

· 论 著 ·

食管鳞状细胞癌组织中 FAK、Paxillin 和 MMP-9 蛋白的表达及临床意义*

庞 霞, 李晟磊, 赵志华, 赵阿红, 张红新, 高冬玲[△]

(郑州大学附属第一医院病理科 450052)

摘要:目的 探讨 FAK、Paxillin 和 MMP-9 蛋白在食管鳞状细胞癌(ESCC)组织中的表达及其意义。方法 应用免疫组化 SP 法检测 59 例 ESCC 组织、27 例癌旁不典型增生组织及 36 例健康食管黏膜组织中 FAK、Paxillin 及 MMP-9 蛋白的表达,并分析 3 种蛋白与临床病理学参数之间的关系。结果 FAK、Paxillin 及 MMP-9 蛋白在 ESCC 组织中的表达均明显高于癌旁不典型增生组织和正常食管黏膜组织,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。FAK 和 Paxillin 蛋白表达与 ESCC 的组织学分级、浸润深度及淋巴结转移密切相关($P < 0.05$),MMP-9 蛋白表达与癌的组织学分级及淋巴结转移密切相关($P < 0.05$);进一步相关性分析表明,MMP-9 与 FAK、Paxillin 蛋白表达呈正相关关系(r 值分别为 0.299 和 0.464, P 值分别为 0.022 和 0.000)。结论 FAK、Paxillin 及 MMP-9 的高表达可能在食管鳞癌的浸润转移中发挥重要作用。

关键词:食管;肿瘤;鳞状细胞;黏着斑激酶;桩蛋白;基质金属蛋白酶 9;肿瘤转移;浸润

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.14.007

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)14-1367-03

Expression and clinical significance of FAK, Paxillin and MMP-9 protein in esophageal squamous cell carcinoma tissue*

Pang Xia, Li Shenglei, Zhao Zhihua, Zhao Ahong, Zhang Hongxin, Gao Dongling[△]

(Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: Objective To explore the expressions of FAK, Paxillin and MMP-9 proteins in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissues and their significances. **Methods** Immunohistochemical SP method was used to detect the expressions of FAK, Paxillin and MMP-9 proteins in 59 cases of ESCC tissues, 27 cases of adjacent atypical hyperplasia epithelium and 36 cases of normal esophageal epithelium, and the relationships between three proteins above and clinicopathological features were analyzed. **Results**

The protein expression levels of FAK, Paxillin and MMP-9 in ESCC tissues were significantly higher than those in the adjacent atypical hyperplasia and normal mucous tissues, and there was significant difference ($P < 0.05$). The expressions of FAK and Paxillin proteins were both closely correlated with the tumor grade, infiltrative depth and lymph node metastasis in ESCC tissues ($P < 0.05$), whereas the expression of MMP-9 protein was tightly correlated with the tumor grade and lymphatic metastasis in esophageal squamous cell carcinoma ($P < 0.05$). Further, correlation analysis revealed that expressions of FAK and Paxillin proteins were both positively related to the expression of MMP-9 protein ($P < 0.05$) ($r = 0.299$ and 0.464 , $P = 0.022$ and 0.000 , respectively). **Conclusion** Overexpressions of FAK, Paxillin and MMP-9 proteins may play pivotal roles in the invasiveness and metastasis of ESCC, which can be achieved via the regulation of MMP-9 expression.

Key words: esophagus; neoplasms, squamous cell; focal adhesion kinase; paxillin; matrix metalloproteinase 9; neoplasm metastasis; infiltration

黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)和桩蛋白(Paxillin)是与细胞黏附相关的蛋白,是整合素介导的信号调控途径中的两个关键性的信号分子。近来研究表明,Paxillin 和 FAK 在多种不同肿瘤细胞迁移、细胞增殖和生存中起着十分重要的作用^[1-3]。Paxillin 是一种存在于细胞胞质内关键的衔接蛋白,是 FAK 下游的焦点黏附调节蛋白之一,能够通过调控基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinases-9, MMP-9)的表达来调控肿瘤细胞的扩散和迁移能力^[4-5],提示 Paxillin、FAK 和 MMP-9 的联合可能在肿瘤细胞的发生、发展以及浸润转移中发挥重要作用。本研究通过免疫组织化学方法检测食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)组织、癌旁及正常食管组织中 FAK、Paxillin 和 MMP-9 的表达情况,并分析三者之间的关系,对进一步了解 ESCC 的转移及预后判断具有一定的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 59 例新鲜切除的食管癌手术标本均于 2009

