

食管鳞癌中 CD151、ERK1/2 及血管生成拟态的表达及临床意义

刘 玉¹, 王子安²

(1. 蚌埠医学院, 安徽 蚌埠 233030; 2. 蚌埠医学院第一附属医院, 安徽 蚌埠 233004)

摘要: [目的] 研究组织分化抗原 151 (CD151) 及细胞外调节蛋白激酶 1/2 (ERK1/2) 在食管鳞状细胞癌 (ESCC) 中的表达情况, 分析两者表达与血管生成拟态 (VM) 的相关性。[方法] 选取 100 例存档石蜡包埋 ESCC 组织标本作为观察组和 50 例癌旁 (≥ 5 cm) 正常食管组织作为对照组, 采用免疫组织化学 ElivisionTM plus 法检测 ESCC 中 CD151 及 ERK1/2 的表达, 运用 CD34/PAS 双染检测食管癌中 VM 存在情况; 并用 Kaplan-Meier 法分析 VM 与预后的关系。[结果] 观察组 CD151 (82%)、ERK1/2 (75%) 蛋白阳性表达率及 VM 存在率 (29%) 均明显高于对照组 (10%、36%、8%) (P 均 < 0.05)。CD151 蛋白表达与 ESCC 的浸润深度、淋巴结转移、临床分期、分化程度有关 (P 均 < 0.05); ERK1/2 蛋白表达与 ESCC 的淋巴结转移、临床分期、分化程度有关 (P 均 < 0.05); ERK1/2 在 CD151 阳性组的表达明显高于 CD151 阴性组, 且两者表达呈正相关 ($r=0.451, P<0.001$); CD151 和 ERK1/2 表达均与 VM 存在呈正相关 ($r=0.299, P=0.002; r=0.318, P=0.001$)。Kaplan-Meier 生存分析显示有 VM 组与无 VM 组 5 年生存率分别为 10.3% 和 50.7% ($P<0.05$)。Cox 多因素回归分析显示: 浸润深度、临床分期、VM 存在是食管鳞癌患者术后 5 年生存率的独立影响因素 (P 均 < 0.05)。[结论] CD151、ERK1/2 在食管鳞癌的发生及发展中具有重要作用, 可能通过 VM 的形成, 影响食管鳞癌的发生发展、转移及预后。**关键词:** 食管鳞状细胞癌; 组织分化抗原 151; 细胞外调节蛋白激酶 1/2; 血管生成拟态; 预后
中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X (2019) 04-0330-05
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.04.B009

Expression of CD151 and ERK1/2 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Their Correlation with Vasculogenic Mimicry

LIU Yu¹, WANG Zi-an²

(1. Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China;

2. The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233034, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of tissue differentiation antigen 151 (CD151) and extracellular regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), and to analyze the their correlation with vasculogenic mimicry (VM). [Methods] One hundred samples of paraffin-embedded ESCC tissue and 50 samples of normal esophageal tissues were collected. The expression of CD151 and ERK1/2 in ESCC was detected by ElivisionTM plus method. The VM in esophageal cancer was detected by CD34/PAS double staining. The relationship between VM and prognosis was analyzed by Kaplan-Meier method. [Results] The positive rate of CD151 (82%), ERK1/2 (75%) and the present rate of VM (29%) in the ESCC group were significantly higher than those in the control group (10%, 36%, 8%; all $P<0.05$). The expression of CD151 protein was correlated with the depth of invasion, lymph node metastasis, clinical stage and degree of differentiation of ESCC (all $P<0.05$). The expression of ERK1/2 protein was correlated with lymph node metastasis, clinical stage and differentiation of ESCC (all $P<0.05$). The expression of ERK1/2 was positively correlated with the expression of CD151 in ESCC ($r=0.451, P<0.001$); the expression of CD151 and ERK1/2 was positively correlated with VM ($r=0.299, P=0.002; r=0.318, P=0.001$). Kaplan-Meier survival curve showed that the 5-years survival rate of VM group and non-VM group was 10.3% and 50.7%, respectively ($P<0.05$). Cox multivariate regression analysis demonstrated that the depth of invasion, clinical stage and VM were the independent factors of the 5-years survival ($P<0.05$). [Conclusion] The expression of CD151 and ERK1/2 are upregulated in ESCC, which may affect the development, metastasis and prognosis of ESCC through VM formation.
Subject words: ESCC; CD151; ERK1/2; VM; prognosis

