肿瘤分子学相关研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0833-04

结肠癌 α-catenin 和 FAK 的表达与侵袭转移的关系

王吉明[1],程 勇[1],董蒲江[2],胡 祥[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院胃肠外科,2. 重庆市普通外科学重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 α-catenin 和黏着斑激酶(Focal adhesion kinase,FAK)在结肠癌中的表达特点及临床意义。方法:分别应用免疫组化、Western blot 方法来检测 34 例结肠癌患者肿瘤组织及相应正常组织的 α-catenin 和 FAK 的表达。结果:α-catenin 和 FAK 在肿瘤组织和正常组织中均有表达,主要表达于细胞膜和细胞浆。α-catenin 的表达在肿瘤组织中明显低于正常组织(t=10.693,P<0.01),FAK 在肿瘤组织中的表达明显高于正常组织(χ^2=10.350,P=0.001),两者在肿瘤组织中的表达呈弱负相关(Pearson 相关系数为−0.383,P=0.025)。α-catenin 和 FAK 的表达在结肠癌 TNM 分期、有无远处转移、和有无淋巴转移方面差异有显著意义(P<0.01),与患者的年龄、性别之间未发现关系。α-catenin 的表达在肿瘤的病理组织分化程度方面差异亦有显著意义,FAK 在不同肿瘤病理组织分化程度之间表达没有统计学意义。结论:肿瘤组织中 FAK 的高表达与 α-catenin 的低表达,共同在结肠癌的发生发展过程中扮演着重要角色。

【关键词】结肠癌;α-连接蛋白;黏着斑激酶;转移

【中国图书分类法分类号】R735.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-22

Expression of α-catenin and focal adhesion kinase in human colon carcinoma and their relationship with tumor invasion and metastasis

WANG Ji-ming, et al

(*Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of α-catenin and focal adhesion kinase (FAK) in colon carcinoma and to reveal their correlation with tumor clinicopathological features. *Methods*: The expression of α-catenin and FAK in tumor tissue and normal tissue of 34 colon carcinoma patients were detected by immunohistochemistry and Western blot. *Results*: The expression of α-catenin and FAK were detected both in tumor tissue and normal tissue, mostly in plasmalemma and endochylema. The expression of α-catenin was significantly lower in tumor tissue than that in normal tissue(t=10.693, P<0.01), but the expression of FAK was higher in tumor tissue than that in normal tissue(χ^2=10.350, P=0.001). A weak negative correlation was found between FAK and α-catenin (Pearson correlation coefficient=−0.383, P=0.025). The expression of α-catenin and FAK were significantly correlated with TNM staging, distant metastasis and lymph node metastasis of colon carcinoma (P<0.01), but not with the sex and age of patients. The expression of α-catenin was also related to tumor differentiation status, but the expression of FAK was not statisticaly significant in different tumor differentiation status. *Conclusion*: The overexpression of FAK and the reduced expression of α-catenin in tumor tissue play an important role in the tumorigenesis and progression of colon carcinoma.

【Key words】Colonic neoplasms; α-catenin; Focal adhesion kinase; Neoplasm metastasis

随着生活水平的提高,结肠癌的发病率在逐年增加,且发病年龄在年轻化,侵袭和转移是导致结肠癌患者临床治疗失败和死亡的主要原因之一。肿瘤侵袭转移是一个多步骤、多因素参与的极其复杂的过程。研究显示,α-catenin 和黏着斑激酶(Focal adhesion kinase,FAK)在多种肿瘤组织中表达,参与肿瘤的发生与侵袭转移,在结肠癌中的研究,国内外文献报道很少。我们分别应用免疫组化、Western blot 方法来检测 34 例患者结肠癌组织及相应正常组织的 α-catenin 和 FAK 的表达,分析它们在结肠癌中的表达特点及临床意义,探讨结肠癌侵袭转移的机制。

作者介绍:王吉明(1982-),男,硕士,
研究方向:胃肠肿瘤诊断与治疗。

通讯作者:程 勇,男,副教授,E-mail:chengyongcq@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 临床标本

