肿瘤·生殖·消化 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000915

# NEDD9、FAK 在上皮性卵巢癌中的表达及临床意义

王海霞[1]，唐良莒[2]，周 琦[1]

（1. 重庆市肿瘤研究所妇瘤科，重庆 400030；2. 重庆医科大学附属第一医院妇产科，重庆 400016）

**【摘 要】目的**：探讨神经元细胞表达的发育下调基因 9(neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 9, NEDD9)及黏着斑激酶(focal adhesion kinase，FAK)在上皮性卵巢癌中的表达及临床意义。**方法**：采用免疫组化法检测 NEDD9 及 FAK 在 52 例上皮性卵巢癌、13 例卵巢交界性肿瘤、28 例卵巢良性肿瘤及 17 例正常卵巢组织中的表达，并对二者在卵巢癌组织中的表达做相关性分析。**结果**：NEDD9 在上皮性卵巢癌组织中的表达明显高于卵巢交界性肿瘤($P$=0.000)、卵巢良性肿瘤($P$=0.000)及正常卵巢组织($P$=0.000)，差异有统计学意义。FAK 在上皮性卵巢癌组织中的表达明显高于卵巢交界性肿瘤($P$=0.002)、卵巢良性肿瘤($P$=0.000)及正常卵巢组织($P$=0.000)，差异有统计学意义。NEDD9 的表达在卵巢癌的 FIGO 分期($P$=0.000)、组织分化程度各亚组间有统计学差异($P$=0.010)，而在确诊时年龄($P$=0.756)、血清 CA-125 水平($P$=0.300)、病理类型($P$=0.526)及腹水($P$=0.506)各亚组间无统计学差异；FAK 的表达在 FIGO 分期($P$=0.008)及腹水($P$=0.027)亚组间有统计学差异，而在确诊时年龄($P$=0.299)，血清 CA-125 水平($P$=0.116)、组织分化程度($P$=0.100)及病理类型($P$=1.000)各亚组间无统计学差异。NEDD9 和 FAK 在卵巢癌中的表达成正相关($r$=0.535，$P$<0.05)。**结论**：NEDD9 及 FAK 在上皮性卵巢癌中高表达，早期联合检测 NEDD9 和 FAK 可能对判断上皮性卵巢癌恶性程度有重要的临床意义。

**【关键词】**神经元细胞表达的发育下调基因 9；黏着斑激酶；上皮性卵巢癌

**【中图分类号】**R711.75 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2015-07-08

# Expression and clinical significance of NEDD9 and FAK in epithelial ovarian cancer

*Wang Haixia[1], Tang Liangdan[2], Zhou Qi[1]*

*(1. Department of Gynecologic Oncology, Chongqing Cancer Institute; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)*

**【Abstract】*Objective***: To investigate the expression and significance of neural precursor cell-expressed, developmentally down-regulated 9(NEDD9) and focal adhesion kinase(FAK) in epithelial ovarian cancer(EOC). ***Methods***: Immunohistochemical staining was performed to detect the expression of NEDD9 and FAK in 52 EOC, 13 borderline tumors, 28 benign tumors and 17 normal ovaries paraffin tissue samples. The correlation between NEDD9 and FAK was analyzed. ***Results***: The expression of NEDD9 in EOC was higher than that in borderline($P$=0.000), benign tumors($P$=0.000) and normal ovaries($P$=0.000). The expression of FAK in EOC was higher than that in borderline($P$=0.002), benign tumors($P$=0.000) and normal ovaries($P$=0.000). The expression of NEDD9 was correlated with FIGO stage($P$=0.000) and histological differentiation($P$=0.010) rather than with the age at diagnosis($P$=0.756), CA125 levels($P$=0.300), histologic type($P$=0.526) or ascites($P$=0.506), while the expression of FAK was correlated with the FIGO stage($P$=0.008) and ascites($P$=0.027) rather than with the age at diagnosis($P$=0.299), CA125 levels($P$=0.116), histological differentiation($P$=0.100) or histologic type($P$=1.000). Spearman correlation coefficient showed that positive correlation was found between NEDD9 and FAK in EOC($r$=0.535, $P$<0.05). ***Conclusion***: NEDD9 and FAK are overexpressed in EOC. Combined screening of NEDD9 and FAK at early stage may have vital clinical significance for evaluation of progress in EOC.

