

# 大肠癌组织中的 EphA2 和 Ki-67 蛋白与患者手术预后的相关性研究

王璐, 徐大洲, 吕胜祥, 李守英

连云港市第一人民医院消化内科, 江苏 连云港 222061

**【摘要】** **目的** 探讨大肠癌组织中 Eph 受体酪氨酸激酶 A2 (Eph receptor tyrosine kinase A2, EphA2)、Ki-67 蛋白在大肠癌组织中的表达与患者预后的相关性。**方法** 选取 2016 年 7 至 12 月收治的行手术治疗的大肠癌患者 115 例, 使用免疫组化法分别检测癌组织和癌旁组织中 EphA2、Ki-67 蛋白表达情况, 分析两种蛋白表达与肿瘤大小、癌组织分化、Dukes 分期、淋巴结转移的相关性, Kaplan-Meier 曲线对比癌组织中 EphA2、Ki-67 蛋白表达与患者生存时间的关系。**结果** 癌组织中 EphA2 表达率为 89.57%, Ki-67 表达率为 66.96%, 均显著高于癌旁组织的 23.78%、29.57%; EphA2 和 Ki-67 蛋白表达与癌组织分化程度、Dukes 分期、淋巴结转移均密切相关 ( $P < 0.05$ ); 随访 36 个月, Kaplan-Meier 曲线显示 EphA2、Ki-67 蛋白表达阴性患者生存率明显高于表达阳性 ( $P < 0.05$ ), Cox 分析显示 EphA2、Ki-67 均是影响大肠癌预后的独立危险因素 ( $P < 0.001$ )。**结论** EphA2、Ki-67 蛋白高表达可能在大肠癌发病、进展中参与度较高, 并且可以预测患者近中期预后状况。

**【关键词】** 大肠癌; Eph 受体酪氨酸激酶 A2; Ki-67; 预后

## Correlation of EphA2 and Ki-67 proteins in colorectal cancer tissues with prognosis of patients

Wang Lu, Xu Dazhou, Lv Shengxiang, Li Shouying

First People's Hospital of Lianyungang City, Lianyungang 222061, Jiangsu, China

**【Abstract】** **Objective** To investigate the correlation between the expression of Eph receptor tyrosine kinase A2 (EphA2) and Ki-67 protein in colorectal cancer tissues and their prognosis. **Methods** From July to December 2016, 115 patients with colorectal cancer undergoing surgery were treated with immunohistochemistry (SP) to detect the expression of EphA2 and Ki-67 protein in cancer tissues and adjacent tissues. Correlation between the expression of these proteins and tumor size, cancer tissue differentiation, Dukes stage, and lymph node metastasis. Kaplan-Meier curve was used to compare the relationship between EphA2, Ki-67 protein expression and cancer survival time in cancer tissues. **Results** The expression rate of EphA2 in cancer tissues was 89.57%, and the expression rate of Ki-67 was 66.96%, which were significantly higher than 23.78% and 29.57% of adjacent tissues. [ $\chi^2 = 45.017, P < 0.001$ ], [ $\chi^2 = 32.195, P < 0.001$ ]; EphA2 and Ki-67 protein expression are closely related to the degree of cancer tissue differentiation, Dukes stage, lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ); KM curve showed that patients with negative EphA2, Ki-67 protein expression were followed up for 36 months Survival rate was significantly higher than positive expression ( $P < 0.05$ ). Cox analysis showed that EphA2 and Ki-67 were independent risk factors affecting the prognosis of colorectal cancer ( $P < 0.001$ ). **Conclusions** The high expression of EphA2 and Ki-67 protein may be involved in the onset and progression of colorectal cancer, and can predict the prognosis of patients in the near to mid-term.

**【Key words】** Colorectal cancer; Eph receptor tyrosine kinase A2; Ki-67; Prognosis

基金项目: 连云港市第一人民医院青年英才豪森基金资助项目 (QNN1815)

作者简介: 王璐(1985年11月), 硕士, 主治医师, 主要从事消化系统疾病临床与基础研究。

通信作者: 吕胜祥(1974年3月), 男, 副主任医师, 主要从事消化系统疾病诊治, E-mail: 2318751035@qq.com

大肠癌是比较常见的肠道恶性肿瘤, 在过去的 20 年间, 全世界范围内大肠癌均呈上升趋势, 且不同性别、地区、年龄、种族人群的发病率差异较大。资料显示, 目前大肠癌发病率占所有肿瘤的第 4 位, 早期大肠癌手术治疗后 5 年生存率可高

