维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)07-0792-04

信号接头蛋白 Crk 在子宫颈癌组织中的表达和意义

阴传敏,姚珍薇,令狐华

(重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究信号接头蛋白 Crk 在宫颈癌及其癌前病变组织中的表达,探讨 Crk 在宫颈癌发生发展中的作用。方法:采用免疫组化 SP 法检测 20 例正常宫颈组织、27 例宫颈上皮内瘤样病变(Cervial intraepithelial neoplasias,CINs)和 50 例宫颈癌切片中 Crk 蛋白的表达水平。结果:Crk 蛋白在宫颈癌组织中的阳性表达率为 68%,高于 CINs 的 40.7%和正常宫颈组织的 10%,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:Crk 可能在宫颈癌的生长、侵润及转移过程中起重要作用,有望作为反映宫颈癌恶性潜能的新指标。

【关键词】宫颈上皮内瘤样病变;宫颈癌;Crk 蛋白

【中国图书分类法分类号】R737.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-07

The expression and significance of signaling adaptor protein Crk in cervix cancer

YING Chuan-min, et al

(*Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of signaling adaptor protein Crk in cervix cancer, cervical intraepithelial neoplasias (CINs) and normal cervix, and evaluate their relationship with the invasive and metastatic capacity of cervical carcinoma. *Methods*: Expression of Crk protein was detected by immunostaining in 20 cases of normal cervix, 27 cases of CINs and 50 cases of cervix cancer. *Result*: Immunostaining revealed that Crk protein was expressed in 68% of cervix cancer, 40.7% of CINs and 10% of normal cervix. *Conclusion*: Over-expression of Crk may play an important role in the development of CINs and cervix cancer. Crk could be used a malignant biomarker of cervix cancer.

【Key words】 CIN; Cervix neoplasms; Crk

Crk 是一种重要的信号接头蛋白,能够同受体酪氨酸激酶和整合蛋白等多种信号分子结合,广泛参与细胞内不同信号途径的信号转导[1]。目前,发现 Crk 在多种恶性肿瘤中表达明显增加,并促使肿瘤细胞增殖、转移和侵袭[2,3]。在宫颈癌中信号接头蛋白 Crk 的研究在国内外未见报道。本文对宫颈癌,宫颈上皮内瘤样病变 (Cervical intraepithelial neoplasias, CINs), 正常宫颈组织进行了 Crk 蛋白表达的检测和分析, 并检测了 CINs 患者宫颈 HPV-DNA 的含量, 以了解 CINs 中宫颈高危型 HPV 感染与信号接头蛋白 Crk 的表达是否有相关性,探讨 Crk 在宫颈癌发生发展过程中的作用及作为反映宫颈癌恶性潜能指标的价值。

作者介绍: 阴传敏(1976-),女,硕士,
研究方向:妇科肿瘤及内分泌。

通讯作者: 姚珍薇,女,教授,E-mail:a68892986@cta.cq.cn。

1 材料和方法

1.1 标本来源

20 例正常宫颈组织收集于 2005 年 4 月至 2006 年 7 月间四川省宜宾市第二人民医院病理科石蜡存档标本。27 例宫颈上皮内瘤变组织(CINs),包括 8 例 CIN Ⅰ、6 例 CIN Ⅱ、13 例 CIN Ⅲ,取材于 2005 年 4 月至 2006 年 9 月重庆市肿瘤医院病理科石蜡存档标本,取材前患者的宫颈分泌物均用杂交捕获二代方法(HC-Ⅱ)定量检测宫颈高危型 HPV-DNA 的含量。50 例宫颈癌患者,年龄 23~75 岁,平均年龄 48 岁,其中 46 例为鳞癌、3 例为腺癌、1 例为腺鳞癌。按 FIGO 分期(1988 年):Ⅰ期 14 例、Ⅱ期 20 例、Ⅲ期 16 例;按组织学分级,高中低分化各为 11、20、19 例。正常宫颈组织为子宫肌瘤、子宫腺肌病行全子宫切除的手术标本。所有标本均经病理学诊断确定,10%福尔马林固定, 石蜡包埋,4 μm 连续切片。各例标本在取材前均未接受放疗、化疗以及物理治疗。