通信作者: 王子安, 主任医师, 副教授, 硕士生导师, 硕士; 蚌埠医学院第一附属医院肿瘤内科, 安徽省蚌埠市龙子湖区长淮路 287 号 (233004); E-mail: wangzian118@sina.com
收稿日期: 2018-06-22; **修回日期:** 2018-07-27

食管癌(ESCC)是常见的消化道恶性肿瘤,以食管鳞癌(ESCC)为主^[1]。CD151 作为四跨膜蛋白(TM4SF)家族之一,通过与 $\alpha 6\beta 1$ 、 $\alpha 3\beta 1$ 等整合素家族(integrin family)及基质金属蛋白酶家族(MMPs)等结合,能促进肿瘤血管内皮细胞迁移和微血管增生,是与肿瘤侵袭转移相关最为密切的 TM4SF^[2]。ERK1/2 是丝裂原活化蛋白激酶家族(MAPKs)成员之一,可被生长因子、细胞因子等外界因素激活^[3];ERK1/2 通路参与细胞的分裂、分化及凋亡,与多种肿瘤的发生有关^[4]。血管生成拟态(VM)是一种新近发现的肿瘤微循环血管,与肿瘤的微循环相连^[5]。有研究表明^[6],VM 为恶性肿瘤提供充足的血供及扩散途径,并且有多个信号通路能参与 VM 的形成,在肿瘤的生长、预后中起着重要作用。本研究就 ESCC 中 CD115、ERK1/2 及 VM 的表达进行分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2012 年 1 月至 2012 年 6 月期间蚌埠医学院第一附属医院病理科 100 例存档石蜡包埋 ESCC 组织标本作为观察组和 50 例癌旁($\geq 5\text{cm}$)正常食管组织作为对照组。所有患者均全符合以下标准:(1)具有完整的临床资料;(2)术前未实施化疗、放疗、激素类药物和靶向药物治疗;(3)均为第一次手术且术后均由 2 位长期从事病理诊断的高年资医师确诊为 ESCC,随访至患者死亡或截止 2017 年 6 月 30 日。采用门诊、电话、信函和到家随访相结合的方式,随访 25~60 个月,中位随访 33 个月。ESCC 术后 1 年内每 3 个月随访 1 次,术后 1~3 年每 6 个月随访 1 次,术后 3 年后每 1 年随访 1 次。总计失访共 6 例,失访比例为 6%。观察组中男性 76 例,女性 24 例;年龄 44~78 岁,平均年龄 62.5 岁;病理学分级分类: G_1 为高分化,共 23 例, G_2 为中分化,共 59 例, G_3 为低分化,共 18 例;侵及黏膜层及浅肌层 38 例,侵及深肌层及外膜 62 例;有淋巴结转移 48 例,无淋巴结转移 52 例;TNM 临床分期:I~II 期 54 例,III~IV 期 46 例。

1.2 实验试剂

鼠抗人 CD151 单克隆抗体(克隆号:66567-1-Ig)及兔抗人 ERK1/2 单克隆抗体(克隆号:Abp51298)均购自 Abbkine 公司,鼠抗人 CD34 单克

隆抗体(产品编号:MAB-0034,克隆号:QBEnd/10)、Elivision™ plus 试剂盒以及 DAB 显色试剂盒均购自福州迈新生物技术开发公司。PAS 染色液由蚌埠医学院第一附属医院病理科配制。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组织化学 Elivision™ plus 法。

