

· 论著 ·

# E-钙黏蛋白及黏着斑激酶在直肠癌组织中的表达及意义

张险峰 江应安 于皆平 于红刚

**【摘要】** 目的 探讨 E-钙黏蛋白(E-CD)及黏着斑激酶(FAK)和磷酸化黏着斑激酶(FAK py397)在直肠癌组织中的表达水平及其临床意义。方法 收集 2001 年至 2002 年武汉大学人民医院手术切除的直肠癌及对应癌旁组织石蜡标本 30 例和 2006 年至 2007 年手术切除的直肠癌新鲜标本及对应癌旁组织 35 例,应用免疫组织化学法、Western blot 检测 E-CD、FAK 和 FAK py397 的表达,采用  $\chi^2$  检验分析相关数据。结果 正常直肠黏膜中 E-CD 呈细胞膜阳性表达,直肠癌组织中 E-CD 细胞膜表达缺失,直肠癌组织中 E-CD、FAK 及 FAK py397 的表达与肿瘤分化程度、浸润深度和淋巴结转移有关( $\chi^2 = 7.099, 18.358, 25.612, 12.316, 28.823, 23.168, 8.927, 18.122, 22.620, P < 0.05$ );与年龄、性别无关( $\chi^2 = 0.439, 1.899, 3.676, 0.541, 4.051, 1.135, P > 0.05$ );癌组织和癌旁组织中 FAK 及 FAK py397 表达率分别为 83% (54/65)、68% (44/65)和 31% (20/65)、26% (17/65),两者比较差异有统计学意义( $\chi^2 = 33.707, 34.163, 20.897, P < 0.05$ )。结论 直肠癌组织中 E-CD 细胞膜表达缺失、FAK 和 FAK py397 的表达水平明显升高,与肿瘤分化程度、浸润深度和淋巴结转移有关,可预测肿瘤的生物行为。

**【关键词】** 直肠肿瘤; E-钙黏蛋白; 黏着斑激酶

**Significance and expression of E-cadherin and focal adhesion kinase in rectal cancer** ZHANG Xian-feng, JIANG Ying-an, YU Jie-ping, YU Hong-gang. Digestive Disease Section, Department of Internal Medicine, People's Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: ZHANG Xian-feng, Email: zhangxianfeng208@yahoo.com.cn

**【Abstract】** **Objective** To investigate the significance and expression of E-cadherin (E-CD), focal adhesion kinase (FAK) and FAK py397 in rectal cancer. **Methods** Thirty paraffin specimens of rectal cancer and adjacent tissues collected from 2001 to 2002 and 35 fresh specimens of rectal cancer and adjacent tissues resected from 2006 to 2007 at People's Hospital of Wuhan University were adopted in this study. The expression of E-CD, FAK and FAK py397 was detected by immunohistochemistry and Western blot. All data were analyzed using chi-square test. **Results** E-CD was positively expressed in the membranes of epithelial cells in normal rectal mucosa, while no E-CD expression was found in the membranes of epithelial cells in rectal cancer tissues. There was a significant correlation between the expression of E-CD, FAK, FAK py397 and tumor differentiation, depth of invasion and lymph node metastasis ( $\chi^2 = 7.099, 18.358, 25.612; 12.316, 28.823, 23.168; 8.927, 18.122, 22.620, P < 0.05$ ), while no relationship between the expression of E-CD, FAK, FAK py397 and age, sex was detected ( $\chi^2 = 0.439, 1.899, 3.676; 0.541, 4.051, 1.135, P > 0.05$ ). The expression levels of FAK and FAK py397 were 83% (54/65) and 68% (44/65) in rectal cancer tissues, and were 31% (20/65) and 26% (17/65) in adjacent tissues, with significant difference ( $\chi^2 = 33.707, 34.163, 20.897, P < 0.05$ ). **Conclusion** Lost expression of E-CD in the membrane of rectal cancer tissue and elevated expression of FAK and FAK py397 in the rectal cancer tissue might be related to the invasion and metastasis of rectal cancer, which may predict the biological behavior of rectal cancer.

