

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.05.013

· 临床研究 ·

Syk、c-erbB-2 和 EGFR 在贲门腺癌中的表达及其临床意义

杨植彬, 连艳萍, 郭艳丽, 郭 炜, 董稚明(河北医科大学第四医院 省肿瘤研究所 病理研究室, 河北 石家庄 050011)

[摘要] 目的:检测贲门腺癌(gastric cardiac adenocarcinoma, GCA)中抑癌基因脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, Syk)及原癌基因c-erbB-2、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的表达情况,探讨其相互关系及其与贲门腺癌发生、发展的关系。方法:收集河北医科大学第四医院胸外科2006年10月至2007年2月手术切除贲门腺癌标本91例,患者术前未经任何抗癌治疗。应用免疫组化SP法检测贲门腺癌组织及相应切缘外正常黏膜组织中Syk、c-erbB-2、EGFR的表达情况,进行相关性比较。结果:Syk在贲门腺癌组织的阳性表达率为24.18%,明显低于相应切缘外正常组织(60.44%, $P < 0.01$)。c-erbB-2、EGFR在贲门腺癌组织的阳性表达率分别为56.04%和58.24%,明显高于其在相应切缘外正常组织中的阳性表达率(20.88%,21.98%;均 $P < 0.01$)。Syk及c-erbB-2表达均与肿瘤组织的病理分级、淋巴结转移及TNM分期有明显的相关性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。EGFR表达仅与淋巴结转移相关($P < 0.01$)。Syk与c-erbB-2和EGFR表达均有相关性($P < 0.05$),而Syk和EGFR表达两者无明显相关性($P > 0.05$)。结论:Syk、c-erbB-2、EGFR基因在贲门腺癌中均异常表达,可能与贲门腺癌的发生有关;3种蛋白的联合检测对贲门腺癌的预后评估有一定的指导意义。

[关键词] 贲门腺癌;抑癌基因;脾酪氨酸激酶;c-erbB-2;表皮生长因子受体

[中图分类号] R735.2; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)05-0549-05

Expressions of Syk, c-erbB-2 and EGFR in gastric cardiac adenocarcinoma and relevant clinical significance

YANG Zhi-bin, LIAN Yan-ping, GUO Yan-li, GUO Wei, DONG Zhi-ming(Laboratory of Pathology, Hebei Cancer Institute, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang,050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expressions of Syk (spleen tyrosine kinase), c-erbB-2 and epidermal growth factor receptor (EGFR) in gastric cardiac adenocarcinoma (GCA) and corresponding adjacent normal tissues, and to discuss their relationship with development and progression of GCA. **Methods:** Ninety-one GCA samples were obtained from the Fourth Hospital of Hebei Medical University (from Oct. 2006 to Dec. 2007). The expressions of Syk, c-erbB-2 and EGFR in GCA and corresponding adjacent normal tissues were determined by immunohistochemistry, and their correlations were analyzed. **Results:** The positive expression rate of Syk in GCA tissues was 24.18%, which was significantly lower than that in the adjacent normal tissues (60.44%, $P < 0.01$). And the positive expression rates of c-erbB-2 and EGFR in GCA tissues were 56.04% and 58.24%, respectively, which were also higher than those in the adjacent normal tissues ($P < 0.01$). The expressions of Syk and c-erbB-2 were correlated with pathology grade, lymphatic metastasis and TNM stage of GCA, and EGFR expression was only correlated with lymphatic metastasis. The expression of Syk was correlated with those of c-erbB-2 and EGFR ($P < 0.05$), but Syk expression had no correlation with EGFR expression ($P > 0.05$). **Conclusion:** Syk, c-erbB-2 and EGFR are abnormally expressed in GCA, which may contribute to pathogenesis of GCA. The combined detection of Syk, c-erbB-2 and EGFR may have potential significance in prognosis prediction of GCA.

