

基因及其蛋白在肿瘤中的表达

DOI: 10.11699/cyxb20130808

FAK、FAKpY397 和 Src 在肝细胞癌中的表达和意义

谷艳娇¹, 张敬坤², 包翠芬², 苏荣健²

(辽宁医学院 1. 附属第一医院病理科; 2. 科学实验中心, 锦州 121001)

【摘要】目的:探讨黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)、磷酸化黏着斑激酶(phospho-FAK Y397, FAKpY397)和类固醇激素受体共活化因子(sceroide receptor coactivator, Src)在不同分化程度肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中的表达情况以及三者的相关性。**方法:**通过免疫组织化学法和人工计数法检测 44 例 HCC 组织及 8 例癌旁正常肝脏组织中 FAK、FAKpY397 和 Src 的表达。**结果:**FAK、FAKpY397 和 Src 在 HCC 组织中表达均高于正常肝脏组织($P=0.027$ 、 $P=0.041$ 、 $P=0.030$)且三者均与 HCC 分化程度有关($P=0.026$ 、 $P=0.045$ 、 $P=0.005$), FAK 和 Src 低分化组阳性率高于高分化组($P=0.015$ 、 $P=0.002$)。HCC 组织中三者表达两两之间呈正相关($P=0.000$ 、 $P=0.000$ 、 $P=0.000$)。**结论:**HCC 组织中 FAK、FAKpY397 和 Src 表达与 HCC 分化程度有关; FAK 和 Src 低分化组阳性率高于高分化组且三者相互之间存在一定相关性。

【关键词】黏着斑激酶; 磷酸化黏着斑激酶; 类固醇激素受体共活化因子; 肝细胞癌

【中国图书分类法分类号】R735.7

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-09-24

Expressions and significances of FAK, FAKpY397 and Src in hepatocellular carcinoma

GU Yanjiao¹, ZHANG Jingkun², BAO Cuifen², SU Rongjian²

(1. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital;

2. Center of Scientific Experiment, Liaoning Medical College)

【Abstract】Objective: To detect the expressions of focal adhesion kinase (FAK), phospho-focal adhesion kinase Y397 (FAKpY397) and sceroide receptor coactivator (Src) in hepatocellular carcinoma (HCC) and the relationship among them. **Methods:** Expressions of FAK, FAKpY397 and Src in 8 cases of normal tissues and 44 cases of HCC tissues were detected by immunohistochemical techniques and manual counting. **Results:** Expressions of FAK, FAKpY397 and Src were higher in HCC tissues than in normal tissues ($P=0.027$, $P=0.041$, $P=0.030$) and had relationship with the differentiation of HCC ($P=0.026$, $P=0.045$, $P=0.005$). Expressions of FAK and Src were higher in low differentiated HCC than in high differentiated HCC ($P=0.015$, $P=0.002$). Positive relationship was found between expressions of FAK, FAKpY397 and Src in HCC tissues ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$). **Conclusions:** Expressions of FAK, FAKpY397 and Src in HCC tissues have relationship with the differentiation of HCC. Expressions of FAK and Src are higher in low differentiated HCC than in high differentiated HCC and correlation is existed between them.

【Key words】 focal adhesion kinase; phospho-focal adhesion kinase Y397; sceroide receptor coactivator; hepatocellular carcinoma

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是人类常见恶性肿瘤之一,转移和复发是其术后生存的主要障碍。研究 HCC 转移和复发的机制,对寻找治疗 HCC 的分子靶点,预防术后复发,提高疗效有重要意义。黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)是一个多功能的非受体酪氨酸激酶,是整合素介导信号转导过程中的中心分子,酪氨酸磷酸化是 FAK

激活的重要方式,其中 Y397 是其主要的自动磷酸化位点^[1]。磷酸化黏着斑激酶(phospho-FAK Y397, FAKpY397)与类固醇激素受体共活化因子(sceroide receptor coactivator, Src)发生作用,使其活性增加,而 Src 活性增加可催化 FAK 的其他酪氨酸磷酸化位点,使其发生磷酸化,二者相互激活,与细胞之间黏附的减少有关^[2]并与肿瘤转移有关^[3]。本研究应用免疫组化方法观察 FAK、FAKpY397 和 Src 在不同分化程度 HCC 中的表达情况探讨其对 HCC 侵袭和转移的影响。

作者介绍:谷艳娇, Email: yanjiaogu@163.com,

研究方向:病理诊断学。

通信作者:苏荣健, Email: rongjiansu@yahoo.com.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81172048)。