选取重庆医科大学第一附属医院胃肠外科 2007 年 11 月至 2008 年 4 月 34 例结肠癌根治术肿瘤标本及距肿瘤边缘 5 cm 以上的邻近正常结肠黏膜组织，术前均未进行抗肿瘤治疗，其中男性 22例，女性 12 例；年龄 32～70 岁，中位年龄 49 岁；组织学类型均为腺癌，低分化 9 例，中分化 14 例，高分化 11 例；国际 TNM 分期（1997 年）：Ⅰ期 3 例，Ⅱ期 10 例，Ⅲ期 8 例，Ⅳ期 13 例；有淋巴结转移 20 例，无淋巴结转移 14 例；有远处器官转移 13 例，无远处器官转移的 21 例。

1.2 主要试剂

免疫组化染色试剂盒 SP-9000、浓缩性 DAB 试剂盒及 FAK（H-1）鼠单克隆抗体（编号：SC-1688）、HRP 标记二抗（山羊抗小鼠、山羊抗兔）为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。α-catenin 兔多克隆抗体购自武汉博士德生物技术有限公司。SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、ECL 化学发光显色试剂盒、β—Actin 抗体（AA128）、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自海门市碧云天生物技术研究所。全蛋白提取试剂盒、5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.3 免疫组化染色

所有标本经 4%多聚甲醛固定，常规石蜡包埋，4 μm 切片，每例均行 HE 染色，脱蜡水化后行免疫组化 S-P 法染色，切片均采用微波抗原修复，其余步骤参照试剂盒说明进行。每例标本均对癌组织和正常结肠粘膜染色进行对比。

1.4 Western blot 检测

将标本在手术离体后立即去掉坏死组织、血块，于 15 min 内迅速投入液氮冷冻后置 -80℃冰箱保存。①组织蛋白提取：取新鲜结肠标本 100 mg 于预冷的匀浆器中，用干净的剪刀将组织块尽量剪碎，加入预冷的细胞裂解液，置于冰上匀浆 30 min，将样品转移到离心管中，4℃下 12 000 r/min 离心 4 min，收集上清液分装，用 BCA 方法对所抽提的蛋白质进行蛋白定量，将样品调整为相同蛋白浓度。相同体积的蛋白样品，加入 4×上样缓冲液至终浓度为 1×，100℃煮 5 min。②配制 8%分离胶和 5%浓缩胶，加样电泳，然后将蛋白转印于 PVDF 膜，5%脱脂奶粉封闭膜 1 h 后加入 α-catenin 抗体（抗体稀释度 1:160）或 FAK 抗体（抗体稀释度 1:200），β-Actin 抗体（1:1 000），4℃过夜，TBST 洗膜 3 次，HRP 标记山羊抗兔 IgG（抗体稀释度 1:2 000）或山羊抗小鼠 IgG（抗体稀释度 1:2 000）37℃反应 1 h，洗膜后 ECL 超敏化学发光法显色，凝胶分析系统分析记录条带光密度。图像分析系统分析，将每个样本 α-catenin 和 FAK 的积分光密度值与 β-actin 的积分光密度值相比，分别得出积分光密度比值，以比值代表它们的蛋白质含量。

1.5 统计学处理

统计软件使用 SPSS13.0 版本，计量资料以算术平均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用 t 检验，计数资料采用 χ^2 检验，相关分析采用 pearson 相关分析，以 $P<0.05$ 判为差异有显著性意义，$P<0.01$ 为差异有非常显著性。

2 结 果

2.1 a-catenin 和 FAK 的免疫组化结果

实验结果发现：α-catenin 在正常结肠粘膜一致表达，定位于上皮细胞的细胞膜连接处，在结肠癌组织中定位于细胞膜和细胞浆，呈较均一的棕黄色或棕褐色颗粒，并且同一患者着色程度和阳性细胞总数低于正常结肠粘膜上皮细胞（图 1～2，同一患者）。FAK 阳性颗粒亦定位于结肠癌组织和正常组织的细胞膜和细胞浆，呈较均一的棕黄色或棕褐色颗粒，主要表达于结肠癌组织中。FAK 在结肠癌组织中多着色较深，而在正常组织中着色浅（图 3～4，同一患者）。

