

基于数据挖掘及免疫组织化学技术分析 EPHA5 在肺腺癌中的表达

李杰, 王兰

(江苏大学江阴临床医学院, 江阴市人民医院呼吸与危重症医学科, 江苏 江阴 214400)

[摘要] **目的** 探索促红细胞生成素产生型人肝细胞受体 A5 (erythropoietin-producing hepatocellular receptor A5, EPHA5) 在肺腺癌中的表达。**方法** 通过网络数据库获得 EPHA5 在不同肿瘤中的变异情况, 构建 EPHA5 蛋白互作网络图, 分析 EPHA5 在肺腺癌中的预后情况。收集肺腺癌患者的手术标本及临床资料, 采用免疫组织化学方法检测 EPHA5 的表达情况, 分析肺腺癌中 EPHA5 表达与患者临床特征的相关性。**结果** EPHA5 在肺腺癌中的突变频率最高, 以错义突变为为主。除 EPH 家族的配体之外, EPHA5 与 RhoA、ADAM10 蛋白密切相关。EPHA5 的高表达与肺腺癌患者的总生存时间和首次进展时间相关。EPHA5 在肺腺癌组织中表达上调, 与患者淋巴结转移、分化程度、TNM 分期显著相关。**结论** EPHA5 在肺腺癌组织中高表达, 可以作为预测肺腺癌预后的一个因素。

[关键词] 肺腺癌; 免疫组织化学; 数据挖掘 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2024.02.016

[中图分类号] R734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2024)02-0215-06

Analysis of the expression of EPHA5 in lung adenocarcinoma based on data mining and immunohistochemistry

LI Jie, WANG Lan

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Jiangyin Clinical Medical College of Jiangsu University/Jiangyin People's Hospital, Jiangsu Province, Jiangyin 214400, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of erythropoietin-producing hepatocellular receptor A5 (EPHA5) in lung adenocarcinoma. **Methods** The variation of EPHA5 in different tumors was obtained through the network database, and the EPHA5 protein interaction network diagram was constructed to analyze the prognosis of EPHA5 in lung adenocarcinoma. The surgical specimens and clinical data of patients with lung adenocarcinoma were collected. The expression of EPHA5 was detected by immunohistochemistry, and the correlation between EPHA5 expression in lung adenocarcinoma and clinical characteristics of patients was analyzed. **Results** EPHA5 has the highest mutation frequency in lung adenocarcinoma, mainly missense mutations. In addition to the ligands of EPH family, EPHA5 was closely related to RhoA and ADAM10 proteins. High expression of EPHA5 was associated with overall survival and time to first progression in patients with lung adenocarcinoma. EPHA5 expression was up-regulated in lung adenocarcinoma tissues, which was significantly correlated with lymph node metastasis, differentiation degree and TNM stage. **Conclusion** EPHA5 is

[收稿日期] 2022-12-09

[基金项目] 国家自然科学基金(82000012); 江苏大学 2021 年度临床医学科技发展基金(JLY2021075); 中华国际医学交流基金会项目(Z-2014-08-2209)

[作者简介] 李杰(1986-), 男, 江苏江阴人, 江苏大学江阴临床医学院副主任医师, 医学博士, 从事肺癌诊治研究。

highly expressed in lung adenocarcinoma tissues, which can be used as a prognostic factor for lung adenocarcinoma.

[Key words] lung adenocarcinoma; immunohistochemistry; data mining

肺癌是当今全球发病及致死率第一的肿瘤^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)在肺癌中所占的比例最高,达到了85%,多数的NSCLC患者就诊时已发生转移,并没有手术机会^[2]。在NSCLC当中以肺腺癌最多见,目前在肺腺癌治疗方面取得重大进展的是第一是靶向治疗领域,驱动基因的发现改善了患者的预后^[3]。第二是免疫治疗领域,免疫检查点抑制剂迅速成为了肺腺癌患者的新的治疗选择。因此,探索肺腺癌发生发展过程中的分子生物学事件和机制,对于肺腺癌的早期诊断、预后判断和干预治疗具有重要的意义。促红细胞生成素产生型人肝细胞(erythropoietin-producing hepatocellular receptor, EPH)受体是目前发现的人类受体酪氨酸激酶家族中最大的亚群,与恶性肿瘤的发生、发展密切相关^[4-5]。根据序列相似性、结构与配体结合亲和力的不同,EPH受体分为EPHA和EPHB两个亚族^[6]。EPHA5是EPHA受体家族的一员,位于4q13.1染色体上,既是EPH家族成员之一,又是人原癌基因RET的融合伴侣成员^[7]。关于其在肺癌中的研究较少。本研究通过网络数据库及免疫组织化学分析EPHA5与肺腺癌的关系,为进一步研究建立基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2018年1—12月在我院胸外科行手术确诊为肺腺癌的患者93例。其中男性39例,女性54例,年龄28~78岁,所有患者手术之前均未行化疗、放疗、靶向治疗及免疫治疗,肺癌的分期与世界卫生组织的相一致。

