维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)08-0973-03

喉癌中 FAK 和 VEGF 的表达及其相互关系的研究

张潜英,沈 娜,余晓燕,叶 琳,陈鸿雁

(重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:检测粘着斑激酶(Focal adhesion kinase,FAK)和血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)在喉鳞状细胞癌中的表达及其与侵袭和转移的关系,探讨二者的相关性。方法:采用免疫组织化学 S-P 法,观察 42 例喉鳞状细胞癌及 40 例声带息肉中 FAK 和 VEGF 的表达情况。结果:FAK 和 VEGF 在喉鳞状细胞癌中的阳性率分别为 79%(33/42)和 71%(30/42),在声带息肉中的阳性表达率分别为 13%(5/40)和 18%(7/40)。喉鳞状细胞癌中 FAK 的表达与病理学分级及肿瘤的原发部位比较差异无统计学意义($P>0.05$),与临床分期及颈部淋巴结转移比较差异有统计学意义($P<0.05$);喉鳞状细胞癌中 VEGF 的表达与临床分期、颈部淋巴结转移比较差异有统计学意义($P<0.05$);FAK 与 VEGF 阳性表达呈正相关($P<0.05$)。结论:FAK、VEGF 在喉鳞状细胞癌的侵袭和转移中起重要作用,二者在喉鳞状细胞癌中表达升高可以作预测侵袭和转移的参考指标。

【关键词】喉肿瘤;免疫组化;粘着斑激酶;血管内皮生长因子

【中国图书分类法分类号】R739.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-07

Correlation between expression of focal adhesion kinase and vascular endothelial growth factor in squamous cell carcinoma of larynx

ZHANG Qian-ying, et al

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

【Abstract】*Objective*: To detect the expression of focal adhesion kinase(FAK) and vascular endothelial growth factor(VEGF)in human laryngeal squamous cell carcinoma to study their correlation in invasion and metastasis. *Methods*: Immunohistochemical S-P method was used to detect the expression of FAK and VEGF in 42 case of human laryngeal squamous cell carcinoma and 40 cases of polyp of vocal cords. All the samples were stained by HE method to confirm their pathologic characteristics. Positive rates of FAK and VEGF were evaluated by microscopy. *Results*: The positive rates of FAK, VEGF were 79% and 71%, respectively in human laryngeal squamous cell carcinoma. While in polyp of vocal cords, 13% and 18%, respectively. The difference was significant($P<0.05$). Moreover, the expression of FAK and VEGF were higher in the specimens with invasion than that these without invasion and lymph node metastasis($P<0.05$). There was a positive relationship between FAK and VEGF in the same sample($r=0.581$, $P<0.05$). *Conclusion*: FAK and VEGF play a key role in the invasion and metastasis of laryngeal squamous cell carcinoma and might prognosticate invasion and metastasis.

【Key words】 Laryngeal neoplasms; Immunohistochemestry; Focal adhesion kinase; Vascular endothelial growth factor

恶性肿瘤细胞发生侵袭和转移的分子机制非常复杂,其中包括:粘附分子介导癌细胞与正常细胞、细胞外基质(Extracellular matrix,ECM)间的粘附:癌细胞释放蛋白水解酶降解所粘附的组织,使癌细胞向纵深方向或远处运动;着床的癌细胞能分泌多种促血管生成因子使内皮细胞形成新生血管。FAK 与肿瘤细胞与细胞外基质成分粘附及信号转导关系密切,而 VEGF 在促进血管新生、重建起重要作用。故本实验采用免疫组织化学技术,对 42 例喉癌组织进行了 FAK 和 VEGF 的检测,探讨两者的表达与喉鳞状细胞癌(简称喉癌)临床病理特征的关系。

1 材料与方法

作者介绍:张潜英(1979-),女,硕士,研究方向:头颈部肿瘤。

通讯作者:陈鸿雁,女,教授,E-mail:cchhyy787@sohu.com。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 材料

1.1.1 病历资料 随机抽取 2000～2005 年重庆医科大学附属第一医院病理科喉癌手术存档石蜡标本 42 例，42 例均经病理检查确诊为鳞状细胞癌，其中男 40 例，女 2 例；年龄46～91 岁，平均 62 岁；声门上型 13 例，声门型 22 例，声门下型 7 例；高分化 19 例、中 11、低分化 12 例；TNM 分期，T_1～T_2 期 14 例，T_3～T_4 期 28 例；有淋巴结转移 15 例，无淋巴结转移 27 例；42 例均无远处转移。取同期切除并经病理检查证实的 40 例声带息肉标本作对照（声带息肉患者中，男 23 例、女 19 例，年龄 19～68 岁）。