1 材料和方法

1.1 材料

收集辽宁医学院附属第一医院 2006 年 8 月-2007 年 12 月,有完整临床及病理资料的 HCC 手术切除的癌组织和癌旁正常肝脏组织患者,平均年龄 51 岁。标本收集过程在辽宁医学院医学伦理委员会监督下进行,符合赫尔辛基宣言,所有病人均知情同意。癌旁正常肝脏组织 8 例,HCC 组织 44 例,其中高、中、低分化分别为 10、13、21 例,所有病例术前均未接受放疗、化疗和免疫治疗等相关治疗。

1.2 方法

加入 10%中性福尔马林固定,常规脱水透明,石蜡包埋,制作 5 μm 厚切片。石蜡切片脱蜡水化后,高压修复 2 min,加 3% H_2O_2 室温孵育 10 min,滴加一抗(兔抗人多克隆抗体,FAK 1:200,FAKpY397 1:100,Src 1:100,Santa Cruz 公司)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,滴加聚合物辅助剂 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,滴加辣根酶标记的二抗(山羊抗兔 IgG 多聚体,北京中杉金桥生物有限公司)37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,DAB(北京中杉金桥生物有限公司)显色 5~10 min,苏木精复染,脱水、透明,封片。PBS 替代一抗作阴性对照。

1.3 结果判定

FAK、FAKpY397 和 Src 阳性表达为细胞质内有棕黄色颗粒沉着。光镜下每张切片在肝癌组织中随机选取 10 个高倍视野,每个视野计数 100 个细胞,并对细胞染色强度及阳性细胞比例进行评分。染色强度评分如下:无着色为 0,淡棕黄色为 1,棕黄色及更深颜色为 2。阳性细胞数评分为:阳性细胞数 $\leq 10\%$ 为 0,11%~25% 为 1,26%~50% 为 2, $\geq 51\%$ 为 3。两项相加除以 2 结果大于 1 为阳性表达。

1.4 统计分析

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。计数资料用率表示,行 χ^2 检验、 χ^2 分割和 Spearman 相关分析。 χ^2 检验和 Spearman 相关分析检验水准均为 $\alpha=0.05$, χ^2 分割检验水准 $\alpha=0.017[\alpha'=2\alpha/(k-1),\alpha=0.05,k$ 为比较的样本组数, $k=3]$ 。

2 结果

2.1 HCC 中 FAK 的表达

FAK 阳性表达定位于细胞质。FAK 在 HCC 组织中的阳性表达率高于正常肝脏组织($P<0.05$),分别为 72.73%(32/44)、25.00%(2/8)(表 1、图 1)。在不同分化程度的 HCC 中,FAK 阳性率与 HCC 分化程度有关($\chi^2=7.301,P=0.026$), χ^2 分割两两比较得高分化与低分化组表达差异有统计学意义,低分化组阳性率高($P<0.017$),余无明显差异($P>0.017$),各组阳性率分别为 40.00%(4/10)、76.92%(10/13)、85.71%(18/21)(表 1、图 1)。

2.2 HCC 中 FAKpY397 的表达

FAKpY397 阳性表达定位于细胞质。FAKpY397 在 HCC 组织中阳性表达率高于正常肝脏组织($P<0.05$),分别为 59.09%(26/44)、12.50%(1/8)(表 2、图 1)。在不同分化程度的 HCC 中,FAKpY397 阳性率与 HCC 分化程度有关($\chi^2=6.189,P=0.045$), χ^2 分割两两比较得各组间阳性率差异无统计学意义($P>0.017$),各组阳性率分别为 30.00%(3/10)、53.85%(7/13)、76.19%(16/21)(表 2、图 1)。

2.3 HCC 中 Src 的表达

Src 阳性表达定位于细胞质。Src 在 HCC 组织中阳性表达率高于正常肝脏组织($P<0.05$),分别为 61.36%(27/44)、12.5%(1/8)(表 1、图 1)。在不同分化程度的 HCC 中,Src 阳性率与 HCC 分化程度有关($\chi^2=10.616,P=0.005$), χ^2 分割两两比较得高分化与低分化组表达差异有统计学意义,低分化组阳性率高($P<0.017$),余无明显差异($P>0.017$),各组阳性率分别为 20.00%(2/10)、61.54%(8/13)、80.95%(17/21)(表 1、图 1)。