1.2 试剂

维普资讯 http://www.cqvip.com

Crk 多克隆抗体购自美国 BD 公司,免疫组化试剂盒(SP9000 kit)和显色试剂盒(DAB kit)购自北京中杉生物试剂公司,其余试剂为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化方法 采用链酶素亲和生物素-过氧化物酶法(SP 法)进行免疫组织化学染色。常规脱蜡至水。3%双氧水封闭内源性过氧化酶 10min,微波加热抗原修复 10min。血清封闭后滴加 Crk 多克隆抗体(稀释浓度 1/100),4℃孵育过夜。滴加二抗,37℃孵育 20min。滴加辣根过氧化物酶标记链霉素亲和生物素,37℃孵育 15min。DAB 显色,苏木精复染,常规脱水透明封片。用乳腺癌的 Crk 阳性表达的切片作阳性对照,以 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照。

1.3.2 HPV-DNA 检测方法 在 27 例 CINs 患者取宫颈活检前,采用美国 Digene 公司提供的 HC-Ⅱ HPV-DNA 检测试剂盒检测患者宫颈外口脱落细胞的高危型 HPV-DNA 含量,其原理是利用放大抗体捕获的信号和检测化学放光信号。具体操作步骤按试剂盒说明进行(略)。HC-Ⅱ采用 96 孔平板法,可 1 次检测 13 种高危型 HPV(即 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59 和 68)。

1.4 结果判断

1.4.1 Crk 蛋白免疫组化判断标准 以细胞质中出现明显的棕黄色颗粒细胞判定为 Crk 阳性。评分方法:参照 Fomwitz 综合计分法并略加修改,选择 5 个高倍视野(400)计数肿瘤细胞总数和 Crk 阳性细胞个数,得出 Crk 阳性细胞百分率,5%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,>75%为 4 分;着色强度为多数阳性细胞呈现的染色计分,浅棕色为 1 分,棕色为 2 分,深棕色为 3 分。行综合评分,0~1 分为阴性(-),2~3 分为弱阳性(+),4~5 分为中度阳性(++),6~7 分为强阳性(+++)。

1.4.2 HPV 阳性的判断标准定为 HPV-DNA 含量为检测样本的相对光单位(Relative light unit,RLU)/标准阳性对照的 RLU≥1.0,相当于标本中检出的 HPV-DNA 的负荷量≥1.0pg/ml,即诊断为高危型 HPV 阳性;反之,结果为阴性。

1.5 统计学方法

采用 SAS9.0 软件包进行多个样本率比较的 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为显著性差异。

2 结 果

2.1 Crk 蛋白在正常宫颈组织、CINs 和宫颈癌组织中的表达

Crk 蛋白主要定位于细胞的细胞浆,在细胞核内也有少量表达,呈棕色或棕黄色颗粒,弥漫性表达,无膜型、及核周聚集现象。在正常宫颈组织中 Crk 蛋白的阳性表达率较低,低级别 CINs(CIN Ⅰ、Ⅱ)中 Crk 蛋白的阳性表达率较正常宫颈组织略高,但两者比较,差异无统计学意义($P>0.05$);而高级别 CINs(CIN Ⅲ)和宫颈癌中的 Crk 蛋白的阳性表达率均显著高于前两者($P<0.05$);在 CINs 中比较,高级别 CINs 显著高于低级别 CINs($P<0.05$)。见表 1及图 1。

2.2 Crk 蛋白表达与 CINs 的 HPV-DNA 含量的关系

在 27 例子宫颈癌前病变(CIN Ⅰ~Ⅲ)中有 13 例为高危型 HPV 阳性,14 例高危型 HPV 阴性,Crk 蛋白阳性表达率分别为 46.2%,35.7%,二者比较虽无显著性差异($P>0.05$),但仍可见前者较后者有增高趋势。

2.3 Crk 蛋白表达与宫颈癌临床分期的关系

在宫颈癌中,Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期组的 Crk 蛋白阳性和强阳性表达率比较,差异虽无显著性($P>0.05$),但随着临床分期的增加,Ⅱ、Ⅲ期组的 Crk 蛋白的阳性和强阳性表达率较 I 期组有明显增高趋势。

2.4 Crk 蛋白表达与宫颈癌组织分化程度的关系

在宫颈癌中,随着病理组织学分化程度的降低,Crk 蛋白的阳性和强阳性表达率也均呈递增趋势,且在高、中、低分化的 3 组宫颈癌中比较,Crk 蛋白的阳性和强阳性率比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 Crk 蛋白表达与宫颈癌淋巴转移的关系

在发生淋巴转移的宫颈癌中,Crk 蛋白阳性表达率为 87.5%,而未发生淋巴转移的 34 例中,Crk 蛋白的阳性表达率为 58.8%,两组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 Crk 在不同子宫颈病变组织中的表达情况