石蜡标本以 $4\mu\text{m}$ 厚连续切片并烤干,在二甲苯溶液及不同浓度的乙醇中脱蜡至水洗。按试剂盒说明书上步骤进行免疫组化染色。以已知阳性片作阳性对照,PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3.2 CD34 和 PAS 套染

标本经 CD34 染色,DAB 显色后,以流水冲洗 1min 终止显色反应,再在 0.5%高碘酸溶液中氧化 10min。流水冲洗 2min 后置于 Schiff 液中染色 15~30min,然后蒸馏水冲洗 3 次,1min/次,蒸馏水冲洗 3~5min;此后依次苏木素浅染细胞核、盐酸酒精分化、返蓝、脱水透明以及中性树胶封片。

1.4 结果判定

1.4.1 免疫组化结果判定

CD151 以细胞膜出现棕黄色颗粒为阳性;ERK1/2 以细胞核或细胞质有棕黄色细颗粒为阳性。采取二次计分法:每例标本随机计数 5 个高倍视野,计数每个高倍视野中阳性细胞所占百分比及强度,结果取平均值;评价标准:(1)染色强度计分:0 分为无色,1 分为淡黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色。(2)阳性细胞百分比计分:0 分为 $<10\%$,1 分为 $10\%\sim 50\%$,2 分为 $50\%\sim 75\%$,3 分为 $>75\%$;两者乘积作为判断结果, <3 分为阴性, ≥ 3 分为阳性。

1.4.2 CD34 和 PAS 套染结果判定

CD34/PAS 套染后显微镜观察到由肿瘤细胞构成的管腔样结构,且管壁见不到内皮细胞、腔内可见红细胞或无红细胞但管壁全部或部分 PAS(+)、免疫组化 CD34(-)的均可判定为 VM;不论管腔内有无红细胞,管壁出现 CD34(+)的血管,均判定为内皮依赖性血管。

以上结果均由 2 位病理医生对免疫组化及 CD34/PAS 套染结果进行判定。

1.5 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件进行统计学分析。在 ESCC 组织中,CD151、ERK1/2、VM 在观察组及对照组中的表达、与临床病理学特征及三者之间的相关性采用 χ^2 和 Spearman 相关性分析,生存分析采用 Kaplan-Meier 法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组 CD151、ERK1/2 及 VM 表达比较

100 例 ESCC 中 CD151 阳性 82 例(82%),CD151 阴性 18 例(18%);ERK1/2 阳性 75 例(75%),ERK1/2 阴性 25 例(25%)。观察组 CD151、ERK1/2 蛋白阳性表达率及 VM 存在率(29%)明显高于对照组(见 Table 1)。CD151、ERK1/2 及 VM 在 ESCC 及癌旁组织中的表达见 Figure 1。

2.2 CD151 及 ERK1/2 表达与 ESCC 临床病理特征的关系

CD151 阳性表达在不同年龄组和性别组差异无统计学意义(P 均 >0.05),但在不同浸润深度、淋巴结转移、临床分期、分化程度组差异均有统计学意义(P 均 <0.05);ERK1/2 阳性表达在不同年龄、性别及浸润深度组差异无统计学意义(P 均 >0.05),但在不同淋巴结转移、临床分期、分化程度组差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。见 Table 2。

2.3 ESCC 中 CD151 与 ERK1/2 表达的关系

CD151 阳性病例中,ERK1/2 阳性率为 84.1%;CD151 阴性病例中,ERK1/2 阳性率为 33.3%。Spearman 相关分析显示,CD151 与 ERK1/2 在 ESCC 中的表达呈正相关($r=0.451,P<0.001$)。见 Table 3。

2.4 ESCC 中 CD151、ERK1/2 表达与 VM 的关系

有 VM 组和无 VM 组的 CD151 阳性表达率分别为 100%和 74.6%,Spearman 相关分析显示两者呈正相关($r=0.299,P=0.002$)。有 VM 组和无 VM 组的 ERK1/2 阳性表达率分别为 96.6%和 66.2%,Spearman 相关分析显示两者呈正相关 ($r=0.318,P=0.001$)。见 Table 4。

