

文章编号:1005-6947(2005)10-0785-04

· 简要论著 ·

# FAK在胃癌中的过度表达与生物学行为关系研究

陈晋湘, 陈子华

(中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南长沙 410008)

**摘要:**为探讨黏着斑激酶(FAK)在胃癌及癌旁组织中的表达及与肿瘤细胞的生物学行为的关系。笔者应用免疫组织化学方法检测40例胃癌及癌旁组织石蜡标本中FAK蛋白的表达水平。结果显示FAK在癌组织中的表达明显高于癌旁组织,低分化组织中的表达高于高、中分化组织,在有淋巴结转移的组织中较无淋巴转移组织表达高,浸润程度越深表达越高。FAK阳性患者术后3,5年生存率分别为67.9%,46.4%,阴性患者术3,5年生存率分别83.3%和50.0%,两组患者术后3,5年生存率无显著性差异( $P > 0.05$ )。伴有FAK过度表达患者术后3,5年生存率分别为65.0%,40.0%,无FAK过度表达患者术后3,5年生存率分别78.6%和57.1%,两组患者术后3,5年生存率无显著性差异( $P > 0.05$ )。提示FAK的表达量可作为胃癌发展过程中一种较有价值的病理指标,但是否有助于患者预后判断尚无法肯定。

**关键词:**胃肿瘤/病理学;黏着斑激酶

**中图分类号:**R735.2;R730.21

**文献标识码:**B

胃癌是一种常见的恶性肿瘤,侵袭和远处转移是导致临床治疗失败和胃癌患者死亡的主要原因。胃癌一方面在早期即可通过淋巴道和血管系统向远处转移,另一方面可穿透胃壁而侵犯邻近组织,形成局部播散。后一过程的发生依赖于肿瘤细胞首先必须从原发灶脱落并且具有活性,肿瘤细胞间相互黏附性能的调节,目前被认为是肿瘤发展、转移的关键。

近年来,整合素介导的信号传导过程中的中心分子——黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)受到重视。FAK激活后,引发其他细胞骨架蛋白和信号蛋白的酪氨酸磷酸化,从而介导细胞与胞外基质(extracellular matrix, ECM)的黏附,参与细胞多种生理功能和病理过程,如细胞识别、生长、分化、迁移、淋巴细胞的归巢以及肿瘤细胞的转移和侵袭。笔者采用免疫组化的方法检测了胃癌及相应癌旁

组织中FAK的表达,以探讨FAK与胃癌分化、侵袭、转移以及预后的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 标本来源

收集我院普通外科1996~1999年手术切除胃癌和癌旁5cm以远的标本40例,其中男23例,女17例;年龄29~72岁,中位年龄50.4岁。早期胃癌13例,进展期胃癌27例;低分化胃癌24例,高中分化胃癌16例;无淋巴转移13例,有淋巴结转移27例,其中9例出现肝脏、肠系膜根部等远处转移。所有患者术前均未接受化疗抗肿瘤药物治疗。标本组织经甲醛常规固定,石蜡包埋,4 $\mu$ m连续切片。每个病例切取癌组织和癌旁组织各2片,1片行免疫组化检测,1片行HE染色。

### 1.2 试剂

单克隆抗体FAK(H-1)购自美国Santa cruz生物技术公司;S-P试剂盒及DAB显色试剂盒为武汉博士德生物技术公司产品。

### 1.3 方法

行免疫组化检测:(1)切片常规脱蜡至水;(2)

收稿日期:2005-05-09; 修订日期:2005-07-21。

作者简介:陈晋湘(1974-),男,湖南长沙人,中南大学湘雅医院主治医师,主要从事胃肠外科方面的研究。

通讯作者:陈晋湘 电话:0731-4327016。

0.3% 过氧化氢室温浸泡 5 ~ 10 min 以灭活内源性酶。蒸馏水洗 3 次; (3) 热修复抗原: 将切片浸入 0.01 M 枸橼酸盐缓冲液 (pH6.1), 微波炉加热至沸腾, 间隔 5 min 后, 反复 2 次。冷却后 PBS (phosphat buffer saline pH7.6) 洗涤 3 次, 每次 3 min; (4) 滴加正常山羊血清封闭液, 恒温 37℃ 30 min。甩去多余液体, 不洗; (5) 滴加 FAK 单抗 (第一抗体) 浓度为 1:50, 恒温 37℃ 30 min 后, 4℃ 过夜。PBS (pH7.6) 洗 5 min, 3 次; (6) 滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG (二抗), 恒温 37℃ 30 min, PBS (pH7.6) 洗 2 min, 3 次; (7) 滴加试剂 SABC, 恒温 37℃ 30 min, PBS (pH7.6) 洗 5 min, 4 次; (8) DAB 显色: 使用 DAB 显色试剂盒 (AR1022)。取 1 mL 蒸馏水, 加试剂盒中 A, B, C 试剂各 1 滴, 混匀后加至切片。室温显色, 镜下控制反应时间 (约 5 ~ 10 min); (9) 苏木素轻度复染。脱水, 透明, 风片。显微镜观察。每批均设立阴性对照 (以 PBS 液代替第一抗体)。以肝细胞 FAK 阳性表达切片做为阳性对照。

