

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.01.025

◇临床医学◇

腺苷 A2a 受体在胃间质瘤中的表达及其临床意义

吴兆映¹, 樊瑞智², 江涛², 史沛聪¹, 时林森², 宋军²作者单位:¹徐州医科大学研究生学院, 江苏 徐州 221002;²徐州医科大学附属医院胃肠外科, 江苏 徐州 221002

通信作者: 宋军, 男, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 研究方向为胃肠道肿瘤, E-mail: songjun@xzhmu.edu.cn

基金项目: 江苏省“六个一工程”(LGY2017093); 江苏省研究生实践创新计划(SJCX0709)

摘要:目的 探讨腺苷 A2a 受体(A2aR)在胃间质瘤组织中的表达情况及其临床意义。方法 应用免疫组织化学染色法, 检测 2012 年至 2017 年 9 月徐州医科大学附属医院 149 例胃间质瘤组织及 85 例瘤旁正常组织中 A2aR 的表达, 结合病人的临床病理资料, 并分析 A2aR 的表达与病人预后的关系。结果 A2aR 在肿瘤组织中表达的阳性率为 51.0%, 明显高于瘤旁正常组织的 31.8%, 差异有统计学意义($P=0.004$); A2aR 的表达与肿瘤的核分裂象、危险度分级以及肿瘤是否坏死相关($P=0.002$ 、 0.010 、 0.013), 而与其他临床病理因素无关($P>0.05$); 单因素生存分析结果表明核分裂象、肿瘤大小、危险度分级、肿瘤是否坏死以及 A2aR 表达水平均为影响胃间质瘤病人预后的重要因素($P=0.046$ 、 <0.001 、 <0.001 、 0.005 、 0.002); COX 多因素分析显示危险度分级、肿瘤是否坏死, 以及 A2aR 表达是影响病人预后的独立危险因素($P=0.001$ 、 0.021 、 0.039)。结论 A2aR 高表达可能促进胃间质瘤的发生发展, 并提示病人的不良预后, A2aR 可能是预测胃间质瘤预后的一个新的标志物, 并且有望成为其治疗的潜在靶点。

关键词: 胃肿瘤; 受体, 腺苷 A2; 免疫组织化学; 病理学, 临床; 预后

The expression of adenosine A2a receptor in gastric stromal tumors and its clinical significance

WU Zhaoying¹, FAN Ruizhi², JIANG Tao², SHI Peicong¹, SHI Linsen², SONG Jun²Author Affiliations: ¹Graduated School of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221002, China;²Department of Gastrointestinal Surgery, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221002, China

Abstract: **Objective** To explore the expression of adenosine A2a receptor (A2aR) in gastric stromal tumor tissues and its clinical significance. **Methods** Immunohistochemical staining were adopted to detect the expression of A2aR in 149 gastric stromal tumor tissues and 85 para-tumor normal tissues in The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University from January 2012 to September 2017. Meanwhile, the relationship between the expression of A2aR and the prognosis of the patients were analyzed. **Results** The positive rate of A2aR expression in tumor tissues was 51.0%, which was significantly higher than 31.8% of normal adjacent tissues ($P=0.004$). The expression of A2aR was correlated with the mitotic index ($P=0.002$), tumor risk classification ($P=0.010$) and tumor necrosis ($P=0.013$), however, not correlated with other clinicopathological factors ($P>0.05$). The results of univariate survival analysis indicated that the mitotic index ($P=0.046$), tumor size ($P<0.001$), tumor risk classification ($P<0.001$), tumor necrosis ($P=0.005$) and A2aR expression ($P=0.002$) were the important factors affecting the prognosis of patients with gastric stromal tumor. COX multivariate survival analysis showed that tumor risk classification ($P=0.001$), tumor necrosis ($P=0.021$), and A2aR expression ($P=0.039$) were independent factors influencing patients' prognosis. **Conclusions** The high expression of A2aR may promote the generation and development of gastric stromal tumors and indicate a poor prognosis. A2aR is expected to be a promising therapeutic target of gastric stromal tumors.

