

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.07.017

# Src 家族酪氨酸激酶 Fyn 在肺鳞状细胞癌组织中的表达及意义

李 鑫<sup>1</sup>, 齐 宇<sup>2</sup>, 张明智<sup>1</sup>, 樊青霞<sup>1</sup>, 王瑞林<sup>1</sup>

## Expression significance of Src Family Throsine Kinase Fyn in Pulmonary Squamous Cell Carcinoma

LI Xin<sup>1</sup>, QI Yu<sup>2</sup>, ZHANG Ming-zhi<sup>1</sup>, FAN Qing-xia<sup>1</sup>, WANG Rui-lin<sup>1</sup>

1. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China, 2. The Department of Thoracic Surgery

Corresponding Author: QI Yu, E-mail: ekansqy@gmail.com

**Abstract: Objective** To determine whether Fyn expression was altered in pulmonary squamous cell carcinoma (SCC) compared with pericancerous normal lung tissue (NORMAL). **Methods** We examined Fyn expression in pulmonary SCC and compared it to the normal lung tissue by immunohistochemical staining and immunoblotting. **Results** By immunohistochemical staining Fyn protein expression levels are increased in pulmonary SCC ( $12.54 \pm 2.45$ ) compared to the NORMAL ( $4.34 \pm 1.27$ ),  $P < 0.01$ . Meanwhile, we got the similar results by immunoblot analysis. **Conclusion** Fyn may act as an important molecule in the pulmonary SCC regulation.

**Key words:** Fyn; Pulmonary squamous cell carcinoma

**摘要:目的** 探讨肺鳞状细胞癌组织中 Fyn 的表达水平及其意义。**方法** 采用免疫组织化学法和免疫印迹法分析肺鳞状细胞癌组织及正常肺组织 Fyn 蛋白表达水平的变化。**结果** 免疫组织化学染色显示肺鳞状细胞癌组织中 Fyn 蛋白表达水平 ( $12.54 \pm 2.45$ ) 高于癌旁正常肺组织中染色指数 ( $4.34 \pm 1.27$ ), 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。免疫印迹结果亦显示肺鳞癌组织中 Fyn 蛋白表达强于癌旁正常肺组织。**结论** Fyn 蛋白在肺鳞状细胞癌组织中过度表达, 提示 Fyn 基因在肺鳞状细胞癌的发生发展过程中起重要作用。

**关键词:** Fyn; 肺鳞状细胞癌

**中图分类号:** R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2010)07-0799-03

## 0 引言

SRC 家族酪氨酸激酶 (SFKs) 包括 Src、Fyn、Yes 等至少 9 种非受体酪氨酸激酶。由于历史的原因, 过去认为 SFKs 对细胞转化不起作用, 并且缺乏其在人类肿瘤发生过程中活性突变的证据, 多年来人们始终怀疑 SFKs 在肿瘤病因学及肿瘤进展方面起重要作用。有关 SFKs 与上皮细胞来源肿瘤之间关系的研究鲜有报道。最近, 多项研究显示 SFKs 蛋白表达水平和(或)催化活性水平的异常升高与人类皮肤癌<sup>[1-2]</sup>、结肠癌<sup>[3]</sup>等多种肿瘤的发生相关。目前, 尚未见到 Fyn 蛋白与肺鳞状细胞癌 (SCC) 关系

的相关报道, 综合 SFKs 特别是 Fyn 的特点, 我们猜测与正常肺组织相比 Fyn 在肺鳞状细胞癌组织中是异常表达的。为了验证此假设, 我们检测了肺鳞状细胞癌福尔马林固定石蜡包埋组织块中的 Fyn 蛋白表达水平, 同时与癌旁正常肺组织 (NORMAL) 作对比。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料

收集郑州大学第一附属医院 30 例肺鳞状细胞癌手术切除标本, 包括肺鳞状细胞癌组织及癌旁正常肺组织。Fyn (SC-16) 抗体 (美国 Santa Cruz 公司); beta Actin 鼠单克隆抗体 (美国 Abcam 公司); 羊抗鼠 IgG HRP 标记抗体 (美国 Bio-Rad 公司); DAB 底物试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); Streptavidin-Horseradish Peroxidase pre-diluted (SAV-HRP) 试剂盒 (美国 BD Biosciences Pharmingen 公