本研究获得江阴市人民医院伦理委员会的批准。

1.2 资料收集方法 首先登录网站<http://www.cbioportal.org/>,选择肿瘤类型为:lung,搜索到其中最大的肺腺癌数据库一共含有586例样本。选定该数据库后,在研究基因的方框里输入:EPHA5,确认后即可获得相关数据。登录网站<https://string-db.org/>,输入要检索的基因:EPHA5,按下确定后即可到处蛋白互作网络图。再登录网站<http://kmplot.com/>,选择肿瘤类型:lung cancer。在之后出现的界面中输入检索基因:EPHA5。在Survival栏目中分别选择“OS”及“FP”项目,在Histology栏

目选择:“adenocarcinoma”,点击“Draw Kaplan-Meier plot”即可得到检索结果。

免疫组织化学试验材料:EPHA5抗体、二甲苯、不同浓度梯度的无水乙醇、枸橼酸钠缓冲液、PBS缓冲液、DAB显色试剂、苏木素试剂等。主要仪器:冰箱、切片机、烤箱、光学显微镜、移液器、恒温箱、医用微波炉等。

1.3 免疫组织化学实验方法

1.3.1 制备蜡块标本 收集患者肺癌组织固定在10%福尔马林中进行石蜡包埋,制备蜡块标本,以3 μm厚度切片。组织样本的收集和使用符合江阴市人民医院伦理委员会的相关规定。

1.3.2 烤片 将制作好的切片置于不锈钢载玻片染色架上,放在68℃的烤箱中烘烤60 min。

1.3.3 脱蜡 将切片从烤箱取出,放入二甲苯中进行脱蜡,先放入装有二甲苯I号的染缸中浸泡10 min,再放入装有二甲苯II号的染缸中浸泡10 min。

1.3.4 水化 依次逐级放入各浓度乙醇水化:无水乙醇5 min,95%乙醇5 min,80%乙醇5 min,75%乙醇5 min,50%乙醇5 min,然后把组织切片放入纯水中孵育5 min。

1.3.5 抗原修复 滴加3%过氧化氢溶液于切片组织上,确保其充分覆盖组织,湿盒孵育10 min。用PBS浸泡清洗3次,5 min/次,尽可能洗去残留的过氧化氢。

1.3.6 一抗孵育 滴加一抗,室温孵育1 h。PBS冲洗3次,2 min/次。

1.3.7 二抗孵育 滴加通用型IgG抗体(Fab段)-HRP多聚体,室温孵育15 min, PBS冲洗3次,2 min/次。

1.3.8 DAB显色 去除切片上多余的PBS,配制DAB显色液,从PBS溶液中取出切片,向组织上滴加约50 μL,确保其充分覆盖组织,将切片置于显微镜下观察颜色控制染色时间大约5 min,染色合适即可置于PBS溶液中终止染色。PBS溶液重复清洗3次,5 min/次。去除残留的液体。

1.3.9 苏木素复染 染色缸内倒入苏木素,将染色架置入,保证切片完全没入苏木素中,复染2~5 min(细胞核变蓝色即可终止),放蒸馏水冲洗,至水变清蓝色消失。之后用酒精分化5 s,再次进行水