2.2 α-catenin 和 FAK 的 Western blot 结果

实验结果发现：α-catenin 和 FAK 在结肠癌及正常黏膜都表达（图 5）。α-catenin 在结肠癌组织和正常组织的积分光密度值平均值分别为 0.509±0.106 与 0.340±0.128，其表达活性在结肠癌组织中明显低于正常组织（$t=10.693$，$P<0.01$）。FAK 在结肠癌组织和正常组织的阳性表达率分别为 94.1%与 61.8%，肿瘤组织中的 FAK 表达活性显著高于正常组织（$\chi^2=10.350$，$P=0.001$）。α-catenin 和 FAK 的表达与结肠癌 TNM 分期、有无远处转移、和有无淋巴转移相关（$P<0.01$），与患者的年龄、性别之间未发现关系，且 α-catenin 的表达与肿瘤的病理组织分化程度亦相关，FAK 在不同肿瘤病理组织分化程度之间表达没有统计学意义（表 1）。α-catenin 和 FAK 在结肠癌中的表达统计分析是一种弱负相关关系。（Pearson 相关系数为—0.383，$P=0.025$）。

3 讨 论

肿瘤的侵袭与转移步骤为瘤细胞脱离原发灶，通过浸润在周围组织中生长，并与局部毛细血管或淋巴管内皮细胞密切接触并穿过其管壁，被转运到靶组织，再穿透毛细血管或淋巴管壁，在基质中增生形成新的继发瘤，或突入腔道（如浆膜腔），象播种一样种植在体腔其他器官的表面，形成多个转移灶。细胞间的粘附抑制可以触发肿瘤细胞脱离原发灶，使肿瘤细胞获得侵袭转移特性，而 α-catenin 和 FAK 在保持细胞粘附中起着重要作用。

α-catenin 是一类粘附分子相关蛋白，与 β-catenin、γ-catenin 等再结合 E-cadenin 胞内段结合形成钙黏和素-连环素复合体（Cadherin-catenin complex，CCC），并与肌动蛋白细胞骨架相连，通过