收稿日期: 2010-01-06; 修回日期: 2010-04-27

作者单位: 1. 450052 郑州大学第一附属医院肿瘤科,

2. 胸外科

通信作者: 齐宇, E-mail: ekansqy@gmail.com

作者简介: 李鑫 (1976-), 女, 博士在读, 主治医师, 主要从事肿瘤的基础与临床研究

司);生物素标记羊抗兔 IgG(IHC)(美国 BD Biosciences Pharmingen 公司); Pierce BCA 蛋白试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司);伯乐 Western 印迹系统(美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学染色** 所有病例均经 HE 染色确定诊断。采用 SP 法行免疫组织化学染色,具体步骤如下:所有标本切片经脱蜡,梯度乙醇水化后蒸馏水润洗。为了暴露隐藏的抗原表位,切片经 85℃ 柠檬酸盐缓冲液(PH6.0)孵育 20min,置于室温 30min 后蒸馏水再次润洗。切片置于 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10min 以灭活内源性过氧化物酶和生物素后 PBST 清洗 3 次。组织切片室温下经普通羊血清孵育 1h 以封闭非特异性抗原。1:100 稀释兔 Fyn 抗体稀释液 4℃ 孵育过夜。亲和纯化生物素标记羊抗兔多克隆免疫球蛋白(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA)1:100 稀释液孵育 30min。辣根过氧化物酶溶液孵育 40min,DAB 底物显色试剂盒(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA)孵育 2min 后 PBST 润洗后苏木精复染,梯度乙醇脱水并封片。对照组:采用已知肺鳞状细胞癌阳性标本作阳性对照,纯化兔 IgG(美国 Invitrogen 公司)替代一抗作为阴性对照,阴性对照均没有染色。

**1.2.2 染色强度分析** 所有切片均经我院两位病理科医师独立阅片,判断肺鳞状细胞癌组和对照组的染色强度及染色范围。染色强度分级如下:1 分无染色,2 分弱染色,3 分中等染色,4 分强染色。染色范围分级如下:1 分 0~25%, 2 分 >25%~50%, 3 分 >50%~75%, 4 分 >75%~100%。染色强度和染色范围的乘积得到每个样品的染色指数。最大染色指数为 16,最小为 0。

**1.2.3 Western blot 检测** 新鲜肺鳞状细胞癌组织及癌旁正常肺组织块经 RIPA 缓冲液裂解,标准曲线法测定样品蛋白浓度,经变性后取 30μg 上样,经 10% SDS-PAGE 电泳,转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜,用兔抗人 Fyn 单抗室温孵育 2 h,洗膜后加入辣根过氧化物标记的羊抗兔二抗,ECL 显影,X 光片暗室中感光。

### 1.3 统计学方法

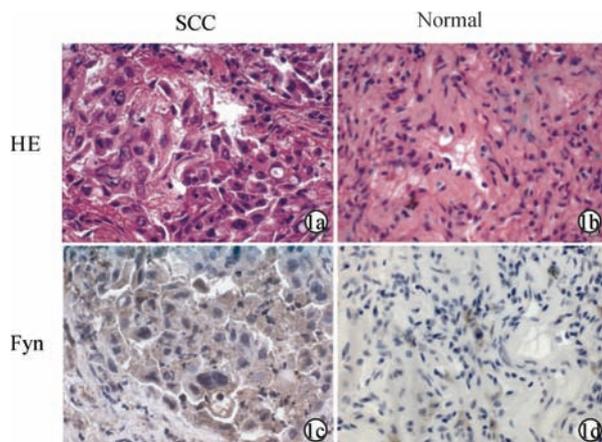
采用双侧 *t* 检验,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果

