

常见泪腺上皮性肿瘤中 EGFL7 的表达及其与血管生成和细胞增殖活性的相关性研究

邢其棋^{1,4}, 张 芳², 刘 栋³, 刘夫玲¹

引用:邢其棋,张芳,刘栋,等. 常见泪腺上皮性肿瘤中 EGFL7 的表达及其与血管生成和细胞增殖活性的相关性研究. 国际眼科杂志 2020;20(7):1139-1142

作者单位:(266011)中国山东省青岛市,青岛大学附属青岛市市立医院¹眼科;²病理科;³全科;⁴(266011)中国山东省青岛市即墨区人民医院眼科

作者简介:邢其棋,硕士,住院医师,研究方向:眼眶病与眼整形。

通讯作者:刘夫玲,博士,主任医师,眼科副主任,研究方向:眼眶病与眼整形. 18561857212@163.com

收稿日期:2019-11-19 修回日期:2020-06-10

摘要

目的:检测常见泪腺上皮性肿瘤中类表皮生长因子结构域 7 (EGFL7)、微血管密度 (MVD)、Ki67 的表达,探究 EGFL7 与 MVD、Ki67 之间的相互关系。

方法:应用免疫组化法,对 10 例正常泪腺组织(取自因炎症假瘤、Mikulicz 病等良性泪腺肿瘤切除后,标本中的部分正常泪腺组织)、20 例泪腺多形性腺瘤、12 例多形性腺癌、14 例腺样囊性癌组织中的 EGFL7 蛋白、Ki67 进行检测,并应用 CD34 标记计数 MVD。

结果:EGFL7 主要在泪腺多形性腺瘤、腺样囊性癌的肿瘤细胞的细胞浆中表达,免疫组化染色结果显示,在正常泪腺组织中 EGFL7 无阳性表达,泪腺多形性腺瘤组织中 EGFL7 的阳性率为 5% (1/20),泪腺多形性腺瘤中 EGFL7 的阳性表达率 83% (10/12),泪腺腺样囊性癌中 EGFL7 的阳性表达率为 86% (12/14),两种恶性肿瘤中的表达率明显高于多形性腺瘤和正常泪腺组织 ($P < 0.001$)。CD34 可使肿瘤微血管染色呈棕黄色的单个或成簇细胞群。在泪腺多形性腺瘤 (32.58 ± 14.46) 及腺样囊性癌 (43.43 ± 4.60) 中 CD34 的表达明显高于多形性腺瘤 (4.20 ± 1.19) ($P < 0.001$);Ki67 在具有增殖活性的细胞核呈棕褐色着色,在泪腺多形性腺瘤 (44.83 ± 13.68) 及腺样囊性癌 (26.29 ± 8.44) 中 Ki67 的表达明显高于多形性腺瘤 (2.80 ± 3.14) 及正常组织 (0.40 ± 0.70) ($P < 0.001$)。在两种恶性肿瘤中 EGFL7 的表达分别与 MVD、Ki67 呈明显正相关 ($r_s = 0.897, P < 0.001$; $r_s = 0.837, P < 0.001$)。

结论:EGFL7 在泪腺上皮性肿瘤中的表达与 MVD、Ki67 呈正相关性,提示 EGFL7 不仅在泪腺上皮性肿瘤血管生成中起重要作用,而且参与泪腺上皮性肿瘤的增殖。

关键词:泪腺上皮性肿瘤;类表皮生长因子结构域 7;微血管密度;增殖

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.7.05

Expression of EGFL7 in common epithelial tumors of lacrimal gland and its correlation with angiogenesis and proliferative activity

Qi - Qi Xing^{1,4}, Fang Zhang², Dong Liu³, Fu - Ling Liu¹

¹Department of Ophthalmology; ²Department of Pathology; ³General Family Medicine, Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao 266011, Shandong Province, China;

⁴Department of Ophthalmology, Jimo District People's Hospital, Qingdao 266011, Shandong Province, China

Correspondence to: Fu - Ling Liu. Department of Ophthalmology, Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao 266011, Shandong Province, China. 18561857212@163.com

Received:2019-11-19 Accepted:2020-06-10

Abstract

• **AIM:** To investigate the expression of epidermal growth factor-like domain 7 (EGFL7) protein in several lacrimal gland tumor types and normal lacrimal gland tissues by immunohistochemical staining. And discuss the correlation of EGFL7 expression with tumor cell proliferation activity and the MVD in lacrimal gland epithelial tumors.