Key words: Stomach neoplasms; Receptors, adenosine A2; Immunohistochemistry; Pathology, clinical; Prognosis

胃肠道间质瘤(Gastrointestinal Stromal Tumors, GISTs)是消化道最常见的间叶组织源性肿瘤, c-kit 或 PDGFRA 基因突变是其标志性特征, 可以发生于

消化道的任何部位, 其中以胃最多见, 约占 50%~70%^[1]。A2aR 属于 G 蛋白偶联受体超家族, 是腺苷(Adenosine, ADO)的受体之一。近年来, 众多的研

究发现 A2aR 在多种肿瘤组织中表达异常^[2], ADO-A2aR 通路可以通过抑制自然杀伤细胞(NK)和细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)等免疫效应细胞的抗肿瘤免疫应答,使肿瘤获得免疫逃逸,从而促进肿瘤生长^[3]。本研究通过对 A2aR 在 149 例胃间质瘤组织及配对的 85 例瘤旁正常组织中(部分标本切缘距肿瘤小于 2 cm,无配对的瘤旁组织)的表达情况进行分析,进而探讨其与病人临床病理特征及预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集徐州医科大学附属医院 2012 年 1 月至 2017 年 9 月收治的 149 例经胃镜或手术病理证实的胃间质瘤病人的临床病理资料,所有病人临床病理资料完整,术前均未行放化疗或靶向治疗。其中男 71 例,女 78 例,男女比例 1:1.1;年龄 24~84 岁,中位年龄 62 岁,核分裂象 $\leq 5/50$ 高倍视野(HPFs)者 114 例, $> 5/50$ HPFs 者 35 例;47 例出现肿瘤坏死;组织学类型:梭形细胞型 87 例,上皮细胞型 49 例,混合细胞型 13 例;肿瘤单发 128 例,多发 21 例;根据 2008 年美国国立研究院(NIH)修订的 GIST 危险度分级标准^[4],高度风险 26 例,中度风险 43 例,低度风险 45 例,极低度风险 35 例。病人或其近亲属知情同意,本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 实验方法 本实验应用免疫组织化学 SP 法检测,将 10% 甲醛溶液固定的石蜡包埋组织标本连续 4 μm 切片,置于 60~70 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中烘烤 1 h。常规二甲苯脱蜡和梯度乙醇脱水,滴加 3% 过氧化氢溶液室温处理 10 min, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,将切片置入 pH=6.0 的柠檬酸缓冲液加热 20 min 行抗原修复,冷却至室温后 PBS 冲洗 3 次,滴加 5% BSA 封闭液,室温下作用 15 min。滴加 A2aR 一抗(美国 Abcam 公司,浓度 1:150),将 PBS 替代一抗作为阴性对照,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBS 冲洗后滴加二抗,室温处理 20 min 后 PBS 冲洗,滴加过氧化物酶标记的链霉素菌抗生物蛋白,20 min 后 PBS 冲洗,滴加 DAB 显色剂,显色适当后苏木素复染 30 s,水洗返蓝,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。判读标准:随机选取 5 个高倍镜视野进行观察,显示 A2aR 定位于细胞膜和/或细胞质,采用半定量积分法,按染色强度分级为:0 分(阴性),1 分(弱阳性),2 分(中度阳性),3 分(强阳性);按阳性细胞所占百分比分级为:1 分(0~25%),2 分(26%~50%),3 分(51%~75%),4 分(76%~100%)。两者相乘,结果 ≤ 6 分为低表达, > 6 分为高表达。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料使用例(%)描述, χ^2 检验,绘制生存曲线采用 Kaplan-Meier

法,单因素分析各变量与预后的关系采用 Log-rank 检验,多因素预后分析采用 Cox 风险回归模型,采用逐步回归法筛选变量,纳入标准是 0.05,剔除标准是 0.10。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A2aR 在胃间质瘤组织及瘤旁正常组织中的表达 A2aR 以胞质和/或胞膜出现棕黄色颗粒为阳性染色,免疫组织化学染色结果显示 A2aR 在胃间质瘤组织及瘤旁正常组织中均有不同程度的表达。胃间质瘤组织中高表达组 51.0%(76/149),低表达组 49.0%(73/149);85 例配对的瘤旁正常组织中高表达组 31.8%(27/85),低表达组 68.2%(58/85)。间质瘤组织中 A2aR 的表达较瘤旁正常组织明显上调,差异有统计学意义($P = 0.004$)。

