

## · 论 著 ·

## 受体酪氨酸激酶 EphB6 蛋白在结直肠癌中表达及临床意义

陈昌浩<sup>1</sup>, 孙岳军<sup>2</sup>, 王建东<sup>3</sup>

**[摘要]** 目的 探索促红细胞生成素产生肝细胞激酶受体 B6(EphB6)蛋白在结直肠癌中表达及其临床意义。方法 采用免疫组织化学染色方法检测一组结直肠癌组织中 EphB6 蛋白表达,分析其与临床病理指标以及患者总生存时间之间的关系。结果 正常黏膜组织 EphB6 蛋白阳性表达率为 75.0%(93/124),腺瘤型息肉为 73.7%(42/57),结直肠癌组织中为 54.0%(67/124),EphB6 在结直肠癌中的表达显著低于腺瘤和正常黏膜( $P<0.05$ )。EphB6 蛋白在癌组织中表达与肿瘤分化( $P<0.01$ )、淋巴结转移( $P<0.01$ )和 Dukes 分期( $P<0.01$ )有关;但与结直肠癌患者的年龄、性别和部位无关。EphB6 低表达患者比高表达患者预后差( $P<0.05$ )。结论 EphB6 在结直肠癌发生、发展和预后中可能具有抑癌基因的作用,可能成为一种新的肿瘤预后和治疗靶点。

**[关键词]** 受体酪氨酸激酶;肝细胞激酶受体 B6;结直肠癌

**[中图分类号]** R365;R735.37 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2016.04.003

**Clinical significance of decreased expression of EphB6 receptor tyrosine kinase in colorectal carcinoma**

CHEN Chang-hao<sup>1</sup>, SUN Yue-jun<sup>2</sup>, WANG Jian-dong<sup>3</sup>. 1. The Second Affiliated Hospital of Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210003, China; 2. Jiangyin Peoples' Hospital, Jiangyin, Jiangsu 214400, China; 3. Nanjing General Hospital, Nanjing, Jiangsu 210002, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the clinical significance of decreased expression of EphB6 receptor tyrosine kinase in colorectal carcinoma. **Methods** A set of colorectal carcinoma samples was detected the expression of EphB6 by using immunohistochemical staining. The relationship between the expression of EphB6 and clinicopathological parameters and survival was analyzed. **Results** The EphB6 expression was detected in normal mucosa (75.0%, 93/124), adenoma (73.7%, 42/57), colorectal carcinoma (54.0%, 67/124). The expression level of EphB6 was significantly decreased in colorectal cancer compared with adenoma and normal mucosa ( $P<0.05$ ). The decreased expression of EphB6 was significantly associated with differentiation ( $P<0.01$ ), lymph node metastasis ( $P<0.01$ ) and Dukes stage ( $P<0.01$ ). There was no significant difference between the expression of EphB6 and age, sex, and tumor location. The patients with decreased expression of EphB6 had a poor survival ( $P<0.05$ ). **Conclusion** EphB6 may have a tumor suppressor role in colorectal carcinoma and may be a new target for therapy.

**[Key words]** receptor tyrosine kinase; EphB6; colorectal carcinoma

促红细胞生成素产生肝细胞激酶受体(erythropoietin producing hepatocyte kinase, Eph)是受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK),包括 EphAs 和 EphBs 受体,和 EphrinAs 和 EphrinBs 配体。Eph 及其 Ephrin 之间传递信号在胚胎发育,特别是神经轴突导向和血管生成等方面发挥着重要功能<sup>[1-5]</sup>。Eph 受体及其配体在多种恶性肿瘤中表现为表达异常,与肿瘤发生、发展、侵袭、和转移过程密切相

关<sup>[6-8]</sup>。与其他 Eph 基因不同,EphB6 在其酪氨酸激酶活性区发生了几个氨基酸的改变,导致与 ATP 结合障碍并失去酪氨酸激酶活性<sup>[9-10]</sup>。不同研究小组对 EphB6 在多种肿瘤中的表达及作用开展了研究。Gu 等<sup>[11]</sup>检测了一组卵巢浆液性肿瘤中 EphB6 蛋白的表达,他们发现 EphB6 在正常输卵管和良性卵巢肿瘤中 100% 表达,78% 的交界性肿瘤中表达,18% 的浆液性癌中表达。EphB6 表达水平与分级和 TNM 分期相关,EphB6 低表达或丢失的患者存活时间降低。Dong 等<sup>[12]</sup>研究了 EphB6 在舌鳞状细胞癌中的表达及其临床意义。本文利用免疫组织化学染色检测了一组结直肠癌标本,探索 EphB6 的表达及其临床病理指标的相关性。