2.5 生存分析

全组病例总的 5 年生存率为 39.0%。Kaplan-Meier 生存分析显示有 VM 组 5 年生存率为 10.3%,无 VM 组 5 年生存率为 50.7%,差异有统计学意义($P<0.001$)(Figure 2)。将 Table 2 中有统计学意义的因素进行 Cox 多因素回归分析,结果显示:浸润深

Table 1 The expression of CD151,ERK1/2 and VM in observation group and control group

Groups	n	CD151				ERK1/2				VM			
		Positive	Negative	χ^2	P	Positive	Negative	χ^2	P	Positive	Negative	χ^2	P
Observation group	100	82	18	70.936	<0.001	75	25	21.520	<0.001	29	71	8.566	0.003
Control group	50	5	45			18	32			4	46		

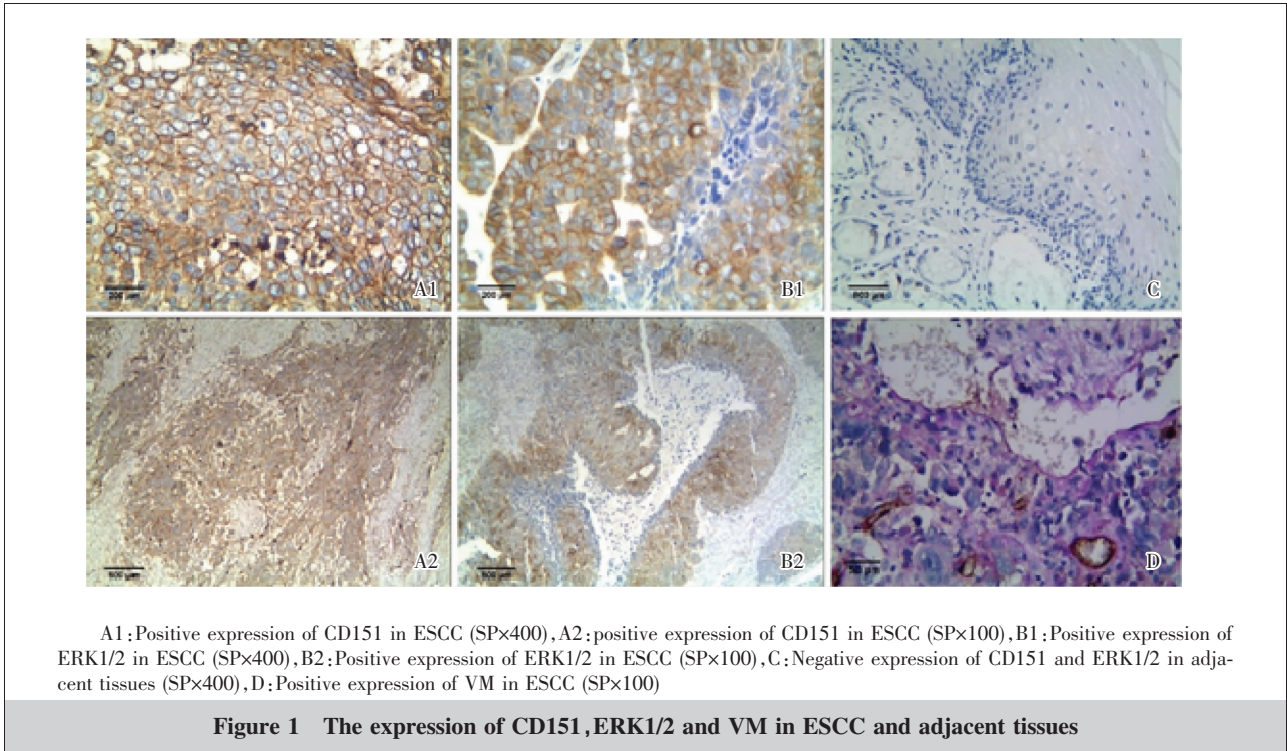


Table 2 Relationship of the expression of CD151 and ERK1/2 with clinicopathological features in ESCC