• **METHODS:** A total of 46 paraffin-embedded specimens of common lacrimal gland epithelial tumors and other lacrimal gland tumor types, including 20 cases of lacrimal gland pleomorphic adenoma, 12 cases of pleomorphic adenocarcinoma, and 14 cases of adenoid cystic carcinoma, as well as ten normal lacrimal glands were analyzed for the expression of EGFL7 protein. For all specimens, the tumor microvascular networks were also labeled with anti-CD34 antibody and the tumor MVD was calculated. The proliferative activity of tumor cells containing Ki67.

• **RESULTS:** EGFL7 protein was scored as positive with the presence of brown color in the cytoplasm, and was mainly observed in cells of lacrimal gland pleomorphic adenocarcinomas and adenoid cystic carcinomas. Immunohistochemical staining showed that EGFL7 was not expressed in normal lacrimal gland tissue. The rates of expression of EGFL7 in lacrimal gland pleomorphic adenomas, lacrimal gland pleomorphic adenocarcinomas, and lacrimal adenoid cystic carcinomas were 5% (1/20), 83% (10/12), and 86% (12/14), respectively. The EGFL7 expression in both malignant

tumor types was significantly higher than that in pleomorphic adenomas and normal lacrimal gland tissues ($P < 0.001$). CD34 staining colored the tumor microvascular network brown-yellow in single cells or clustered cell populations. The expression of CD34 in lacrimal gland pleomorphic adenocarcinomas (32.58 ± 14.46) and adenoid cystic carcinomas (43.43 ± 4.60) was significantly higher than that in pleomorphic adenomas (4.20 ± 1.19) ($P < 0.001$). Ki67 staining appeared as a brownish color in cell nuclei, indicating proliferative activity. The expression of Ki67 in lacrimal gland pleomorphic adenocarcinomas (44.83 ± 13.68) and adenoid cystic carcinomas (26.29 ± 8.44) was significantly higher than that in pleomorphic adenomas (2.80 ± 3.14) and normal tissues (0.40 ± 0.70) ($P < 0.001$). Furthermore, the expression of EGFL7 protein was positively correlated with high MVD and Ki67 expression in lacrimal epithelial tumors ($r_s = 0.897$, $P < 0.001$; $r_s = 0.837$, $P < 0.001$).

• **CONCLUSION:** The correlation of EGFL7 expression with high MVD and Ki67 expression suggests that high EGFL7 expression plays an important role in promoting tumor angiogenesis and tumor proliferation.

• **KEYWORDS:** lacrimal epithelial tumors; EGFL7; MVD; angiogenesis

Citation: Xing QQ, Zhang F, Liu D, *et al.* Expression of EGFL7 in common epithelial tumors of lacrimal gland and its correlation with angiogenesis and proliferative activity. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(7):1139-1142