**【Key words】**neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 9(NEDD9); focal adhesion kinase; epithelial ovarian cancer

**作者介绍**：王海霞，Email：wanghx1985@126.com，研究方向：妇科恶性肿瘤。

**通信作者**：周 琦，Email：qizhou9128@163.com。

**基金项目**：重庆市博士后科研特别资助项目（编号：Xm2015084）；重庆市科委基础科学与前沿技术研究（重点）资助项目（编号：cstc2015jcyjB0601）。

**优先出版**：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160408.1604.006.html (2016-04-08)

卵巢癌的发病率在女性常见的恶性肿瘤中位于第五位，死亡率居于女性生殖系统恶性肿瘤首位[1]，而上皮性卵巢癌（epithelial ovarian cancer，EOC）占所有卵巢癌病理类型的 80%以上[2]。侵袭与转移是导致卵巢癌患者治疗失败和死亡率居高不下的主要原因。因此，了解 EOC 的侵袭转移机制对改善患者预后具有重要意义。

神经元细胞表达的发育下调基因 9（neural precursor cell-expressed，developmentally down-regulated 9，NEDD9）属于 CAS（crk-associated substrate）家族成员之一，归类为骨架蛋白，定位于黏着斑[3]。作为骨架蛋白，NEDD9 是连接刺激信号与效应分子的桥梁，它能通过调节蛋白复合体来调控细胞的黏附、迁移、趋化等诸多生物学行为[4]。近年研究发现，NEDD9 参与多种实体恶性肿瘤的发生发展，而它在妇科恶性肿瘤中的研究甚少。黏着斑激酶（focal adhesion kinase，FAK）是一种胞质蛋白酪氨酸激酶，在介导细胞与细胞及细胞与细胞外基质间的黏附中起关键作用，它在多种晚期恶性肿瘤中表达升高和/或被激活[5]。体内外研究表明，NEDD9 与 FAK 的相互作用是细胞迁移和侵袭的关键起始事件[6]。

本研究采用免疫组化法分析了 NEDD9 及 FAK 蛋白在不同卵巢组织中的表达，并进一步探讨这 2 种蛋白在卵巢癌发生发展中的作用及临床意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 组织标本及临床资料

收集 2011 年 10 月至 2013 年 6 月于重庆医科大学附属第一医院妇科和重庆市肿瘤医院妇瘤科住院手术，术后病理证实为 EOC 患者的组织标本 52 例，同时收集同期行卵巢手术的卵巢交界性肿瘤 13 例，卵巢良性肿瘤 28 例及正常卵巢组织（因良性病变而切除卵巢者）17 例作为对照。所有患者均为首发病例，术前均未接受化疗、放疗及激素等治疗。所获标本均征得患者知情同意，并签署知情同意书。新鲜标本获取后一部分立即置入液氮中冻存，再转入-80 ℃冰箱中保存；另一部分置于中性福尔马林固定待用。EOC 患者的手术病理分期采用国际妇产联盟（FIGO）2006 年手术病理分期标准。病理组织学分级参照世界卫生组织（WHO）分级标准。EOC 患者的临床病理资料详见表 2。

### 1.2 主要试剂

免疫组化试剂盒（货号：SP9000）购自北京中杉金桥生物技术有限公司。鼠抗人 NEDD9 单克隆抗体（货号：ab18056）及兔抗人 FAK 单克隆抗体（货号：ab40794）均购自美国 Abcam 公司。

### 1.3 方法

免疫组化法：采用 SABC 法[7]。石蜡包埋福尔马林中的标本，4 μm 厚连续切片制片，免疫组化染色按试剂说明书操作。一抗 NEDD9 及 FAK 抗体均用 PBS 按 1:100 稀释，阴性对照以 PBS 做一抗代替，二抗为生物素标记的山羊抗小鼠/兔 IgG，DAB 显色，镜下掌握染色程度。苏木精复染，盐酸酒精分化，梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片，镜检。