#### 1.4 结果判断

光镜下分析结果: (1) 按切片中细胞显色深浅积分: 0 分, 细胞无显色; 1 分, 显色为黄色; 2 分, 为棕黄色; 3 分, 为棕褐色。 (2) 按切片中显色细胞的比例评分: 1 分, 显色细胞占切片中细胞总数的 10% 以下; 2 分, 11% ~ 50% 细胞显色; 3 分, 51% ~ 75% 以上细胞显色; 4 分, > 75%。每例肿瘤积分 = A + B, 按积分高低分为: 3 分以下为 (-); 3 分为 (+); 4 分以上为 (++) , 表示为过量表达<sup>[1]</sup>。由 2 名病理科医生单盲观察结果。

#### 1.5 统计学方法

采用卡方检验及精确概率法计算组间差异, 患者生存率分析采用 Kaplan-Meire 寿命表法及 Log-rank 检验组间生存率差异

## 2 结果

### 2.1 FAK 在胃癌及癌旁组织的表达

FAK 在胃癌及癌旁组织的表达阳性率分别为 82.5% 和 70%, 无显著性差异 ( $\chi^2 = 0.02$ ;  $P > 0.05$ ), 但是在癌组织中强阳性率为 57.5%, 而癌旁组织强阳性率仅为 5.0%, 两者存在显著性差异 ( $\chi^2 = 26.9$ ,  $P < 0.005$ ), 提示 FAK 在胃癌组织中存在过度表达 (表 1)。

在 24 例低分化胃癌组织和 16 例高中分化胃癌

组织中, FAK 表达阳性率分别为 83.0% 和 81.3%, 无显著性差异 ( $\chi^2 = 0.89$ ,  $P > 0.05$ )。但在 24 例低分化胃癌组织中, 有 17 例 FAK 表达为强阳性, 而在 16 例高中分化胃癌组织中仅 6 例表达为强阳性, 两者 FAK 表达量有显著性差异 ( $\chi^2 = 4.36$ ,  $P < 0.05$ ) (表 1)。

早期胃癌和进展期胃癌 FAK 表达阳性率分别为 61.5% 和 92.6%, 存在显著性差异 ( $\chi^2 = 3.9$ ,  $P < 0.05$ )。在 13 例早期胃癌中, 仅 3 例 FAK 表达为强阳性, 而 27 例进展期胃癌中有 20 例 FAK 强阳性表达, 两者存在显著性差异 ( $\chi^2 = 7.36$ ,  $P < 0.01$ )。提示 FAK 的表达可能与肿瘤浸润深度相关 (表 1)。

在 13 例无淋巴转移的胃癌病例中, 有 3 例 FAK 呈强阳性表达, 而 27 例有淋巴转移甚至远处转移的病例中, 有 20 例为强阳性表达, 两者之间存在显著性差异 ( $\chi^2 = 7.36$ ,  $P < 0.01$ ), 且 FAK 表达阳性率也存在显著性差异 ( $\chi^2 = 8.21$ ,  $P < 0.005$ )。提示 FAK 的表达可能与胃癌的转移相关。在有淋巴转移的胃癌组与有远处转移组之间, 无论是 FAK 的阳性率还是强阳性率均无显著性差异 (表 1)。

表 1 FAK 在胃癌及癌旁组织的表达

项目	例数	FAK 表达			阳性率 (%)	强阳性率 (%)
		(+)	(++)	(-)		
组织类型						
癌旁组织	40	26	2	12	70.0	5.0
癌组织	40	10	23	7	82.5	57.5
分化程度						
低分化	24	3	17	4	83.0	70.8
高或中分化	16	7	6	3	81.3	37.5
肿瘤分期						
早期	13	5	3	5	61.5	23.1
进展期	27	5	20	2	92.6	74.1
无淋巴转移	13	4	3	6	53.8	23.1
转移情况						
有淋巴转移	18	4	13	1	94.4	72.2
有远处转移	9	2	7	0	100.0	78.8

### 2.2 FAK 的表达与术后生存率的关系

本次研究中有 34 例获得随访, 随访时间为 10 ~ 68 个月。FAK 阴性患者, 术后 3, 5 年生存率分

别83.3%,50%,与FAK阳性患者的术后3,5年无显著性差异( $P > 0.05$ )(表2)