2.2 A2aR 在胃间质瘤 149 例中的表达与病人临床病理特征的关系 胃间质瘤组织中 A2aR 的表达与肿瘤的核分裂象($P = 0.002$)、危险度分级($P = 0.010$)以及肿瘤是否坏死($P = 0.013$)相关,而与其他临床病理因素无关($P > 0.05$)。详见表 1。

表 1 胃间质瘤 149 例中 A2aR 的表达与临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	A2aR 低表达/例	A2aR 高表达/例	χ^2 值	P 值
年龄				1.523	0.217
≤ 60 岁	73	32	41		
> 60 岁	76	41	35		
性别				1.113	0.292
男	71	38	33		
女	78	35	43		
部位				0.923	0.630
胃底	86	45	41		
胃体	50	22	28		
胃窦	13	6	7		
肿瘤最大径				2.158	0.142
≤ 5.0 cm	89	48	41		
> 5.0 cm	60	25	35		
核分裂象				9.920	0.002
≤ 5/50 HPFs	114	64	50		
> 5/50 HPFs	35	9	26		
危险度分级				6.581	0.010
极低/低	80	47	33		
中/高	69	26	43		
细胞类型				2.196	0.334
梭形细胞型	87	40	47		
上皮细胞型	49	28	21		
混合细胞型	13	5	8		
生长方式				2.399	0.121
单发	128	66	62		
多发	21	7	14		
肿瘤是否坏死				6.141	0.013
否	102	57	45		
是	47	16	31		

注:HPFs 为高倍视野

2.3 胃间质瘤病人预后的单因素分析 本组病人随访资料均完整,随访时间7~76月,中位随访时间32月,共30例病人在随访期间因疾病进展而死亡。如表2所示:单因素生存分析结果表明核分裂象($P=0.046$),肿瘤大小($P<0.001$),危险度分级($P<0.001$),肿瘤是否坏死($P=0.005$)以及A2aR表达水平($P=0.002$)均为影响胃间质瘤病人预后的重要因素。

表2 胃间质瘤149例影响预后的单因素分析

临床病理特征	例数	死亡/例	存活/例	χ^2 值	P值
年龄				0.908	0.341
≤60岁	73	16	57		
>60岁	76	14	62		
性别				0.044	0.833
男	71	13	58		
女	78	17	61		
部位				1.455	0.483
胃底	86	15	71		
胃体	50	13	37		
胃窦	13	2	11		
肿瘤最大径				25.919	<0.001
≤5.0 cm	89	6	83		
>5.0 cm	60	24	36		
核分裂象				3.996	0.046
≤5/50 HPFs	114	19	95		
>5/50 HPFs	35	11	24		
危险度分级				28.741	<0.001
极低/低	80	3	77		
中/高	69	27	42		
细胞类型				1.942	0.379
梭形细胞型	87	19	68		
上皮细胞型	49	8	41		
混合细胞型	13	3	10		
生长方式				1.566	0.211
单发	128	28	100		
多发	21	2	19		
是否坏死				7.988	0.005
否	102	15	87		
是	47	15	32		
A2aR				9.330	0.002
低表达	73	8	65		
高表达	76	22	54		

注:HPFs为高倍视野

2.4 胃间质瘤病人预后的多因素分析 将单因素分析中具有统计学意义的因素纳入COX多因素分析中,结果显示危险度分级($P=0.001$),肿瘤是否坏死($P=0.021$),以及A2aR表达($P=0.039$)是影响病人预后的独立危险因素,见表3。

3 讨论

目前,手术完整切除是治疗胃间质瘤的首要方法,但是术后的高复发率一直是困扰我们的难题,甲磺酸伊马替尼是一种酪氨酸激酶抑制剂,对中高

表3 胃间质瘤149例影响预后的COX多因素分析

临床病理因素	例数	β 值	HR值	95%CI	P值
危险度分级		2.078	7.991	2.317~27.561	0.001
极低/低	80				
中/高	69				
肿瘤是否坏死		0.871	2.389	1.141~5.002	0.021
否	102				
是	47				
A2aR表达		0.932	2.539	1.049~6.145	0.039
低表达	73				
高表达	76				

危肿瘤进行术后靶向药物辅助治疗显著改善了病人的预后^[5]。但是,对靶向药物的耐药已经成为一个难以解决的问题,其中10.0%~15.0%的病人是原发性耐药,而60.0%~76.6%的病人在治疗期间会产生继发性耐药^[6-7]。