Index	n	CD151			ERK1/2		
		Positive	χ^2	P	Positive	χ^2	P
Gender							
Male	76	61(80.3)	0.647	0.421	57(75.0)	0.000	1.000
Female	24	21(87.5)			18(75.0)		
Age (years)							
>60	65	55(84.6)	0.861	0.354	46(70.8)	1.773	0.183
≤60	35	27(77.1)			29(82.9)		
Infiltration depth							
Mucosal to superficial muscle	38	23(60.5)	19.143	<0.001	26(68.4)	1.415	0.234
Deep muscle toSerosal layer	62	59(95.2)			49(79.0)		
Lymph node metastasis							
Yes	48	46(95.8)	11.968	0.001	43(89.6)	10.470	0.001
No	52	36(69.2)			32(61.5)		
TNM							
I + II	54	40(74.1)	4.996	0.025	33(61.1)	12.077	0.001
III +IV	46	42(91.3)			42(91.3)		
Pathological grading							
G ₁	23	13(56.5)	14.855	0.001	11(47.8)	12.181	0.002
G ₂	59	51(86.4)			48(81.4)		
G ₃	18	18(100)			16(88.9)		

Table 3 Correlation of CD151 and ERK1/2 protein expression in ESCC

CD151	ERK1/2		<i>r</i>	<i>P</i>
	Positive	Negative		
Positive	69	13	0.451	<0.001
Negative	6	12		

Table 4 Correlation of CD151 and ERK1/2 protein expression with VM in ESCC

VM	CD151				ERK1/2			
	Positive	Negative	<i>r</i>	<i>P</i>	Positive	Negative	<i>r</i>	<i>P</i>
Positive	29	0	0.299	0.002	28	1	0.318	0.001
Negative	53	18			47	24		

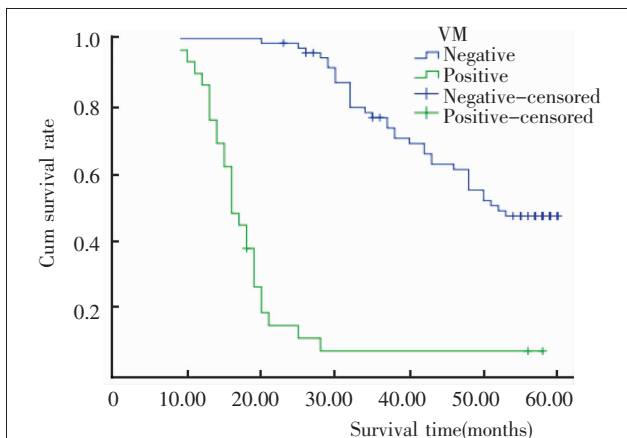


Figure 2 The survival curve of patients with different VM

度、临床分期、VM 存在可能是 ESCC 患者术后 5 年生存率的独立影响因素。见 Table 5。

3 讨 论

CD151 与整合素家族形成复合体后,通过囊泡运输靶基序(YXX ϕ)运输重要信号分子,并激活 FAK、ERK、PI3K/Akt、Rac/cdc42 信号通路,促进血管生成^[7]。ERK1/2 作为 MAPK/ERK 通路中 2 个重要成员,细胞未被激活时位于细胞质,一旦被激活则以磷酸化状态

迅速转移至细胞核,并通过磷酸化反应激活转录因子、酶以及细胞骨架相关蛋白等多种底物来调节相关基因表达,进而加速细胞增殖、分化,抑制细胞凋亡及促进血管生成^[8]。CD151 对细胞以及类微血管样结构形成的促进作用能被 ERK 抑制剂部分抑制;在蛋白表达水平上,CD151 蛋白表达增高,ERK 蛋白磷酸化明显上调,而抑制 CD151 蛋白表达则使磷酸化 ERK 蛋白表达明显降低,再次说明了 CD151 可以凭借激活 ERK 的方式,实现其促进血管生成的作用^[9]。本