[Key words] gastric cardiac adenocarcinoma; tumor suppression gene; spleen tyrosine kinase; c-erbB-2; EGFR

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(5): 549-553]

[基金项目] 河北省科学技术研究与发展计划项目(No.072761223)。Project supported by the Science and Technology Research and Development Program of Hebei Province (No.072761223)

[作者简介] 杨植彬(1956-)男,河北省石家庄市人,主管技师,主要从事肿瘤病因及病理方面的研究,E-mail:zhibinyang@yahoo.cn

[通信作者] 董稚明(DONG Zhi-ming, corresponding author),E-mail:dongzhiming2000@yahoo.com.cn

消化道肿瘤是严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一。贲门癌过去在肿瘤登记中经常被当作食管癌或胃癌, 最近几年由于内镜筛查和病理诊断技术的进步已经被独立出来。流行病学调查表明, 20世纪80年代以来, 贲门腺癌的发病呈不断上升趋势^[1]。脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, Syk)基因在T细胞和B细胞的成熟和活化过程中起关键作用, 该基因的表达缺失会导致T、B淋巴细胞活化障碍, 失去对异常细胞的监测作用, 从而导致肿瘤的形成和浸润转移。c-erbB-2是癌基因HER2/neu编码的相对分子质量为185 000的蛋白, 该基因的扩增和过表达, 可使细胞增殖加快, 细胞周期加速, 恶性表现增强。有研究认为Syk与HER2/neu是一对功能相反的抑癌/原癌基因。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)属于I型受体酪氨酸激酶, 是原癌基因ErbB1(c-erbB-1, HER1)的表达产物。许多肿瘤上皮可高表达EGFR, 其与肿瘤进展、血管生成、转移扩散、凋亡受抑、放疗抵抗等密切相关。目前Syk的表达与肿瘤浸润转移的研究较多, 但Syk、c-erbB-2和EGFR三者结合, 检测其表达在贲门癌浸润转移中的作用, 国内外研究甚少。本研究应用免疫组化SP法检测贲门腺癌中Syk、c-erbB-2、EGFR的表达情况, 探讨三者的相互关系及与贲门腺癌的浸润、转移和分化程度之间的相关性, 以期对贲门腺癌的发病机制、基因治疗、免疫治疗和临床预后等方面提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 标本

收集河北医科大学第四医院胸外科2006年10月至2007年2月手术切除贲门腺癌标本91例, 患者术前未经任何抗癌治疗, 均有完整的临床病历资料。其中男78例、女13例, 年龄39岁~78岁, 中位年龄63岁。所有患者均签署知情同意书并报院伦理委员会批准。91例患者均取肿瘤组织原发灶及相应切缘外正常组织作为对照。术后立即取材, 经4%甲醛液固定, 石蜡包埋, 4 μm连续切片8张。1张常规H-E染色证实切缘外均为正常组织, 并确定了标本的组织学类型; 其余用于免疫组织化学染色。患者的临床病理资料见表1。

1.2 免疫组化检测 Syk、c-erbB-2、EGFR 的表达

用免疫组化SP法试剂盒(北京中杉金桥公司), 检测Syk、c-erbB-2、EGFR在贲门腺癌及相应正常黏膜中的表达情况。石蜡切片常规脱蜡, 梯度酒精水化。3%甲醇过氧化氢封闭后, 用pH8.5的

EDTA高压修复3 min, 羊血清封闭, 再依次加入一抗、二抗和三抗, DAB显色, 苏木精复染。以PBS代替一抗做空白对照。

1.3 免疫组化结果的判定

Syk的阳性染色定位于细胞质, 将细胞质内出现均匀一致的棕黄色颗粒定义为阳性细胞。c-erbB-2、EGFR阳性染色主要定位于细胞膜, 部分细胞胞质也有阳性表达, 将细胞膜及部分细胞质内出现均匀一致的棕黄色颗粒定义为阳性细胞。随机选取5个高倍视野(×400)计数肿瘤细胞总数和阳性细胞数, 得出阳性细胞百分率。当贲门腺癌组织中存在不同分化程度的区域时, 选择同一肿瘤组织切片中占优势分化程度的肿瘤区域进行计数统计。阳性细胞率≤25%记为0分, 26%~50%为1分, 51%~75%为2分, >75%为3分; 再按多数阳性细胞呈现的染色强度予以记分: 无显色为0分, 浅棕黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分。将上述两项得分相加: 0分判为“-”, 1~2分判为“+”, 3~4分判为“++”, 5~6分判为“+++”。将“-”为阴性表达, 将“+”“++”及“+++”为阳性表达。由3名临床病理医师阅片, 根据其评分的平均值确定判定结果。