达90%，晚期患者即便采用综合治疗手段平均生存时间仅12个月左右<sup>[1]</sup>。中晚期大肠癌患者术后转移、复发的概率较高，肿瘤转移的途径主要包括淋巴结转移、血运转移、局部侵袭和浸润转移等<sup>[2]</sup>。Ki-67基因位于10q25的编码蛋白，普遍存在于人增生细胞核中，是肿瘤细胞增殖活性的重要指标之一<sup>[3]</sup>。Eph受体酪氨酸激酶A2(phrin type-A receptor 2, EphA2)作为促新生血管形成的蛋白，在肿瘤发生、发展中起着重要的作用<sup>[4]</sup>。Ki-67和EphA2在大肠癌相互表达的关系以及临床意义鲜有报道，本研究采用免疫组织化学法测定两者在大肠癌组中的表达情况，分析其与患者临床病理特征、预后状况的相关性，为大肠癌的诊治提供新的思路。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取2016年7—12月间行手术治疗的大肠癌、癌旁组织标本115例，男性65例、女性50例，年龄29~76(42.81±5.23)岁。病理类型：腺癌81例、黏液腺癌25例、印戒细胞癌3例、其他6例。分化程度：高分化38例、中分化64例、低分化13例；溃疡型70例、隆起型27例、浸润型18例；转移情况：淋巴结转移39例、无淋巴结转移76例。

**1.2 免疫组化检测** 试剂：EphA2为兔抗人多克隆抗体、鼠抗人Ki-67单克隆抗体、枸橼酸缓冲液、DAB显色试剂盒以及配套试剂盒均购自北京中杉金桥生物工程有限公司。试验方法：将选中蜡块以4mm间距连续切片，然后行苏木精-伊红染色、SP染色，置于光镜下观察。SP试验步骤：过氧化氢做内源酶灭活处理，抗原修复液修复抗原，分别滴加一抗、二抗，滴加链霉素抗生物素过氧化物酶，DAB显色、苏木素复染，脱水、透明、封片，置于镜下观察。结果判定如下。EphA2呈棕黄色染色为免疫组化阳性，染色强度评分标准：无染色计0分，淡黄色计1分，黄色计2分，棕黄色计3分；随机选取5个高倍视野(×400)，每个视野中计数100个肿瘤细胞，阳性细胞占比≤5%为0分；6%~25%计1分；26%~50%计为2分，51%~75%计3分，76%~100%计为4分。Ki-67以细胞核呈棕褐色为免疫组化阳性，染色强度评分标准：无染色计0分，淡黄色计为1分，棕黄色为计2分，棕褐色计3分；每个视野中染色细胞占比0~10%为阴性

(0分)，11%~30%计1分，31%~70%计2分，71%~100%计3分。染色强度和阳性细胞占比计分乘积为阳性等级：0分为阴性(-)，1~4分为弱阳性(+)，5~8分为阳性(++)，9~12分为强阳性(+++)。

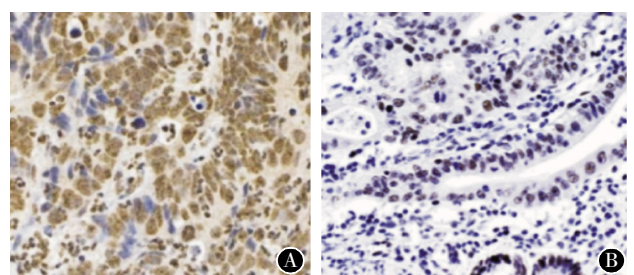
**1.3 统计学方法** 采用SPSS 25.0统计学软件处理实验数据，计数资料用%表示，组间行 $\chi^2$ 检验；等级资料相关性分析采用Spearman秩相关，绘制Kaplan-Meier曲线进行生存分析，采用Log-rank法检验差异，以 $P<0.05$ ，数据差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 EphA2和Ki-67蛋白在大肠癌组织和癌旁组织的表达情况** 115例大肠癌组织中EphA2阳性率为89.57%，癌旁组织阳性率为23.78%， $P<0.001$ ；癌组织中Ki-67阳性表达率为66.96%，癌旁组织中阳性率为29.57%， $P<0.001$ ，见表1。免疫组化染色结果见图1。

表1 大肠癌组织、癌旁组织EphA2和Ki-67表达阳性率

组织	例数	EphA2[n(%)]		Ki-67[n(%)]	
		阳性	阴性	阳性	阴性
癌组织	115	103(89.57)	12(10.43)	77(66.96)	38(33.04)
癌旁组织	115	27(23.78)	88(76.22)	34(29.57)	81(60.43)
$\chi^2$		45.017		32.195	
$P$		<0.001		<0.001	