A2aR是腺苷(Adenosine, ADO)的四个受体之一,其余三个包括A1R、A2bR和A3R,均属于G蛋白偶联受体超家族^[8]。已有研究表明,A2aR在多种肿瘤中发挥作用。Mediavilla等^[9]通过免疫印迹分析和免疫组织化学染色发现A2aR在非小细胞肺癌的肿瘤细胞上阳性表达,并进一步研究证实,应用A2aR拮抗剂既可以在体外下调肿瘤细胞的增殖,又可以抑制小鼠体内移植瘤的生长。Kalhan等^[10]研究表明,A2aR在胰腺和肠神经内分泌肿瘤中过表达,A2aR激动剂(CGS21680)可以促进肿瘤细胞增殖,而A2aR选择性拮抗剂(SCH442416)则可削弱这种作用。Etique等^[11]还发现,选择性激动剂CGS21680激活A2aR能够刺激MCF-7乳腺癌细胞的增殖。然而,腺苷及其受体是否参与了胃肠道间质瘤的起病及进展目前尚无相关研究报道。

本课题对A2aR是否与胃间质瘤的发生发展相关展开了初步研究,结果显示,A2aR主要表达于细胞的胞质和胞膜,胃间质瘤细胞中A2aR的高表达率为51.0%(76/149),高于癌旁正常组织的31.8%(27/85),差异有统计学意义($P=0.004$),并且A2aR表达与肿瘤的核分裂象($P=0.002$)、危险度分级($P=0.010$)以及肿瘤是否坏死($P=0.013$)密切相关,提示A2aR可能参与了胃间质瘤的发生发展。

既往研究表明,A2aR的配体ADO是ATP在体内的代谢产物,参与细胞内能量代谢和核酸合成等生理过程,是细胞间重要的信号转导因子^[12-13]。然而,由于在肿瘤组织中的缺氧微环境下,缺氧诱导因子 α (HIF- α)诱导细胞外核苷酸酶(CD39, CD73)过度表达,可以促进ATP分解为ADO,导致肿瘤微环境中ADO的显著增加^[14]。ADO与A2aR结合将会激活腺苷酸环化酶(AC)从而促进cAMP的产生,

cAMP作为第二信使通过细胞缝隙连接进入效应细胞,激活细胞内cAMP-蛋白激酶-A(PKA)-淋巴细胞特异性酪氨酸激酶(Lck)/肉瘤基因蛋白激酶(Src激酶)信号通路,抑制免疫效应细胞如NK细胞、CD8+T细胞、DC细胞、巨噬细胞的抗肿瘤免疫应答,从而促进肿瘤的生长^[15]。Subramanian等^[16]研究发现,A2aR激动剂可以通过干预ADO-A2aR途径来下调效应T细胞、NK细胞、抗原呈递细胞和中性粒细胞的激活。在此基础上,我们猜想,在胃间质瘤的肿瘤微环境中,由于肿瘤组织坏死,造成局部缺氧状态,ADO产生增加,导致A2aR的表达在肿瘤细胞中适应性上调,ADO与A2aR进一步结合,抑制免疫效应细胞对肿瘤细胞的杀伤,从而促进肿瘤的发展。但是A2aR发挥生物学功能的具体作用机制仍需进一步的研究来证实。

影响胃间质瘤预后的因素较多,各研究得出的结论并不完全一致,目前常用的标准是2008年美国国立研究院(NIH)修订的GIST危险度分级,但是部分研究认为其并不能完全反映病人的预后情况^[17-18]。一项多中心胃间质瘤诊治分析研究显示,有6.9%的极低危病人以及14.2%的低危病人术后因疾病进展而死亡^[19]。Aso等^[20]2013年报告了一例直径15 mm的胃间质瘤,在原发病灶手术切除后1年出现肝转移。因此,寻找能够更加准确预测病人预后的分子标志物十分重要。在本研究中,单因素预后分析显示,A2aR表达水平是影响病人预后的重要因素($P=0.002$),A2aR高表达病人的预后较差,多因素预后分析进一步证实,A2aR表达是影响预后的独立危险因素($P=0.039$),提示其有可能成为胃间质瘤预后的指标。