**【Key words】** Rectal neoplasms; E-cadherin; Focal adhesion kinase

E-钙黏蛋白(E-cadherin, E-CD)是一种钙依赖性黏附分子。研究结果表明 E-CD 表达减少使癌细

胞易发生浸润转移<sup>[1]</sup>。黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)作为一种非受体酪氨酸蛋白激酶,介导细胞外信号由整合素、酪氨酸蛋白激酶受体、G 蛋白偶联受体向细胞内传导,是细胞内多条信号转导通路的交汇点<sup>[2]</sup>。py397 是 FAK 自动磷酸化位点。本研究收集 2001 年至 2002 年我科手术切除的直肠癌及对应癌旁组织石蜡标本 30 例和 2006 年至 2007 年

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2010.02.023

基金项目:国家自然科学基金(30300154)

作者单位:430060 武汉大学人民医院消化内科

通信作者:张险峰,Email: zhangxianfeng208@yahoo.com.cn

手术切除的直肠癌新鲜标本及对应癌旁组织 35 例,探讨 E-CD、FAK 和 FAK py397 在直肠癌中的表达水平及临床意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

本组手术切除的直肠癌及对应癌旁组织石蜡标本 30 例、直肠癌新鲜标本及每例对应远切端的癌旁组织(距肿瘤边缘 >5 cm)35 例。HE 染色证实为直肠癌。全部患者术前未接受放、化疗。TNM 分期采用美国癌症联合委员会标准。全组中男 39 例,女 26 例;年龄 40 ~ 75 岁,平均年龄 61.5 岁。

### 1.2 试剂

小鼠抗 E-CD 多克隆抗体、兔抗 FAK 单克隆抗体、羊抗兔 IgG-HRP、预染蛋白 Marker、Western blot 化学发光试剂盒均购自美国 Santa Cruz 公司;兔抗磷酸化 FAK 多克隆抗体购自美国 Upstate 公司;SP 试剂盒、DAB 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 免疫组织化学方法:**石蜡切片脱蜡、水化;免疫组织化学染色程序按试剂盒说明进行。E-CD、FAK 和 FAK py397 工作液浓度分别为 1:400、1:100 和 1:1000,不进行抗原修复。Triton X-100 孵育 10 min;封闭非特异性抗原。每批均取 1 片用 PBS 取代一抗做阴性对照实验。

**1.3.2 结果判定:**免疫组织化学染色完成后 24 h 内光镜下阅片。E-CD 染色结果以细胞膜 >70% 细胞阳性为正常表达,反之为表达缺失。FAK 及 FAK py397 以细胞质染为淡黄至黄褐色者为阳性细胞,光镜下分析:(1)按切片中细胞显色有无及深浅计分:细胞无显色为 0 分;浅黄色为 1 分;棕黄色为 2 分;棕褐色为 3 分。(2)按切片中显色细胞的比例评分:显色肿瘤细胞占切片中肿瘤细胞总数 25% 以下为 1 分;26% ~ 75% 肿瘤细胞显色为 2 分;76% 以

上肿瘤细胞显色为 3 分。每例肿瘤积分 = (1) × (2),按积分高低分为:阴性积分为 0 分;阳性积分为 1 ~ 4 分;强阳性积分为 >4 分。

**1.3.3 Western blot 检测:**35 例直肠癌新鲜标本及对应癌旁组织中取 15 例冻存的直肠癌组织及对应癌旁组织各 100 mg,用组织裂解液(50 mmol/L Tris-HCl,150 mmol/L NaCl,1% 脱氧胆酸钠,1% NP40,1% SDS, Aprotinin、Leupatin、Pepstatin 均为 1 g/L, PMSF 1 mmol/L)1 ml 匀浆,离心后取上清液,用 Bradford 法进行蛋白定量。各取 20 μg 经 10% SDS-PAGE 电泳后转移至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,随之与 E-CD 抗体、FAK 抗体及 FAK py397 抗体孵育,4 °C 过夜,羊抗兔 IgG-HRP 室温反应 2 h,用化学发光试剂盒对反应产物进行检测,X 线胶片摄片。

### 1.4 统计学分析

应用 SPSS 11.0 统计软件进行分析,采用  $\chi^2$  检验分析相关数据。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

E-CD 在正常直肠黏膜中表达定位于细胞膜(图 1)。FAK 在直肠癌组织中表达定位于细胞质,呈弥漫性或颗粒状(图 2)。FAK py397 在直肠癌组织中表达也定位于细胞质,呈局限性(图 3)。E-CD、FAK 及 FAK py397 的表达在肿瘤分化、浸润深度和淋巴结转移中差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),与患者性别、年龄、远处转移无关(表 1)。E-CD、FAK 及 FAK py397 在癌组织与癌旁组织中表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(表 2)。