0 引言

肿瘤发生侵袭转移是一个多环节、多步骤的动态过程,涉及肿瘤细胞的黏附、降解、移动和血管生成、增殖等事件。类表皮生长因子结构域7(epidermal growth factor like domain7,EGFL7)的研究涉及血管形成过程中的关键性作用。本文拟检测常见泪腺上皮性肿瘤中EGFL7的表达,及其与微血管密度(microvascular density,MVD)、肿瘤细胞增殖活性(Ki67)的相关性。为肿瘤的预后判定及抗血管生成治疗提供新的探索。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2009-01/2019-01青岛市市立医院住院手术患者10例正常泪腺组织(正常泪腺组织取自因炎性假瘤、Mikulicz病等良性泪腺肿瘤切除后,标本中的部分正常泪腺组织)和46例泪腺上皮性肿瘤患者,术后病理分别为泪腺多形性腺瘤20例、多形性腺瘤12例、腺样囊性癌14例。主要试剂:兔抗EGFL7单克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司),鼠抗CD34单克隆抗体、鼠抗Ki67单克隆抗体(中杉金桥生物技术有限公司)。本研究经我院伦理委员会审批通过,所有患者均知情同意。

1.2 方法 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(streptavidin-peroxidase,SP),行高温高压修复抗原处理,染色步骤按SP试剂盒提供的说明书进行。用磷酸盐缓冲液(PBS)替代一抗作阴性对照,用已知阳性切片作阳性对照。

评定标准:EGFL7染色判定标准参照 Shimizu 等^[1]曾描述的方法进行评定和积分。由两位高年资病理科医师独立完成高倍镜下观察每张切片单个视野内染色阳性细

胞及比例计数。根据阳性细胞占同类细胞总数的百分率及细胞染色强度综合判定。具体为:(1)染色强度评分标准:细胞浆不显色,0分;胞浆呈淡黄色,1分;胞浆呈棕黄色,2分;胞浆呈棕褐色,3分。(2)阳性细胞所占比例评分标准:阳性细胞数 $\leq 10\%$,记为0分; $10\% \sim < 40\%$,记为1分; $40\% \sim < 70\%$,记为2分; $\geq 70\%$,记为3分。(3)染色强度评分+阳性细胞所占比例评分=总评分;总积分0~1分为阴性,大于2分为阳性; < 2 分为(-),2~3分为(+),4~5分为(++), > 5 分为(+++)。Ki67是以细胞核染成均一的棕褐色,胞浆及胞膜不着色为阳性细胞。随机选取5个高倍镜视野,每个视野计算100个肿瘤细胞的阳性细胞数,取其均值为Ki67指数(Ki67LI)。微血管密度(MVD)的测定参照 Weidner 建议的方法^[2]:CD34阳性染色以血管内皮细胞胞质及胞膜出现棕黄色颗粒沉着为阳性,计数微血管染色(CD34)呈棕黄色的单个或成簇细胞群,计数时需要排除管腔直径大于8个红细胞的或管壁肌层较厚的微血管。计数时先用低倍镜找出3个微血管最密集的区域,然后再用200倍镜在上述3个视野中分别计数微血管数,最后取其平均值即为该肿瘤组织的微血管密度值。

统计学分析:采用SPSS 23.0软件进行统计分析,其中EGFL7在正常泪腺、泪腺多形性腺瘤、多形性腺瘤及腺样囊性癌中的表达关系采用Fisher确切概率法检验统计,组间两两比较采用卡方分割法,采用Bonferroni法校正检验水准,校正后的检验水准 $\alpha = (0.05/6) = 0.0083$;Ki67指数与MVD以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料比较采用方差分析,组间两两比较采用Bonferroni法校正检验水准;EGFL7表达与MVD、Ki67指数在多形性腺瘤及腺样囊性癌中的表达的相关性检验采用Spearman等级相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGFL7在正常泪腺及常见泪腺上皮性肿瘤中的表达情况 EGFL7的阳性表达为细胞质呈棕黄色或棕褐色着色(图1),主要表达在泪腺多形性腺瘤及腺样囊性癌的肿瘤细胞中,EGFL7在12例多形性腺瘤中的阳性表达率为83%(10/12),其中弱阳性率为17%(2/12),中等阳性率为42%(5/12),强阳性率为25%(3/12)(表1),在14例腺样囊性癌中的阳性表达率为86%(12/14),其中弱阳性率为21%(3/14),中等阳性率为36%(5/14),强阳性率为29%(4/14)。而在多形性腺瘤及正常泪腺组织中几乎无阳性表达。采用Fisher确切概率法检验统计分析,结果显示EGFL7在腺样囊性癌及多形性腺瘤中的表达明显高于多形性腺瘤及正常泪腺组织中的表达,且具有统计学意义($P < 0.001$),而在正常组织与多形性腺瘤中的表达无明显统计学意义($P = 1.000$),同样在腺样囊性癌与多形性腺瘤中的表达无明显统计学意义($P = 1.000$),见表1。