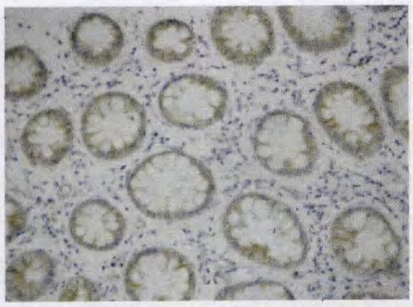


图 1 α-catenin 在正常结肠粘膜阳性表达（SP×400）

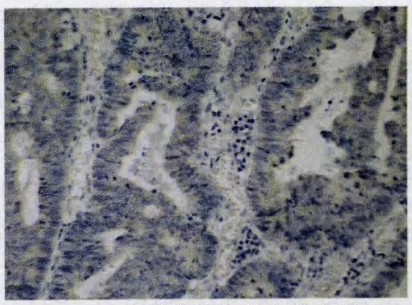


图 2 α-catenin 在结肠癌组织阳性表达（SP×400）

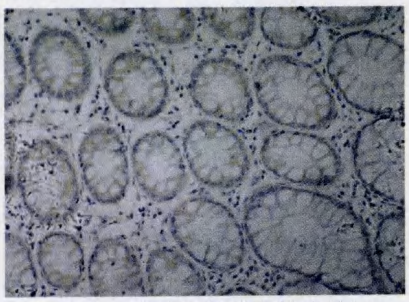


图 3 FAK 在正常结肠粘膜阳性表达（SP×400）

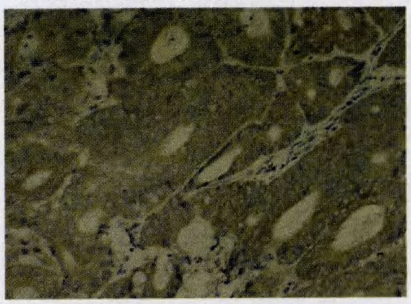


图 4 FAK 在结肠癌组织阳性表达（SP×400）

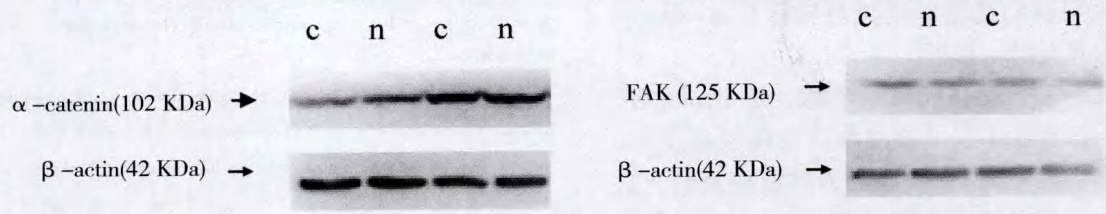


图 5 Western blot 显示 α-catenin 和 FAK 在癌组织（c）与正常组织中(n)的表达差异

表 1 α-catenin 和 FAK 的表达与结肠癌临床特征的关系

临床病理		例数	积光密度比（$\bar{x} \pm s$）		t/p 值	
			a-catenin/β-Actin	FAK/β-Actin	a-catenin	FAK
性别						
	男	22	0.360 ± 0.121	0.245 ± 0.070	1.241/*P*=0.224	1.739/*P*=0.092
	女	12	0.303 ± 0.138	0.292 ± 0.085		
年龄						
	>50	16	0.373 ± 0.151	0.240 ± 0.073	1.414/*P*=0.167	1.575/*P*=0.125
	<50	18	0.311 ± 0.100	0.281 ± 0.078		
TNM 分期						
	Ⅰ+Ⅱ	13	0.418 ± 0.119	0.219 ± 0.068	3.126/*P*<0.01	2.760/*P*=0.009
	Ⅲ+Ⅳ	21	0.292 ± 0.111	0.288 ± 0.073		
淋巴结转移						
	有	20	0.272 ± 0.095	0.297 ± 0.072	4.811/*P*<0.01	3.733/*P*=0.001
	无	14	0.438 ± 0.105	0.211 ± 0.056		
远处转移						
	有	13	0.236 ± 0.075	0.321 ± 0.073	4.794/*P*<0.01	4.374/*P*<0.01
	无	21	0.404 ± 0.111	0.224 ± 0.056		
分化程度						
	高分化	11	0.455 ± 0.106	0.240 ± 0.077	*P*<0.05*	*P*>0.05*
	中分化	14	0.334 ± 0.082	0.261 ± 0.081		
	低分化	9	0.209 ± 0.073	0.288 ± 0.075		

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[1]。如果它们的结构、功能异常,可能影响细胞的粘附性,从而促使肿瘤发生侵袭转移[2]。近年来很多学者研究表明,α-catenin 是一种抑制肿瘤浸润和转移的分子,它的异常可以促使细胞离解、肿瘤细胞的浸润性增加,从而增加远处转移的可能性。早期胃癌[3],胰腺癌[4]等多种肿瘤存在 α-catenin 的异常表达,与肿瘤细胞的分化、浸润转移密切相关。本实验通过免疫组化染色观察和 Western blot 检测显示,α-catenin 在正常结肠粘膜一致表达定位于上皮细胞的细胞膜连接处,在结肠癌组织中定位于细胞膜和细胞浆,结肠癌组织表达活性明显低于在正常组织中的表达,并且其表达活性随着肿瘤的 TNM 分期的升高、淋巴结转移、分化程度的降低和远处转移而降低,而与年龄、性别等因素无关,这说明肿瘤细胞的侵袭与转移与 α-catenin 表达活性的降低是一致的。