1.1.2 试剂 FAK，VEGF 单克隆抗体均购自 Santa cruz 有限公司，FAK 稀释倍数 1∶50；VEGF 稀释倍数 1∶80。S-P 试剂盒购自北京中杉技术有限公司。

1.2 方法

采用免疫组化 S-P 法，严格按照操作规定程序进行，对照实验同步进行。用已知阳性喉癌切片阳性对照，0.01mol/L PBS 液代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判断

FAK、VEGF 免疫组化染色以细胞质出现片状或颗粒状棕黄色着色为阳性。半定量法计算阳性细胞平均百分率：每张切片取 5 个高倍视野，每个视野记数 100 个细胞，计算各视野阳性细胞的平均百分比，阳性细胞数，<10% 为(－)；10%～30% (+)；30%～70%为(++)；70%以上(+++)。

1.4 统计学处理

采用 SPSS12.0 统计软件。计数资料比较用 χ^2 检验，小样本资料比较用 Fisher's 精确概率法，计量资料比较用 t 检验，相关性分析用 Spearman 等级相关分析。$P\leq0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 FAK 和 VEGF 在声带息肉、喉癌组织中分布和表达特征

FAK 和 VEGF 阳性表达均为癌细胞胞质内出现棕黄色颗粒，细胞核均不着色。

FAK 和 VEGF 在喉癌中的阳性率分别为 79%(33/42)和 71%(30/42)，在声带息肉中的阳性表达率分别为 13%(5/40)和 18%(7/40)，两者之间存在显著性差异($P<0.01$)。其中声带息肉中阳性表达强度均较低。

2.2 FAK 和 VEGF 的表达与喉癌的肿瘤原发部位、淋巴结转移、临床分期、病理分级的关系

见表 2。

2.3 FAK 和 VEGF 在喉癌组织中表达的相关性

见表 3。

3 讨 论

喉癌占全身恶性肿瘤的 1%～5%，占呼吸道恶性肿瘤的 65%～70%。我国东北地区为喉癌高发区，并且近年发病率有逐年增加的趋势。喉癌绝大多数是鳞状细胞癌，一般占全部喉癌的 93%～99%。大量研究认为，FAK、VEGF 与消化系统肿瘤癌的发生发展密切相关。但在喉癌中国内外研究较少。

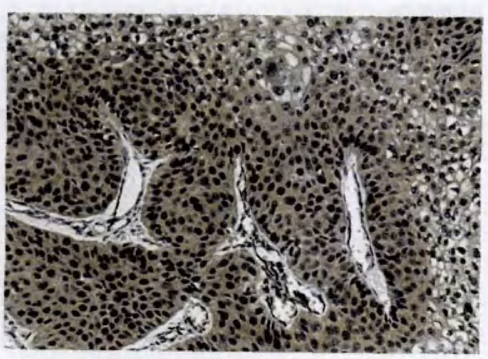


图 1 FAK 在喉癌中阳性(+++)表达(SP×100)

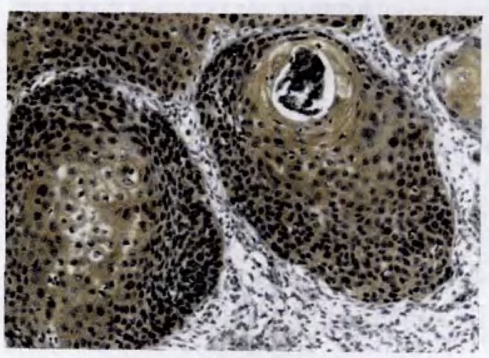


图 2 VEGF 在喉癌中的阳性(+++)表达(SP×100)

表 1 FAK 和 VEGF 分别在喉癌、声带息肉中的表达

	FAK				VEGF			
	－	+	++	+++	－	+	++	+++
喉癌	9	8	12	13	12	11	9	10
声带息肉	35	5	0	0	33	6	1	0