1.4 统计学处理

采用SPSS10.0软件包, 应用采用 χ^2 检验、校正 χ^2 检验和Spearman等级相关分析各参数之间的差异和相关性。

2 结果

2.1 Syk在贲门腺癌及相应正常黏膜组织中的表达情况

镜下观察Syk蛋白高表达主要见于切缘正常组织, 癌组织呈低表达或不表达。91例贲门腺癌组织中, 有22例呈阳性表达, 阳性率为24.18%; 相应切缘正常组织中蛋白表达阳性率为60.44%(55/91), 明显高于癌组织, 且差异有统计学意义($\chi^2 = 24.514, P = 0.000$, 图1)。Syk蛋白在高中分化组中明显高于低分化组, 淋巴结转移阳性组中明显低于淋巴结转移阴性组, 在Ⅲ、Ⅳ肿瘤患者中Syk蛋白的阳性表达明显低于Ⅰ、Ⅱ期肿瘤患者, 且差异均有统计学意义(表1)。

2.2 c-erbB-2在贲门腺癌及相应正常黏膜组织中的表达

结果显示, 91例贲门腺癌组织中, c-erbB-2阳性表达51例, 阳性率为56.04%; 相应正常黏膜组织中, c-erbB-2阳性率为27.47%(25/91)。癌组织中的表达明显高于正常黏膜, 差异有统计学意义($\chi^2 =$

15.272, $P = 0.000$, 图 1)。c-erbB-2 蛋白在贲门腺癌组织中的表达与肿瘤患者的病理分级、淋巴结转移及 TNM 分期均相关($P < 0.01$, 表 1)。

2.3 EGFR 在贲门腺癌及相应正常组织中的表达

EGFR 在 91 例贲门腺癌组织中,有 53 例呈阳性表达,阳性率为 58.24%,明显高于相应正常黏膜组织(32.97%, 30/91),差异有统计学意义($\chi^2 = 11.717, P = 0.001$, 图 1)。在贲门腺癌组织中,EGFR 的表达仅与肿瘤患者的淋巴结转移相关($P < 0.01$),而与肿瘤组织的病理分级及 TNM 分期无关(表 1)。

表 1 贲门腺癌组织中 Syk、c-erbB-2 及 EGFR 的表达与临床病理参数的关系($n, \%$)

Tab.1 Correlation of Syk, c-erbB-2, EGFR expressions with clinicopathologic features of gastric cardiac adenocarcinoma tissues ($n, \%$)

Feature	N	Positive expression rate n		
		Syk	c-erbB-2	EGFR
Differentiation degree				
Well-moderate	56	19(33.93)**	16(28.57)**	31(55.36)
Poor	35	3(8.57)	35(100)	22(62.86)
TNM stage				
I - II	55	19(34.55)**	17(30.91)**	31(56.36)
III -IV	36	3(8.33)	34(94.44)	22(61.11)
Lymph node metastasis				
Negative	40	14(35.00)*	16(40.00)**	14(35.00)**
Positive	51	8(15.69)	35(68.63)	39(76.47)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs other groups

表 2 贲门腺癌组织中 Syk 和 c-erbB-2 表达的相关性(n)
Tab.2 Relationship of Syk with c-erbB-2 expression in gastric cardiac adenocarcinoma tissues (n)

Syk	c-erbB-2		χ^2	P
	+	-		
+	5	17	13.073	0.000
-	46	23		
Total	51	40		

2.4 Syk、c-erbB-2 和 EGFR 三者之间表达的相关性

在 Syk 表达阳性的 22 例贲门腺癌组织中,有 5 例 c-erbB-2 表达呈阳性,阳性率为 22.72%,明显低于 Syk 表达阴性组 66.67%(46/69),差异有统计学意义,提示两者具有相关性(表 2);同时,在 Syk 表达阳性组的贲门腺癌组织中,EGFR 表达阳性的阳性率低于 Syk 表达阴性组,但差异无统计学意义(表 3);在 c-erbB-2 表达阳性组中 EGFR 表达的阳性率为 68.62%,明显高于 c-erbB-2 表达阴性组(45.0%),差异有统计学意义,提示 c-erbB-2 与 EGFR 表达具有相关性(表 4)。