组别	例数	Crk				阳性率(%)
		-	+	++	+++	
正常宫颈	20	18	2	0	0	10.0
CIN Ⅰ、Ⅱ	14	11	3	0	0	21.4
CIN Ⅲ	13	5	6	2	0	61.5*▲
宫颈癌	50	16	12	12	10	68.0*▲

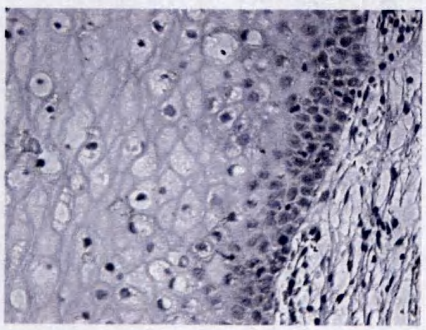
注:*表示该组与正常宫颈组比较,$P<0.05$;▲表示该组与 CIN Ⅰ、Ⅱ组比较,$P<0.05$。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 Crk 的表达情况与宫颈癌临床病理特征的关系

组别	例数	Crk				阳性率（%）	强阳性率（%）
		−	+	++	+++		
年龄							
≤35	13	4	4	3	2	69.2	15.4
>35	37	12	8	9	8	67.6	21.6
临床期别							
Ⅰ	14	6	3	4	1	57.1	7.1
Ⅱ	20	6	5	4	5	70.0	25.0
Ⅲ	16	4	4	4	4	75.0	25.0
病理分级							
高分化	11	7	3	1	0	36.4	0
中分化	20	6	5	6	3	70.0*	15.0▲
低分化	19	3	4	5	7	84.2*	36.8▲
淋巴结转移							
无	34	14	8	6	6	58.8	17.6
有	16	2	4	6	4	87.5*	25.0

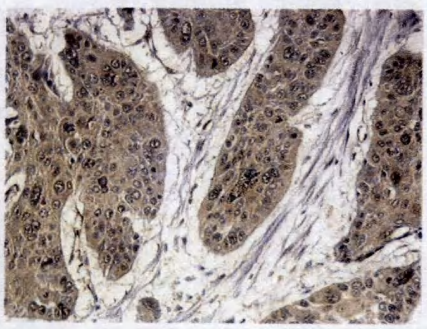
注：* 表示该项与本组第一项比较，$P<0.05$；▲表示该项与本组第一项比较，$P<0.05$。



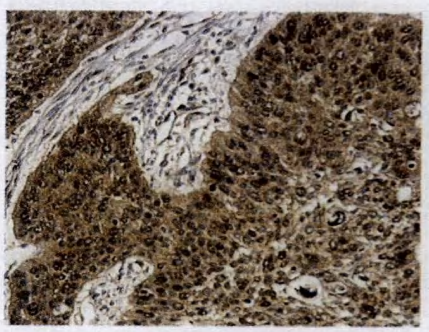
正常宫颈



CIN Ⅱ



高分化鳞癌



中—低分化鳞癌

图 1 Crk 在不同宫颈组织中的表达（SP×200 倍）

3 讨 论

3.1 Crk 蛋白表达与宫颈癌发生发展的关系

宫颈癌的发生多为由癌前病变发展为原位癌，侵润癌的渐进性过程。寻求一个在宫颈癌早期发现、预防和治疗中的有效标记，具有重要的临床意

维普资讯 http://www.cqvip.com

义。

接头蛋白 Crk 是原癌基因 crk 表达的产物，在胚胎和多数成人组织中广泛表达。Crk 包含 1 个 SH2 和 1 个或 2 个 SH3 结构域，在信号传导通路中，其 SH2 结构域通常与上游的信号分子相连，而 SH3 结构域则与下游的效应分子相连，使得不能直接相互联系的信号分子发生相互作用，信号得到有序且特异性传导[1,4]。目前，国外多个学者在人类神经恶性胶质瘤、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌等多种肿瘤中均监测到 Crk Ⅰ/Ⅱ mRNA 及其蛋白水平过度表达，其表达水平与恶性肿瘤的发生发展相关[2,3,5,6]。在研究癌细胞生物学行为时，发现增高的 Crk 通过与多种蛋白质连接构成的复合物，参与细胞粘着斑的组装和细胞骨架的重组，调节细胞与细胞外基质的吸附反应，促使癌细胞的迁徙和侵袭。并通过下游的 C3G 和 DOCK180 等信号分子，传递信号给小 GTP 酶 -Rac、Rap 以及 Rho 等，调节 MAP 激酶和 JUK 通路，促使肿瘤细胞增殖、扩散反应。在这些信号传导途径中，Crk 同众多的蛋白质信号分子结合，起着重要的承上启下的连接作用，广泛参与肿瘤细胞的增殖、吸附和侵袭等反应[1,3,6]。为了解信号接头蛋白 Crk 在宫颈癌中的的表达情况及其在宫颈癌的发生发展过程中的作用，我们用免疫组化 SP 法对正常宫颈组织，宫颈 CINs 病变和宫颈癌组织做了 Crk蛋白的半定量检测。