判断标准[7]：由 2 位病理医师双盲阅片，每张切片于镜下随机选择 5 个高倍镜视野，以光镜下肿瘤细胞内出现棕黄色颗粒者为阳性反应细胞，根据肿瘤细胞的染色强度和阳性细胞面积进行计分。按肿瘤细胞染色强度计分：无染色计 0 分，浅黄色计 1 分，棕黄色计 2 分，黄褐色计 3 分。按肿瘤阳性细胞面积计分：无阳性细胞计 0 分，<33%计 1 分，33%~66%计 2 分，>66%计 3 分。两者计分的乘积为最终得分，得分≤4 为蛋白无表达或低表达，得分>4 则为蛋白高表达。

### 1.4 统计学分析

应用 SPSS 18.0 软件进行数据统计分析，计数资料用率表示，Fisher 确切概率法比较 NEDD9 蛋白及 FAK 蛋白在不同卵巢组织中的表达阳性率及其与临床病理特征的相关性；Spearman 相关系数分析 NEDD9 与 FAK 蛋白在卵巢癌中表达的相关性，检验水准 $\alpha$=0.05。

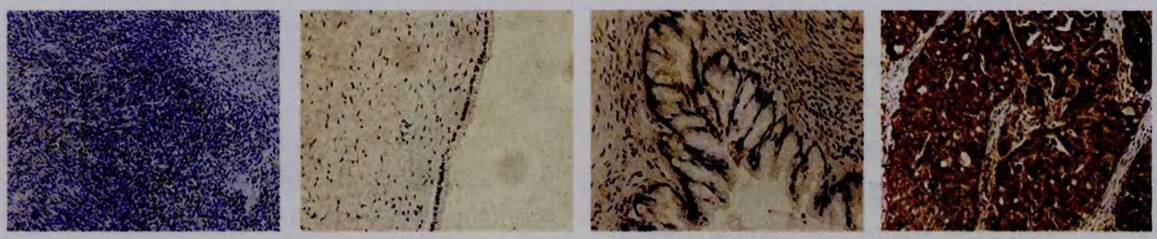
## 2 结 果

### 2.1 免疫组化分析 NEDD9 及 FAK 在不同卵巢组织中的表达

NEDD9 及 FAK 蛋白均在 EOC 组织中广泛表达，NEDD9 蛋白主要表达在肿瘤细胞的胞浆和胞膜（见图 1），而 FAK 蛋白主要表达在肿瘤细胞的胞浆（见图 2）。NEDD9 在 EOC 组织中的表达阳性率为 73.08%，明显高于卵巢交界性肿瘤（15.38%，$P$=0.000）、卵巢良性肿瘤（14.29%，$P$=0.000）及正常卵巢组织（11.76%，$P$=0.000）；而其在卵巢交界性肿瘤、卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织中的表达，组间比较差异无统计学意义（交界 vs.良性，$P$=1.000，交界 vs.正常，$P$=1.000，良性 vs.正常，$P$=1.000）。FAK 蛋白在 EOC 组织中的表达阳性率为 78.85%，明显高于卵巢交界性肿瘤（30.77%，$P$=0.002）、卵巢良性肿瘤（25.00%，$P$=0.000）及正常卵巢组织（23.53%，$P$=0.000）；而其在卵巢交界性肿瘤、卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织中的表达，组间比较差异无统计学意义（交界 vs.良性，$P$=0.719，交界 vs.正常，$P$=0.698，良性 vs.正常，$P$=1.000）（见表1）。

### 2.2 NEDD9 及 FAK 表达与卵巢癌临床病理特征的关系

NEDD9 蛋白的表达水平在 EOC 患者的 FIGO 分期（$P$<



A. 正常卵巢　B. 良性肿瘤　C. 交界性肿瘤　D. 上皮性卵巢癌

图 1　NEDD9 在不同卵巢组织中的表达（200×）

Fig.1　Expression of NEDD9 in ovarian tissues（200×）



A. 正常卵巢　B. 良性肿瘤　C. 交界性肿瘤　D. 上皮性卵巢癌

图 2　FAK 在不同卵巢组织中的表达（200×）

Fig.2　Expression of FAK in ovarian tissues（200×）

表 1　NEDD9、FAK 在不同卵巢组织中的表达

Tab.1　Expression of NEDD9 and FAK in ovarian tissues

| 组织病理类型 | $n$ | NEDD9 表达 | | $P$ 值 | FAK 表达 | | $P$ 值 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 无或低 | 高 | | 无或低 | 高 | |
| EOC组 | 52 | 14 | 38 | | 11 | 41 | |
| 交界性肿瘤组 | 13 | 11 | 2 | 0.000[a] | 9 | 4 | 0.000[b] |
| 良性肿瘤组 | 28 | 24 | 4 | 0.000[a] | 21 | 7 | 0.002[b] |
| 正常卵巢组 | 17 | 15 | 2 | 0.000[a] | 13 | 4 | 0.000[b] |

