

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.09.014

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200117.1509.008.html\(2020-01-19\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200117.1509.008.html(2020-01-19))ILK、 β -catenin 和 VEGF 在非小细胞肺癌中的表达及意义*王林辉¹, 陈慧勇², 杜日昌¹, 李静¹, 肖高芳¹, 高双全¹, 张莹¹

(广东省韶关市粤北人民医院:1. 病理科;2. 胸外科 512026)

[摘要] **目的** 探讨整合素连接激酶(ILK)、 β -连环蛋白(β -catenin)和血管内皮生长因子(VEGF)在非小细胞肺癌(NSCLC)组织中的表达水平及其与临床病理特征间的关系。**方法** 应用免疫组织化学 SP 法测定 108 例 NSCLC 患者癌组织(NSCLC 组)、癌旁组织(距离肿瘤 2 cm, 癌旁组)和正常肺组织(距离肿瘤 5 cm, 对照组)中 ILK、 β -catenin 及 VEGF 的表达水平, 并对其表达水平与患者的性别、年龄、肿瘤体积大小、病理类型、分化程度、淋巴结转移、远处器官转移和临床 TNM 分期等情况进行分析, 同时对 β -catenin、ILK 和 VEGF 之间进行相关性分析。**结果** 免疫组化结果显示 β -catenin 阳性表达主要位于细胞核, 而 ILK 和 VEGF 的阳性表达主要位于细胞质。NSCLC 组中 β -catenin、ILK 和 VEGF 的阳性表达率分别为 68.52%(74/108)、75.93%(82/108)和 85.19%(92/108), 明显高于癌旁组和对照组($P < 0.05$)。ILK、 β -catenin 和 VEGF 的阳性表达与 NSCLC 的分化程度、远处器官转移、淋巴结转移和 TNM 分期明显相关($P < 0.05$); 与患者年龄、性别、瘤体大小、病理类型无关($P > 0.05$)。在 NSCLC 组中, β -catenin 的阳性表达和 ILK 的阳性表达呈明显正相关($P < 0.05$), ILK 的过度表达和 VEGF 的阳性表达也呈明显正相关($P < 0.05$)。**结论** ILK、 β -catenin 和 VEGF 在 NSCLC 中高表达且相互影响, 对其浸润深度、淋巴结转移和远处器官转移等都有着重要作用。

[关键词] 癌, 非小细胞肺; β -连环蛋白; 整合素连接激酶; 血管内皮生长因子**[中图分类号]** R734.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)09-1433-05

Expression and significance of ILK, β -catenin and VEGF in non-small cell lung cancer*

WANG Linhui¹, CHEN Huiyong², DU Richang¹, LI Jing¹,XIAO Gaofang¹, GAO Shuangquan¹, ZHANG Ying¹

(1. Department of Pathology; 2. Department of Thoracic Surgery, Yuebei People's Hospital, Shaoguan, Guangdong 512026, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression levels of integrin-linked kinase (ILK), β -catenin and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the tissue of non-small cell lung cancer (NSCLC) and their relation with clinicopathological features. **Methods** The immunohistochemical (IHC) SP method was applied to detect the expression levels of ILK, β -catenin and VEGF in cancer tissues (NSCLC group), paracancerous tissues (2 cm from tumor, paracancerous group) and normal pulmonary tissue (5 cm from tumor, control group) of 108 cases of NSCLC. The relationships between the expression levels of ILK, β -catenin and VEGF with the sex, age, tumor size, pathological type, differentiation degree, lymph node metastasis, distant organs metastasis and clinical TNM stage were analyzed. Meanwhile the correlation of ILK, β -catenin and VEGF was also analyzed. **Results** The IHC results showed that the positive expression of β -catenin was mainly in the nucleus, while the positive expression of ILK and VEGF was mainly located in the cytoplasm. The positive expression rates of β -catenin, ILK and VEGF in the NSCLC group were 68.52% (74/108), 75.93% (82/108) and 85.19% (82/108) respectively, which were significantly higher than those in the paracancerous group and control group ($P < 0.05$). The positive expressions of β -catenin, ILK and VEGF had significant correlation with the differentiation degree, distant organ metastasis, lymph node metastasis and TNM stage of NSCLC ($P < 0.05$), but had no correlation with the age, sex, tumor size and pathological type ($P > 0.05$). In the NSCLC group, the positive expression of β -catenin had significantly positive correlation with the ILK positive expres-

sion ($P > 0.05$), and the overexpression of ILK also had significantly positive correlation with the VEGF positive expression ($P > 0.05$). **Conclusion** β -catenin, ILK and VEGF in NSCLC are highly expressed, interacted with each other and play the important role in the invasion depth, lymph node metastasis and distant organ metastasis of NSCLC.