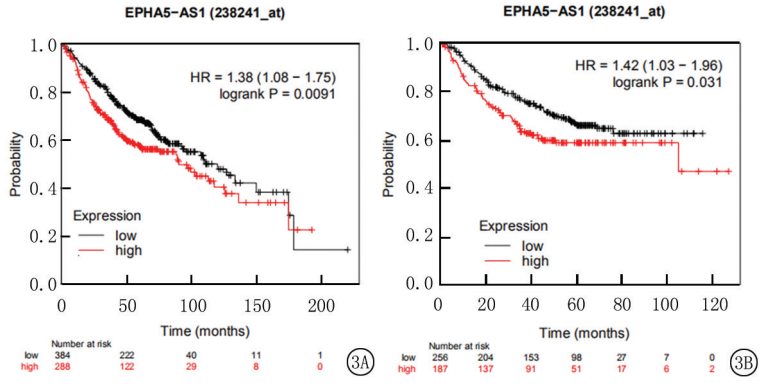
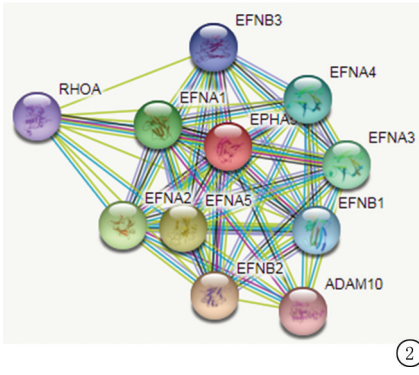


图2 EPHA5 蛋白互作网络图

Figure 2 EPHA5 protein interaction network

图3 KMplot 预后分析

A. EPHA5 mRNA 表达与 OS(Overall survival, 总生存时间)关系; B. EPHA5 mRNA 表达与 FP(First progression, 首次进展时间)关系

Figure 3 KMplot prognosis analysis

2.4 EPHA5 表达与患者临床资料的相关性分析

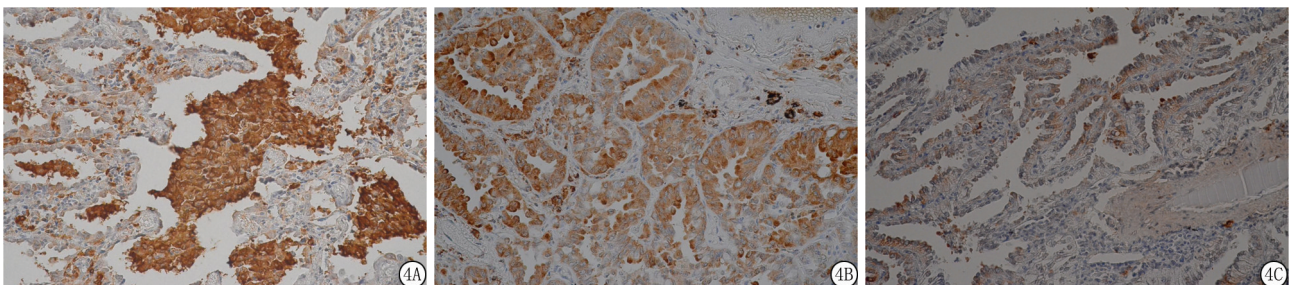
93 例肺腺癌患者中 EPHA5 基因高表达者共 54 例, 低表达者共 39 例, 高表达率为 58.1%。肺腺癌患者的性别、年龄、肿瘤大小与 EPHA5 表达无相关性(P>0.05), 淋巴结转移(P=0.003)、分化程度(P=0.020)、TNM 分期(P=0.002)与 EPHA5 表达水平显著相关。见表 1。

表 1 EPHA5 表达与患者临床资料的相关性

Table 1 Correlation between EPHA5 expression and clinical data of patients

指标	例数	EPHA5 低表达	EPHA5 高表达	χ^2 值	P 值
性别					
男性	39	18	21	0.494	0.484
女性	54	21	33		
年龄(岁)					
<55	33	17	16	1.932	0.165
≥55	60	22	38		
分化					
差	15	2	13	7.817	0.020
中等	60	26	34		
好	18	11	7		
淋巴结转移					
无	54	30	24	9.314	0.002
有	39	9	30		
肿瘤大小					
T1	50	24	26	2.303	0.317
T2	31	12	19		
TNM 分期					
I	54	29	25	12.230	0.002
II	33	6	27		

2.5 免疫组织化学图片 通过免疫组织化学方法检测了 EPHA5 在 93 例肺腺癌患者组织标本当中的表达情况, 下面为具有代表性的免疫组织化学图片(图 4)。



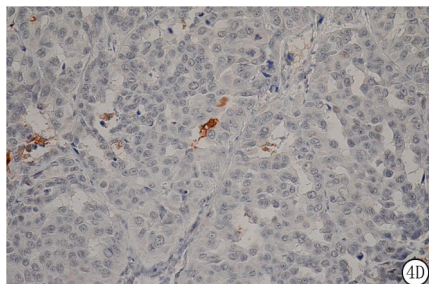


图4 代表性免疫组化图(×400)