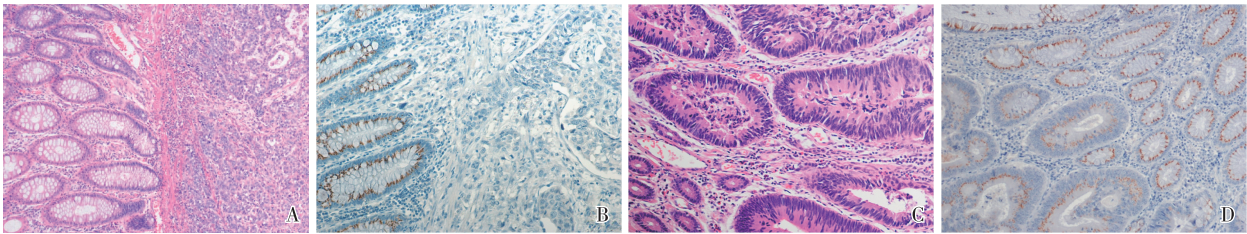
**1 材料与方法****1.1 组织标本** 本研究所用石蜡标本为东南大学附

基金项目: 国家自然科学基金(81371611)

作者单位: 1. 210003 江苏南京,东南大学附属第二医院肝胆外科;2. 214400 江苏江阴,江阴市人民医院病理科;3. 210002 江苏南京,南京军区南京总医院病理科

通讯作者: 王建东, E-mail: jd\_wang@outlook.com

引用格式: 陈昌浩,孙岳军,王建东.受体酪氨酸激酶 EphB6 蛋白在结直肠癌中表达及临床意义[J].东南国防医药,2016,18(4):346-348.



A: 显示癌组织与癌旁正常组织交界处,癌组织呈实性片状分布;B: 显示 EphB6 蛋白在正常黏膜腺腔的高尔基体分泌部着色,EphB6 在肿瘤组织的表达较正常组织中下调;C: 显示结肠腺瘤型息肉伴低级别上皮内瘤变;D: 显示 EphB6 蛋白在结肠直肠癌和正常黏膜腺腔的高尔基体分泌部中均着色(放大倍数×200,A、C 为 HE 染色,B、D 为 Envision 法)

图 1 EphB6 蛋白在结直肠癌、良性病变和正常组织中的表达

属第二人民医院和江阴市人民医院病理科存档病例,所取标本均获得患者知情同意,并获得医院伦理委员会批准。收集 124 例结直肠癌、57 例腺瘤型息肉(2005 年 8 月–2012 年 7 月)的石蜡组织标本,结直肠癌病例中女 54 例,男 70 例,中位年龄 56 岁(36~82 岁),选取了不同分化肿瘤(高分化癌 19 例,中分化癌 79 例,低分化癌 26 例)。另外还选取了良性息肉 57 例,中位年龄 58 岁(31~74 岁),包括低级别上皮内瘤变 45 例,高级别上皮内瘤变 12 例。

**1.2 方法** 兔抗人 EphB6 抗体购自美国 ABGENT 公司,稀释度为 1:500;二抗和 DAB 显色试剂盒采用福州迈新公司产品。4 微米组织切片,脱腊、水化后,高压抗原修复,应用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 修复内源性过氧化物酶。Envision 法检测组织 EphB6 蛋白表达,用磷酸盐缓冲液(PBS)代替 EphB6 一抗做阴性对照,按照试剂盒说明书严格操作。

**1.3 结果** 判断高倍镜下分析 10 个视野(×400),每个高倍镜视野分析计数 100 个肿瘤细胞。本实验采用半定量计分方法,即阳性细胞百分数+染色强度:阳性细胞数<5%为 0 分,5%~25%为 1 分,26~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,>75%为 4 分;无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,深黄色为 3 分。最终结果:0 分为缺失表达,1~2 分为低表达,缺失表达和低表达为阴性;3~4 分为中表达,5~7 分为高表达,中表达和高表达为阳性表达。