EphA2(×400)

Ki-67(×400)

图1 免疫组织检测大肠癌组织中EphA2和Ki-67蛋白表达

**2.2 癌组织中EphA2与Ki-67表达的相关性** 相关性分析显示，大肠癌组织中EphA2表达与Ki-67无相关性( $r=0.307$ ,  $P=0.097$ )。

**2.3 EphA2与Ki-67表达与大肠癌临床病理特征的相关性** 大肠癌组织中EphA2与Ki-67蛋白表达肿瘤大小、分化程度、Dukes分期、淋巴结转移等存在密切相关性( $P<0.05$ )，见表2。

**2.4 大肠癌组织中EphA2与Ki-67蛋白表达与预后的相关性** 术后随访36个月，Kaplan-Meier分析显示EphA2阳性表达患者生存率为62.1%，

低于阴性表达组的 75.0%, Log Rank 检验  $c^2=3.830, P=0.043$ ; Ki-67 阳性表达组生存率为 57.1%, 低于阴性表达组的 78.9%,  $c^2=4.963, P=0.026$ , 图 2。Cox 多因素分析显示, EphA2 与 Ki-67 蛋白是影响大肠癌患者预后的独立危险因素, 见表 3。

### 3 讨论

大肠癌发生和进展是一个涉及多种基因改变、多阶段致癌的复杂过程, 包括癌基因的激活、抑癌基因失活、缺如等。与其他实体瘤相同的是病灶发生、进展都必须依赖新生血管形成来提供营养。EphA2 是 Eph 家族中 EphA 亚族中的成员, 其作用之一就是促进新生血管生成<sup>[5]</sup>。马晓洁等<sup>[6]</sup>表示 EphA2 经血管生成拟态 (vasculogenic mimicry, VM) 模式, 加速肿瘤毛细血管网络的生长, 间接参与肿瘤的进展中。有报道显示, 肿瘤病灶直径一

且超过 1 mm 便有生成毛细血管生成, 且组织中 EphA2 表达与毛细血管形成呈正相关<sup>[7]</sup>。机制可能是通过与其配体 EphA1 结合促使肿瘤血管内皮细胞迁移, 同时影响细胞骨架来导致基质黏附、细胞黏附改变, 以促进组织、内皮细胞形成毛细血管样结构形成<sup>[8]</sup>。本研究结果显示, 大肠癌组织中 EphA2 蛋白表达阳性率为 89.57%, 明显高于癌旁组织的 23.78%, 与高其宏<sup>[9]</sup>的结果相一致。Yue 等<sup>[10]</sup>发现正常上皮细胞中 EphA2 受体位于细胞连接处, 而恶性肿瘤细胞中则广泛分布于肿瘤细胞表面, 无法与配体结合发生降解从而呈现高表

表 3 多因素分析影响大肠癌预后的危险因素

影响因素	风险比	95%CI	P 值
EphA2(阳性 vs. 阴性)	3.014	1.511~4.11	<0.001
Ki-67(阳性 vs. 阴性)	2.406	1.674~5.223	<0.001
Dukes 分期(A+B vs. C+D)	1.581	1.163~2.158	0.005
淋巴结转移(是 vs. 否)	2.141	1.362~3.774	0.001

表 2 大肠癌组织中 EphA2 与 Ki-67 蛋白表达与病理特征的相关性

影响因素	n	EphA2 阳性率	$\chi^2/P$	Ki-67 阳性率	$\chi^2/P$
性别			0.018/0.894		0.044/0.835
男	65	58(89.23)		43(66.15)	
女	50	45(90.00)		34(68.0)	
年龄			0.067/0.795		1.923/0.165
≥60 岁	53	48(90.57)		32(60.38)	
<60 岁	62	57(91.94)		45(72.58)	
肿瘤大小			6.148/0.013		5.552/0.018
<5 cm	67	56(91.04)		39(58.21)	
≥5 cm	48	47(97.92)		38(79.17)	
病理类型			5.779/0.114		6.690/0.075
腺癌	81	75(92.59)		55(71.43)	
黏液腺癌	25	22(88.0)		17(67.90)	
印戒细胞癌	3	3(100.0)		2(66.67)	
其他	6	3(50.00)		3(50.00)	
分化程度			5.411/0.020		4.438/0.036
高分化	38	30(78.95)		16(42.11)	
中分化	64	60(93.75)		51(79.69)	
低分化	13	13(100.0)		10(76.92)	
Dukes 分期			5.335/0.021		3.913/0.048
A+B	70	59(84.29)		42(60.00)	
C+D	45	44(97.78)		35(77.78)	
肉眼类型			0.118/0.943		0.214/0.861
浸润型	18	15(83.33)		12(66.67)	
溃疡型	70	65(92.86)		47(67.14)	
隆起型	27	23(85.19)		18(66.67)	
淋巴结转移			3.912/0.048		4.188/0.041
是	39	38(97.44)		31(79.49)	
否	76	65(85.53)		46(60.53)	