表 3 贲门腺癌组织中 Syk 和 EGFR 表达的相关性(n)
Tab.3 Relationship of Syk with EGFR expression in gastric cardiac adenocarcinoma tissues(n)

Syk	EGFR		χ^2	P
	+	-		
+	9	13	3.584	0.058
-	44	25		
Total	53	38		

表 4 贲门腺癌组织中 c-erbB-2 和 EGFR 表达的相关性(n)
Tab.4 Relationship of c-erbB-2 with EGFR expression in gastric cardiac adenocarcinoma tissues(n)

c-erbB-2	EGFR		χ^2	P
	+	-		
+	35	16	5.146	0.023
-	18	22		
Total	53	38		

3 讨论

贲门腺癌是胃癌的一种特殊类型,具有自己的解剖学组织学特性、临床表现以及独特的诊断和治疗方法。流行病学调查表明,其发病有不断上升趋势。由于贲门腺癌发病隐匿,患者初次就诊时大部分已属中晚期^[2],五年生存率较低,严重威胁着人类的健康。而其浸润和转移是导致患者死亡的主要原因。研究表明肿瘤的发生、转移是一个多种因素

共同参与的多步骤、多基因调控的复杂过程,涉及多种原癌基因的激活和抑癌基因的失活;与多种生长因子及其受体的调节失常有关。

Syk 是一种非受体型酪氨酸激酶,它首先是从猪脾 cDNA 文库中分离出来的,其编码基因为 Syk 基因,位于人类染色体 9q22 上,蛋白质分子量为 72 000。大量研究显示,Syk 的表达降低或缺失与肿瘤密切相关。夏建国等^[3]发现,胃癌邻近正常组织中 Syk 基因 mRNA 的表达率显著高于胃癌组织。Wang 等^[4]对国内人群的研究,进一步验证了 Syk 的这种表达特性。并且,关于肝癌^[5]和乳腺癌^[6]的研

究也得出了相同结果。本研究发现,正常黏膜组织中 Syk 的阳性表达率显著高于贲门腺癌组织,与以往研究一致。有研究^[7]表明 Syk 可能因为 DNA 甲基化等机制在分子水平上抑制其转录,从而使蛋白表达减低或缺失,诱发组织恶变。实验结果提示,Syk 的低表达或不表达很可能成为肿瘤形成的一个重要标志。另外,本研究发现,正常组织中 Syk 的阳性表达率较相关文献偏低,可能与标本的组织类型、数量及组成有关,免疫组化的评分标准不一也可能是造成这种差异的原因。