A. EPHA5 强染色; B. EPHA5 中度染色; C. EPHA5 弱染色; D. EPHA5 阴性染色

Figure 4 Representative immunohistochemical diagram(×400)

3 讨 论

医学科学的发展已经进入大数据信息化时代,生信分析能从大量医学数据中检索并挖掘到隐藏其中的有效信息,为实验设计寻求依据,为研究开展找出可行的路径。cBioPortal 数据库可用于多个癌症基因组学数据集的交互式探索,能够快速、直观、高质量地获取大规模癌症基因组学项目的分子谱和与临床预后的相关性。在 cBioPortal 数据库中检索到 EPHA5 在肺腺癌中突变最高,以错义突变为主,为进一步研究提供了基础。String 数据库主要用于检索已知蛋白质和预测未知蛋白质之间相互作用,既包括蛋白质之间的直接相互作用,也包括蛋白质之间的间接功能相关性^[8]。本研究检索到除了 EPH 自身家族的配体之外, RhoA 是与 EPHA5 关系密切的基因。其是小分子 G 蛋白 Rho 家族成员之一,主要参与细胞骨架组装、细胞分裂、细胞黏附等多种细胞功能调节。RhoA 在 NSCLC 中过表达,与肿瘤分化、TNM 分期、淋巴转移和预后不良相关^[9]。ADAM10 是我们搜索到的另一个与 EPHA5 关系密切的基因,是人体产生的 22 种 ADAM 蛋白酶之一,其可加工肿瘤相关底物,被确定为加工各种底物(例如 Notch1 蛋白)的胞外域中的关键蛋白酶,在 NSCLC 组织中,特别在转移的肿瘤组织中 ADAM10 表达显著增加,其通过激活 Notch1 信号通路促进 NSCLC 细胞迁移和侵袭;而下调 ADAM10 表达可减少 NSCLC 细胞的迁移和侵袭^[10]。KM plotter 数据库是进行生存分析最具权威及数据最全的数据库,数据类型有芯片数据、高通量测序数据,涉及 mRNA 和 miRNA,且数据在不断更新,可进行在线生存分析。本研究检索该库发现, EPHA5 高表达的肺腺癌患者总生存时间以及首次进展时间均缩短,提示 EPHA5 是提示肺腺癌患者预后差的一个指标,对肺癌的 EPHA5 基因进行研究是有临床意义的。

本研究对 93 例有临床基本信息且手术前未做过放化疗的肺腺癌患者的肿瘤组织样本进行了 EPHA5 蛋白表达的免疫组化分析。结果显示其中

有 54 例高表达 EPHA5, 39 例低表达或者阴性表达,高表达患者占 58.1%。这与 Giaginis 等^[11]的研究结果相一致。当时他们的研究结果显示, 56 例腺癌中共有 35 例 EPHA5 高表达, 占 62.5%。本研究还发现, EPHA5 表达与患者年龄, 性别等无明显相关性, 而与癌细胞分化程度, 淋巴结转移状态, TMN 分期相关。因为患者术后的时间并不长, 生存期数据还无法全部获得。但是根据免疫组化实验中发现的 EPHA5 高表达的肺腺癌患者更容易具备癌细胞分化差, 淋巴结转移等情况, 可以预测其与较差的患者预后相关。EPHA5 基因在肺腺癌组织当中过表达, EPHA5 表达水平与淋巴结转移、分化程度以及 TNM 分期有关, 提示 EPHA5 高表达可能增强了肺腺癌的侵袭能力, 预示着更差的预后。

多个研究证实 EPHA5 参与到结肠癌、卵巢浆液性癌、前列腺癌、乳腺癌、食管鳞癌等多种恶性肿瘤的发生发展中^[12-14]。而在既往关于 EPHA5 与肺癌的研究中, Giaginis 等^[11]检测了 88 例 NSCLC 患者肿瘤组织中 EPHA5 的表达情况, 共有 51 例(58.0%)高表达, 其中在 56 例肺腺癌标本中共有 35 例(62.5%)高表达。EPHA5 的表达与 NSCLC 细胞增殖能力呈正相关。Staquicini 等^[15]发现在 NSCLC 细胞系的 NCI-H460、NCI-H1299 及 NCI-H522 细胞中均有 EPHA5 mRNA 及蛋白的高表达, EPHA5 具有调节细胞的基因毒性损伤反应的作用。Zhang 等^[16]发现, 在 NSCLC 细胞上过表达野生型 EPHA5 及沉默 EPHA5 基因则均表现为抑癌效应, 但 EPHA5 基因突变则可促进 NSCLC 细胞的迁移和侵袭, 显著降低 NK 细胞对 NSCLC 细胞的细胞毒性。临床研究还发现, 与无 EPHA5 突变的 NSCLC 患者相比, EPHA5 突变患者接受 PD-1 单抗治疗的效果更差^[17]。但对于 EPHA5 在肺癌中的机制目前仍不甚明了。本研究结果表明 EPHA5 在肺腺癌组织中高表达, 可以作为预测肺腺癌预后的一个因素, 为进一步在细胞及动物水平阐明 EPHA5 与肺腺癌的关系以及相关的分子机制提供了基础。

