肠癌细胞中表达程度不同,并存在甲基化倾向。Eph A1 蛋白在肠腺瘤中呈弥漫强阳性,在癌组织中不表达或低表达;低表达多见于低分化腺癌、肠壁浸润程度更深和淋巴结转移。Eph A1 下调多见于中晚期病例,下调较上调患者预后不良,表达越低,生存率越低,研究^[7]证实,去甲基化处理可以使 Eph A1 重新表达。Wang 等^[8]检测大肠癌细胞系中 Eph A7 的表达,发现大肠癌细胞系 DLD1、HT29、HCT116、SW480 和 SW620 中 Eph A7 基因低表达。经甲基化特异性引物基因扩增、亚硫酸氢钠处理后 DNA 测序等,发现其启动子区 CpG 岛高甲基化。进一步应用 RT-PCR 技术^[9],检测出结直肠癌患者血浆中微量游离 DNA 中甲基化的 Eph A7 基因,提示启动子区 CpG 岛甲基化是 Eph A7 在大肠癌中低表达的机制,血浆甲基化 Eph A7 可能作为一种新的肿瘤标志物。Xi 等^[10]研究发现 Eph A3 在大肠癌组织中的表达显著高于正常黏膜,Eph A3 的表达与肿瘤的大小、组织学分级、浸润深度、淋巴结转移、远处转移和 TNM 分期相关,Eph A3 的高表达与低生存率相关。Eph A3 可能在肿瘤的发生发展中发挥着重要的作用,可作为肿瘤治疗临床评估和评价大肠癌预后的一个有利指标。Oshima 等^[11]研究发现,Eph A2 的过表达与 Eph B1 的低表达可能促进大肠癌的肝转移,提示有可能成为预测大肠癌肝转移的一个有效指标。Eph A 在大肠癌发生的不同阶段其表达情况不一致,Eph A 的表达与大肠癌的分级与分期存在一定的相关性,但目前关于 Ephrin A 在大肠癌发生发展中的作用报道较少,还有待进一步的研究^[12]。

4 Eph B 亚群在结直肠癌发生、发展和转移中的作用

4.1 Eph B 受体的高表达 早期的研究提示多种

Eph B 家族的成员在人结直肠癌高表达,在癌细胞的运动、侵袭及转移中发挥促进作用。Martiny-Baron 等^[13]研究发现 Eph B4 的表达在结直肠癌中明显上调,但因研究样本数较少($n=15$),在对比 Eph B4 在正常和癌组织中的表达差异时,未就 Eph B4 在不同肿瘤分期中的表达进行对比。

4.2 Eph B 受体的低表达 新近发现 Eph B 的表达在结直肠癌中存在不同程度的下调,其表达水平与肿瘤的恶性程度和患者的生存期相关,Eph B 的表达越少,肿瘤的恶性程度就越高,患者的生存期就越短。Battle 等^[14]和 Clevers 等^[15]检测了 Eph B2 受体在正常肠隐窝干细胞、肠腺瘤细胞、肠原位癌细胞、肠癌淋巴结转移细胞和肝转移细胞中的表达,发现 Eph B2 受体在他们中的表达呈递减趋势,发现在小鼠结直肠癌模型中,使用基因工程技术干扰癌细胞 Eph B2 受体的表达, Eph B2 受体的缺失加快了结直肠肿瘤的形成。这项研究提示,大多数大肠癌细胞在腺瘤和癌之间的过渡阶段失去了 Eph B2 受体的表达,并且 Eph B2 表达的多少与肠癌的浸润深度和远端转移密切相关, Eph B2 的表达越低,肿瘤分化越差,浸润程度越深,远端转移越多。这些结果在其他一些独立实验中也得到了进一步的支持,Guo 等^[16]研究认为, Eph B2 在正常结肠黏膜底部腺管的上皮细胞表面、在 78.0% 的腺瘤、55.4% 的原发性结肠癌、37.8% 的淋巴结转移组织和 39.2% 的肝转移组织中存在表达;结肠癌 Dukes C 期和 D 期表达低于 A 期和 B 期,中晚期结肠癌淋巴转移灶的表达低于原发癌,肝转移灶表达低于原发灶,在结肠癌细胞株的体外实验中亦证明了过度表达的 Eph B2 受体能够抑制肿瘤细胞的生长、黏附和转移,推测 Eph B2 在结直肠癌发生和发展的每一个关键步骤中持续减少、表达缺失是预后不良的强烈指标。Merlos-Suarez 等^[17]发现成人肠道干细胞被高表达的 Eph B2 受体标记,被标记的干细胞在大肠癌的复发中起到了核心作用。Senior 等^[18]构建的肿瘤体内模型显示,与对照组相比,高表达的 Eph B2 显著减小肿瘤的大小达 10 mm,即使是中等水平的 Eph B2 的表达也会减少大肠癌细胞的生长、迁移和侵袭。Sheng 等^[19]研究发现 Eph B1 在结直肠中低分化腺瘤中高表达, Eph B1 的表达下调和结直肠癌的分化和浸润深度有关,表达下调越明显,恶性程度越高;表达下调的越多,浸润深度越深甚至达浆膜外脂肪组织。Chiu 等^[20]提示 Eph B3 在恶性程度高的结直肠癌中表达显著下降,研究者将 Eph B3 转染至 HT-29 人结肠癌细胞中,发现肿瘤细胞的生长受到