年 3 月 2 日至 4 月 23 日之间取自安阳市肿瘤医院。其中男性 37 例,女性 22 例,年龄为 40~79 岁,所有患者术前均无化疗、放疗及免疫治疗史。全部食管癌标本分别在无坏死区癌组织、癌旁 3 cm 以内及远端正常黏膜组织 3 处取材,经 40 g/L 甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋、连续切片,切片厚度 4~6 μm ,分别用于 HE 和免疫组化染色。经 HE 染色病理组织学证实,癌灶组织均证实为 ESCC。按 WHO 分类标准(1996)进行组织学分级:高分化 13 例,中分化 27 例,低分化 19 例。浸润至肌层 19 例,浸润到外膜及邻近组织 40 例;伴淋巴结转移者 17 例,无淋巴结转移者 42 例。癌旁组织中 27 例是不典型增生。远端正常黏膜组织中 36 例是正常食管黏膜。

1.2 主要试剂 FAK 兔抗人多克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司,稀释倍数 1:70。Paxillin 兔抗人单克隆抗体,购于上海太阳生物技术有限公司,稀释倍数 1:50。MMP-9 兔抗人多克隆抗体、S-P 免疫组化试剂盒和 DAB 显色剂均购自北京中杉金桥生物技术开发公司。

* 基金项目:河南省基础与前沿技术研究项目(082300453202)。

[△] 通讯作者, Tel:13838117420; E-mail: gaodlxq@yahoo.com.cn。

表 1 正常黏膜、食管鳞癌、非典型增生组织 FAK、Paxillin 及 MMP-9 的蛋白表达

组织类型	n	FAK[n(%)]	χ^2	P	Paxillin[n(%)]	χ^2	P	MMP-9[n(%)]	χ^2	P
正常黏膜上皮	36	7(19.4)			13(36.1)			10(27.8)		
非典型增生	27	16(59.3)	34.899	0.000	15(55.6)	11.419	0.003	19(70.4)	28.519	0.000
食管鳞癌组织	59	47(79.7)			42(71.2)			48(81.4)		

表 2 FAK 及 Paxillin、MMP-9 蛋白表达与食管鳞癌临床病理因素的关系

项目	n	FAK[n(%)]	χ^2	P	Paxillin[n(%)]	χ^2	P	MMP-9[n(%)]	χ^2	P
性别										
男	37	30(81.1)	0.000	0.986	25(67.6)	0.249	0.618	31(83.8)	0.076	0.783
女	22	17(77.3)			17(77.3)			17(77.3)		
年龄(岁)										
<60	17	12(70.6)	0.554	0.457	10(58.8)	1.034	0.309	12(70.6)	0.964	0.326
≥60	42	35(83.3)			32(76.2)			36(85.7)		
组织学分级										
高分化	13	7(53.8)			6(46.2)			8(61.5)		
中分化	27	22(81.5)	7.943	0.019	19(70.4)	7.309	0.026	21(77.8)	10.833	0.004
低分化	19	18(94.7)			17(89.5)			19(100.00)		
浸润深度										
T ₁ ~T ₂	19	11(57.9)	6.333	0.012	9(47.4)	6.133	0.013	13(68.4)	1.961	0.161
T ₃ ~T ₄	40	36(90.0)			33(82.5)			35(87.5)		
淋巴结转移										
有	17	17(100.00)	4.461	0.035	16(94.1)	4.652	0.031	17(100.00)	3.882	0.049
无	42	30(71.4)			26(61.9)			31(73.8)		

1.3 检测方法 所有标本均经 40 g/L 甲醛固定,石蜡包埋,4~6 μ m 连续切片,采用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(S-P)连接法检测。详细步骤严格按 S-P 试剂盒说明操作,每批染色均以 FAK、Paxillin 和 MMP-9 已知阳性的切片为阳性对照,以 PBS 代替一抗为阴性对照。

1.4 结果判定 FAK 和 MMP-9 蛋白主要定位于细胞质, Paxillin 表达于细胞质和(或)细胞膜内。结果判断如下^[6-7],每张片子随机选取 5 个高倍视野,每个视野计数 200 个细胞,共计数 1 000 个细胞:(1)参照免疫组化染色评分标准染色强度进行评估。细胞无显色为 0 分,呈浅黄色颗粒为 1 分,呈浅棕黄色颗粒为 2 分,出现大量深棕褐色的颗粒为 3 分。(2)按阳性细胞数占同类细胞数的百分比进行评分。阳性细胞数小于 5% 为 0 分,5%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,>75% 为 4 分。取(1)、(2)两项评分的乘积作为总积分,0~1 分为阴性(-),≥2 分为阳性(+).