2.4 FAK、FAKpY397 和 Src 在 HCC 中表达的相关性

对 44 例 HCC 标本中 FAK、FAKpY397 和 Src 的表达进行 Spearman 相关分析,FAK 和 FAKpY397 的 Spearman 相关系数 $r_s=0.736,P=0.000$;FAKpY397 和 Src 的 Spearman 相关系数 $r_s=0.669,P=0.000$;FAK 和 Src 的 Spearman 相关系数 $r_s=0.667,P=0.000$ 。

表 1 FAK、FAKpY397 和 Src 在不同分化程度 HCC 中的表达

Tab.1 Expressions of FAK,FAKpY397 and Src in HCC with different histologic grades

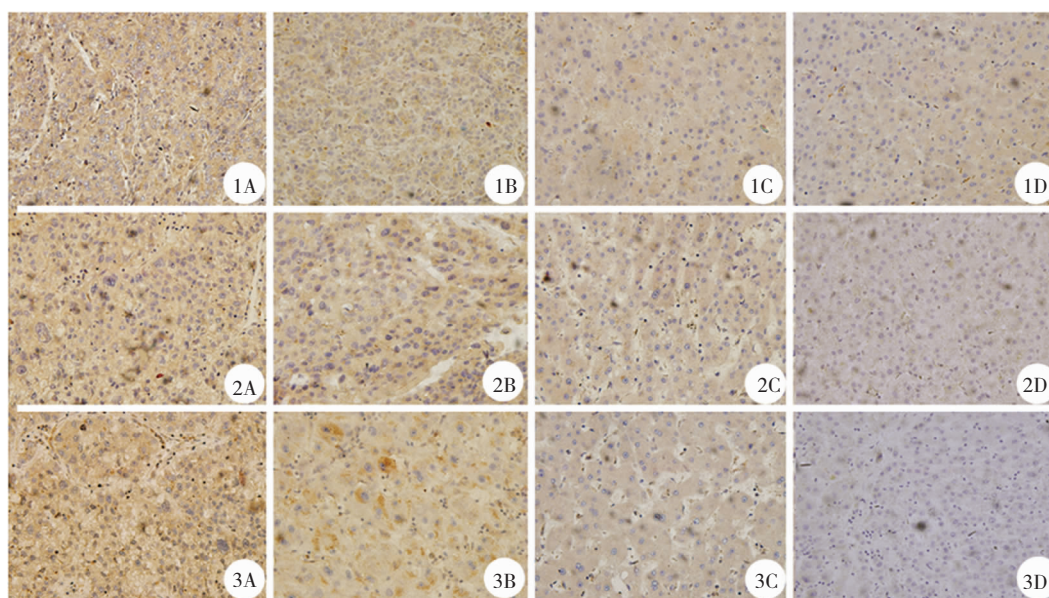
HCC 分化程度	例数 (n)	FAK				FAKpY397				Src			
		-	+	阳性率 (%)	P 值	-	+	阳性率 (%)	P 值	-	+	阳性率 (%)	P 值
高分化	10	6	4	40.00	0.102 ^a	7	3	30.00	0.402 ^a	8	2	20.00	0.090 ^a
中分化	13	3	10	76.92	0.653 ^b	6	7	53.85	0.262 ^b	5	8	61.54	0.254 ^b
低分化	21	3	18	85.71	0.015 ^d	5	16	76.19	0.021 ^c	4	17	80.95	0.002 ^d

注:a,高分化组与中分化组比较的 P 值;b,中分化组与低分化组比较的 P 值;c,高分化组与低分化组比较的 P 值;d, $P<0.017$

表 2 FAK、FAKpY397 和 Src 在正常肝脏组织和 HCC 组织中的表达

Tab.2 Expressions of FAK,FAKpY397 and Src in HCC and normal hepatic tissues

组织类型	例数 (n)	FAK				FAKpY397				Src			
		-	+	阳性率 (%)	χ^2 值/P 值	-	+	阳性率 (%)	χ^2 值/P 值	-	+	阳性率 (%)	χ^2 值/P 值
正常组织	8	6	2	25.00	4.867/0.027	7	1	12.50	4.168/0.041	7	1	12.50	4.686/0.030
HCC 组织	44	12	32	72.73		18	26	59.09		17	27	61.36	



1A~1D. FAK 在低分化、中分化、高分化 HCC 及正常肝组织中的表达;2A~2D. FAKpY397 在低分化、中分化、高分化 HCC 及正常肝组织中的表达;3A~3D. Src 在低分化、中分化、高分化 HCC 及正常肝组织中的表达

图 1 FAK、FAKpY397 和 Src 在不同分化程度 HCC 及正常肝组织中的表达 (400 ×)