E-CD 与 FAK 同为阴性者 2 例,同为阳性者 9 例,E-CD 阴性 FAK 阳性者 45 例,E-CD 阳性 FAK 阴性者 9 例。E-CD 与 FAK py397 同为阴性者 8 例,同为阳性者 5 例,E-CD 阴性 FAK py397 阳性者 39 例,E-CD 阳性 FAK py397 阴性者 13 例。

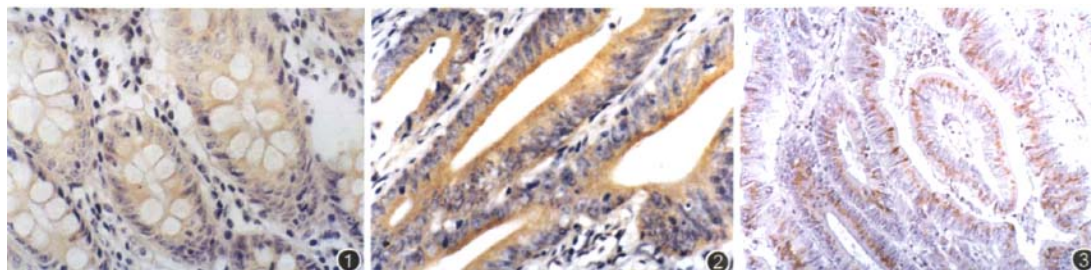


图 1 E-CD 在正常直肠黏膜中表达定位于细胞膜,呈棕黄色颗粒沉着 SP×400 图 2 FAK 在直肠癌组织中表达定位于细胞质,呈弥漫性或颗粒状 SP×400 图 3 FAK py397 在直肠癌组织中表达定位于细胞质,呈局限性 SP×400

表 1 直肠癌组织中 E-CD、FAK 及 FAK py397 的表达及与各临床病理参数的关系(例)

| 临床病理参数         | 例数 | E-CD |    | $\chi^2$ 值 | P 值   | FAK |    |     | $\chi^2$ 值 | P 值   | FAK py397 |    |     | $\chi^2$ 值 | P 值   |
|----------------|----|------|----|------------|-------|-----|----|-----|------------|-------|-----------|----|-----|------------|-------|
|                |    | 阴性   | 阳性 |            |       | 阴性  | 阳性 | 强阳性 |            |       | 阴性        | 阳性 | 强阳性 |            |       |
| 年龄(岁)          |    |      |    |            |       |     |    |     |            |       |           |    |     |            |       |
| ≥50            | 35 | 27   | 8  | 0.439      | >0.05 | 5   | 10 | 20  | 1.899      | >0.05 | 11        | 9  | 15  | 3.676      | >0.05 |
| <50            | 30 | 20   | 10 |            |       | 6   | 12 | 12  |            |       | 10        | 10 | 10  |            |       |
| 性别             |    |      |    |            |       |     |    |     |            |       |           |    |     |            |       |
| 男              | 39 | 30   | 9  | 0.541      | >0.05 | 4   | 16 | 19  | 4.051      | >0.05 | 14        | 12 | 13  | 1.135      | >0.05 |
| 女              | 26 | 17   | 9  |            |       | 7   | 6  | 13  |            |       | 7         | 7  | 12  |            |       |
| 分化程度           |    |      |    |            |       |     |    |     |            |       |           |    |     |            |       |
| 高              | 14 | 7    | 7  | 7.099      | <0.05 | 7   | 4  | 3   | 18.358     | <0.05 | 10        | 3  | 1   | 25.612     | <0.05 |
| 中              | 25 | 17   | 8  |            |       | 4   | 6  | 15  |            |       | 11        | 4  | 10  |            |       |
| 低              | 26 | 23   | 3  |            |       | 0   | 12 | 14  |            |       | 0         | 12 | 14  |            |       |
| TNM 分期         |    |      |    |            |       |     |    |     |            |       |           |    |     |            |       |
| T <sub>1</sub> | 7  | 3    | 4  | 12.316     | <0.05 | 4   | 3  | 0   | 28.823     | <0.05 | 6         | 1  | 0   | 23.168     | <0.05 |
| T <sub>2</sub> | 8  | 5    | 3  |            |       | 4   | 3  | 1   |            |       | 5         | 3  | 0   |            |       |
| T <sub>3</sub> | 25 | 15   | 10 |            |       | 1   | 12 | 12  |            |       | 7         | 9  | 9   |            |       |
| T <sub>4</sub> | 25 | 24   | 1  |            |       | 2   | 4  | 19  |            |       | 3         | 6  | 16  |            |       |
| N <sub>0</sub> | 27 | 15   | 12 | 8.927      | <0.05 | 7   | 14 | 6   | 18.122     | <0.05 | 17        | 6  | 4   | 22.620     | <0.05 |
| N <sub>1</sub> | 18 | 13   | 5  |            |       | 3   | 6  | 9   |            |       | 3         | 7  | 8   |            |       |
| N <sub>2</sub> | 20 | 19   | 1  |            |       | 1   | 2  | 17  |            |       | 1         | 6  | 13  |            |       |
| M <sub>0</sub> | 35 | 27   | 8  |            |       | 6   | 13 | 16  |            |       | 12        | 12 | 11  |            |       |
| M <sub>1</sub> | 30 | 20   | 10 | 0.439      | >0.05 | 5   | 9  | 16  | 0.436      | >0.05 | 9         | 7  | 14  | 1.730      | >0.05 |
| 合计             | 65 | 47   | 18 |            |       | 11  | 22 | 32  |            |       | 21        | 19 | 25  |            |       |