[Key words] carcinoma, non-small-cell lung; β -catenin; integrin-linked kinases; vascular endothelial growth factor

目前,肺癌是最为常见的恶性肿瘤之一,其发病率和致死率在国内外都高居所有恶性肿瘤之首。肺癌类型多样,大多数都属于非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC),具有早期诊断率低、侵袭和转移早、转移率高等特点,这也是导致肺癌预后差、生存期短的重要原因。众所周知,所有恶性肿瘤,包括肺癌,其形成和转移都是一个多因素、多步骤的精密调节过程,其中涉及了多种癌基因、抑癌基因及一些信号转导通路的参与,任何一个基因表达异常或是通路活性的改变,都会促进肿瘤的发生和发展^[1-2]。因此,更好地了解 NSCLC 侵袭和转移的相关基因的表达,对探索 NSCLC 形成和发展的机制有重要的意义,可为新的治疗策略提供理论基础。

整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,相对分子量仅为 59×10^3 。作为一种整合素和生长因子受体的细胞质的效应分子,ILK 能通过调节下游靶蛋白的表达,如 NF- κ B 通路^[3],基质金属蛋白酶 9(MMP-9)等^[4],参与恶性肿瘤细胞的粘连、生长、发展和血管生成等过程^[5],在恶性肿瘤的侵袭和转移中发挥着至关重要的作用。有研究发现, β -连环蛋白(β -catenin)是其下游靶蛋白^[6-7],而作为 Wnt/ β -catenin 信号通路中的关键调节分子, β -catenin 表达量的异常或细胞核、细胞质异位表达都能激活下游靶基因,为肿瘤细胞的侵袭和转移打开通道,提供物质基础^[8]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)由于其启动子中含有能够与 β -catenin/Tcf-4 复合体结合的位点,是公认的 Wnt/ β -catenin 通路的下游靶基因^[9]。因此,本研究采用免疫组织化学法检测 NSCLC 中 β -catenin、ILK 和 VEGF 的表达,并结合临床病理特点探讨其相关性以及在 NSCLC 发生、发展、浸润转移过程中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择本院病理科 2011 年 1 月至 2019 年 3 月所获得的 NSCLC 患者手术切除标本 108 份(NSCLC 组),同时收集 108 份癌旁组织(距离癌组织 2 cm,癌旁组)和 108 份正常的肺组织(距离癌组织 5 cm 以上,对照组)。108 例 NSCLC 患者中,男 74 例,女 34 例;年龄 30~78 岁,平均(53.44 \pm 11.78)岁;其中鳞癌 75 例,腺癌 33 例。术前均未经化疗、放疗或药物靶向治疗等,且基本的临床资料都齐全。所有标本均采用 10% 的中性福尔马林浸泡固定,石蜡包埋。

1.2 方法

1.2.1 试剂及免疫组织化学染色

免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,抗体-兔抗人多克隆抗体 anti- β -catenin、anti-ILK 和 anti-VEGF 及 DAB 显色试剂盒均购自北京博奥森生物技术有限公司。采用 SP 法。具体步骤如下:将包埋的石蜡组织进行连续切片,制备成 5 μ m 厚的切片。所有切片经二甲苯和梯度乙醇脱蜡、透明,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次后,采用柠檬酸盐缓冲液进行高压修复抗原;冷却至室温后再次 PBS 洗涤,经 3% H_2O_2 充分消除过氧化物酶 30 min;然后用试剂盒中 A 液封闭 60 min;甩干后滴加不同的稀释抗体液,4 $^{\circ}C$ 冰箱过夜;复温后滴加 B 液,室温下放置 30 min, PBS 冲洗后再次滴加 C 液,放置 30 min;用 DAB 液进行显色,在显微镜下观察并终止显色;苏木素复染后经乙醇、二甲苯脱水透明;最后中性树胶封片观察。用已知阳性组织切片作阳性对照,以 PBS 替代一抗作为阴性对照。

1.2.2 结果判定

阳性标准:细胞质或细胞核中出现棕黄色颗粒的细胞为阳性。随机选取 5 个高倍视野进行观察,读取每个视野内所有细胞的染色情况。阳性细胞小于或等于 5% 计 0 分, >5%~25% 计 1 分, >25%~50% 计 2 分, >50%~75% 计 3 分, >75% 计 4 分;阳性强度显示:黄色计 1 分,棕黄色计 2 分,棕褐色计 3 分。将细胞阳性表达率与染色强度二者积分相乘:0 分为阴性(-), 1~4 分为弱阳性(+), 5~8 分为中度阳性(++), 9~12 分为强阳性(+++).