[参考文献]

- [1] 梁铎,刘梦雯,张丽,等.全球部分地区肺癌发病趋势及年龄变化情况分析[J].中国肿瘤,2020,31(9):683-692.
- [2] 杨燕珍,李玉付,何伟,等.细胞焦亡在非小细胞肺癌发生发展和治疗预后中作用及机制的研究进展[J].现代肿瘤医学,2020,30(23):4396-4401.
- [3] 杨亚冰,陈俊以,佟巍,等.非小细胞肺癌靶向治疗耐药及对策的研究进展[J].癌症进展,2020,18(16):1625-1627.
- [4] 王雷,李婧怡,李幸,等.晚期非小细胞肺癌免疫检查点抑制剂治疗专家共识解读[J].河北医科大学学报,2020,41(1):1-6.
- [5] 胡耀华,赵菊梅,师长宏.动物模型在 Eph 家族蛋白功能研究中的应用[J].实验动物与比较医学,2022,42(4):351-357.
- [6] 董伟钊,刘伟,胡国信.促红细胞生成素产生肝细胞受体在肝纤维化、肝癌发病机制中的作用[J].临床肝胆病杂志,2021,37(11):2663-2666.
- [7] Velcheti V, Madison R, Ali SM, et al. FRMD4A/RET: A Novel RET oncogenic fusion variant in non-small cell lung carcinoma[J]. J Thorac Oncol, 2018, 13(7): e122-e123.
- [8] Szklarczyk D, J Morris JH, Cook H et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D362-D368.
- [9] Zhang D, Zhang JY, Dai SD, et al. Co-expression of delta-catenin and RhoA is significantly associated with a malignant lung cancer phenotype[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(7): 3724-3732.
- [10] Guo J, He L, Yuan P. ADAM10 overexpression in human non-small cell lung cancer correlates with cell migration and invasion through the activation of the Notch1 signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2012, 28(5): 1709-1718.
- [11] Giaginis C, Tsoukalas N, Bournakis E, et al. Ephrin (Eph) receptor A1, A4, A5 and A7 expression in human non-small cell lung carcinoma: associations with clinicopathological parameters, tumor proliferative capacity and patients' survival [J]. BMC Clin Pathol, 2014, 14(1): 8.
- [12] Gu S, Feng J, Jin Q, et al. Reduced expression of EphA5 is associated with lymph node metastasis, advanced TNM stage, and poor prognosis in colorectal carcinoma [J]. Histol Histopathol, 2017, 32(5): 491-497.
- [13] Li Y, Chu J, Feng W, et al. EPHA5 mediates trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancers through regulating cancer stem cell-like properties [J]. FASEBJ, 2019, 33(4): 4851-4865.
- [14] Zhang R, Liu J, Zhang W, et al. EphA5 knockdown enhances the invasion and migration ability of esophageal squamous cell carcinoma via epithelial-mesenchymal transition through activating Wnt/ β -catenin Pathway [J]. Cancer Cell Int, 2020, 20: 20.
- [15] Staquicini FI, Qian MD, Salameh A, et al. Receptor tyrosine kinase EPHA5 is a functional molecular target in human lung cancer [J]. J Biol Chem, 2015, 290(12): 7345-7359.
- [16] Zhang J, Zhang Z, Song W, et al. EPHA5 mutation impairs natural killer cell-mediated cytotoxicity against non-small lung cancer cells and promotes cancer cell migration and invasion [J]. Mol Cell Probes, 2020, 52: 101566.
- [17] Wang H, Shan Q, Guo J, et al. PDL1 high expression without TP53, KEAP1 and EPHA5 mutations could better predict survival for patients with NSCLC receiving atezolizumab [J]. Lung Cancer, 2021, 151: 76-83.

(本文编辑:刘斯静)