注：a，b 均与 EOC 组相比

0.01）、组织分化程度各亚组间有统计学差异（$P$=0.010），即 FIGO 分期越晚、组织分化程度越低，NEDD9 蛋白的表达水平越高。但该蛋白的表达水平在患者确诊时年龄（$P$=0.756）、血清 CA-125 水平（$P$=0.300）、病理类型（$P$=0.526）及腹水（$P$=0.506）各亚组间无统计学差异（见表 2）。

FAK 蛋白的表达水平在 EOC 患者的 FIGO 分期（$P$=0.008）及腹水（$P$=0.027）各亚组间有统计学差异，即 FIGO 分期越晚、有腹水，FAK 蛋白的表达水平越高。但该蛋白的表达水平在患者确诊时年龄（$P$=0.299）、血清 CA-125 水平（$P$=0.116）、组织分化程度（$P$=0.100）及病理类型（$P$=1.000）各亚组间无统计学差异（见表 2）。

### 2.3　NEDD9 与 FAK 在卵巢癌中表达的相关性

Spearman 相关系数分析结果显示，NEDD9 与 FAK 在 EOC 组织中的表达成正相关（$r_s$=0.535，$P$<0.05）。

## 3　讨　论

由于卵巢癌具有高转移率、高复发率、高死亡率的特点[8]，使它成为严重威胁女性健康的恶性肿瘤，因此，寻求调控 EOC 发生发展的关键基因成为卵巢癌研究的热点、难点。

多项研究[9-11]表明，NEDD9 在恶性肿瘤中可能是促转移基因，在多种恶性肿瘤中表达增高，其高表达与不良预后相关。结肠癌的研究发现，NEDD9 在 10 种不同结肠癌细胞系中的表达均明显高于正常结肠上皮细胞[12]，而沉默结肠癌细胞 LS174T 中 NEDD9 的表达，细胞的增殖和侵袭转移能力也被抑

表 2 NEDD9 及 FAK 蛋白的表达与 EOC 患者临床病理特征的关系

Tab.2 Association of NEDD9 expression with clinicopathologic characteristic

| 临床病理特征 | n | NEDD9 表达 | | P 值 | FAK 表达 | | P 值 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 无或低 | 高 | | 无或低 | 高 | |
| 年龄（岁） | | | | | | | |
| ≤50 | 20 | 6 | 14 | 0.756 | 6 | 14 | 0.299 |
| >50 | 32 | 8 | 24 | | 5 | 27 | |
| 血清 CA125（U/ml） | | | | | | | |
| <35 | 13 | 5 | 8 | 0.300 | 5 | 8 | 0.116 |
| ≥35 | 39 | 9 | 30 | | 6 | 33 | |
| FIGO 分期 | | | | | | | |
| Ⅰ/Ⅱ | 15 | 10 | 5 | 0.000[a] | 7 | 8 | 0.008[a] |
| Ⅲ/Ⅳ | 37 | 4 | 33 | | 4 | 33 | |
| 组织学分级 | | | | | | | |
| G1 | 12 | 7 | 5 | 0.010[b] | 5 | 7 | 0.100 |
| G2/G3 | 40 | 7 | 33 | | 6 | 34 | |
| 组织病理类型 | | | | | | | |
| 浆液性 | 31 | 7 | 24 | | 7 | 24 | |
| 子宫内膜样 | 11 | 4 | 7 | | 2 | 9 | |
| 黏液性 | 7 | 2 | 5 | | 1 | 6 | |
| 透明细胞 | 3 | 1 | 2 | 0.526 | 1 | 2 | 1.000 |
| 浆液性 vs. 非浆液性 | | | | | | | |
| 腹水 | | | | | | | |
| 有 | 17 | 6 | 11 | 0.506 | 7 | 10 | 0.027[c] |
| 无 | 35 | 8 | 27 | | 4 | 31 | |