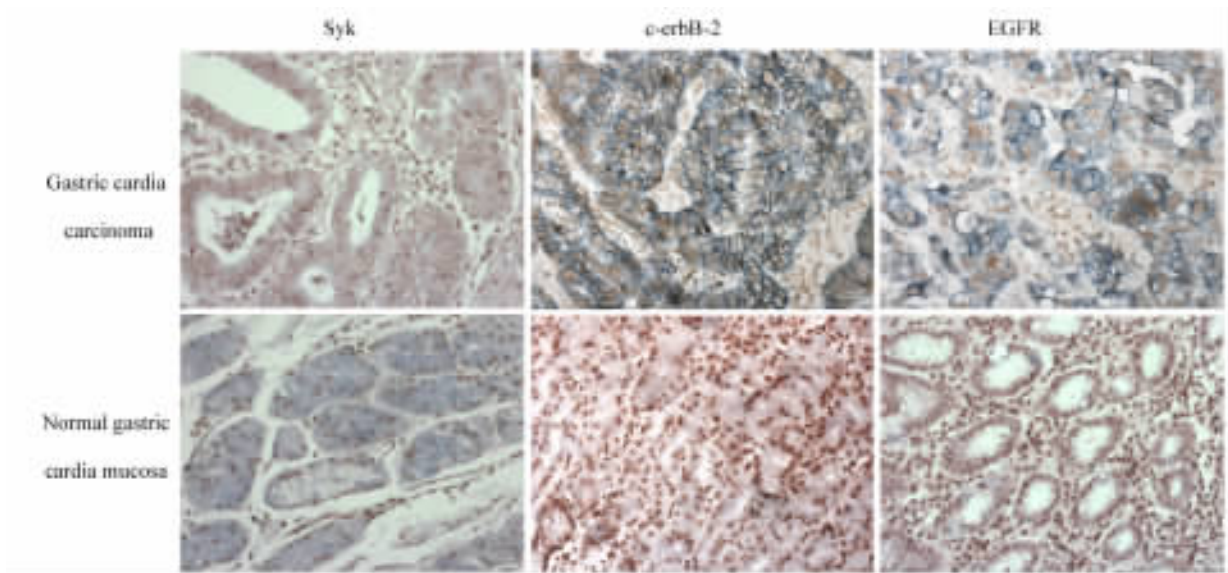


图1 Syk、c-erbB-2 和 EGFR 在贲门腺癌及正常贲门黏膜中的表达(×200)

Fig.1 Syk, c-erbB-2 and EGFR expressions in normal gastric cardiac mucosa and gastric cardiac adenocarcinoma (×200)

在口腔鳞状细胞癌及细胞株的研究^[7]中发现, Syk 的表达水平与肿瘤细胞的侵袭能力有关,同样在胃癌中,随着组织学分级的增高,Syk 阳性表达率依次减低^[8]。本研究结果显示,贲门腺癌中高中分化组 Syk 的表达率显著高于低分化组,与以往的研究一致。同时本研究结果显示,Syk 蛋白表达率与淋巴结转移相关,提示 Syk 的表达降低或缺失可能是引起贲门腺癌发生淋巴结转移的一个重要因素。

c-erbB-2 基因定位于人染色体 17q21,其基因产物为 c-erbB-2 蛋白,分子量为 185 000,属于生长因子受体家族一员。在多种恶性肿瘤中能够检测到 c-erbB-2 基因的过表达^[9]。本实验也发现癌组织中 c-erbB-2 的表达明显高于正常黏膜组织,支持以往研究结果。提示 c-erbB-2 在癌组织中的高表达可能与贲门腺癌的发生有关。并且随着组织学分级的增

高,c-erbB-2 的阳性表达率也随之增高。提示 c-erbB-2 表达水平增高很可能出现于组织的恶性演进过程中,是组织细胞恶变的标志。

EGFR 是原癌基因 c-erbB-1 的表达产物,为 c-erbB 家族中的一员,广泛分布于哺乳动物的上皮细胞膜。Chandrika 等^[10]研究发现 EGFR 在正常肺组织、癌前病变和肺癌组织中的表达是逐级升高的。在本研究中,EGFR 在切缘正常组织及癌组织中的表达也有逐渐增高的趋势,提示 EGFR 可作为组织癌变的分子标记物,对肿瘤的诊断和判断预后具有重要价值。

Nicholson 等^[11]在总结了从 1985 年至 2000 年 PubMed 收录的所有有关 EGFR 的文献后发现,有二百多个研究结果证实 EGFR 的表达水平与肿瘤患者的预后有关。然而,近期研究中,EGFR 高表达与分

化、转移、浸润深度是否相关仍存在很大分歧。本研究发现 EGFR 高表达与淋巴结转移相关,但未发现其与分化程度和浸润深度有关,推测 EGFR 高表达的肿瘤易发生转移,患者预后差,但 Locker^[12] 提出 EGFR 表达水平与组织学分级和淋巴结转移等无关。这种差异可能与样本种属不同、样本容量不等、EGFR 在不同肿瘤组织中的表达程度不一有关。