**1.4 随访** 中位随访时间为 7 个月,79 例结直肠癌获得有效随访资料,随访期间,57 例(72.1%)死亡(38 例死于复发)。随访从手术之日开始,失访、死于其他疾病或者在随访截至时仍存活视为截尾数据。总生存期(overall survival, OS)定义为从初次治疗开始至死亡或随访终点时间。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计学分析,计数资料组间比较采用  $\chi^2$  检验,生存率采用 Kaplan-Meier 法计算,Log-rank 检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 EphB6 在肠正常黏膜、腺瘤和结直肠癌组织中的表达** 免疫组化示 EphB6 阳性染色主要表现为高尔基体分泌部着色(图 1)。EphB6 蛋白在正常黏膜、腺瘤和癌组织中阳性表达率分别为 75.0%(93/124)、73.7%(42/57)和 54.0%(67/124)。结直肠癌癌组织中 EphB6 蛋白的表达明低于腺瘤型息肉和正常黏膜( $P<0.05$ )。

**2.2 EphB6 表达与临床病理指标之间的关系** 应用统计学工具分析 EphB6 蛋白表达与结直肠癌患者临床病理多项参数之间的关系,见表 1。

表 1 EphB6 蛋白在结直肠癌中的表达与患者临床病理参数之间的关系

病理参数	n	EphB6 阴性	EphB6 阳性
性别			
男	70	34(49%)	36(51%)
女	54	26(48%)	28(52%)
年龄			
<55 岁	64	29(45%)	35(55%)
≥55 岁	60	31(52%)	29(48%)
部位			
升横结肠	47	24(42%)	33(58%)
降乙结肠、直肠	77	36(54%)	31(46%)
浸润深度			
黏膜至肌层	42	14(33%)	28(67%)*
浆膜或外膜	82	46(56%)	36(44%)*
分化			
高	19	6(40%)	13(60%)*
中	79	33(42%)	46(58%)*
低	26	24(81%)	2(19%)*
淋巴结转移			
无	72	29(40%)	43(60%)*
有	52	34(65%)	18(35%)*
Dukes 分期			
A+B	67	24(36%)	43(64%)*
C+D	57	36(63%)	21(37%)*

注:与 EphB6 阴性比较,\* $P<0.01$

**2.3 EphB6 表达与患者预后的关系** 进一步分析 EphB6 表达水平与患者的预后关系, EphB6 表达患者的平均生存期分别为 53.8 个月;低表达患者的平均生存期为 83.3 个月,两组 5 年总生存率分别为 63.2% 和 83.2%。统计学分析发现 EphB6 低表达的患者较 EphB6 高表达的患者生存时间短(图 2)

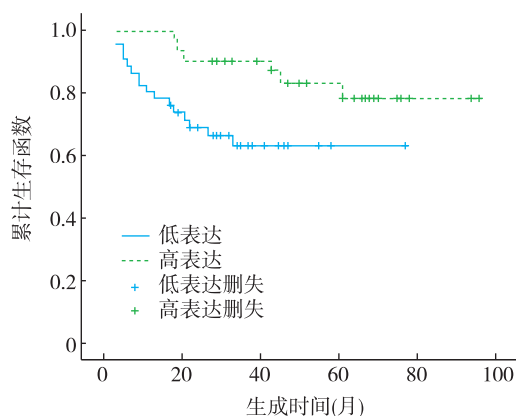


图 2 EphB6 表达与患者生存

Kaplan-Meier 曲线为结直肠癌患者的生存分析, EphB6 蛋白低表达患者较高表达患者预后差,具有统计学差异( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

结直肠癌是全球危害健康最常见恶性肿瘤,发病率为全部癌症的第三位。虽然在结直肠癌治疗方面已取得重大进步,但目前临床治疗手段包括手术、化疗、放疗和靶向治疗等对晚期转移结直肠癌的效果并未发生根本性改善。研究结直肠癌的分子机制,早期发现肿瘤和进行个体化治疗,改善治疗策略,对提高患者的生存率具有重要意义<sup>[13]</sup>。