Fig.1 Expressions of FAK, FAKpY397 and Src in HCC with different histologic grades and normal hepatic tissues (400 ×)

据此推测 FAK、FAKpY397 和 Src 在 HCC 组织不同分化程度中两两之间存在一定的相关性。

3 讨论

FAK 是一种非受体蛋白酪氨酸激酶,分布在细胞黏着斑部位,是介导细胞与细胞间、细胞与细胞外基质信号转导的重要的胞内分子,与肿瘤细胞生存、增殖、凋亡、迁移及血管生成等密切相关^[4-5]。以往研究表明,FAK 在多种肿瘤中高表达^[6-8]。本研究发现,在 HCC 组织中 FAK 表达阳性率明显高于正常肝组织,且与 HCC 分化程度有关,低分化组阳性率高于高分化组,而组织的分化程度与肿瘤的侵袭和转移能力密切相关,提示 FAK 在调节 HCC 的侵袭和转移方面扮演着重要角色。与 Park 等^[9]对 FAK 在胃癌中的表达情况研究结果相似。

FAK 通过其多个位点的酪氨酸、丝氨酸、苏氨酸等的磷酸化与含有 SH2 或 SH3 结构域的蛋白质接合,参与肿瘤的发生、发展、侵袭及转移。酪氨酸磷酸化是其主要活化形式,FAK 已知有 6 个可以被磷酸化的酪氨酸位点,位于 N 端结构域的 Tyr397、Tyr407;位于酪氨酸激酶域的 Tyr576、Tyr577 和位于 C 端结构域的 Tyr861、Tyr925^[9]。其中 Tyr397 是主要的自磷酸化部位。FAKpY397 可与多种含 SH2 结构域的蛋白质分子结合,如 Src 家族、细胞信号抑制

因子、生长因子连接蛋白 7、shc 接头蛋白、P120Ras-GAP、PI-3K 等。以启动下游相应的事件发生,参与肿瘤的发生、发展、侵袭及转移。作为整个事件的启动点,Y397 的磷酸化水平可反映细胞内 FAK 的活化状况,其作用显得尤为突出^[10]。本研究结果表明,HCC 中 FAKpY397 的表达率明显高于癌旁组织,且与 HCC 分化程度有关,提示 FAKpY397 在肿瘤的侵袭和转移中起重要作用。Lai 等^[11]对胃癌的研究结果表明,FAKpY397 比 FAK 更能作为胃癌复发的独立危险因素。因此测定 FAKpY397 的表达比单纯测定 FAK 更能有效预测肿瘤的发生、发展。

研究表明非受体酪氨酸激酶 Src 在肿瘤的增殖、存活、黏连和迁移中起重要作用,抑制 Src 激酶的活性可抑制肿瘤的转移。Src 与 FAKpY397 形成 FAK/Src 复合物后能够彼此激活,活化的 Src 可催化 FAK 的其他酪氨酸磷酸化位点使其发生磷酸化,使 FAK 完全激活,亦使 FAK 信号传导通路活化,启动下游相应的事件发生。本研究结果表明,HCC 中 Src 的表达率明显高于癌旁组织,且与 HCC 分化程度有关,低分化组阳性率高于高分化组,提示 Src 与 HCC 的侵袭、转移密切相关。Chatzizacharias 等^[7]对子宫内膜癌、胰腺癌^[12],Theocharis 等^[8]对舌鳞状细胞癌等的研究表明,Src 在癌组织中均有较高的表达,与其临床预后有关。