1.3 统计学处理

数据采用 SPSS22.0 统计软件进行分析,计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验,各指标间用 Spearman 秩相关分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组 ILK、 β -catenin、VEGF 表达水平比较

免疫组织化学结果显示,ILK 和 VEGF 的棕黄色颗粒主要存在于癌细胞细胞质内;而 β -catenin 的阳性表达主要位于细胞核中,少部分在细胞质内。NSCLC 组中 β -catenin、ILK 和 VEGF 的阳性表达率分别为 68.52%(74/108)、75.93%(82/108)和 85.19%(92/108),明显高于癌旁组和对照组($P < 0.05$);3 种指标在癌旁组和对照组标本组织中的表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。3 种指标在 NSCLC 组织中的表达情况,见图 1。

表 1 3 组标本组织中 ILK、 β -catenin、VEGF 阳性表达情况比较[n(%), n=108]

组别	ILK	β -catenin	VEGF
对照组	25(23.15) ^a	19(17.59) ^a	32(29.63) ^a
癌旁组	28(25.93) ^a	22(20.37) ^a	35(32.41) ^a
NSCLC 组	82(75.93)	74(68.52)	92(85.19)

^a: $P < 0.05$, 与 NSCLC 组比较。

2.2 ILK、 β -catenin、VEGF 阳性表达与 NSCLC 临床病理主要参数的关系

在 NSCLC 组中, β -catenin、ILK 和 VEGF 的阳性表达与 NSCLC 的分化程度、远处器官转移、淋巴结转移和 TNM 分期明显相关($P < 0.05$); 与患者年龄、性别、瘤体大小、病理类型无关($P > 0.05$), 见表 2。

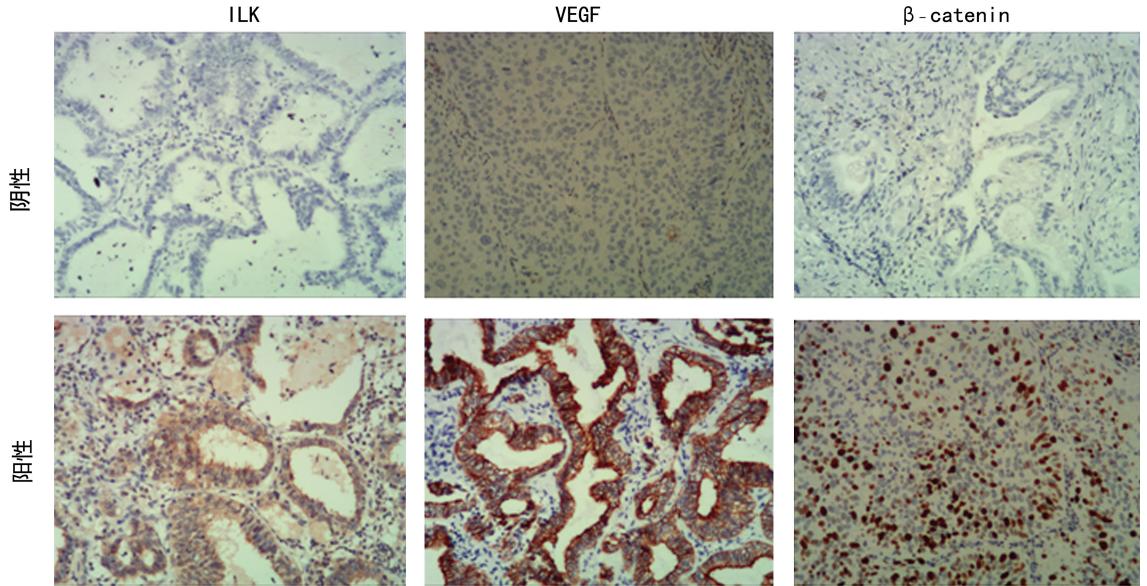


图 1 ILK、 β -catenin、VEGF 在 NSCLC 组织中的表达($\times 100$)

表 2 ILK、 β -catenin、VEGF 的阳性表达与 NSCLC 临床病理主要参数的关系[n(%)]