研究结果显示:在 ESCC 的临床病理学特征中,CD151 及 ERK1/2 与患者性别、年龄无关,但与患者分化程度、淋巴结转移、临床分期具有明显相关性,除此之外,CD151 蛋白还与患者浸润深度相关($P<0.05$)。Spearman 等级相关分析提示,在 ESCC 中,CD151 蛋白与 ERK1/2 蛋白表达呈正相关($r=0.451, P<0.001$),这也提示 CD151 能促进 ERK1/2 蛋白表达,并参与 ESCC 的发生、发展。

目前对 VM 的研究主要集中在其形成机制和信号通路,及与肿瘤细胞的转移、侵袭相关的胞外基质重塑因子,如:血管内皮钙黏蛋白(VE-cad-

Table 5 Multivariate analysis of factors affecting postoperative 5-years survival of patients with ESCC

Index	B	SE	Wald	P	HR	95%CI
Infiltration depth	1.976	0.284	43.511	0.015	6.575	1.161~3.371
Lymph node metastasis	0.274	0.495	3.226	0.103	1.638	0.317~6.658
TNM	0.925	0.373	6.104	0.016	2.357	1.031~2.672
Pathological grading	0.314	0.505	2.592	0.138	1.654	0.451~7.137
CD151	0.578	0.895	0.415	0.519	1.783	0.307~10.314
ERK1/2	0.591	1.146	0.267	0.605	1.806	0.191~17.126
VM	2.128	0.808	6.962	0.008	0.119	0.024~0.579

herin)、上皮细胞激酶(EphA2)、磷脂酰肌醇激酶(PI3K)、层黏连蛋白 5 γ 2(Ln-5 γ 2)、低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)、局部黏着斑激酶(FAK)和 MMPs 等^[10];而在 VM 的形成过程中,PI3K/Akt 信号通路占主要作用,该通路主要通过调节 MT1-MMP1,MMP2 和 Ln-5 γ 2 链的裂解参与 VM 的形成^[11]。除此之外,VE-cadherin 可以通过介导 EphA2 与膜表面的配体相互作用使 EphA2 磷酸化,磷酸化的 EphA2 通过 FAK 和 ERK1/2 激活 PIK3,最终 MMP2 激活 Ln-5 γ 2 裂解从而导致 VM 形成^[12]。已有文献报道^[13],CD151 能激活 ERK、FAK,并通过 MAPKs/ERK 和 PI3K/Akt 通路促进新生血管形成;破坏 FAK 信号的相关非激酶表达能使 ERK1/2 磷酸化下调,以致尿激酶和基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)/膜型基质金属蛋白酶-2 (MT2-MMP)下调,从而可抑制 VM 形成^[14]。本研究结果显示:ESCC 组织中,有 VM 组中 CD151、ERK1/2 的表达均明显强于无 VM 组,而且 VM 与二者均呈正相关($r=0.299,0.318$; P 均 <0.05)。因此,CD151 蛋白可能通过促进 ERK1/2 蛋白表达,并经 PI3K/Akt/MT1-MMP1/MMP2/Ln-5 γ 2、MAPKs/PI3K/ERK 等多条通路参与食管鳞癌的 VM 形成,从而促进食管鳞癌的转移和浸润。

VM 的密度对肿瘤患者的不良预后及 5 年生存率的影响尤为显著^[15]。本研究中 Cox 回归分析显示 ESCC 患者术后 5 年生存率与临床分期、浸润深度、VM 有关;VM 组与无 VM 组的 5 年生存率分别为 10.3%和 50.7%,差异有统计学意义($P<0.001$)进一步证实了 VM 能影响 ESCC 患者的预后。

