

# FAK 在大肠癌中的表达及其临床意义

杨红军, 丁彦青

杨红军, 丁彦青, 中国人民解放军第一军医大学病理学教研室  
广东省广州市 510515  
国家自然科学基金及国家“973”资助课题, No.30170423, No.  
2001C13510208  
项目负责人: 丁彦青, 510515, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学病理学教研室. dyq@fimmu.com  
电话: 020-61642148 传真: 020-87705671  
收稿日期: 2002-10-09 接受日期: 2002-11-04

## 摘要

目的: 研究黏着斑激酶 (FAK) 在大肠癌及癌旁组织中的表达及其与肿瘤细胞分化、浸润、转移等生物学行为的关系。

方法: 应用免疫组织化学 LSAB 法检测 60 例大肠癌及癌旁组织石蜡标本中 FAK 蛋白的表达水平。

结果: FAK 在癌组织中的表达明显高于癌旁组织 ( $\chi^2=42.553$ ,  $P=0.000$ ), 低分化癌组织较高分化、中分化组织中 FAK 的表达水平高 ( $\chi^2=4.848$ ,  $P=0.028$ ), 浸润程度越深表达越高 ( $\chi^2=11.518$ ,  $P=0.001$ ), 有淋巴结转移较无转移组织的表达水平高 ( $\chi^2=9.613$ ,  $P=0.002$ )。

结论: FAK 可能既是一种转化相关酶又是一种演变相关酶。FAK 的表达量可作为肿瘤发生、发展过程中一种较有价值的病理指标。

杨红军, 丁彦青. FAK 在大肠癌中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2003; 11(5): 663-665

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/663.htm>

## 0 引言

大肠癌是一种常见的恶性肿瘤, 侵袭与远处转移是导致大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肿瘤细胞与宿主细胞相互作用的生物学过程。由整合素 (integrin) 激活 FAK 介导的信号转导在此过程中发挥着重要作用<sup>[1,2]</sup>。

整合素是一类跨膜糖蛋白受体, 他与配体 (大部分为 ECM 成分) 的连接促使 FAP 即黏着斑的形成。FAP 是整合素转导信号的结构基础。除细胞骨架蛋白外, 在 FAP 内还存在多种重要的信号转导分子, 如 FAK、Src 等。可以说 FAP 的存在为这些信号分子间的反应提供了一个支架, 便利了整合素介导的信号传递<sup>[3,4]</sup>。FAK (黏着斑激酶) 是一非受体酪氨酸蛋白激酶<sup>[5]</sup>。FAP 形成后, FAK 发生自主磷酸化而活化并且与 Src 形成信号转导复合物。Src 与 FAK 结合后能够相互激活, 使 FAK 完全活化。活化的 FAK 进而通过 paxillin、Grb2、Cas、PI-3K 及 STAT 等与信号转导有关的分子, 激活多条信号转导通路<sup>[6-8]</sup>。从而参与细胞分化、增生、伸展和迁移,

以及肿瘤的侵袭和转移等。因此, FAK 被认为是整合素依赖性信号转导通路的基础分子, 在整合素介导的信号转导途径中起着关键作用<sup>[9,10]</sup>。

本研究采用免疫组织化学方法检测了大肠癌及相应癌旁组织中 FAK 的表达, 以此了解 FAK 在大肠癌组织及相应癌旁组织中的表达情况, 并分析他们与癌细胞分化程度及侵袭转移间的关系。

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集我校附属南方医院外科手术标本共 60 例, 全部为腺癌, 其中男性 46 例, 女性 14 例。年龄 26-75 岁, 组织经 100 mL/L 甲醛常规固定, 石蜡包埋, 5  $\mu\text{m}$  连续切片, 分别进行 H E 染色和免疫组化染色。FAK (H-1) 抗体 (小鼠抗人单克隆抗体) 及生物素标记的羊抗小鼠 IgG 为 Santa Cruz 公司产品。LSAB (SP) 试剂为美国 Vector Laboratories 公司产品, 其余试剂为国产分析纯。