本研究结果显示，Crk 蛋白在正常宫颈组织仅 10%呈阳性表达，在 CIN Ⅰ、Ⅱ中 21.4%呈现阳性表达；CIN Ⅲ中 61.5%呈现阳性表达；在宫颈癌组织中的阳性表达率为 68%，提示 Crk 蛋白表达水平的增高与宫颈癌的发生发展有重要关系。本组结果与 Hiroshi Nishihara 等[2]检测肺的炎性病灶、癌前病变以及肺癌的 Crk 蛋白表达结果相似，均为在癌前病变阶段接头蛋白 Crk 表达即明显增高。由此可见，过度表达的 Crk 蛋白具有促进恶性肿瘤发生发展的作用，并且在宫颈高级别的 CINs 中，Crk 蛋白的表达可以作为一个判断其有可能发展为侵润癌的有用指标。

目前的研究已经表明，高危型 HPV 感染是致宫颈癌的首要因素[7]。我们结果显示，13 例高危型 HPV 阳性的 CINs 中 Crk 蛋白表达率为 46.2%，14 例 HPV-DNA 阴性的 CINs 的 Crk 蛋白阳性表达率 35.7%。二者比较虽无显著差异，但 HPV 阳性的 CINs 中 Crk 蛋白表达率仍略高于 HPV-DNA 阴性者，为明确高危型 HPV 感染是否促进 Crk 的表达，还需进一步积累样本说明。

3.2 Crk 蛋白表达与宫颈癌临床病理的关系

本研究发现，随着宫颈癌的病理分级、临床分期的递增以及淋巴结的转移，Crk 蛋白阳性表达率和着色强度也在递增。Miller CT[8]在肺癌检测 Crk 的蛋白和 mRNA 表达也有类似的发现。均表明 Crk 蛋白通过促进癌细胞的侵袭、转移在癌症的发展过程中发挥重要作用。可能在宫颈癌的发生发展过程中，癌细胞内过度表达的 Crk，通过其 SH2、SH3 结构域和上、下游的信号分子结合形成多分子复合物，使细胞内信号以有序且增强的方式传递，形成足够稳定、有力的粘着斑以及重组细胞骨架，提高了宫颈癌细胞在细胞外基质的粘附性以及侵袭和迁徙能力，并可能通过传递信号至其下游的小 GTP 酶 -Rac、Rap 以及 Rho 等，激活癌细胞的增殖、粘附、侵袭等信号通路，增强宫颈癌病变的恶性潜能。

本实验结果表明 Crk 与宫颈癌的发生、发展有密切关系，特别是与病理分级和淋巴转移的关系更为密切，可望作为宫颈癌早期诊断和反映恶性潜能的一种新的标志物。

参 考 文 献

[1] Stephan MF. Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles[J]. Oncogene, 2001; 20(44): 6348-6371.

[2] Hiroshi N, Shinya T. Molecular and immunohistochemical analysis of signaling adaptor protein Crk in human cancers[J]. Cancer Letters, 2002; 180(1): 55-61.

[3] Sonia P, Rodrigues. CrkI and CrkII function as key signaling integrators for migration and invasion of cancer cells[J]. Molecular Cancer Research, 2005; 3(2): 183-194.

[4] Buday L. Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptorproteins[J]. BiochimBiophysActa, 1999; 1422(2): 187-204.

[5] Takino T. CrkI adapter protein modulates cell migration and invasion in glioblastoma[J]. Cancer Res, 2003; 63(9): 2335-2337.

[6] Linghu H, Tsuda M. Involvement of adaptor protein Crk in malignant feature of human ovarian cancer cell line MCAS[J]. Oncogene, 2006; 25(25): 3547-3556.

[7] Nicolas FS. Vial load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia[J]. Int J Cancer, 2003; 103(5): 519-524.

[8] Miller CT, Chen G. Increased C-CRK proto-oncogene expression is associated with an aggressive phenotype in lung adenocarcinomas[J]. Oncogene, 2003; 22(39): 7950-7957.

(责任编辑：谭乐勤)