综上所述,A2aR高表达可能促进胃间质瘤的发生发展,并提示病人的不良预后,A2aR可能是预测胃间质瘤预后的一个新的标志物,并且有望成为其治疗的潜在靶点。

参考文献

- [1] Gastrointestinal stromal tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO, 2014, 25 Suppl 3: iii21-6.
- [2] PROSSER RS, YE L, PANDEY A, et al. Activation processes in ligand-activated G protein-coupled receptors: a case study of the adenosine A_{2A} receptor[J]. Bioessays, 2017, 39(9) DOI: 10.1002/bies.201700072.
- [3] LEONE RD, LO YC, POWELL JD. A2aR antagonists: Next generation checkpoint blockade for cancer immunotherapy[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2015, 13: 265-272.
- [4] Risk stratification of patients diagnosed with gastrointestinal stromal tumor[J]. Human pathology, 2008, 39(10): 1411-1419.
- [5] DEMATTEO RP, BALLMAN KV, ANTONESCU CR, et al. Adjuvant imatinib mesylate after resection of localised, primary gastrointestinal stromal tumour: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Lancet, 2009, 373(9669): 1097-1104.
- [6] MEI L, DU W, IDOWU M, et al. Advances and Challenges on Management of Gastrointestinal Stromal Tumors[J]. Frontiers in Oncology, 2018, 8: 135.
- [7] 李烦繁, 胡雪阳. 晚期肠源性间质瘤临床特征和伊马替尼疗效分析[J]. 安徽医药, 2016, 20(9): 1739-1743.
- [8] SHETH S, BRITO R, MUKHERJEA D, et al. Adenosine receptors: expression, function and regulation[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(2): 2024-2052.
- [9] MEDIIVILLA-VARELA M, LUDDY K, NOYES D, et al. Antagonism of adenosine A_{2A} receptor expressed by lung adenocarcinoma tumor cells and cancer associated fibroblasts inhibits their growth[J]. Cancer Biology & Therapy, 2013, 14(9): 860-868.
- [10] KALHAN A, GHARIBI B, VAZQUEZ M, et al. Adenosine A_{2A} and A_{2B} receptor expression in neuroendocrine tumours: potential targets for therapy[J]. Purinergic Signalling, 2012, 8(2): 265-274.
- [11] ETIQUE N, GRILLIER-VUISOZ I, LECOMTE J. Crosstalk between adenosine receptor (A_{2A} isoform) and ERalpha mediates ethanol action in MCF-7 breast cancer cells[J]. Oncology Reports, 2009, 21(4): 977-981.
- [12] ALLARD B, TURCOTTE M, SPRING K, et al. Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis[J]. International Journal of Cancer, 2014, 134(6): 1466-1473.
- [13] KAZEMI MH, RAOOFI MS, HOJJAT-FARSANGI M, et al. Adenosine and adenosine receptors in the immunopathogenesis and treatment of cancer[J]. Journal of Cellular Physiology, 2018, 233(3): 2032-2057.
- [14] OHTA A. A Metabolic immune checkpoint: adenosine in tumor microenvironment[J]. Front Immunol, 2016, 7: 109.
- [15] WEHBI VL, TASKÉN K. Molecular mechanisms for cAMP-mediated Immunoregulation in t cells-role of anchored protein kinase a signaling units[J]. Frontiers in Immunology, 2016, 7: 222.
- [16] SUBRAMANIAN M, KINI R, MADASU M, et al. Extracellular adenosine controls NKT-cell-dependent hepatitis induction[J]. European Journal of Immunology, 2014, 44(4): 1119-1129.
- [17] 王峰, 宋鹏, 汪灏, 等. 284例胃间质瘤临床特征及预后分析[J]. 中华普外科手术学杂志(电子版), 2017, 11(2): 123-126. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-3946.2017.02.012.
- [18] LIU X, CHU KM. Molecular biomarkers for prognosis of gastrointestinal stromal tumor[J]. Clinical & Translational Oncology, 2019, 21(2): 145-151.
- [19] 侯庆生, 罗文强, 李乐平, 等. 山东地区多中心胃胃肠间质瘤诊治分析: GISSG1201研究中期报告[J]. 中华胃肠外科杂志, 2017, 20(9): 1025-1030.
- [20] ASO A, IHARA E, KUBO H, et al. Gastric gastrointestinal stromal tumor smaller than 20 mm with liver metastasis[J]. Clinical Journal of Gastroenterology, 2013, 6(1): 29-32.

(收稿日期: 2018-10-18, 修回日期: 2019-10-11)