到目前为止,有关 Syk, c-erbB-2 及 EGFR 联合研究的报道较少。Syk 与 c-erbB-2 是一对功能相反的抑癌/癌基因,c-erbB-2 过度表达可以诱导血管内皮细胞收缩,使血管内皮细胞间隙增大,从而使肿瘤细胞易于穿过血管屏障发生转移;而 Syk 可以抑制 c-erbB-2 收缩血管内皮细胞的作用,从而抑制肿瘤的转移。本研究结果显示,Syk 与 c-erbB-2 两者表达呈显著负相关,从蛋白水平上验证了这一观点。EGFR 与 c-erbB-2 同属于表皮生长因子受体家族,其作用机理相似。Ruschel 等^[13] 发现,在细胞膜的某些部位 Syk 和 EGFR 呈共区域化现象,从而负反馈调节 Syk 的活性。同时,Syk 的表达下调可增强 EGFR 配体的活性,认为在 EGFR 信号传导过程中 Syk 起负向调节作用。本研究发现 Syk 与 EGFR 两者表达无相关性,但呈现出负向趋势。提示 Syk 和 EGFR 在肿瘤发生发展中发挥相反的作用。在恶性肿瘤发生机制的癌基因研究中,许多学者提出了基因协同作用假说,认为在恶性肿瘤发生发展和浸润转移过程的各个阶段,至少有两个或两个以上功能不同的原癌基因异常激活后导致癌变。本研究发现 c-erbB-2 和 EGFR 的表达均与淋巴结转移相关,两者的表达具有一致性,提示在贲门腺癌浸润转移中,二者可能具有协同作用。

本研究发现 Syk、c-erbB-2、EGFR 蛋白表达的改变在贲门腺癌发生、发展、浸润、转移中,分别起到了不同的和/或相互协同的作用,可为临床上联合检测上述参数进行肿瘤预防以及为肿瘤患者的治疗、预后提供分子标志物。

[参考文献]

[1] 郭艳丽,孙萍萍,郭 炜,杨植彬,邴 钢,董雅明. 贲门腺癌中 VEGF-C、VEGF-D 和 D2-40 的表达及意义 [J]. 临床与实验

病理学杂志, 2009, 25(1): 81-83.

- [2] 熊 刚,邱 阳,杨 康,李 军,廖克龙,王明荣,等. 1924 例食管癌和贲门癌的外科治疗经验 [J]. 重庆医学, 2008, 37(4): 342-344.
- [3] 夏建国,丁永斌,陈国玉. 胃癌候选抑癌基因 Syk 表达的意义 [J]. 世界华人消化杂志, 2004, 2(4): 767-769.
- [4] Wang S, Ding YB, Chen GY, Xia JG, Wu ZY. Hypermethylation of Syk gene in promoter region associated with oncogenesis and metastasis of gastric carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(12): 1815-1818.
- [5] Yuan Y, Wang J, Li J, Wang L, Li M, Yang Z, et al. Frequent epigenetic inactivation of Syk gene in human hepatocellular carcinoma: An independent prognostic marker [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(22): 6687-6695.
- [6] 王华毅,张兆祥,胡余昌,黎家华,王雅琴,刘宇飞. 乳腺癌和非癌组织中 Syk、survivin 和 Ki-67 的表达及其相关性 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2008, 24(2): 158-161.
- [7] Ogane S, Onda T, Takano N, Yajima T, Uchiyama T, Shibahara T. Spleen tyrosine kinase as a novel candidate tumor suppressor gene for human oral squamous cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2009, 124(11): 2651-2657.
- [8] 袁士龙,郭春良,焦 辉,李端阳,冯爱民,丁永斌. Syk 与胃癌生物学行为的相关性研究 [J]. 武警医学院学报, 2007, 16(5): 514-517.
- [9] Hsu C, Huang CL. HER-2/neu overexpression is rare in hepatocellular carcinoma and not predictive of anti-HER-2/neu regulation of cell growth and chemo-sensitivity [J]. Cancer, 2002, 94(2): 415-420.
- [10] Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Weiss H, Bell WC, Heimbürger DC. Differential expression of growth factors in squamous cell carcinoma and precancerous lesions of the lung [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(3): 734-744.
- [11] Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis [J]. Eur J Cancer, 2001, 37(4): 9-15.
- [12] Lewis S, Locker A, Todd JH, Bell JA, Nicholson R, Elston CW, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in breast carcinoma [J]. J Clin Pathol, 1990, 43(5): 385-389.
- [13] Ruschel A, Ullrich A. Protein tyrosine kinase Syk modulates EGFR signalling in human mammary epithelial cells [J]. Cell Signal, 2004, 16(11): 1249-1261.

[收稿日期] 2010-06-28

[修回日期] 2010-08-14

[本文编辑] 韩 丹

欢迎登陆我刊网站 www.biother.org