本研究利用特异性多克隆抗体进行免疫化学染色,检测了一组结直肠癌、腺瘤及正常黏膜组织中 EphB6 蛋白的表达情况,分析 EphB6 蛋白表达与患者临床病理指标和生存时间之间的关系,为临床评估疾病进展及判断预后提供线索。本研究揭示了 EphB6 蛋白表达与临床病理指标相关,即 EphB6 蛋白在结直肠癌中表达与分化程度、淋巴结转移和 Dukes 分期有关,具有统计学意义( $P<0.01$ );但尚未发现其表达下调与年龄、性别、肿瘤浸润深度、部位存在相关性。这结果提示 EphB6 蛋白可能对结直肠癌的分化、转移和生长浸润产生影响,与肿瘤进展相关。本研究通过统计学分析 EphB6 蛋白表达与结直肠癌患者的生存时间,发现 EphB6 低表达组平均生存时间明显低于高表达组患者。我们推测 EphB6 基因有望评估结直肠癌患者预后的重要指标之一。

因此,本研究结果提示 EphB6 蛋白表达水平下调可能参与了良性腺瘤向结直肠癌的转变过程,即该基因蛋白可能参与了结直肠癌的早期发生和肿瘤的进展过程。EphB6 蛋白表达与肿瘤分化和淋巴结转移有关,提示该蛋白可能具有抑制肿瘤细胞发生浸润和转移。虽然本研究提示 EphB6 基因在结直肠癌的进展过程中可能发挥一定抑制作用,但其表达的调控机制和肿瘤抑制作用仍有待下一步深入研究。我们相信对 EphB6 在结直肠癌中的深入研究,可能为此疾病的风险评估及患者预后评价提供新的实验室指标。

### 【参考文献】

- [1] Kania A, Klein R. Mechanisms of ephrin-Eph signalling in development, physiology and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(4):240-256.
- [2] Suzuki DG, Murakami Y, Yamazaki Y, et al. Expression patterns of Eph genes in the "dual visual development" of the lamprey and their significance in the evolution of vision in vertebrates [J]. *Evol Dev*, 2015, 17(2):139-147.
- [3] King DE. Acute DSS colitis alters EphB6 receptor expression in neurons of the spinal dorsal horn [J]. *Neurosci Lett*, 2014, 559:105-110.
- [4] Ende G, Poitz DM, Strasser RH, et al. The role of the Eph/ephrin-system in atherosclerotic plaque development: a complex puzzle [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2014, 23(4):251.
- [5] Nievergall E, Lackmann M, Janes PW. Eph-dependent cell-cell adhesion and segregation in development and cancer [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(11):1813-1842.
- [6] 彭李博, 王建东. 受体酪氨酸激酶 Eph 基因表达与人类结直肠癌的研究进展 [J]. *东南国防医药*, 2013, 15(1):48-51.
- [7] Jones AM, Ferguson P, Gardner J, et al. NRAS and EPHB6 mutation rates differ in metastatic melanomas of patients in the North Island versus South Island of New Zealand [J]. *Oncotarget*, 2016. doi: 10.18632/oncotarget.9351. [Epub ahead of print]
- [8] Giaginis C, Alexandrou P, Poulaki E, et al. Clinical Significance of EphB4 and EphB6 Expression in Human Malignant and Benign Thyroid Lesions [J]. *Pathol Oncol Res*, 2016, 22(2):269-275.
- [9] Allonby O, El Zawily AM, Freywald T, et al. Ligand stimulation induces clathrin- and Rab5-dependent downregulation of the kinase-dead EphB6 receptor preceded by the disruption of EphB6-Hsp90 interaction [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(12):2645-2657.
- [10] Akada M, Harada K, Negishi M, et al. EphB6 promotes anoikis by modulating EphA2 signaling [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(12):2879-2884.
- [11] Gu Y, Li F, Qian N, et al. Expression of EphB6 in ovarian serous carcinoma is associated with grade, TNM stage and survival [J]. *J Clin Pathol*, 2016, 69(5):448-453.
- [12] Dong Y, Pan J, Ni Y, et al. High expression of EphB6 protein in tongue squamous cell carcinoma is associated with a poor outcome [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9):11428-11433.
- [13] 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 EphA7 基因 [J]. *东南国防医药*, 2009, 11(2):97-99, 130.

(收稿日期:2016-06-22;修回日期:2016-07-06)

(本文编辑:黄攸生; 英文编辑:王建东)