注：a，与Ⅰ/Ⅱ组比较；b：与 G1 组比较；c：与有腹水组比较

制[13-14]。本研究显示，与卵巢交界性肿瘤、卵巢良性肿瘤和正常卵巢组织相比，NEDD9 的表达在 EOC 组织中明显升高，进一步分析 NEDD9 表达与 EOC临床病理特征关系显示，NEDD9 的高表达与 FIGO 分期晚、组织分化差相关，这与 NEDD9 在胃癌[15]和胰腺癌[16]中的研究一致。提示 NEDD9 在卵巢组织中高表达可能是正常卵巢组织癌性转化、卵巢癌侵袭转移的标志之一。有文献报道，NEDD9 蛋白主要表达于胞浆[17]，而肺癌的研究显示其主要表达于胞浆及胞核[18]，前列腺癌的[19]研究显示其主要表达于胞核。本研究发现 NEDD9 蛋白主要表达于胞浆和胞膜，NEDD9 蛋白的定位改变，可能由于 NEDD9 受到细胞周期及多种细胞粘附相关受体的动态调控，从而使其在不同的生理病理过程中发挥作用[20]。

联合多基因分析肿瘤发生发展的机制以寻求有效的肿瘤筛查指标是当前研究的热点。研究发现，NEDD9 与 FAK 的相互作用是细胞迁移和侵袭的关键起始事件[8]。在细胞黏附的刺激下，NEDD9 与 FAK 和 Src 形成蛋白复合体，并使 NEDD9 磷酸化，产生利于 Crk 等效应分子的结合位点，NEDD9-Crk 复合物进一步激活 Rho 和 Ras 家族 GTPase，从而促进细胞黏附、迁移和侵袭[21]。已有研究表明，FAK 在多种恶性肿瘤中表达增高/活性增强[22-27]。本研究显示，FAK 在 EOC 组织中高表达，其高表达与 EOC 的 FIGO 分期晚及腹水有关，表明 FAK 在 EOC 的恶性增殖、转化及转移中可能起促进作用。联合分析NEDD9 与 FAK 在 EOC 中的表达呈正相关，推测 NEDD9 和 FAK 的高表达在 EOC 的侵袭转移中可能有协同作用。

总之，NEDD9 和 FAK 可能共同参与了卵巢癌的发生发展与转移，二者的相关性提示，早期联合检测 NEDD9 和 FAK 可能作为评价卵巢癌侵袭性的指标；但二者调控卵巢癌进展的分子生物学机制有待进一步研究，下一步拟从细胞及动物水平进行深入探讨。

## 参 考 文 献

[1] Anugraham M, Jacob F, Nixdorf S, et al. Specific glycosylation of membrane proteins in epithelial ovarian cancer cell lines: glycan structures reflect gene expression and DNA methylation status[J]. Mol Cell

Proteomics, 2014, 13(9): 2213-2232.

[2] Dutta S, Wang FQ, Phalen A, et al. Biomarkers for ovarian cancer detection and therapy[J]. Cancer Biol Ther, 2010, 9(9): 668-677.

[3] Michael S, Guerrero J, Thomas Parsons, et al. Cas and NEDD9 contribute to tumor progression through dynamic regulation of the cytoskeleton[J]. Genes Cancer, 2012, 3(5-6): 371-381.

[4] O'Neill GM, Seo S, Serebriiskii IG, et al. A new central scaffold for metastasis:parsing HEF1/Cas-L/NEDD9[J]. Cancer Res,2007,67(19): 8975-8979.

[5] Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in cancer:mechanistic findings and clinical applications[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(9): 598-610.

[6] Natarajan M, Stewart JE, Golemis EA, et al. HEF1 is a necessary and specific downstream effector of FAK that promotes the migration of glioblastoma cells[J]. Oncogene, 2006, 25(12):1721-1732.

[7] Zhang J, Tang LD, Shen L, et al. High level of WAVE1 expression is associated with tumor aggressiveness and unfavorable prognosis of epithelial ovarian cancer[J].Gynecol Oncol, 2012, 127( 1):223-230.

[8] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1):9-29.

[9] Kim M, Gans JD, Nogueira C, et al. Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene[J]. Cell, 2006, 125(7): 1269-1281.