参考文献:

- [1] Chen W,Zheng R,Baade PD,et al. Cancer statistics in china,2015[J]. CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132.
- [2] Rao MR,Gopinath S,Alapati K,et al. Knockdown of cathepsin B and uPAR inhibits CD151 and α 3 β 1 integrin-mediated cell adhesion and invasion in glioma[J]. Mol Carcinog, 2013, 52(10):777-790.
- [3] Wang Y, Han R, Zuo Z. Dexmedetomidine post-treatment induces neuroprotection via activation of extracellular signal-regulated kinase in rats with subarachnoid haemorrhage[J]. Br J Anaesth,2016, 116(3):384-392.
- [4] Kovalska M,Kovalska L,Pavlikova M,et al. Intracellular signaling MAPK pathway after cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Neurochem Res,2012,37(7):1568-1577.
- [5] Zhao WJ,Yang YP. The formation of tumor vascular diversity and Its significance[J]. Journal of Chinese Oncology,2015,21(6):507-511.[赵文静,杨俐萍.肿瘤血管多样性的形成及其研究意义[J].肿瘤学杂志,2015,21(6):507-511.]
- [6] Liu X,Wang JH,Li S,et al. Histone deacetylase 3 expression correlates with vasculogenic mimicry through the phosphoinositide3-kinase/ERK-MMP-laminin5 γ 2 signaling pathway[J]. Cancer Sci,2015,106(7):857-866.
- [7] Wei Q,Liu ZX,Huang XL. Progress in the research of pro-angiogenesis of four transmembrane superfamily protein CD151[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry,2011,20(1):92-97.[魏全,刘正湘,黄晓琳.四跨膜超家族蛋白 CD151 促血管生成的研究进展[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2011,20(1):92-97.]
- [8] Baranski Z,Booij TH,Kuijjer ML,et al. MEK inhibition induces apoptosis in osteosarcoma cells with constitutive ERK1/2 phosphorylation [J]. Genes Cancer,2015,6 (11-12):503-512.
- [9] Zuo HJ,Lin JY,Liu ZY,et al. Activation of the ERK signaling pathway is involved in CD151-induced angiogenic effects on the formation of CD151-integrin complexes[J]. Chinese Pharmacology,2010,31(7):805-812.
- [10] Bai J,Xu ZJ,Liao CL,et al. Progress in research on the vascularization mimicry in cancer [J]. Journal of Central South University (Medical Science),2017,42(3):357-364. [白驹,徐志杰,廖朝亮,等.血管形成拟态在肿瘤中的研究进展[J].中南大学学报(医学版),2017,42(3):357-364.]
- [11] Zhang X,Song Q,Wei C,et al. LRIG1 inhibits hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation via suppression of the EGFR/PI3K/AKT pathway and epithelial-to-mesenchymal transition in human glioma SHG-44 cells[J]. Cell Stress Chaperones,2015,20(4):631-641.
- [12] Lu XS,Sun W,Ge CY,et al. Contribution of the PI3K/MMPs/Ln-5 γ 2 and EphA2/FAK/Paxillin signaling pathways to tumor growth and vasculogenic mimicry of gallbladder carcinomas[J]. Int J Oncol,2013,42(6):2103-2115.
- [13] Zuo H,Liu Z,Liu X,et al. CD151 gene delivery after myocardial infarction promotes functional neovascularization and activates FAK signaling[J]. Mol Med,2009,15(9-10):307-315.
- [14] Zhang J,Gao Q,Zhou Y,et al. Focal adhesion kinase-promoted tumor glucose metabolism is associated with a shift of mitochondrial respiration to glycolysis [J]. Oncogene, 2016,35(15):1926-1942.
- [15] Guo Q,Yuan Y,Jin Z,et al. Association between tumor vasculogenic mimicry and the poor prognosis of gastric cancer in China:an updated systematic review and meta-analysis[J]. Biomed Res Int,2016,2016(4):1-8.