

文章编号:1005-6947(2007)04-0335-03

· 基础研究 ·

大肠癌患者外周血淋巴细胞粘着斑激酶表达的临床意义

邓联球^{1,2}, 廖国庆¹, 王万川¹, 丁杰¹, 刘湘国¹

(1. 中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南长沙 410008; 2. 湖南省洞口县人民医院 肿瘤外科, 湖南洞口 422600)

摘要:目的 探讨大肠癌患者外周血淋巴细胞粘着斑激酶(FAK)的表达及其临床意义。方法 结果 结论 方法 应用流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测40例大肠癌患者及20例正常人外周血淋巴细胞中FAK的表达。结果 大肠癌患者外周血淋巴细胞FAK阳性表达率为60.0%,与正常人(25.0%)比较,差异有显著性意义($P < 0.05$)。并且外周血淋巴细胞FAK表达与大肠癌临床分期、组织学分化程度、淋巴转移有关。结论 大肠癌患者外周血淋巴细胞FAK异常表达与肿瘤状况有关,对大肠癌的早期诊断、临床分期、组织学分型、淋巴转移的预测等可能有一定帮助。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(4):335-337]

关键词: 结直肠肿瘤/血液; 粘着斑激酶; 流式细胞术; 预后

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A

Expression of focal adhesion kinase in peripheral blood of patient with colorectal cancer

DENG Lian-Qiu^{1,2}, LIAO Guo-qing¹, WANG Wan-chuan¹, DING Jie¹, LIU Xiang-guo¹

(1. Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2. Department of Tumor Surgery, the People's Hospital of Dongkou, Dongkou, Hunan 422300, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of focal adhesion kinase in peripheral blood of colorectal cancer and its clinical significance. **Methods** Focal adhesion kinase in peripheral blood was determined with flow cytometry in 40 cases of colorectal cancer and 20 cases of control group. **Results** The positive rate of focal adhesion kinase in colorectal cancer group was 60.0% and in control group was 25.0%, respectively ($P < 0.05$). Mean value of focal adhesion kinase expression was high in cases with cancers and was related to clinical stage, degree of histological differentiation, and lymphatic metastasis. **Conclusions** Focal adhesion kinase expression in human peripheral blood lymphocytes may be related with the tumor load statue, and can be used as an index for surveillance and screening of colorectal cancer high risk population.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(4):335-337]

Key words: Colorectal Neoplasms/blood; Focal Adhesion Kinase; Flow Cytometry; Prognosis

CLC number: R735.3 **Document code:** A

粘着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)作为胞内信号转导的平台,介导细胞内外信号网络系统的交联反应,活化多条信号转导通路,进而调节肿瘤细胞的恶性表型及肿瘤血管的生成。研究

表明,整合素激活FAK介导的信号转导通路在肿瘤侵袭转移过程中发挥着重要作用。FAK被认为是整合素依赖性信号转导通路中的基础分子^[1]。以往的研究多侧重于肿瘤细胞或组织中FAK的改变,本研究通过流式细胞技术(flow cytometry, FCM)检测大肠癌患者外周血淋巴细胞中FAK的表达,探讨FAK蛋白表达与大肠癌生物学行为的关系。

收稿日期:2006-08-15; 修订日期:2006-09-11。

作者简介:邓联球,男,湖南洞口人,湖南洞口县人民医院主治医师,主要从事普外科及肿瘤外科方面的研究。

通讯作者:廖国庆 E-mail:liaoquqing@medmail.com.cn

1 材料与方 法

1.1 标本来源及分组

1.1.1 大肠癌组 标本取材于2005年5月—12月湘雅医院胃肠外科收治的大肠癌患者的外周静脉血,肝素抗凝。男22例,女18例;年龄25~80岁,平均59岁。其中,结肠癌21例,直肠癌19例,全部经手术及病理证实。Dukes分期:A期5例,B期10例,C期12例,D期13例;组织学类型:高分化腺癌13例,中分化腺癌11例,低分化腺癌10例,未分化腺癌6例;伴淋巴结转移25例,无淋巴结转移15例。

1.1.2 正常人对 照组 正常人外周静脉血标本(肝素抗凝),取自20例志愿者。男11例,女9例;年龄27~74岁,平均55岁。

1.2 主要仪器和试剂

(1)流式细胞仪 FACS 420 (BD CO. USA)。(2)鼠抗人粘着斑激酶单克隆抗体(1:100),试剂购自福州迈新生物技术开发有限公司。(3)人淋巴细胞分离液(即用型)200mL/瓶,购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司。(4)羊抗鼠 FITC-IgG (1:400),购自北京华美生物技术开发有限公司。