表2 FAK阳性表达与术后生存率的关系

项目	病例数	3年生存率(%)	5年生存率(%)
FAK阳性病例	28	67.9	46.4
FAK阴性病例	6	83.3	50.0
P值	-	>0.05	>0.05

FAK过量表达患者术后3,5年生存率分别为65.0%,40.0%,FAK非过表达患者术后3,5年生存率分别为78.6%,57.1%,两组术后生存率无显著性差异( $P > 0.05$ )(表3)。

表3 FAK过量表达与术后生存率的关系

项目	病例数	3年生存率(%)	5年生存率(%)
FAK过量表达	20	65.0	40.0
FAK非过量表达	14	78.6	57.1
P值	-	>0.05	>0.05

### 3 讨论

FAK是一个分子量为125kD的胞浆酪氨酸激酶,在整合素介导的信号传递途径中被激活后能进一步活化MAPK(mitogen-activated protein kinase)、PI-3K(phosphatidylinositol-3 kinase)等蛋白,对细胞的增殖、存活、粘附、转移进行调节,因此,FAK被认为是整合素依赖性信号传导通路的基础分子,有胞内第一信号之称<sup>[2]</sup>。

本研究发现,胃癌组织FAK表达的阳性率与癌旁组织表达的阳性率间无明显差异( $P > 0.05$ )。这与许多国内外相关研究的结果相吻合<sup>[3,4]</sup>。肿瘤组织与癌旁组织FAK表达无明显差异的主要原因考虑为FAK广泛存在于大多数正常组织<sup>[4]</sup>,它介导细胞在ECM上的黏附和迁移,并调控细胞的增殖和存活,整合素介导的细胞粘附到ECM是大多数细胞增殖所必需的。

本研究发现,尽管胃癌组织与癌旁组织FAK表达阳性率无明显差异,但在癌旁组织中,FAK表达水平较低,强阳性率仅为5%,而在癌组织中则明显的升高,强阳性率为57.5%,两者间差异明显( $P < 0.05$ ),提示在胃癌组织中FAK存在过

度表达。推测其原因可能有以下几方面:(1)FAK的激活需要整合蛋白与ECM配体结合,整合蛋白的表达量影响着FAK的表达,癌组织中,整合蛋白 $\beta 1$ 的表达明显高于正常组织,整合素的亚基与FAK的N-端区结合后,引起FAK构象改变,使激酶结构域处于活化状态,活性提高,使FAK的表达量增高<sup>[5]</sup>;(2),在癌组织中,FAK可以自主磷酸化后暂时形成复合物,活性较高,使细胞外的存活信号通过FAK介导的途径不断放大,从而使癌细胞不断增殖,FAK呈现高水平表达<sup>[6]</sup>。近年来,有许多研究显示FAK在食管癌、卵巢癌、大肠癌等恶性肿瘤中呈现过度表达。这些研究的结论与本研究的结果一致。

目前部分研究显示,FAK表达与肿瘤侵袭、转移密切相关。Miyazaki<sup>[7]</sup>等研究食管癌中FAK表达中发现,FAK过量表达与食管癌的浸润深度、淋巴转移甚至至转移淋巴结的数量均密切相关。Schneider<sup>[8]</sup>等研究发现,在口腔癌组织中,出现FAK过度表达的肿瘤组织侵袭力明显高于不伴有FAK过度表达的肿瘤组织。但也有部分研究结果得出了不同的结论,Ayaki<sup>[9]</sup>等对正常大肠黏膜、大肠腺癌以及肝转移配伍样本研究发现,原发癌组织中FAK表达量明显高于正常黏膜组织,而转移癌中FAK表达量却下降至正常黏膜水平,提示FAK的表达量与肿瘤的转移无明显联系。本研究显示,早期胃癌与进展期胃癌中FAK阳性表达率及强阳性表达率均存在显著性差异( $P < 0.05 \sim 0.01$ )。提示FAK的表达可能与肿瘤浸润深度相关,浸润越深表达越高。较之无淋巴转移的胃癌病例,有淋巴转移的胃癌病例中FAK的表达量( $P < 0.01$ )和阳性率( $P < 0.05$ )也明显升高。依据本研究结果,笔者认为,FAK的表达影响着胃癌的浸润与转移,推测其原因可能为:(1)肿瘤细胞在整合蛋白的介导下与ECM黏附是其生长、增殖的必要条件。癌细胞的同质黏附降低,癌细胞与肿瘤间质细胞和基质粘附改变,都是影响肿瘤细胞从原发灶脱落的关键因素。而癌细胞在游出血管的过程中,与血管内皮及基膜的异质粘附是影响肿瘤转移的重要条件。FAK在以上各个途径