## 1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学方法 采用我室创立的真空负压链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法 (LSAB 或 SP 法)<sup>[11]</sup>。具体步骤如下: (1) 石蜡切片常规脱蜡至水 10 min; (2) 置于 3 mL/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  甲醇中真空负压 5 min; (3) 水洗 1 min; (4) 切片置入 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中, 放入已预先将温度调到 95 左右的真空恒温干燥箱中, 真空负压 10 min, 室温静置 10 min; (5) PBS 洗 3 次, 共 3 min; (6) 加 1 滴或 50  $\mu\text{L}$  10 mL/L 正常羊血清 (第二抗体动物血清), 真空负压 5 min; (7) 加 1 滴或 50  $\mu\text{L}$  一抗 (1:100 稀释), 真空负压 5 min; (8) PBS 冲洗 3 次, 共 3 min; (9) 加 1 滴或 50  $\mu\text{L}$  二抗 (1:100), 真空负压 5 min; (10) PBS 洗 3 次, 共 2 min; (11) 加 1 滴或 50  $\mu\text{L}$  SP 复合物, 真空负压 5 min; (12) PBS 洗 2 次, 共 2 min; (13) DAB- $\text{H}_2\text{O}_2$  显色 5 min; (14) PBS 洗 1 min, 水洗 1 min, 苏木素复染 1 min, 中性树脂胶封固。每例均取 1 片用 PBS 取代一抗作阴性对照。

1.2.2 分化分级标准 参照 WHO 癌细胞分化分级标准: 低分化 (级), 中分化 (级), 高分化 (级)。

1.2.3 半定量结果判断<sup>[12]</sup> 免疫组化染色, 无棕黄色为 (-); 淡棕黄色为 (+); 棕黄色为 (++) ; 棕褐色为 (+++)。同样物镜下观察阳性细胞数 (-): 无阳性细胞; (+): 阳性细胞 10%; (++) : 阳性细胞为 11-50%; (+++) : 阳性细胞 >50%。

统计学处理 采用  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

2.1 FAK在大肠癌及癌旁组织中的表达 在60例癌组织中有35例FAK表达为强阳性(+++)或较强阳性(++),在60例癌旁组织中仅有2例较强阳性,二者有显著性差异( $\chi^2=42.553$ ,  $P=0.000$ ).大肠癌与癌旁组织的FAK表达阳性率有显著性差异( $\chi^2=8.711$ ,  $P=0.003$ ),见表1.

表1 FAK在大肠癌及癌旁组织中的表达

组织	n	FAK				阳性率(%)
		-	+	++	+++	
组织类别						
癌旁组织	60	22	36	2	0	63.3
癌组织	60	8	17	23	12	86.7
分化程度						
低分化	35	4	7	15	9	88.6
高或中分化	25	5	10	7	3	80.0
浸润程度						
黏膜或浅肌层	13	7	4	2	0	46.2
深肌层或全层	47	2	13	20	12	95.7
转移情况						
无淋巴结转移	29	8	10	10	1	72.4
有淋巴结转移	31	0	7	13	11	100.0

2.2 FAK的表达与大肠癌分化程度的关系 在35例低分化大肠癌组织中,表达为强阳性或较强阳性者共24例,在25例高、中分化组织中表达为强阳性或较强阳性者共10例,二者有显著性差异( $\chi^2=4.848$ ,  $P=0.028$ ).但低分化组与高中分化组的FAK表达阳性率相比无显著性差异( $\chi^2=0.840$ ,  $P=0.359$ ),见表1.

2.3 FAK的表达与大肠癌浸润程度的关系 在13例有浅肌层或黏膜浸润的癌组织中,2例为较强阳性.在47例有深肌层或全层浸润的癌组织中,表达为强阳性或较强阳性者共32例.可见FAK在深肌层或全层浸润的癌组织中的表达明显高于浸润较浅的组织,有显著性差异( $\chi^2=11.518$ ,  $P=0.001$ ).2组间的FAK表达阳性率有显著性差异( $\chi^2=19.642$ ,  $P=0.000$ ),见表1.

2.4 FAK的表达与大肠癌转移的关系 在29例无淋巴结转移的癌组织中,表达为强阳性或较强阳性者共11例.31例有淋巴结转移的癌组织中,表达为强阳性或较强阳性者共24例,说明转移组与非转移组之间表达量有显著性差异( $\chi^2=9.613$ ,  $P=0.002$ ),且2组间的FAK表达阳性率也有显著性差异( $\chi^2=9.867$ ,  $P=0.002$ ),见表1.