1.3 实验方法及步骤

1.3.1 外周血中单个核细胞悬液的制备 (1)1mL抗凝外周血加入等体积人淋巴细胞分离液,分离人抗凝外周血中单个核细胞,PBS缓冲液洗涤2遍,制成单细胞悬液,用70%冷乙醇(-4℃)1mL固定,保存于-4℃冰箱中备用;(2)取离心后的细胞,弃上清液,加入PBS缓冲液制成1mL细胞悬液,其中取50 μ L置入试管中,用台盼蓝染色,以红细胞计数板计数细胞数目,以PBS缓冲液调整细胞悬液浓度为1 \times 10⁶/mL。

1.3.2 间接免疫荧光染色法 (1)将细胞悬液加入试管中,每管约1 \times 10⁶个细胞,1000g离心5min,弃上清液;(2)加入一抗(所标记的特异性抗体)100 μ L,室温避光30min后加入二抗(FITC-IgG抗体)100 μ L混匀,室温避光放置30min后加入PBS液10mL,轻吹打,1000r/min离心5min,弃上清液,除去未结合的多余荧光抗体;(3)加入1mLPBS缓冲液,样品放在0~4℃环境中,准备上机检测。

以PBS缓冲液代替粘着斑激酶单抗的阴性对照;以只加粘着斑激酶单抗的阳性对照和只加入1:400 FITC-IgG的阳性对照。

1.3.3 FAK表达的检测方法 采用美国BD

(Becton Dickson)公司生产的流式细胞仪 FACS 420型,激发光源为15mW氩离子激光器,波长为488nm,输出功率为200mW,进行单参数检测;FITC发出绿色荧光,以530nm的带通过滤片;用cellquest软件自动取每个样品1 \times 10⁴个细胞分析结果;测量前以鸡红细胞作为标准样品,将流式细胞仪的标准误差(CV)调整在5%以内。

1.3.4 FAK表达的定量分析 参照Morkve^[1]提出的荧光指数(fluorescence index, FI)代表每例标本的相对平均特异荧光强度,并以正常大肠黏膜细胞的FI值作为正常标准阈值。

FI=(检测样品粘着斑激酶平均荧光强度-对照样品平均荧光强度)/正常对照样品粘着斑激酶平均荧光强度

1.3.5 阳性结果判断 检测样品细胞FI值大于正常对照样品细胞表达荧光强度的上限值者,则判定为阳性表达,反之则为阴性表达。

1.4 统计学处理

采用SPSS10.0统计软件进行统计处理,所有计数资料均采用 χ^2 检验,四格表精确法, $P<0.05$ 表明有统计学意义

2 结 果

2.1 大肠癌组与正常组外周血淋巴细胞FAK的表达

大肠癌组与正常对照组中FAK阳性表达率分别为60%,25% ($P<0.05$) (表1)。

表1 大肠癌患者与正常人外周血淋巴细胞FAK的表达

组别	例数	阳性例数	阴性例数	阴性率	P值
正常人	20	5	15	25.0	$P<0.05$
大肠癌	40	24	16	60.0	

2.2 大肠癌患者Dukes各期外周血淋巴细胞FAK的表达

FAK在大肠癌Dukes各期阳性表达率分别为:Dukes(A+B)33.3%,Dukes(C+D)76%;在A,B期与C,D期间差异有显著性($P<0.01$) (表2)。

表2 大肠癌患者Dukes各期外周血淋巴细胞FAK的表达

Dukes分期	例数	阳性例数	阴性例数	(%)	P值
A+B	15	5	10	(33.3)	<0.01
C+D	25	19	6	(76.0)	

2.3 大肠癌患者外周血淋巴细胞FAK表达与淋巴结转移关系

伴有淋巴转移者FAK阳性表达率(80.0%)高于无淋巴转(26.7%) ($P<0.01$) (表3)。

表3 大肠癌患者外周血淋巴细胞 FAK 表达与淋巴结转移关系

淋巴转移	例数	阳性例数	阴性例数	(%)	P 值
无转移	15	4	11	(26.7)	<0.01
有转移	25	20	5	(80.0)	

2.4 大肠癌患者外周血淋巴细胞 FAK 表达与组织分化程度的关系

FAK 在高、中、低、未分化腺癌中阳性表达率分别为 30.8%, 63.6%, 70%, 100%, 各组间差异均有显著性($P < 0.05$) (表4)。

表4 大肠癌患者淋巴细胞 FAK 表达与组织分化程度关系

组织分化程度	例数	阳性例数	阴性例数	阴性率
高分化腺癌	13	4	9	30.8
中分化腺癌	11	7	4	63.6
低分化腺癌	10	7	3	70.0
未分化腺癌	6	6	0	100.0