[10] Xia L, Huang W, Tian D, et al. Overexpression of forkhead box C1 promotes tumor metastasis and indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2013, 57(2): 610-624.

[11] Xue YZ, Sheng YY, Liu ZL, et al. Expression of NEDD9 in pancreatic ductal adenocarcinoma and its clinical significance[J]. Tumour Biol, 2012, 34(2): 895-899.

[12] Kim SH, Xia D, Kim SW, et al. Human enhancer of filamentation 1 is a mediator of hypoxia-inducible factor-1alpha-mediated migration incolorectal carcinoma cells[J]. Cancer Res, 2010, 70(10): 4054-4063.

[13] Li Y, Bavarva JH, Wang Z, et al. HEF1, a novel target of Wnt signaling, promotes colonic cell migration and cancer progression[J]. Oncogene, 2011, 30(23): 2633-2643.

[14] Xia D, Holla VR, Wang D, et al. HEF1 is a crucial mediator of the proliferative effects of prostaglandin E(2) on colon cancer cells[J]. Cancer Res, 2010, 70(2): 824-831.

[15] Liu Y, Wang D, Zhao KL, et al. NEDD9 overexpression correlates with poor prognosis in gastric cancer[J]. Tumour Biol, 2014, 35(7): 6351-6356.

[16] Xue YZ, Sheng YY, Liu ZL, et al. Expression of NEDD9 in pancreatic ductal adenocarcinoma and its clinical significance[J]. Tumour Biol, 2012, 34(2): 895-899.

[17] Lu P, Wang ZP, Dang Z, et al. Expression of NEDD9 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance[J]. Oncol Rep, 2015, 33 (5): 2375-2383.

[18] Chang JX, Gao F, Zhao GQ, et al. Role of NEDD9 in invasion and metastasis of lung adenocarcinoma[J]. Exp Ther Med, 2012, 4(5): 795-800.

[19] Morimoto K, Tanaka T, Nitta Y, et al. NEDD9 crucially regulates TGF-beta- triggered epithelial-mesenchymal transition and cell invasion in prostate cancer cells: Involvement in cancer progressiveness[J]. The Prostate, 2014, 74(8): 901-910.

[20] Law SF, Zhang YZ, Klein-Szanto AJ, et al. Cell cycle-regulated processing of HEF1 to multiple protein forms differentially targeted to multiple subcellular compartments[J]. Mol Cell Biol,1998,18(6): 3540-3551.

[21] Guerrero MS, Parsons JT, Bouton AH. Cas and NEDD9 contribute to tumor progression through dynamic regulation of the cytoskeleton[J]. Genes Cancer, 2012, 3(5-6): 371-381.

[22] Bosch R, Dieguez-Gonzalez R, Moreno MJ, et al. Focal adhesion protein expression in human diffuse large B-cell lymphoma[J]. Histopathology, 2014, 65(1): 119-131.

[23] Chen Y, Xia X, Wang S, et al. High FAK combined with low JWA expression: clinical prognostic and predictive role for adjuvant fluorouracil-leucovorin- oxaliplatin treatment in resectable gastric cancer patients[J]. J Gastroenterol, 2013, 48(9): 1034-1044.

[24] Béraud C, Dormoy V, Danilin S, et al. Targeting FAK scaffold functions inhibits human renal cell carcinoma growth[J]. Int J Cancer, 2015, 137(7): 1549-1559.

[25] Gu S, Kounenidakis M, Schmidt EM, et al. Rapid activation of FAK/mTOR/ p70S6K/PAK1-signaling controls the early testosterone-induced actin reorganization in colon cancer cells[J]. Cell Signal, 2013, 25(1): 66-73.

[26] Garouniatis A,Zizi-Sermpetzoglou A,Rizos S,et al. FAK,CD44v6, c-Met and EGFR in colorectal cancer parameters:tumour progression, metastasis, patient survival and receptor crosstalk[J]. Int J Colorectal Dis, 2013, 28(1): 9-18.

[27] Taliaferro-Smith L, Oberlick E, Liu T, et al. FAK activation is required for IGF1R-mediated regulation of EMT, migration, and invasion in mesenchymal triple negative breast cancer cells[J]. Oncotarget, 2015, 6(7): 4757-4772.

（责任编辑：张辉洁）