2.2 MVD在常见泪腺上皮性肿瘤中的表达情况 CD34相关抗原染色后,可以看到在切片组织中的肿瘤微血管染色呈棕黄色的单个或成簇细胞群(图2)。腺样囊性癌组织中的微血管密度为(43.43 ± 4.60)、多形性腺瘤(32.58 ± 14.46),显著高于多形性腺瘤(4.20 ± 1.19)。采用方差分析结果显示,在常见泪腺上皮性肿瘤中MVD的表达差异具有统计学意义($P < 0.001$)。组间两两比较的结果显示MVD在腺样囊性癌及多形性腺瘤中的表达明显高于多形性腺瘤,且差异有统计学意义($P < 0.001$),而在腺样囊性

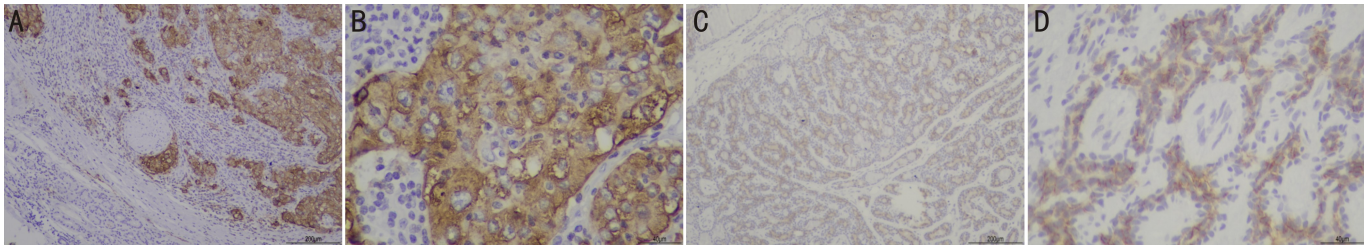


图1 EGFL7在多形性腺瘤和腺样囊性癌中的表达情况 A:EGFL7在多形性腺瘤中的表达(+)(10×10,IHC); B:EGFL7在多形性腺瘤中的表达(+)(10×40,IHC); C:EGFL7在腺样囊性癌中的表达(+)(10×10,IHC); D:EGFL7在腺样囊性癌中表达(+)(10×40,IHC)。

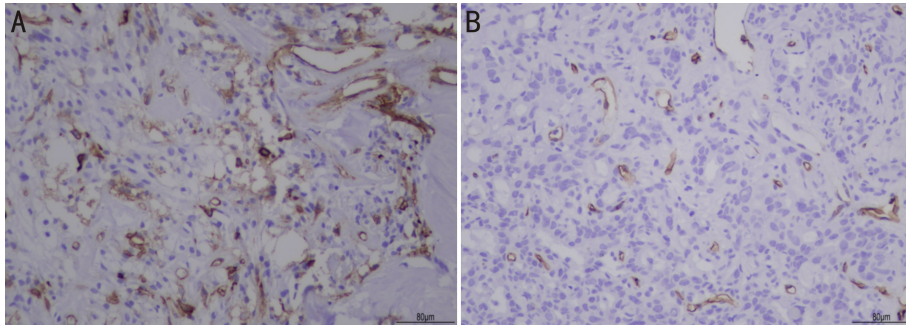


图2 CD34在腺样囊性癌和多形性腺瘤中的表达 A:CD34在腺样囊性癌中的表达(10×20,IHC); B:CD34在多形性腺瘤中的表达(10×20,IHC)。