明显抑制。Kumar 等^[21]发现敲除 Eph B4 会抑制肿瘤的生长和转移, Eph B4 存在调节肿瘤的血管发生和肿瘤细胞生成的潜力。而笔者最近通过检测 Eph B6 在结直肠癌组织及其周围正常组织的表达,发现 Eph B6 在大肠癌细胞中表达下调,多见于中晚期病例及淋巴结转移者,提示 Eph B6 在结直肠癌的发展过程中可能有一定抑制肿瘤转移及发展的作用。

以上实验证明了 Eph B 受体与大肠癌的表达和肿瘤的浸润程度以及远端转移呈负相关,与肿瘤组织的分化程度以及存活率呈正相关,提示 Eph B 对于肿瘤的生长具有抑制作用,提示了 Eph B 可能是结直肠癌潜在的抑癌基因。

5 Eph 基因是潜在的结直肠癌治疗新靶点

由于 Eph 基因在肿瘤的发生、发展以及预后中可能发挥一定作用,国内外已有研究人员开始将它作为肿瘤生物治疗的新靶标。Yamaguchi 等^[22]用 Eph A2 肽加强型树突状细胞疫苗治疗鼠结肠癌,发现此疫苗可以通过增加 CD8⁺ 和 CD4⁺ 的 T 细胞功能发挥长效抗肿瘤效应。Xia 等^[23]报道利用 RNA 干扰或反义寡核苷酸技术敲除 Eph B4 编码的癌蛋白,使肿瘤细胞生长、迁移和侵袭受到明显抑制并诱导凋亡。Abéngozar 等^[24]研究表明,抗 Ephrin B2 治疗会减少小鼠体内血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)生成并降低新生血管的形成,引起血管和淋巴管生成的急剧减少,针对 Ephrin B2 的特异性抗体,联合现有的抗血管生成药物,可以作为一种治疗癌症和和血管生成相关疾病的有效治疗手段。Lee 等^[25]利用在 HT-29 人结直肠癌细胞株里接种鸡胚绒毛尿囊膜,发现肿瘤细胞的生长和血管生成受到苯基苯乙烯酮的显著抑制,苯基苯乙烯酮通过抑制多种 RTK 受体发挥抗血管生成及治疗癌症的重要作用。Landen 等^[26]利用特异性抗体来中和 Eph A2 以及小片段干扰性 RNA (small interfering RNA, siRNA) 干扰 Eph A2 表达等方法,配合紫杉类药物治疗卵巢癌等肿瘤,结果显示可抑制肿瘤生长和肿瘤血管形成,并提高了患者生存率。目前,大肠癌基因治疗的核心问题是靶向性,朱役等^[27]利用纳米材料构建载有靶向 VEGF mRNA 的 siRNA 质粒,发现纳米基因载体具有较高的包封率及转染率,可有效降低大肠癌细胞株 SW620 中 VEGF mRNA 的表达量。利用基因技术,找到个体不同的致病靶点,采用个体化的基因治疗是大肠癌治疗的发展方向之一。

目前研究证实 Eph 基因对维持生物胚胎发育、

调节神经轴突导向和控制血管生成等方面都具有重要作用,同时在大肠癌的发生、发展和预后中亦发挥重要作用。国内外已有很多大肠癌中 Eph 表达谱的研究,有关 Eph 在结直肠癌的基因治疗的研究也在不断深入,但 Eph 与其配体对大肠癌的复杂的调控机制尚未完全明确,相信随着有关研究的深入和技术的进步,可为进一步阐明大肠癌发生、发展,包括药物治疗和分子靶向治疗提供新的前景。