注:各组间多重比较均 $P < 0.05$

3 讨论

恶性肿瘤细胞发生浸润转移时首先肿瘤细胞与细胞外基质成分发生黏附,随之肿瘤细胞分泌多种蛋白水解酶,使贴近肿瘤细胞表面的有限区域的基质降解而形成癌细胞移动的通路。FAK 作为细胞内重要的信号分子,是整合素依赖性信号转导通路的基础分子,整合素早期通过使 FAK 酪氨酸磷酸化而使其激活。激活后的 FAK 与 Src 结合形成 FAK-Src 复合物,从而被进一步活化进入 Ras 途径,进而激活 MAPK。激活 MAPK 可以激活各种转录因子,介导 FAK 调节基因表达的活性。进而介导细胞的黏附和迁移,调节细胞的增殖与存活。

FAK 是一个胞浆酪氨酸激酶,在绝大多数组织和细胞中均有表达,而且在进化中高度保守^[2]。FAK 与肿瘤细胞、细胞外基质成分黏附及信号传导关系密切^[3-4]。

本研究结果表明,正常对照组中外周血淋巴细胞 FAK 阳性表达率低于大肠癌组($P < 0.05$); FAK 在大肠癌 Dukes A, B 期的阳性表达率显著低于 C, D 期($P < 0.01$)。伴有淋巴转移者 FAK 阳性表达率显著高于无淋巴转移者高于无淋巴转移者($P < 0.01$); FAK 在高、中、低、未分化腺癌的阳性表达率各组间的差异均有显著性意义($P < 0.05$)。这与 Schneider 等^[5]的报道结果基本一致。以上实验结果表明:外周血淋巴细胞 FAK 表达与大肠癌临床分期、组织学分化程度、淋巴转移有一定关系。

从外周血淋巴细胞 FAK 表达与大肠癌组织中表达的相关性,推测可能的机理有二:其一,外周

血中 FAK 异常表达,说明受检者自身细胞周期调控异常, DNA 修复能力下降,去除突变细胞的能力下降,此时其体内已具备一定量的 FAK 突变细胞,这部分细胞潜伏着向肿瘤细胞演进的危险,在外界理化因素刺激及体内其它癌基因激活和/或抑癌基因失活的相互作用下,它们就有可能进入肿瘤的启动阶段;另一种可能机制是外周血淋巴细胞接受到基因突变的遗传信息^[6]。淋巴细胞对肿瘤细胞有较强的防御和监视功能,一方面肿瘤抗原可能刺激淋巴细胞使其产生免疫反应,从而杀伤肿瘤细胞;另一方面,淋巴细胞通过对抗原信息的提呈和处理,获得肿瘤细胞的生物信息。淋巴细胞产生的免疫球蛋白类物质通过作用于癌基因、抑癌基因,直接或间接影响肿瘤的发生、发展过程^[7]。癌基因、抑癌基因的突变引起的细胞抗原信息的变化必定为淋巴细胞所捕获。因此,粘着斑激酶基因突变所引起的细胞遗传学特性的改变同样可能呈递给过客淋巴细胞。

总之,FAK 作为胞内信号转导的平台,介导细胞内外信号网络系统的交联反应,活化多条信号转导通路,进而调节肿瘤细胞的恶性表型及肿瘤血管的生成。研究外周血淋巴细胞的 FAK 表达可了解直肠癌的生物形状特点。外周血淋巴细胞 FAK 的检测手段简单、快捷,对术前预测大肠癌的预后有一定意义。其确切意义还有待扩大样本量进一步证实。

参考文献:

- [1] Riemenschneider MJ, Mueller W, Betensky RA, *et al.* In situ analysis of integrin and growth factor receptor signaling pathways in human glioblastomas suggests overlapping relationships with focal adhesion kinase activation [J]. *Am J Pathol*, 2005, 167(5): 1397-1387.
- [2] Morkve O, Leaerum OD. Flow cytometry measurement of p21, p53 protein expression and DNA content in paraffin embedded tissues from bronchial carcinoma [J]. *Cytometry*, 1991, 12(5): 438-444.
- [3] Parsons JT, Martin KH, Slack JK, *et al.* Focal Adhesion Kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement [J]. *Oncogene*, 2000, 19(49): 5606-5613.
- [4] Lark AL, Livasy CA, Calvo B, *et al.* Overexpression of focal adhesion kinase in primary colorectal carcinomas and colorectal liver metastases: immunohistochemistry and real-time PCR analyses [J]. *Clinical Cancer Research*, 2003, 9(1): 215-222.
- [5] 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.
- [6] Theocharis SE, Kouraklis GP, Kakisis JD, *et al.* Focal adhesion kinase expression is not a prognostic predictor in colon adenocarcinoma patients [J]. *European journal of surgical oncology*, 2003, 29(3): 571-574.
- [7] 沈宗丽,周振英,朱月清. 肿瘤患者外周血淋巴细胞 P53 高表达的临床意义 [J]. *肿瘤学杂志*, 2002, 8(2): 92-93.