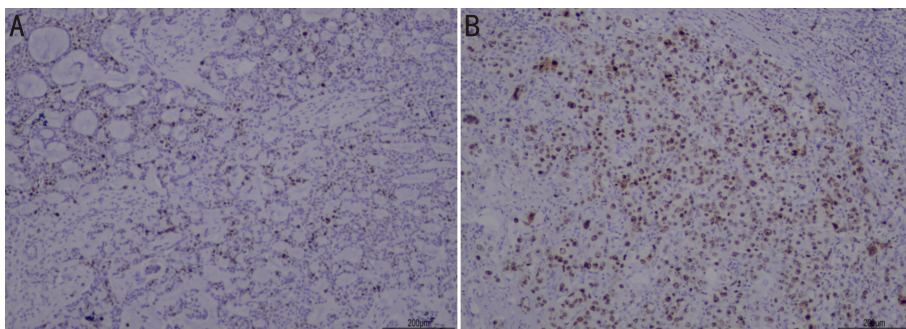


图3 Ki67在腺样囊性癌和多形性腺瘤中的表达 A:Ki67在腺样囊性癌中的表达(10×10,IHC); B:Ki67在多形性腺瘤中的表达(10×10,IHC)。

表1 常见泪腺上皮性肿瘤及正常泪腺中EGFL7蛋白的表达例

分组	例数	-	+	++	+++
正常泪腺	10	10	0	0	0
多形性腺瘤	20	19	1	0	0
多形性腺癌	12	2	2	5	3
腺样囊性癌	14	2	3	5	4

表2 泪腺上皮性肿瘤中EGFL7的表达水平与MVD和Ki67的关系

EGFL7	等级	例数	$\bar{x} \pm s$	
			CD34	Ki67LI
EGFL7	-	23	6.19±8.00	5.81±6.16
	+	6	31.33±8.14	25.67±5.51
	++	10	37.70±11.45	37.80±2.39
	+++	7	45.71±14.28	48.00±5.03

癌与多形性腺瘤之间无明显统计学差异($P=0.822$)。

2.3 Ki67在常见泪腺上皮性肿瘤及正常泪腺中的表达

Ki67相关抗原染色后,我们可以观察到,该抗原在所有分组中均有不同程度的表达,阳性细胞表现为细胞核呈棕褐色(图3)。采用Ki67指数(Ki67LI)表示Ki67在组织中的表达情况。在泪腺多形性腺瘤中的Ki67表达量最高为(44.83±13.68),其次是腺样囊性癌(26.29±8.44),在泪腺多形性腺癌(2.80±3.14)及正常泪腺组织(0.40±0.70)中亦有少量表达。采用方差分析结果显示,在常见泪腺上皮性肿瘤及正常泪腺组织中Ki67的表达差异具有统计学意义($P<0.001$)。且组间两两比较均具有明显的统计学差异($P<0.001$)。

2.4 常见泪腺上皮性肿瘤中EGFL7的表达水平与MVD及Ki67的关系

经Spearman等级相关分析发现,在常见

泪腺上皮性肿瘤中EGFL7的表达水平与MVD的表达呈明显正相关($r_s=0.897, P<0.001$),与Ki67的表达呈明显正相关($r_s=0.837, P<0.001$),见表2。

3 讨论

EGFL7属于一个小基因家族,是由Fitch等^[3]和Nichol等^[4]首次发现,EGFL7高表达与胚胎发育早期,并证实了其在胚胎过程中主要介导引起内皮细胞运动并迁移到正确的位置形成血管管腔,缺乏EGFL7的表达可导致胚胎血管管腔形成障碍^[5]。EGFL7被血管内皮细胞分泌后停留在其附近,表明其可能跟细胞外基质相关,介导细胞间相互作用^[6-8]。目前研究发现EGFL7在多种人类恶性肿瘤中均有表达^[9-10],包括肺癌、胶质瘤^[11]、结直肠癌、肝癌^[10]、胃癌^[12]、乳腺癌、前列腺癌、食道癌、卵巢