基因及其蛋白在肿瘤中的表达

DOI: 10.11699/cyxb20130809

PTP4A1 在舌鳞癌组织及 TCA8113 细胞中的表达及意义

漆小娟, 季 平, 潘 丽, 时恩来, 徐 望

(重庆医科大学附属口腔医院颌面外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:检测 PTP4A1 基因在舌鳞癌组织及舌鳞癌细胞系 TCA8113 中的表达,并探讨其表达水平与舌鳞癌临床病理参数的关系。**方法:**应用免疫组化 SP 法检测 30 例舌鳞癌和 15 例正常舌组织石蜡包埋组织中 PTP4A1 的表达;对 15 例新鲜舌鳞癌组织进行 real-time PCR,检测 PTP4A1 在舌鳞癌组织、癌旁组织、正常舌组织的表达,此外对 TCA8113 细胞中 PTP4A1 的表达水平也进行了检测。**结果:**免疫组化结果显示,PTP4A1 表达于舌鳞癌组织的细胞质和细胞核,在舌鳞癌组织中呈阳性和强阳性表达,而在正常舌组织中呈阴性和弱阳性表达;PTP4A1 在舌鳞癌的阳性表达率为 83%,显著高于其在正常舌组织中的表达率 33.3%;PTP4A1 在舌鳞癌组织和正常舌组织的表达差异有统计学意义($P=0.001<0.05$);而且 PTP4A1 的表达水平与肿瘤的淋巴转移相关($P=0.014<0.05$),而与病人的性别、年龄、肿瘤的大小、肿瘤的分期分级无明显相关。Real-time PCR 实验结果显示舌鳞癌组织及舌鳞癌细胞系 TCA8113 细胞中的 PTP4A1 的 mRNA 表达水平高于其在癌旁和正常舌组织的表达,癌旁组织的表达高于正常舌组织的表达($P=0.000<0.05$)。**结论:**PTP4A1 基因 mRNA 水平和蛋白水平表达在舌鳞癌组织中表达均较癌旁和正常舌组织高,可能在舌鳞癌的发生发展过程中起着一定作用。

【关键词】人舌鳞状细胞癌;PTP4A1;免疫组织化学;Real-time PCR

【中国图书分类法分类号】R739.8

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-12-11

作者介绍:漆小娟,Email:529199785@qq.com,

研究方向:口腔头颈部肿瘤临床与基础研究。

通信作者:季 平,Email:jiping_62@hotmail.com。

综上所述,FAK 自磷酸化 Tyr397 形成 FAKpY397,之后以 FAK/Src 复合物的形式彼此激活,进一步启动下游相应细胞信号传导通路,共同参与了 HCC 的侵袭和转移过程。本研究结果也表明 3 个因子彼此之间有很大的相关性。FAK、FAKpY397 和 c-Src 同时发生异常可作为评估 HCC 恶性程度的重要生物学指标,并可作为分子靶向治疗的作用靶点。

参 考 文 献

- [1] Gu J, Tamura M, Pankov R, et al. Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN[J]. J Cell Biol, 1999, 146(2): 389-403.
- [2] Hamaguchi M, Matsuyoshi N, Ohnishi Y, et al. p60 v-Src causes tyrosine phosphorylation and inactivation of the N-cadherin-catenin cell adhesion system[J]. Embo J, 1993, 12(1): 307-314.
- [3] Irby R B, Mao W, Coppola D, et al. Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers[J]. Nat Genet, 1999, 21(2): 187-190.
- [4] Lim S T, Chen X L, Lim Y, et al. Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation[J]. Mol Cell, 2008, 29(1): 9-22.
- [5] Canel M, Secades P, Garzon-Arango M, et al. Involvement of focal adhesion kinase in cellular invasion of head and neck squamous cell

carcinomas via regulation of MMP-2 expression[J]. Br J Cancer, 2008, 98(7): 1274-1284.

[6] Park J H, Lee B L, Yoon J, et al. Focal adhesion kinase (FAK) gene amplification and its clinical implications in gastric cancer[J]. Hum Pathol, 2010, 41(12): 1664-1673.

[7] Chatzizacharias N A, Giaginis C, Gatzidou E, et al. Expression and clinical significance of FAK and Src proteins in human endometrial adenocarcinoma[J]. Pathol Oncol Res, 2011, 17(2): 277-285.

[8] Theocharis S, Kljanienko J, Giaginis C, et al. FAK and Src expression in mobile tongue squamous cell carcinoma: associations with clinicopathological parameters and patients survival[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(8): 1369-1377.

[9] Ilic D, Damsky C H, Yamamoto T. Focal adhesion kinase: at the crossroads of signal transduction[J]. J Cell Sci, 1997, 110(Pt4): 401-407.

[10] Fu Y M, Zhang H, Ding M, et al. Specific amino acid restriction inhibits attachment and spreading of human melanoma via modulation of the integrin/focal adhesion kinase pathway and actin cytoskeleton remodeling[J]. Clin Exp Metastasis, 2004, 21(7): 587-598.

[11] Lai I R, Chu P Y, Lin H S, et al. Phosphorylation of focal adhesion kinase at Tyr397 in gastric carcinomas and its clinical significance[J]. Am J Pathol, 2010, 177(4): 1629-1637.

[12] Chatzizacharias N A, Giaginis C, Zizi-serbetzoglou D, et al. Evaluation of the clinical significance of focal adhesion kinase and SRC expression in human pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Pancreas, 2010, 39(6): 930-936.

(责任编辑:冉明会)