中起着关键作用,FAK的高表达是许多上皮、间皮肿瘤获得侵袭、转移的共同途径<sup>[10]</sup>。(2)在癌组织中,FAK的过度表达可以有效地抑制抑癌基因PTEN的功能,从而有利于肿瘤不断生长<sup>[1]</sup>。(3)在正常组织中,FAK对细胞的锚着依赖(anchorage-dependent)性生长起调控作用<sup>[12]</sup>,肿瘤细胞中FAK的过度表达可以使细胞生长失控,转变为锚着非依赖生长,FAK可以在无锚基的情况下保持细胞的活性,抑制细胞凋亡,这也是实体癌细胞完成“失巢”转移的基本条件<sup>[13]</sup>。反之,有研究<sup>[14]</sup>证明,抑制肿瘤细胞中FAK的表达可导致肿瘤细胞凋亡。

FAK在肿瘤组织中的表达与患者预后的关系目前尚无定论,Theocharis<sup>[15]</sup>等对80例大肠癌患者进行随访,发现其生存率与FAK表达无关。相反的,Miyazaki<sup>[7]</sup>等对91例食管癌患者进行随访,伴有FAK过度表达患者与无FAK过度表达患者的5年生存率间存在明显差异( $P=0.006$ )。本研究显示,FAK阴性患者,阳性表达、强阳性患者之间的术后3,5年生存率均。提示在胃癌组织中,FAK表达的阳性率和表达量均与患者预后无明显关系。但要确定胃癌中FAK表达与预后的确切关系,还需要更进一步研究。

#### 参考文献:

[1] 许良中,杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准[J]. 中国癌症杂志,1996,6(4):229.

[2] Schlaefer DD, Jones KC, Hunter T. Multipl Grb2-mediated integrin stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events[J]. Mol Cell Biol,1998(5):2571-2585.

[3] 杨红军,周军,丁彦青. 大肠癌中FAK的表达与生物学行为关系的研究[J]. 中国肿瘤临床,2003,30(9):624-626.

[4] Oktay M, Wary KK, Dans M, et al. Integrin mediated activation of focal adhesion kinase is required for signaling to JunNH2-terminal kinase and progression through the Gphase of the cell cycle[J]. J cell Biol, 1999, 145: 1461 -

1469.

- [5] Calalb M, Pille TR, Hanks SK. Tyrosinephosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: AroleforSrcfamily kinases[J]. Mol Cell Biol, 1995, 15(2):954-963.
- [6] 刘红岩. 整合素激活FAK介导的信号传导途径研究进展[J]. 国外医学免疫学分册,2000,23(1):1-5.
- [7] Miyazaki T, Kato H, Nakajima M, et al. FAK overexpression is correlated with tumour invasiveness and lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma[J]. Br J Cancer, 2003,89(1):140-145.
- [8] Schneider GB, Kurago Z, Zaharias R, et al. Elevated focal adhesion kinase expression facilitates oral tumor cell invasion. [J] Cancer,2002,95(12):2508-2515.
- [9] Ayaki M, kamotsu K, Mukai M, et al. Reduced expression of focal adhesion kinase in liver metastases compared with matched primary human colorectal adenocarcinomas[J]. Clin Cancer Res, 2001,7(10):3106-3112.
- [10] Owens LV, Xu LH, Graven KJ, et al. Overexpression of the focal adhesion kinase (P125FAK) in invasive human tumors[J]. Cancer Res, 1995, 55:2752-2755.
- [11] Masahito T, Jianguo G, Erik HJ, et al. PTEN interaction with focal adhesion kinase and suppression of the extracellularmatrix dependent phosphatidy linositol 13 kinase/AKT cell survival pathway[J]. biochem, 1999, 274(29):20693.
- [12] Ilic D, Almeida EAC, Schlaepfer D, et al. Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis[J]. Cell Biol, 1998,143:547-560.
- [13] Sonoda Y, Matsumoto Y, Funakoshi M, et al. Anti apoptotic role of focal adhesion kinase[J]. biochem, 2000, 275(21):16309.
- [14] Xu L. H., Yang X., Craven R. J, et al. The COOH-terminal domain of the focal adhesion kinase induces loss of adhesion and cell death in human tumor cells[J]. J Growth Differ. 1998, 9: 999-1005.
- [15] Theocharis SE, Kouraklis GP, Kakisis JD, et al. Focal adhesion kinase expression is not a prognostic predictor in colon adenocarcinoma patients[J]. Eur J Surg Oncol, 2003, 29(7):571-574.