癌^[13]和肾癌^[14]。EGFL7在各种肿瘤中的表达升高已被证明它在肿瘤的新生血管生成、肿瘤增殖及侵袭中发挥核心作用^[15]。此外,近年来的研究表明,EGFL7还具有促进肿瘤细胞迁徙、上皮间质转化^[16]、免疫逃逸^[17]等作用。

血管生成在病理条件下,这一过程将导致疾病的进展与增殖,例如,肿瘤的持续快速生长需要血管生成平衡向原血管生成因子倾斜,以保证肿瘤有足够的营养供应^[18]。肿瘤增殖生长与有丝分裂活性有关^[19],许多来自细胞核细胞周期分析的报告显示,Ki67存在于细胞周期的G1、S和G2阶段,这暗示了它在许多肿瘤中作为细胞增殖标志物的作用^[20]。

在此前,有研究发现^[20],在脑胶质瘤中发现Ki67与MVD呈显著正相关,且与肿瘤分级呈正相关,说明该研究支持增殖活性依赖于血管生成水平。EGFL7的表达也与Ki67呈正相关^[21],且提示EGFL7的上调与肿瘤的增殖和侵袭密切相关。Xu等^[22]研究发现,在靶向抑制了EGFL7的表达以后肿瘤的生长速度变慢,增殖活性降低,这进一步说明EGFL7的表达与肿瘤的增殖活性有密切关系。

在本实验研究中,应用免疫组化技术检测了EGFL7在常见泪腺上皮性肿瘤组织中的表达水平。发现EGFL7在正常泪腺组织和多形性腺瘤中几乎没有表达,而在多形性腺瘤及腺样囊性癌中显著表达。使用CD34抗体标记常见泪腺上皮性肿瘤中的微血管,结果显示,在腺样囊性癌及多形性腺瘤组织中的MVD显著高于多形性腺瘤,并且泪腺多形性腺瘤、腺样囊性癌及多形性腺瘤中EGFL7的表达与MVD之间有明显的正相关性,提示EGFL7可能在泪腺上皮性肿瘤的血管生成中起作用。Torben等^[23]在基因工程小鼠、免疫缺陷裸鼠模型体内研究中发现相对于单独应用抗VEGF药物,联合抗EGFL7、抗VEGF能明显减缓肿瘤生长。有研究中发现EGFL7对转移性直肠癌患者一线化疗联合贝伐单抗有预测价值。因此,EGFL7可能成为恶性泪腺上皮性肿瘤临床进展的一个新的预测因子。

此外,在多形性腺瘤及腺样囊性癌组织标本中Ki67的表达明显高于多形性腺瘤及正常泪腺组织,说明在恶性泪腺上皮性肿瘤中的增殖活性明显高于正常泪腺组织及多形性腺瘤。了解EGFL7在泪腺上皮性肿瘤的良好性肿瘤的进展过程中的表达,这有利于抗血管生成治疗在泪腺上皮性肿瘤中的应用。

通过对EGFL7在泪腺上皮性肿瘤中表达的研究,我们发现EGFL7在泪腺上皮性肿瘤中不仅可以促进肿瘤新生血管的生成,而且一定程度上促进肿瘤的增殖,通过不同的环节、不同方式对肿瘤的生物行为产生影响,从而促进泪腺上皮性肿瘤发生、发展。通过该实验研究表明,EGFL7可能成为评估泪腺上皮性肿瘤预后的分子标记物,并有可能成为泪腺上皮性肿瘤抗血管治疗的一个潜在靶点。

参考文献

- 1 Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissues. *Hum Pathol* 1990;21(6):607-612
- 2 Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84(24):1875-1887