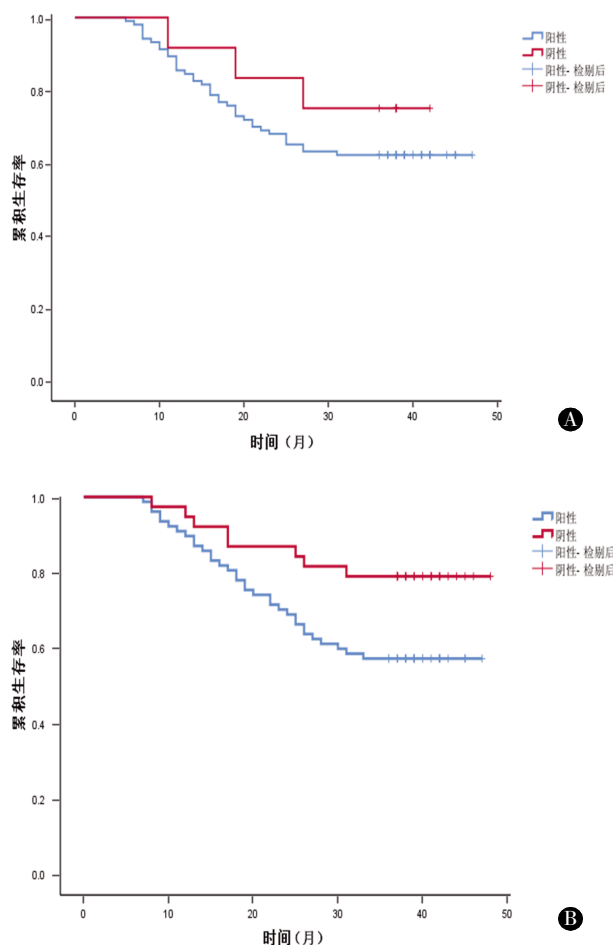


图 2 Kaplan-Meier 分析两种蛋白表达情况与预后的关系注:A 为 EphA2 表达和预后相关性;B 为 Ki-67 表达和预后相关性

达。Eriksson 等<sup>[11]</sup>表示大多数肿瘤远处转移、复发患者均存在 EphA2 过表达情况,推测 EphA2 受体位体异常后会成为功能强大的癌蛋白,启动其他信号转导途径,调节肿瘤细胞侵袭、黏附和转移。局部浸润、淋巴转移等都是肿瘤复发、远处转移主要方式,也是影响患者预后质量的危险因素,肿瘤新生血管的形成直接参与了上述过程,推测其 EphA2 能够作为预测大肠癌预后质量的重要指标。分析显示,EphA2 表达与肿瘤大小、分化程度、Dukes 分期以及淋巴转移均密切相关,且 EphA2 表达阳性组患者的生存率显著低于阴性组,推断 EphA2 可能在 Dukes 分期较晚、低分化大肠癌患者中促进新生血管形成,导致病情持续进展促使发生淋巴转移。

Ki-67 是一种与细胞增生相关的标志性核蛋白,出了细胞周期的 G0 期外的其他周期均有表达<sup>[12]</sup>。鉴于其半衰期较短,DNA 修复状态细胞中表达极低,所以能更准确反映细胞的增殖活性<sup>[13-14]</sup>。目前已被证实 Ki-67 蛋白与乳腺癌恶性程度密切相关<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,Ki-67 蛋白与大肠癌肿瘤大小、分化程度、Dukes 分期、淋巴结转移等关系密切,与王启明等<sup>[16]</sup>的报道相吻合。随访 3 年,显示 Ki-67 阳性组患者生存率远低于阴性组。Cox 多因素分析发现 EphA2、Ki-67 依然是影响大肠癌患者预后质量的独立危险因素。

有报道显示,结直肠癌组织中 Ki-67 阳性表达敏感度较高,但特异度欠佳<sup>[17]</sup>。本研究可能受限于样本量的原因未出现低特异性现象,希望能扩大样本量更准确评估 Ki-67 在大肠癌中的临床价值。另外,Ki-67 应用于大肠癌中临床研究较少,结果也需要进一步进行验证。