Western blot 检测 15 例癌组织及对应癌旁组织中 E-CD、FAK、FAK py397 的表达。其中 4 例癌组织中有 E-CD 表达,癌旁组织均有 E-CD 表达。12 例癌组织中有 FAK 表达,5 例癌旁组织中有 FAK 表达;9 例癌组织中有 FAK py397 表达,5 例癌旁组织中有 FAK py397 表达。两者癌组织表达强度明显高于癌旁组织。

表 2 E-CD、FAK 及 FAK py397 在直肠癌和对应癌旁组织的阳性表达率(例,%)

| 组织         | 例数 | E-CD    | FAK     | FAK py397 |
|------------|----|---------|---------|-----------|
| 直肠癌组织      | 65 | 18 (28) | 54 (83) | 44 (68)   |
| 癌旁组织       | 65 | 52 (80) | 20 (31) | 17 (26)   |
| $\chi^2$ 值 |    | 33.707  | 34.163  | 20.879    |
| P 值        |    | <0.05   | <0.05   | <0.05     |

3 讨论

E-CD 作为肿瘤抑制分子,可通过介导细胞间接接触黏附,从而抑制肿瘤细胞转移。它与  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -Catenin 和 PI20ctn 等结合形成钙黏和素-连环素复合体,并与肌动蛋白细胞骨架相连,通过介导细胞

黏附和信号转导,参与调节组织发生和形态分化,对细胞识别、迁移、归类等行为及细胞命运发挥重要作用。多种上皮源性的肿瘤细胞 E-CD 分子表达明显减少或功能缺陷,且其与肿瘤细胞的侵袭转移显著相关<sup>[3]</sup>。吴泽宇等<sup>[4]</sup>研究发现,E-CD 丢失促进了胃癌的浸润转移。本研究结果证实 E-CD 细胞膜表达缺失与肿瘤分化程度、浸润深度和淋巴结转移密切相关。E-CD 细胞膜表达缺失可能参与了肿瘤的形成,降低了同种细胞间的黏附作用,促进肿瘤的侵袭和转移。目前已知的 E-CD 表达调控因素有基因突变,启动子周围甲基化和酪氨酸磷酸化<sup>[5]</sup>。

FAK 是 Schaller 于 1992 年在丝氨酸转化细胞的磷酸化蛋白中发现的能使 Src 内源性蛋白酪氨酸激酶激活的主要底物。FAK 表达可以促进肿瘤细胞的浸润和转移<sup>[6]</sup>。本研究结果表明 FAK 和 FAK py397 的表达与肿瘤分化程度、浸润深度和淋巴结转移有关。FAK 的自磷酸化位点 py397 的磷酸化是提高细胞运动能力的一个关键事件。研究结果表明将反义寡核苷酸引入 MHCC97 肝癌细胞或用 Genistein 抑制 MHCC97 肝癌细胞 FAK 磷酸化表达,可使此细胞株黏膜侵袭活力下降<sup>[7]</sup>。这表明磷酸

化 FAK 有重要作用。

实验结果还表明检测 E-CD、FAK 的表达可预测肿瘤播散的可能性,尤其是肿瘤的分化程度、浸润深度和淋巴结转移。通过反义技术抑制 FAK 的表达或通过 FRNK 阻止 FAK 信号的传递可减少肿瘤细胞的迁移<sup>[8]</sup>。这使得 FAK 还可能成为一个治疗靶点。酪氨酸磷酸化抑制剂 Qu 和 Lu 处理的肿瘤细胞 FAK 磷酸化水平明显降低, MMP 也平行减少,影响肿瘤细胞的浸润潜能,说明抑制 FAK 的磷酸化可能抑制肿瘤细胞浸润<sup>[9]</sup>。这也是治疗肿瘤的新思路。