### 2.1 肺鳞状细胞癌及癌旁正常肺组织 Fyn 蛋白免疫组织化学染色观察

所有病例均经 HE 染色以明确诊断。正常肺组

织 Fyn 蛋白弱染色,肺鳞状细胞癌组织 Fyn 蛋白强染色,见图 1。



1a,1b Normal and SCC staining with hematoxylin and eosin (HE, × 400); 1c: Fyn staining was stronger in pulmonary squamous cell carcinoma, 1d: Fyn staining was weak, even diminished in NORMAL(Fyn IHC Staining × 400)

图 1 Fyn 蛋白在正常肺组织及肺鳞状细胞癌中的表达

Figure 1 Immunohistochemical staining for Src family tyrosine kinases Fyn in normal pulmonary tissue and pulmonary squamous cell carcinoma

### 2.2 肺鳞状细胞癌及正常肺组织 Fyn 蛋白免疫组织化学染色强度分析

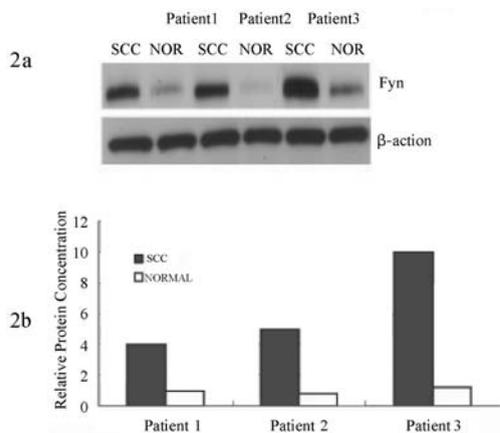
所有切片经半定量法分析免疫组织化学染色指数,最大 16,最小 0。Fyn 蛋白在肺鳞状细胞癌组织染色指数高于正常肺组织中染色指数。Fyn 蛋白在食管鳞状细胞癌组织染色指数(12.54 ± 2.45)高于癌旁正常肺组织中染色指数(4.34 ± 1.27),差异有统计学意义(*P* < 0.01)。

### 2.3 肺鳞状细胞癌组织和正常黏膜组织 Fyn 蛋白 Western 印迹观察

通过免疫印迹发现,Fyn 蛋白在肺鳞状细胞癌组织中的表达强于正常肺组织, *n* = 3,见图 2a。Quantity-one 软件测量灰度,并经 β-actin 标准化后显示,Fyn 蛋白在肺鳞癌组织中表达明显高于对照组,见图 2b。

## 3 讨论

肺癌是起源于支气管黏膜上皮、腺上皮、肺泡上皮组织的恶性肿瘤,正常支气管黏膜上皮组织具有自我更新能力,维持上皮细胞生长与终止分化,处于相对平衡状态。而在支气管鳞状细胞癌中,这种相对的平衡状态被破坏,支气管上皮组织从分化状态转变为增殖状态,相关研究是我们解开肺鳞状细胞癌发生的关键事件。



2a: Tissue samples of pulmonary squamous cell carcinoma (SCC) and normal pulmonary tissue were homogenized in a radiimmune precipitation (RIPA) lysis buffer and protein concentration was determined by standard curve methods, lysates were subjected to SDS-PAGE analysis. 2b: A densitometric analysis of western blot data after standardization to  $\beta$ -actin signals, is represented graphically