综上所述,EphA2 和 Ki-67 蛋白在大肠癌组织中呈高表达状态,且与癌症恶性程度关系密切,并且都是影响患者预后质量的危险因素,因此联合测定其表达水平能够为临床靶向治疗提供参考。

#### 参考文献

- [1] 王巧燕. 危险度评估问卷联合粪便隐血试验为方法的大肠癌筛查与大肠癌患者预后的关联 [J]. 中国肿瘤, 2019, 28(4):252-256.
- [2] 王振军,付李缘. 大肠癌筛查共识与争议[J]. 临床外科杂志, 2018,26(10):721-723.
- [3] SERENAT ERIS YALCIN, IRFAN OCAL, YAKUP YALCIN, et al. Evaluation of the Ki-67 Proliferation Index and Urocortin Expression in Women with Ovarian Endometriomas [J]. Eur J Med, 2017, 49(2):107-112.
- [4] TORRES-ADORNO AM, VITRAC H, QI Y, et al. Abstract 1235: EPHA2-targeted therapy enhances the cytotoxicity of eicosapentaenoic acid against triple-negative inflammatory breast cancer[J]. Cancer Res, 2017, 77(13 Supplement):1235-1235.
- [5] FINNEY, ALEXANDRA C, FUNK, STEVEN D, GREEN, JONETTE M, et al. EphA2 Expression Regulates Inflammation and Fibroproliferative Remodeling in Atherosclerosis [J]. Circulation, 2017,136:566-582.
- [6] 马晓洁,李杰,谭榜宪. 肝细胞肝癌中 EphA2 表达与血管生成拟态及临床病理的关系 [J]. 中国煤炭工业医学杂志 2014,17(4):101-104.
- [7] CHITRAMUTHU B, BATEMAN A. Progranulin and the receptor tyrosine kinase EphA2,partners in crime? [J]. J Cell Biol, 2016, 215(5) : 603-605.
- [8] SU J, JI XB, XIE JH, et al.Expressions of angiogenesis-related factors: CD105, Eph A2 and Ephrin A1 in laryngeal squamous cell carcinoma and clinical implication [J]. Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi, 2016, 51(12) : 929-936.
- [9] 高其宏. Eph 受体酪氨酸激酶 A2 和金属蛋白酶 2 在大肠癌组织的表达及其与大肠癌发生发展的关系 [J]. 安徽医药, 2018, 22(5):857-859.
- [10] YUE Z, SAKURAI H. Emerging and Diverse Functions of the EphA2 Noncanonical Pathway in Cancer Progression [J]. Biol Pharm Bull, 2017, 40(10):1616-1624.
- [11] ERIKSSON O, THULIN Å, ASPLUND A, et al. Cross-talk between the Tissue Factor/coagulation factor VIIa complex and the tyrosine kinase receptor EphA2 in cancer[J]. BMC Cancer, 2016, 16(1):1-14.
- [12] 陈序庚,洪海洲,王娜,等. 自拟中药汤剂对幽门螺杆菌相关性胃癌前病患者胃黏膜 Ki-67 蛋白表达的影响[J]. 中华医院感染学杂志, 2019,29(12):1829-1833.
- [13] 陆宝华,刘利敏,陈翔,等. 甲状腺癌患者 CXCR4 和 Ki-67 表达及其与预后的相关性 [J]. 检验医学与临床, 2019, 16(18):2610-2613.
- [14] CHIERICO L, RIZZELLO L, GUAN LJ, et al. The role of the two splice variants and extranuclear pathway on Ki-67 regulation in non-cancer and cancer cells[J]. PLoS One, 2017, 12(2):e0171815.
- [15] 吕金燕,王刚,王若雨,等. E-cadherin 以及转录因子 ZEB1 在乳腺癌中的表达及与 ER、PR、HER-2 及 Ki-67 表达的相关性[J]. 医学分子生物学杂志, 2019,16(1):52-56.
- [16] 王启明,周苏娜,邵秋菊,等. 基于决策曲线分析和生存分析评估 Her-2 和 Ki-67 对结直肠癌预后的价值 [J]. 山西医科大学学报, 2018,49(5):513-517.
- [17] 朱凯,何晶晶,苏义林,等. CD133 和 Ki-67 在神经母细胞瘤中的表达及其与预后的关系 [J]. 安徽医学, 2017, 38(11):1455-1459.