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 FAK 和 VEGF 的表达与喉癌临床病理特征的关系

	FAK			VEGF		
	+/++/+++	-	P 值	+/++/+++	-	P 值
肿瘤部位						
声门上型	11	2	0.516	11	2	0.178
声门型	17	5		13	9	
声门下型	5	2		6	1	
临床分期						
T_1~T_2	8	6	0.017	7	7	0.038
T_3~T_4	25	3		23	5	
病理组织学分级						
高	13	6	0.293	12	7	0.245
中	9	2		10	1	
低	11	1		8	4	
淋巴结转移						
转移(N_1、N_2)	15	0	0.016	14	1	0.031
非转移(N_0)	18	9		16	11	

表 3 FAK、VEGF 在喉癌中表达相关性

FAK	VEGF		合计
	-	+/++/+++	
-	7	2	9
+/++/+++	5	28	33
合计	12	30	42

二者具有明显的正相关性(r=0.581,P<0.05)。

1992 年,Hanks SK[1]及 Schaller MD 等[2]分别在 v-Src 转染的鸡胚细胞及正常细胞中发现了一个在整合素富集的细胞粘附区高度磷酸化的分子量为 125ku 与细胞粘附关系密切的蛋白,命名为粘着斑激酶。FAK 是一个多功能的非受体酪氨酸激酶,它在细胞间及细胞与细胞外基质粘附中起关键作用,同时与胚胎发育、细胞生存、周期调控、增殖、凋亡、铺展、迁移、侵袭、转移及血管生成等密切相关。大量研究证明 FAK 的高表达与肿瘤的转移、侵袭有关。1993 年 Weiner TM 等[3]首先报道了在 49 例人类乳腺癌、肠癌、甲状腺癌的分析中显示85% 侵袭性肿瘤和 100% 伴有转移的肿瘤 FAK mRNA 表达增加。Agochiya 等[4]研究证实在结肠癌、甲状腺肿瘤、肺癌中 FAK mRNA 表达增加。1995 年,Owens[5]报道了 FAK 蛋白的高表达与乳腺癌、肠癌的侵袭性相关。本实验研究表明,喉癌中 FAK、VEGF 的表达明显高于声带息肉中的表达,统计学分析差别有显著性。在喉癌中 FAK 的表达与临床分期和淋巴结转移相关(P<0.05),与病理学分级及肿瘤的原发部位比较差异无统计学意义(P>0.05)。与 Canel M 等[6]在头颈部鳞状细胞癌中的研究结果相近。由此可见,喉癌中 FAK 的高表达可能与其远处淋巴结转移及侵袭有关。

VEGF 是由各种肿瘤细胞及某些正常细胞产生的,通过旁分泌方式与位于血管内皮细胞或某些肿瘤细胞表面的 VEGF 受体(Vlt-1 和 KDPdF1t-1)特异性结合,直接刺激内皮细胞增殖,改变内皮细胞基因的活化方式,诱导内皮细胞表达蛋白网的水解酶、间质胶原酶和组织因子,这些作用共同促进血浆纤维蛋白外渗,导致纤维素在肿瘤间质中沉积,促进巨噬细胞、纤维母细胞及内皮细胞生长,从而在原位诱导血管生成,并产生纤维蛋白溶酶原激活剂和胶原酶,不仅可促进内皮细胞移动,有利于肿瘤间质血管生成,而且还有利于癌细胞脱落进入血管或向邻近纤维蛋白和结缔组织基质扩散,为肿瘤的侵润、转移创造条件。因此,它对肿瘤的新生血管生成和间质产生具有重要影响,特别与实体瘤的关系密切。本实验结果显示,VEGF 在喉癌组织中阳性表达率显著高于声带息肉中,两者之间存在显著性差异(P<0.05),喉癌中 VEGF 的表达与临床分期、淋巴结转移比较差异有统计学意义(P<0.05),与原发

(下转第 996 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

意到血管外膜成纤维细胞在血管再狭窄过程中也起了重要作用,并证明了血管外膜成纤维细胞的增殖及迁移参与了血管再狭窄的形成。静脉桥血管再狭窄主要有早期的血栓形成、中期的管壁增厚、晚期的粥样硬化。不同的试验可从不同的角度进行研究,各种预防治疗研究也在积极展开。因此,建立有效的动物模型十分关键。