图 2 正常肺组织及肺鳞状细胞癌组织中 Fyn 蛋白 Western Blot 检测结果

Figure 2 Immunoblotting analysis of Srcasm in ESCC and UNR

SRC 家族酪氨酸激酶(SFKs)是一个多功能蛋白质家族,参与包括细胞分化、增殖、迁移、血管生成等在内的人体多种正常机能活动及癌变的过程<sup>[4]</sup>。在细胞分化过程中 Fyn 是 SFK 家族中唯一发生酶活性改变的酪氨酸激酶<sup>[5]</sup>。体外实验中,Fyn 缺陷小鼠上皮细胞的分化失常表明 Fyn 参与上皮细胞的分化。体内实验中,K14-Fyn 转基因鼠表皮增厚、增殖依赖于 Fyn 水平的高表达。这可能与 p44/42MAPK、STAT3 和 PDK1 的细胞信号转导通路的活化有关<sup>[1]</sup>。Jie Zhang 等<sup>[6]</sup>通过免疫印迹及免疫组织化学染色检测了肺腺癌组织及人肺非小细胞肺癌细胞系中 Src 酪氨酸激酶及磷酸化活化酪氨酸激酶的水平,结果显示在这些组织及细胞中 Src 酪氨酸激酶水平高表达。Lesslie 等<sup>[3]</sup>的研究显示在人 HT29 和 KM12L4 结直肠癌细胞株中血管内皮生长因子激活 Src 家族酪氨酸激酶而使其高表达,并证实 SFKs 与结直肠癌的侵袭和转移密切相关。国内张永涛等<sup>[7]</sup>应用 SFKs 抑制剂 PP2 处理乳腺癌 MDA-MB231 细胞,SFKs 表达明显降低,细胞的增殖和侵袭力明显受到抑制,也证实 SFKs 与肿瘤细胞的增殖等密切相关。这些研究显示 Src 家族酪氨酸激酶尤其是 Fyn 在人上皮起源肿瘤中扮演了重要角色。究其原因,可能有:(1)Fyn 促进细胞周期

蛋白复合体的表达,抑制 P27 的表达,加速转化细胞 G<sub>1</sub> 期向 S 期的过渡,引起细胞增殖<sup>[5]</sup>。(2)Fyn 激活蛋白激酶 B(PKB),而活化的 PKB 参与抑制细胞凋亡的作用<sup>[8]</sup>。

本结果显示 Fyn 蛋白水平在肺鳞状细胞癌组中的表达高于正常肺组织组。这一结果说明 Fyn 水平增高是肺鳞状细胞癌的一个重要特征,提示 Fyn 参与支气管肺鳞癌发生的细胞信号转导,促进支气管黏膜上皮细胞的增殖,诱发支气管黏膜上皮发生癌变。其可能的机制为 Fyn 基因的活性突变和(或)负调控机制的受损。最近 Li 等<sup>[1]</sup>通过体内和体外实验证实 Srcasm 是 Fyn 的作用底物和负调控因子,在人皮肤鳞癌组织中这种负调控机制受损,导致皮肤鳞癌的发生,我们猜测在肺鳞状细胞癌中存在相似的负调控机制。本研究结果显示 Fyn 在肺鳞癌组织中高表达,在肺正常组织中亦有表达,但其表达水平明显低于肺鳞癌组织,我们认为在肺鳞状细胞癌发生过程中 Fyn 负调控机制受损可能起主导作用,这些有待我们后续研究加以证明<sup>[9]</sup>。

参考文献:

[1] Li W, Marshall C, Mei L, et al. Srcasm corrects Fyn-induced epidermal hyperplasia by kinase down-regulation[J]. J Biol Chem, 2007,282(2):1161-1169.  
 [2] Pulitzer M, Li W, Hanson M, et al. Srcasm overexpression in psoriasis-insights into pathogenesis[J]. J Cutan Pathol, 2007, 34(2):160-165.  
 [3] Lesslie DP, Summy JM, Parikh NU, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 mediates migration of human colorectal carcinoma cells by activation of Src family kinases [J]. Br J Cancer, 2006,94(11):1710-1717.  
 [4] Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by Src family kinases[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997,13:513-609.  
 [5] Calautti E, Missero C, Stein PL, et al. fyn tyrosine kinase is involved in keratinocyte differentiation control[J]. Genes Dev, 1995,9(18):2279-2291.  
 [6] Zhang J, Kalyankrishna S, Wislez M, et al. SRC-family kinases are activated in non-small cell lung cancer and promote the survival of epidermal growth factor receptor-dependent cell lines[J]. Am J Pathol, 2007,170(1):366-376.  
 [7] 张永涛,魏军成,赵良平,等. PP2 药物抑制乳腺癌细胞侵袭与增殖的机制[J]. 肿瘤防治研究, 2008,35(1):11-13.  
 [8] Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP. Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression[J]. Cancer Res, 1995,55 (24):6161-6165.  
 [9] 朱红, Tam, Yec, 等. EGFR 突变与非小细胞肺癌酪氨酸激酶抑制剂靶间治疗[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2007, 14(2):105-109.

[编辑:黄国玲;校对:周永红]