## 3 讨论

FAK是一种非受体酪氨酸蛋白激酶,主要在细胞质中表达,与肿瘤关系密切.本研究显示,FAK在大肠癌组织中的表达量明显高于癌旁组织,二者的阳性率有

显著性差异;低分化大肠癌组织的FAK表达量比高、中分化癌组织的表达量高,但他们的阳性率无显著性差异;FAK的表达与癌细胞浸润、转移有关,浸润程度越深,FAK的表达越强,同时有淋巴结转移的癌组织FAK的表达较无转移组高,他们的阳性率有显著性差异.此结果与其他学者的相关研究类似<sup>[13-15]</sup>.

尽管目前关于FAK在癌组织及低分化癌组织中表达比癌旁及高、中分化癌组织高的原因尚未明了,但通常认为包括以下几个方面:(1)FAK分子中有6个酪氨酸的磷酸化位点,其中Tyr397为自身磷酸化位点,对Src有调控作用.在正常组织中,ECM蛋白含量较低,而在肿瘤基质中,ECM蛋白含量升高,同时,癌旁组织整合素 $\alpha_5\beta_1$ 等亚基高表达,造成基质蛋白相对更少,使整合素不能有效地与基质结合,此时FAK的Tyr397虽然被磷酸化,但FAK的活性并不高,FAK表达较低;另外,在癌旁组织中可能Src的表达本身较低,使Src不能与FAK进行有效的结合,从而使FAK的活性更低,FAK的表达下降<sup>[16]</sup>.当然,就本实验而言,Src及整合素 $\alpha_5\beta_1$ 等的表达水平尚需实验加以证实;(2)在癌旁组织中还存在着与FAK连接的PTEN等对整合素介导的信号转导起负调控作用的因子,使FAK的活性降低,FAK的表达下降<sup>[17]</sup>; (3)也有研究认为FAK的过度表达与其基因量的增加有关<sup>[18]</sup>.如前所述,FAK的磷酸化在信号转导过程中起着关键作用,因此,FAK表达的上调或下调对此过程也具有深远的影响.癌组织中FAK处于过度表达,从而将存活信号不断放大,导致癌细胞不断地以非锚定生长的方式增生.而肿瘤细胞的不断增生和运动是肿瘤浸润的前提,即肿瘤细胞的增生和运动有利于细胞侵袭和浸润,肿瘤浸润是转移的前奏.所以上述原因也导致了浸润及转移组大肠癌中FAK的表达升高.高、中分化癌与低分化癌的FAK表达阳性率无显著性差异的原因,可能由于FAK是一种在大多数正常组织中都存在的基因<sup>[15,19]</sup>,可能在正常组织中FAK有表达,但表达水平较低,如本研究所见,癌旁组织FAK表达大多为弱阳性,而在癌组织中表达明显升高.

由此可见,FAK作为整合素介导的信号转导过程中的基础分子,是一种与细胞的癌变、分化、转移相关的蛋白激酶,他可能既是一种转化相关酶,又是一种演变相关酶.FAK表达的高低可能作为肿瘤发生、发展过程中一种较有价值的病理指标,而对FAK表达量及活性的调控对改变癌细胞的发展将有积极作用.

## 4 参考文献

- 1 Kumar CC. Signaling by integrin receptors. *Oncogene* 1998; 17:1365-1373
- 2 Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999; 285: 1028-1032
- 3 Cary LA, Han DC, Guan JL. Integrin-mediated signal transduction pathways. *Histol Histopathol* 1999; 14: 1001-1009
- 4 Calderwood DA, Shattil SJ, Ginsberg MH. Integrins and actin

- filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem* 2000;275:22607-22610
- 5 Schaller MD, Parsons JT. Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:705-710
  - 6 Schlaepfer DD, Hunter T. Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol* 1998; 8: 151-157
  - 7 Liu G, Guibao CD, Zheng J. Structural insight into the mechanisms of targeting and signaling of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* 2002;22:2751-2760
  - 8 Hayashi I, Vuori K, Liddington RC. The focal adhesion targeting (FAT) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin. *Nat Struct Biol* 2002;9:101-106
  - 9 Roy S, Ruest PJ, Hanks SK. FAK regulates tyrosine phosphorylation of CAS, paxillin, and PYK2 in cells expressing v-Src, but is not a critical determinant of v-Src transformation. *J Cell Biochem* 2002;84:377-388
  - 10 Salazar EP, Rozengurt E. Src family kinases are required for integrin-mediated but not for G protein-coupled receptor stimulation of focal adhesion kinase autophosphorylation at Tyr-397. *J Biol Chem* 2001;276:17788-17795
  - 11 蔡俊杰, 邱红明, 张盛. 应用真空负压 LSAB 法快速显示各种组织相关抗原的研究. *中国组织化学与细胞化学杂志* 1996;5:109-111
  - 12 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准. *中国癌症杂志* 1996;6:229-231
  - 13 Ayaki M, Komatsu K, Mukai M, Murata K, Kameyama M, Ishiguro S, Miyoshi J, Tatsuta M, Nakamura H. Reduced expression of focal adhesion kinase in liver metastases compared with matched primary human colorectal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2001; 7:3106-3112
  - 14 Brunton VG, Fincham VJ, McLean GW, Winder SJ, Paraskeva C, Marshall JF, Frame MC. The protrusive phase and full development of integrin-dependent adhesions in colon epithelial cells require FAK- and ERK-mediated actin spike formation: deregulation in cancer cells. *Neoplasia* 2001;3:215-226
  - 15 Cance WG, Harris JE, Iacocca MV, Roche E, Yang X, Chang J, Simkins S, Xu L. Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin Cancer Res* 2000;6:2417-2423
  - 16 Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* 1999;71:435-478
  - 17 Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 1998;280:1614-1617
  - 18 Agochiya M, Brunton VG, Owens DW, Parkinson EK, Paraskeva C, Keith WN, Frame MC. Increased dosage and amplification of the focal adhesion kinase gene in human cancer cells. *Oncogene* 1999;18:5646-5653
  - 19 Hanks SK, Calalb MB, Harper MC, Patel SK. Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89: 8487-8491

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 大黄对大鼠结肠动力及肠神经系统的影响

童卫东, 张胜本, 刘宝华, 张连阳, 黄显凯, 高峰

童卫东, 张胜本, 刘宝华, 张连阳, 黄显凯, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所普外科 重庆市 400042  
高峰, 兰州军区总医院普外科 甘肃省兰州市 730001  
项目负责人: 童卫东, 400042, 重庆市长江支路10号, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所普外科. vdtong@hotmail.com  
电话: 023-68757248  
收稿日期: 2002-11-19 接受日期: 2002-11-29

### 摘要

目的: 探讨长期应用大黄对结肠机电、肠神经系统的影响。

方法: 建立大鼠“泻剂结肠”模型, 应用电生理、组化及免疫组化技术研究大黄对大鼠结肠动力、ENS 多种神经递质及 Cajal 间质细胞(ICC)的影响。

结果: 大鼠饲养大黄 3 mo 后, 结肠慢波频率减慢; 结肠肌间丛 NADPH 阳性神经细胞数目增多, AchE 阳性神经细胞数目减少; NOS 免疫反应性增强, SOM 免疫反应性减弱; 肌间丛 ICC 分布不均匀, 突起连接杂乱。

结论: 长期应用大黄对结肠动力和 ENS 有损害作用, 在临床治疗顽固性便秘时应避免长期应用大黄等刺激性泻剂。

童卫东, 张胜本, 刘宝华, 张连阳, 黄显凯, 高峰. 大黄对大鼠结肠动力及肠神经系统的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(5):665-667

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/665.htm>

### 0 引言

大黄是慢传输性便秘(slow transit constipation, STC)患者常用的一种泻剂, STC 结肠动力和多种肠神经递质有异常变化, 但这些变化是否继发于长期服用大黄等刺激性泻剂争议较多<sup>[1]</sup>。我们用大黄建立大鼠“泻剂结肠”模型, 用电生理、肌间神经丛铺片、免疫组化、碘化锌-锇酸(zinc iodide-osmic acid, ZIO)染色等方法, 检测结肠机电、肠神经递质及 Cajal 间质细胞(interstitial cells of cajal, ICC)变化, 探讨大黄对结肠动力和肠神经系统(enteric nervous system, ENS)的影响及其可能机制。

### 1 材料和方法

1.1 材料 成年 Wistar 大鼠 32 只随机分为对照组和大黄组, 每组 16 只。

#### 1.2 方法

1.2.1 模型建立 对照组饲以普通干饲料。大黄组饲以含大黄饲料, 起始剂量为 200 mg/(kg·d), 半数致泻剂量为 1 000 mg/(kg·d), 维持此剂量直到稀便消失, 再按 200 mg/(kg·d)递增, 如此保持半数以上动物有下泻作用饲养 3 mo, 最终调整剂量为 2 400 mg/(kg·d)。

1.2.2 结肠机电测定 禁食 24 h, 在结肠近段(距盲肠约