- 3 Fitch MJ, Campagnolo L, Kuhnert F, et al. Eglf7, a novel epidermal growth factor-domain gene expressed in endothelial cells. *Dev Dyn* 2004;230(2):316-324
- 4 Nichol D, Shawber C, Fitch MJ, et al. Impaired angiogenesis and altered Notch signaling in mice overexpressing endothelial Eglf7. *Blood* 2011;117(24):6738-6739
- 5 林婷婷,何彦津,张虹,等. 眼眶腺样囊性癌的治疗与预后分析. *中华眼科杂志* 2009;45(4):309-313
- 6 Kao DI, Lacko LA, Ding BS, et al. Endothelial cells control pancreatic cell fate at defined stages through EGFL7 signaling. *Stem Cell Reports* 2015;4(2):181-189
- 7 Pannier D, Philippin-Lauridant G, Baranzelli MC, et al. High expression levels of eglf7 correlate with low endothelial cell activation in peritumoral vessels of human breast cancer. *Oncol Lett* 2016;12(2):1422-1428
- 8 Engel J. EGF-like domains in extracellular matrix proteins: localized signals for growth and differentiation? *FEBS Lett* 1989;251(1-2):1-7
- 9 Fan C, Yang LY, Wu F, et al. The expression of Eglf7 in human normal tissues and epithelial tumors. *Int J Biol Markers* 2013;28(1):71-83
- 10 Wang FY, Kang CS, Wang-Gou SY, et al. EGFL7 is an intercellular EGFR signal messenger that plays an oncogenic role in glioma. *Cancer Lett* 2017;384(1):9-18
- 11 Shen X, Han Y, Xue X, et al. Epidermal growth factor-like domain 7 promotes cell invasion and angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Biomed Pharmacother* 2016;77(2):167-175
- 12 Philippin-Lauridant G, Baranzelli MC, Samson C, et al. Expression of Eglf7 correlates with low-grade invasive lesions in human breast cancer. *Int J Oncol* 2013;42(4):1367-1375
- 13 Deng QJ, Xie LQ, Li H. Overexpressed MALAT1 promotes invasion and metastasis of gastric cancer cells via increasing EGFL7 expression. *Life Sci* 2016;157(7):38-44
- 14 Yamauchi M, Fukuda T, Wada T, et al. Expression of epidermal growth factor-like domain 7 may be a predictive marker of the effect of neoadjuvant chemotherapy for locally advanced uterine cervical cancer. *Oncol Lett* 2016;12(6):5183-5189
- 15 Hong G, Kuek V, Shi J, et al. EGFL7: Master regulator of cancer pathogenesis, angiogenesis and an emerging mediator of bone homeostasis. *J Cell Physiol* 2018;233(11):8526-8537
- 16 Takao Y. Inspection of Hepatocellular Carcinoma 5: Angiography. *Nihon Hoshasen Gijutsu Gakkai Zasshi* 2016;72(7):627-635
- 17 Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005;307(5706):58-62
- 18 Huang CH, Li XJ, Zhou YZ, et al. Expression and clinical significance of EGFL7 in malignant glioma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010;136(11):1737-1743
- 19 Lannig MB, Moller CB, Andersen AH, et al. Quality assessment of Ki67 staining using cell line proliferation index and stain intensity features. *Cytometry A* 2019;95(4):381-388
- 20 Kloppel G, Perren A, Heitz PU. The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1014(4):13-27
- 21 Ohgaki H. Epidemiology of brain tumors. *Methods Mol Biol* 2009;472(11):323-342
- 22 Xu HF, Chen L, Liu XD, et al. Targeting EGFL7 expression through RNA interference suppresses renal cell carcinoma growth by inhibiting angiogenesis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(7):3045-3050
- 23 Torben FH, Boye SN, Anders J, et al. Intra-tumoural vessel area estimated by expression of epidermal growth factor-like domain 7 and microRNA-126 in primary tumours and metastases of patients with colorectal cancer: a descriptive study. *J Translational Med* 2015;16(1):10-13