有研究用 PTCA 使血管内膜损伤建立再狭窄模型[4],但不足以模拟静脉桥的再狭窄。新西兰大白兔价格低廉,所需手术器械要求不高,手术操作简单,动物手术麻醉便于管理,结果满意,故该模型能真实反映动静脉旁路术的病理过程,是很多人研究防治静脉桥狭窄所采用的模型[1]。

由于兔的颈外静脉较颈总动脉粗,因此我们将动脉剪成 45° 斜面,断面和静脉的基本一致,便于吻合,减少出血,并且可以避免吻合口狭窄。兔静脉壁很薄,在取材时要仔细清除多余组织,而且,术中必需借助手术放大镜,吻合时看清内膜,以免错误进针。必要时可以用生理盐水浸泡术野,便于血管壁两侧分开。

以往吻合都采用间断缝合,但间断吻合打结多,耗时较久,也容易不小心拉伤血管壁,由于兔静脉壁很薄,两侧管壁也难以通过弹性张力阻止出血,所以吻合口较易出血,补充缝合的难度也较大,因此耗时比较多;而采用间断加连续的吻合方法可以避免上诉问题,缩短手术时间,且吻合口出血很少,本次试验没有 1 例需补充缝合的。

对于单纯连续吻合,几乎没有人采用,本实验前也有过尝试,但因静脉太薄,难以暴露好吻合口,而且容易形成狭窄,所以放弃。

术后 1 月,两组标本均有明显的新内膜形成,中膜增厚,两组没有统计学上的差异。因此该改进的间断加连续吻合方法可以代替单纯的间断吻合方法建立静脉桥狭窄动物模型。

参 考 文 献

[1] 连 锋,朱洪生,郑家豪,等.冠状动脉旁路术后静脉桥狭窄模型的建立[J]. 上海试验动物学,2002;22(2):889-891.

[2] Schachner Thomas.Pharmacologic inhibition of vein graft neointimal hyperplasia[J]. Thorac Cadiovasc Surg,2006;131(4):1065-1072.

[3] 伍校琼,蔡维君,罗学港.静脉移植物中整合素 α5β1 的表达及其与再狭窄的关系[J]. 第三军医大学学报,2006;28(19):1949-1951.

[4] 蒲庆华,时 德.大鼠颈动脉再狭窄模型的建立及其病理机制的初步研究[J]. 重庆医科大学学报,2002;27(4):396-399.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 975 页)

灶部位及病理分级比较无统计学意义($P>0.05$),说明 VEGF 异常表达与喉癌促血管形成以及侵袭、淋巴结转移有密切关系。

本研究还表明,FAK、VEGF 在喉癌中表达有明显的相关性,二者具有明显的正相关性($r=0581$,$P<0.05$)。这可能是因为 VEGF 可通过诱导 FAK 磷酸化介导内皮细胞移行并抑制凋亡[7]。因此二者协同作用,共同促进肿瘤细胞侵袭与转移。故 FAK、VEGF 表达的检测可作为临床判断喉癌侵袭、转移的参考指标。

参 考 文 献

[1] Hanks SK,Calalb MB,Harper MC,et al. Focal adhesion protein tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1992;89(18):8487-8491.

[2] Schaller MD,Borgman CA,Cobb BS,et al. ppl25FAK a structurally distinctive protein tyrosine kinase associated with focal adhesions[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1992;89(11):5192-5196.

[3] Weiner TM,Lin ET,Gmven KJ,et al. Expression of focal adhesion kinase and invasive cancer[J]. Lancet,1993;42:1024-1025.

[4] Agochiya M,Brunton VG,Owens DW,et al. Increased dosage and amplification of the adhesion kinase gene in human cancer cells [J]. Oncogene,1999;18(41):5646-5653.

[5] OwensLV,Xu L,Craven RJ,et al. Overexpression of the focal adhesion kinasep125FAK in invasive human tumors[J]. Cancer Res,1995;55(13):2752-3755.

[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[J]. Clin Cancer Res,2006;12(11):3272-3279.

[7] Awaham HK,Iee TH.Vascular endothelial growth factor regulates focal adhesion assembly in hnman brain microvascular endothelial cells through activation of the focal adhesion kinase and related adhesion focal tyrosine kinase[J]. Biol Chem,2003;278(38):36661-36668.

(责任编辑:关蕴良)