FAK 是一种非受体酪氨酸激酶,是 Hanks 等[5]从 v-src 转染的鸡胚成纤维细胞中克隆鉴定出来,因与细胞黏附关系密切,故命名为黏着斑激酶。它是细胞内多条信号转导途径的交汇点,对调节细胞的黏附、增殖和凋亡等生物学行为极为重要。在肝癌[6]、胃癌[7]、食管癌[8]等多种恶性肿瘤组织的研究中发现,FAK 均有不同程度的过表达,并与肿瘤的侵袭转移密切相关,可能与如下原因有关:①过度表达的 FAK 通过信号传导作用,使肿瘤细胞在缺乏黏附的情况下,不会发生失巢凋亡,促进癌细胞的侵袭和转移能力[9]。②FAK 能介导细胞骨架蛋白的集聚和解聚,调节黏着斑的形成、解离,高表达的 FAK 促使细胞黏附及迁移活动更为活跃,癌细胞更具侵袭性[10]。③FAK 可以通过 FAK/MAKP 途径,影响整合素与配体的亲和力变化,进一步增强细胞的迁移能力[11]。④FAK 能通过刺激 MMP-2/MMP-9 的分泌,促使癌细胞周围基质的降解,更有利于肿瘤的生长、浸润[12]。在本实验中,我们发现 FAK 在肿瘤组织和正常组织中均有表达,但主要表达于肿瘤组织,主要定位于细胞膜和细胞浆。FAK 在肿瘤组织中的表达活性明显高于正常组织,并且其表达活性随着肿瘤的 TNM 分期的升高、淋巴结转移、远处转移而升高,而与病理分化程度,年龄、性别未发现关系,这表明 FAK 在结直肠癌中的高表达,也促进了肿瘤细胞的侵袭与转移。

总之,随着肿瘤的 TNM 分期的升高、淋巴结转移、远处转移,α-catenin 表达活性降低,FAK 表达活性的增加,它们在结肠癌的发生发展中共同扮演了重要的角色,统计分析显示一种较弱负相关关系。这提示我们,分析 α-catenin、FAK 在肿瘤中的表达活性,有助于评价肿瘤的侵袭转移能力,并且通过 α-catenin 调节 CCC 粘附功能,能为抑制肿瘤侵袭转移,提供新的治疗手段。FAK 可能也是非常好的肿瘤治疗新靶点,降低 FAK 的表达活性可以阻断多条与肿瘤侵袭转移相关的信号通路。

参 考 文 献

[1] Benjamin JM, Nelson WJ. Bench to bedside and back again: Molecular mecha nisms of alpha-catenin function and roles in tumorigenesis[J]. Semin Cancer Biol, 2008, 18(1): 53-64.

[2] Brunner EC, Romeike BF, Jung M, et al. Altered expression of beta-catenin/E-cad herin in meningiomas[J]. Histopathology, 2006, 49(2): 178-187.

[3] Joo YE, Rew JS, Choi SK, et al. Expression of e-cadherin and catenins in early gastric cancer[J]. J Clin Gastroenterol, 2002, 35(1): 35-42.

[4] Li YJ, Meng YX, Ji XR. Relationship between expressions of E-cadherin and alpha-catenin and biological behaviors of human pancreatic cancer[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2003, 2(3): 471-477.

[5] Sakamoto Y, Ogita H, Hirota T, et al. Interaction of integrin alpha(v) beta3 with nectin. Implication in cross-talk between cell-matrix and cell-cell junctions[J]. J Biol Chem, 2006, 281(28): 19631-19644.

[6] Itoh S, Maeda T, Shimada M. Role of expression of focal adhesion kinase in progresssion of hepatocellular carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(8): 2812-2817.

[7] Su JM, Gui L, Zhou YP, et al. Expression of focal adhesion kinase and alpha5 and beta1 integrins in carcinomas and its clinical significance [J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(4): 613-618.

[8] Miyazaki, T, Kato H, Nakajima M, et al. FAK overexpression is correlated with tumour invasiveness and lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma[J]. Br J Cancer, 2003, 89(1): 140-145.

[9] *Duxbury MS, Ito H, Zinner MJ, et al. Focal adhesion kinase gene silencing promotes anoikis and suppresses metastasis of human pancreatic adenocarcinoma cells[J]. Surgery, 2004, 135(5), 555-562.*

[10] Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6(1): 56-68.

[11] Crowe DL, Ohannessian A. Recruitment of focal adhesion kinase and paxillin to beta1 integrin promotes cancer cell migration via mitogen activated protein kinase activation[J]. BMC Cancer, 2004, 4(1): 18.

[12] Sein TT, Thant AA, Hiraiwa Y, et al. A role for FAK in the Concanavalin A-dependent secretion of matrix metalloproteinase-2 and-9[J]. Oncogene, 2000, 19(48): 5539-5542.

(责任编辑:关蕴良)