1.5 统计学处理 应用 SPSS11.0 统计学软件行 χ^2 检验及相关性分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 在不同组织中 FAK、Paxillin 和 MMP-9 蛋白的表达及其与 ESCC 组织中的临床病理因素的关系 FAK 和 MMP-9 蛋白主要存在于癌组织细胞质中,呈浅黄色至棕黄色(插 I 图 1, 2)。Paxillin 蛋白主要存在于细胞质和(或)细胞膜内,均呈棕黄色(插 I 图 3)。在不同组织中 FAK、Paxillin 和 MMP-9 蛋白的表达及其与 ESCC 临床病理因素的关系见表 1、2。

2.2 FAK、Paxillin 及 MMP-9 蛋白在 ESCC 组织中表达的相关性 FAK、Paxillin 及 MMP-9 蛋白在 ESCC 组织中的表达呈正相关关系见表 3。

表 3 食管鳞癌组织中 MMP-9 与 FAK 及 Paxillin 蛋白表达的相关性分析

指标	n	FAK		r	P	Paxillin		r	P
		+	-			+	-		
MMP-9									
+	48	41	7	0.299	0.022	39	9	0.464	0.000
-	11	6	5			3	8		

3 讨论

FAK 是定位于人染色体 8q24,分子质量为 125 kD 的非受体酪氨酸激酶,它是细胞信号传导通路中的重要组成部分,与肿瘤的发生、发展及浸润、转移密切相关^[8]。许多文献报道 FAK 在肝癌、乳腺癌及甲状腺癌等高侵袭、高转移的恶性肿瘤中存在活性显著增高的现象,说明它涉及肿瘤细胞与周围基质和基底膜的破坏,与肿瘤的浸润和转移有关^[9-10]。Paxillin 是近年来发现的一种信号衔接蛋白,人类 Paxillin 基因定位于 12q24 染色体,大小为 6 kb,其表达产物是一种细胞骨架上的灶性粘连磷酸蛋白,是酪氨酸激酶的一种底物,构成细胞与细胞外基质局部黏附关键部位。Chatzizacharias 等^[11]报道,FAK 在整合素信号转导途径发挥重要作用,FAK 一旦被整合素或非整合素的刺激因子激活后,它能结合并激活其他分子,包括 Src、PI3K、Grb2、PI3K 和 Paxillin,进而促进信号转导,提示 FAK 和 Paxillin 的联合检测可能在肿瘤细胞中具有更为重要的价值。Schaller^[4]研究指出,Paxillin 等位基因缺失的小鼠已发生胚胎期死亡,而该基因缺失的成纤维细胞表现为细胞迁徙能力缺陷,说明 Paxillin 基因具有调控细胞扩散和移动的能力。近年有学者在许多恶性肿瘤中发现,Paxillin 的异常表达

不但与肿瘤的发生、发展有关,而且与肿瘤的浸润、转移密切相关^[12-13],其通过上调 MMP-9 的表达提高肿瘤细胞的迁移能力^[14],上述研究提示 FAK 和 Paxillin 在肿瘤浸润转移中的作用与 MMP-9 的表达密切相关。

在本实验中发现食管鳞癌组织中 FAK、Paxillin 及 MMP-9 蛋白表达均显著高于癌旁及健康对照组($P < 0.05$),提示其过度表达可能与食管癌发生、发展及浸润转移密切相关。此外,FAK 和 Paxillin 的表达均与肿瘤的分化程度、浸润深度及淋巴结转移密切相关($P < 0.05$),提示上述两种蛋白的过表达对食管鳞癌恶性程度和侵袭能力的评估有一定的参考价值。进一步相关性分析显示,FAK 和 Paxillin 的表达均与 MMP-9 的表达呈正相关($P < 0.05$),表明 FAK 和 Paxillin 可能通过 MMP-9 的协同作用加速食管鳞癌的浸润转移。

总之,本研究结果提示 FAK、Paxillin 及 MMP-9 的高表达可能在食管鳞癌的发生发展及浸润转移中发挥重要作用,其发挥转移的重要分子机制可能是通过调控 MMP-9 的表达实现的,然而其确切的分子机制还有待进一步探讨。进一步研究 Paxillin 和 FAK 在食管鳞癌转移中的分子作用机制,有望为后续临床上联合检测 Paxillin 和 FAK 蛋白的表达来诊断食管癌提供理论依据。

参考文献:

- [1] Fraley SI, Feng Y, Krishnamurthy R, et al. A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(6): 598-604.
- [2] Zheng Y, Lu Z. Paradoxical roles of FAK in tumor cell migration and metastasis [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(21): 3474-3479.
- [3] Chu PY, Huang LY, Hsu CH, et al. Tyrosine phosphorylation of growth factor receptor-bound protein-7 by focal adhesion kinase in the regulation of cell migration, proliferation, and tumorigenesis [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(30): 20215-20226.
- [4] Schaller MD. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein [J]. *Oncogene*, 2001, 20(44): 6459-6472.