【参考文献】

- [1] Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, et al. A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the Eph gene [J]. Science, 1987, 238 (4834): 1717-1720.
- [2] Pasquale E B. Eph-Ephrin bidirectional signaling in physiology and disease [J]. Cell, 2008, 133 (1): 38-52.
- [3] Battle E, Henderson J T, Begthel H, et al. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/EphrinB [J]. Cell, 2002, 111 (2): 251-263.
- [4] Migani P, Bartlett C, Dunlop S, et al. Regional and cellular distribution of Ephrin B1 in adult mouse brain [J]. Brain Res, 2009, 1247: 50-61.
- [5] Saito T, Masuda N, Miyazaki T, et al. Expression of Eph A2 and E-cadherin in colorectal cancer: correlation with cancer metastasis [J]. Oncol Rep, 2004, 11 (3): 605-611.
- [6] Dong Y, Wang J, Sheng Z, et al. Downregulation of Eph A1 in colorectal carcinomas correlates with invasion and metastasis [J]. Mod Pathol, 2009, 22 (1): 151-160.
- [7] Herath NI, Doecke J, Spanevello MD, et al. Epigenetic silencing of Eph A1 expression in colorectal cancer is correlated with poor survival [J]. Br J Cancer, 2009, 100 (7): 1095-1102.
- [8] Wang J, Kataoka H, Suzuki M, et al. Downregulation of Eph A7 by hypermethylation in colorectal cancer [J]. Oncogene, 2005, 24 (36): 5637-5647.
- [9] 王建东, 王绪林, 董迎春, 等. TaqMan 探针检测结直肠癌血浆中微量甲基化 Eph A7 基因 [J]. 东南国防医药, 2009, 11 (2): 97-99.
- [10] Xi HQ, Zhao P. Clinicopathological significance and prognostic value of Eph A3 and CD133 expression in colorectal carcinoma [J]. J Clin Pathol, 2011, 64 (6): 498-503.
- [11] Oshima T, Akaike M, Yoshihara K, et al. Overexpression of Eph A4 gene and reduced expression of Eph B2 gene correlates with liver metastasis in colorectal cancer [J]. Int J Oncol, 2008, 33 (3): 573-577.
- [12] Brantley-Sieders DM. Clinical relevance of Ephs and Ephrins in cancer: lessons from breast, colorectal, and lung cancer profiling [J]. Semin Cell Dev Biol, 2012, 23 (1): 102-108.
- [13] Martiny-Baron G, Korff T, Schaffner F, et al. Inhibition of tumor growth and angiogenesis by soluble Eph B4 [J]. Neoplasia, 2004, 6 (3): 248-257.
- [14] Battle E, Bacani J, Begthel H, et al. Eph B receptor activity suppresses colorectal cancer progression [J]. Nature, 2005, 435 (7045): 1126-1130.
- [15] Clevers H, Battle E. Eph B/Ephrin B receptors and wnt signaling in colorectal cancer [J]. Cancer Res, 2006, 66 (1): 2-5.
- [16] Guo D L, Zhang J, Yuen S T, et al. Reduced expression of Eph B2 that parallels invasion and metastasis in colorectal tumours [J]. Carcinogenesis, 2006, 27 (3): 454-464.
- [17] Merlos-Suarez A, Barriga FM, Jung P, et al. The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse [J]. Cell Stem Cell, 2011, 8 (5): 511-524.
- [18] Senior PV, Zhang BX, Chan ST. Loss of cell-surface receptor Eph B2 is important for the growth, migration, and invasiveness of a colon cancer cell line [J]. Int J Colorectal Dis, 2010, 25 (6): 687-694.
- [19] Sheng Z, Wang J, Dong Y, et al. Eph B1 is underexpressed in poorly differentiated colorectal cancers [J]. Pathobiology, 2008, 75 (5): 274-280.
- [20] Chiu ST, Chang KJ, Ting CH, et al. Over-expression of Eph B3 enhances cell-cell contacts and suppresses tumor growth in HT-29 human colon cancer cells [J]. Carcinogenesis, 2009, 30 (9): 1475-1486.
- [21] Kumar SR, Seehnet JS, Ley EJ, et al. Preferential induction of Eph B4 over Eph B2 and its implication in colorectal cancer progression [J]. Cancer Res, 2009, 69 (9): 3736-3745.
- [22] Yamaguchi S, Tatsumi T, Takehara T, et al. Immunotherapy of murine colon cancer using receptor tyrosine kinase Eph A2-derived peptide-pulsed dendritic cell vaccines [J]. Cancer, 2007, 110 (7): 1469-1477.
- [23] Xia G, Kumar SR, Masood R, et al. Up-regulation of Eph B4 in mesothelioma and its biological significance [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11 (12): 4305-4315.
- [24] Abengozar MA, de Frutos S, Ferreira S, et al. Blocking Ephrin B2 with highly specific antibodies inhibits angiogenesis, lymphangiogenesis, and tumor growth [J]. Blood, 2012, 119 (19): 4565-4576.
- [25] Lee JS, Kang Y, Kim JT, et al. The anti-angiogenic and anti-tumor activity of synthetic phenylpropenone derivatives is mediated through the inhibition of receptor tyrosine kinases [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 677 (1-3): 22-30.
- [26] Landen CN, Kinch MS, Sood AK. Eph A2 as a target for ovarian cancer therapy [J]. Expert Opin Ther Targets, 2005, 9 (6): 1179-1187.
- [27] 朱 役, 贾绍昌, 蔡 凯, 等. 靶向血管内皮生长因子的纳米颗粒制备及其对大肠癌细胞株 SW620 的作用 [J]. 医学研究生学报, 2011, 24 (10): 19-22.

(收稿日期: 2012-05-15; 修回日期: 2012-07-06)

(本文编辑: 张仲书)