本研究结果证实直肠癌组织中 E-CD 细胞膜表达缺失与 FAK 及 FAK py397 有关, FAK 可能抑制了 E-CD 细胞膜的表达。有报道认为胃泌素通过磷酸化 FAK py397 和活化 FAK 通路而影响细胞中 E-钙黏蛋白、 $\beta$ -连环蛋白复合物的再分布,导致细胞黏附能力降低,引起一些转录因子的活化,促进肿瘤细胞容易从原位浸润和向远处转移<sup>[10]</sup>。Avizienyte 等<sup>[11]</sup>的研究结果表明,在人类 KMRC 结肠癌细胞, Src 介导的 E-CD 的下调需要整合素调控的 FAK 磷酸化,即 FAK 活性的提高可导致 E-CD 表达下调。这提示整合素诱导的 FAK 磷酸化信号传导与 E-CD 介导的细胞间黏附有密切关系。

E-CD、FAK 及 FAK py397 的表达与直肠癌细胞的分化程度、肿瘤的浸润深度和淋巴结转移有关, E-CD 细胞膜表达缺失、FAK 及 FAK py397 的过度表达将加速直肠癌细胞的增殖,促进直肠癌的浸润和转移。这对预测肿瘤的生物行为,指导临床治疗有重要意义。

# 参考文献

- [1] Aoki R, Yasuda M, Torisu R, et al. Relationship between lymph node metastasis and E-cadherin expression in submucosal invasive gastric carcinomas with gastric-phenotype. J Med Invest, 2007, 54 (1/2): 159 - 167.
- [2] Schaller MD. Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. Biochim Biophys Acta, 2001, 1540 (1): 1 - 21.
- [3] Shibata T, Hirohashi S. E-cadherin cell adhesion system in human cancer. Seikagaku, 2006, 78(7): 647 - 656.
- [4] 吴泽宇, 李靖华, 詹文华, 等. 胃癌组织中 MMP-2 和 E-cadherin 的表达及意义. 中华消化外科杂志, 2007, 6(1): 61 - 63.
- [5] Kwon GY, Yoo BC, Koh KC, et al. Promoter methylation of E-cadherin in hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules. J Korean Med Sci, 2005, 20(2): 242 - 247.
- [6] Canel M, Secades P, Rodrigo JP, et al. Overexpression of focal adhesion kinase in head and neck squamous cell carcinoma is independent of fak gene copy number. Clin Cancer Res, 2006, 12 (11 Pt 1): 3272 - 3279.
- [7] 朱晨芳, 顾岩, 王兵. FAK 阻断对 MHCC97 肝癌细胞侵袭性的影响. 肝脏, 2005, 10(3): 220 - 221.
- [8] 曹俊, 于皆平, 刘超红, 等. hFRNK 基因转移对结肠癌细胞中 E-钙黏素/ $\beta$ -连环素复合物的影响. 中华肿瘤杂志, 2007, 29 (5): 346 - 350.
- [9] Lee LT, Huang YT, Hwang JJ, et al. Transinactivation of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and focal adhesion kinase phosphorylation by dietary flavonoids: effect on invasive potential of human carcinoma cells. Biochem Pharmacol, 2004, 67 (11): 2103 - 2114.
- [10] 曹俊, 于皆平, 周岚, 等. 胃泌素对结肠癌细胞中粘着斑激酶通路下游 E-钙黏蛋白/ $\beta$ -连环蛋白复合物的影响. 中华消化杂志, 2006, 26(12): 813 - 817.
- [11] Avizienyte E, Wyke AW, Jones RJ, et al. Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signaling. Nat Cell Biol, 2002, 4(8): 632 - 638.

(收稿日期: 2009-11-27)

(本文编辑: 陈敏)

## 广告目次

深圳健安医药有限公司 ..... 封二  
阿斯利康制药有限公司 ..... 对封二  
强生(上海)医疗器械有限公司 ..... 对导读  
深圳万和制药有限公司 ..... 对中文目次 1  
深圳市瑞霖医疗器械有限公司 ..... 对中文目次 2

绵阳立德电子技术有限公司 ..... 对英文目次 1  
盖天力药业 ..... 对英文目次 2  
深圳翰宇药业股份有限公司 ..... 对正文  
西赛尔企业公司 ..... 封三  
江苏先声药业有限公司 ..... 封底