- [5] Das A, Yaqoob U, Mehta D, et al. FXR promotes endothelial cell motility through coordinated regulation of FAK and MMP-9 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(4): 562-570.
- [6] 江海, 李赋, 李炳, 等. E-钙黏素在 68 例食管鳞状细胞癌中的表达及意义 [J]. *重庆医学*, 2010, 39(3): 346-347.
- [7] 徐丹. 子宫内膜癌组织中钙磷脂结合蛋白的表达及其意义 [J]. *重庆医学*, 2010, 39(4): 401-402.
- [8] 敖洪峰, 敖金平, 孙勇, 等. FAK 与人类肿瘤的关系 [J]. *实验与检验医学*, 2008, 26(5): 533-536.
- [9] Lau GM, Lau GM, Yu GL, et al. Expression of Src and FAK in hepatocellular carcinoma and the effect of Src inhibitors on hepatocellular carcinoma in vitro [J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54(7): 1465-1474.
- [10] Golubovskaya VM, Conway-Dorsey K, Edmiston SN, et al. FAK overexpression and p53 mutations are highly correlated in human breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(7): 1735-1738.
- [11] Chatzizacharias NA, Kouraklis GP, Theocharis SE. Clinical significance of FAK expression in human neoplasia [J]. *Histol Histopathol*, 2008, 23(5): 629-650.
- [12] Rajapakse N, Kim MM, Mendis E, et al. Carboxylated chitooligosaccharides (CCOS) inhibit MMP-9 expression in human fibrosarcoma cells via down-regulation of AP-1 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1760(12): 1780-1788.
- [13] Jagadeeswaran R, Surawska H, Krishnaswamy S, et al. Paxillin is a target for somatic mutations in lung cancer: implications for cell growth and invasion [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(1): 132-142.
- [14] Aponte M, Jiang W, Lakkis M, et al. Activation of platelet-activating factor receptor and pleiotropic effects on tyrosine phospho-EGFR/Src/FAK/paxillin in ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(14): 5839-5848.

(收稿日期: 2010-05-10 修回日期: 2010-10-11)

(上接第 1355 页)

有提示作用。此例患者院外 B 超提示胆囊多枚结石, 7 d 后复查仅见胆囊颈部有 1 枚结石; 而且保守治疗过程中腹痛无缓解, 仍仅满足于急性胆囊炎诊断, 未进一步寻找原因, 直至出现休克症状才引起重视。该患者病情发展快, 中毒症状重可能系因胆石巨大在肠壁蠕动过程中使肠黏膜广泛挫伤, 肠黏膜屏障功能破坏加速肠源性内毒素的吸收所致。

肠壁切开取石是解除胆石所致肠梗阻的基本方法, 由于将胆石推入盲肠或原位压碎会造成肠壁损伤均不宜采用, 而对于胆肠内瘘是否 I 期修补目前尚有争议^[3]。近年来有人主张同时切除胆囊、修补内瘘以减少术后胆石性肠梗阻复发、胆囊炎、胆管炎及胆囊癌的发生率。亦有人认为胆石排空后内瘘多能自行愈合, 行胆囊切除、修补内瘘延长手术时间, 增加手术的并发症和病死率^[4]。该例患者解除胆石性肠梗阻同时行胆囊切除、内瘘修补, 但术后并发切口感染及部分裂开, 如仅行切开取石, II 期处理胆肠内瘘效果可能会更好, 但有胆石再次引起肠梗阻之虞。

重视病史询问、结合辅助检查, 胆囊结石伴急性胆囊炎在保守治疗过程中症状不缓解且出现肠梗阻症状, 应考虑到该病

的可能, 一旦确诊尽早手术, 术中视情况是否 I 期行胆囊切除、内瘘修补。

参考文献:

- [1] Kirchmayr W, Muhlmann G, Zitt M, et al. Gallstone ileus: rare and still controversial [J]. *ANZ J Surg*, 2005, 75(4): 234-238.
- [2] Moschos J, Pilpilidis I, Antonopoulos Z, et al. Complicated endoscopic management of Bouveret's syndrome. A case report and review [J]. *Rom J Gastroenterol*, 2005, 14(1): 75-77.
- [3] Nakao A, Okamoto Y, Sunami M, et al. The oldest patient with Gallstone ileus: report of a case and review of 176 cases in Japan [J]. *Kurume Med J*, 2008, 55(1/2): 29-33.
- [4] 唐华, 张才全. 胆石性肠梗阻 6 例报告 [J]. *重庆医学*, 2001, 30(3): 229-230.

(收稿日期: 2010-04-08 修回日期: 2010-08-22)