项目	n	ILK			β -catenin			VEGF		
		阳性	χ^2	P	阳性	χ^2	P	阳性	χ^2	P
年龄(岁)			1.64	0.32		0.77	0.61		0.01	1.00
<60	35	24(68.57)			22(62.86)			30(85.71)		
≥ 60	73	58(79.45)			52(71.23)			62(84.93)		
性别			0.15	0.93		0.09	0.95		0.00	1.00
男	74	57(77.03)			50(67.57)			63(85.14)		
女	34	25(73.53)			24(70.59)			29(85.29)		
肿瘤直径(cm)			0.76	0.60		0.27	0.84		1.53	0.29
≥ 5	66	52(78.79)			44(66.67)			54(81.82)		
<5	42	30(71.43)			30(71.43)			38(90.48)		
病理类型			0.00	1.00		0.08	0.96		0.43	0.79
鳞癌	75	57(76.00)			52(69.33)			65(86.67)		
腺癌	33	25(75.76)			22(66.67)			27(82.82)		
分化程度			18.32	0.00		7.89	0.02		16.49	0.00
低分化	74	65(87.84)			57(77.03)			70(94.59)		
中-高分化	34	17(50.00)			18(52.94)			22(64.71)		
淋巴结转移			14.04	0.00		6.78	0.04		6.15	0.03
无	38	20(52.63)			23(60.53)			28(73.68)		
有	70	62(88.57)			53(75.71)			64(91.43)		
器官转移			6.66	0.03		8.38	0.02		7.57	0.03
无	47	30(63.83)			25(53.19)			35(74.47)		
有	61	52(85.25)			49(80.33)			57(93.44)		
临床分期			7.39	0.03		13.92	0.00		14.65	0.00
I~II	42	26(61.90)			20(47.62)			25(59.52)		
III~VI	66	56(84.85)			54(81.82)			57(86.36)		

2.3 ILK、 β -catenin 和 VEGF 阳性表达的相关性

在 108 份 NSCLC 组织中,ILK 和 β -catenin 蛋白共同表达阳性 68 份,均阴性表达为 20 份;ILK 和 VEGF 蛋白共同表达阳性 74 份,均阴性表达 8 份; β -catenin 和 VEGF 蛋白共同阳性表达 69 份,共同阴性表达 11 份。3 种指标两两之间表达呈明显正相关 ($P < 0.05$),见表 3~5。

表 3 ILK 蛋白的阳性表达和 β -catenin 的相关性

β -catenin	ILK(n)		χ^2	<i>r</i>	<i>P</i>
	阴性	阳性			
阴性	20	14	32.78	0.48	0.00
阳性	6	68			

表 4 ILK 蛋白的阳性表达和 VEGF 的相关性

VEGF	ILK(n)		χ^2	<i>r</i>	<i>P</i>
	阴性	阳性			
阴性	8	8	6.91	0.25	0.04
阳性	18	74			

表 5 β -catenin 蛋白的阳性表达和 VEGF 的相关性

VEGF	β -catenin(n)		χ^2	<i>r</i>	<i>P</i>
	阴性	阳性			
阴性	11	23	12.09	0.32	0.00
阳性	5	69			

3 讨 论

ILK 是一种丝氨酸/苏氨酸的蛋白激酶,主要分布于细胞质内,其过度表达直接参与了多种恶性肿瘤的发生发展、浸润转移和临床预后等过程,被认为是一种新型的癌基因。研究结果已经证实利用 siRNA-ILK 或 ILK 的小分子抑制剂可促进肿瘤细胞的凋亡,抑制肿瘤的浸润和转移^[6,10],因此,ILK 可能是治疗恶性肿瘤的一个潜在靶点^[11]。本研究结果显示中,ILK 在 NSCLC 组的阳性表达率明显高于癌旁组 and 对照组;ILK 的表达水平随着肿瘤分化程度的降低而表达增强;且 ILK 的阳性表达与淋巴结转移、器官转移和 TNM 分期呈正相关。这些结果表明 ILK 的过度表达可能激活了 NSCLC 中某些肿瘤相关的因子或信号通路,从而参与了 NSCLC 的形成、发展、浸润、转移等过程。ILK 在肿瘤中的作用机制主要有两方面:(1)ILK 与许多蛋白质结合,构成黏着斑的主要成分,在调节细胞粘连、播散、迁移等过程中起着重要作用^[12];(2)直接与整合素结合,启动整合素信号通路,如 AMPK^[13]、PI3K/Akt^[14],参与肿瘤细胞的生长和分化。

作为 ILK 信号通路下游的重要通路之一^[15-16],Wnt/ β -catenin 通路在维持胚胎的发育、细胞的生长、分化等起着重要作用,其异常激活也被认为与恶性肿瘤的发生有着密切关系^[17-18]。而 β -catenin 是该通路

中最为重要的调节物质,主要存在于细胞质中。当 Wnt 通路异常激活时,细胞质内 β -catenin 大量聚集,然后迁移到细胞核内,调节转录因子 Tcf/Lef,激活下游的靶基因,在细胞分裂,凋亡和分化中起作用。因此,细胞核内 β -catenin 的聚集被认为是肿瘤发生发展的一种标志。本研究结果显示,在癌旁组织和正常肺组织的细胞质内存在着 β -catenin 的阳性,还有少量表达于细胞膜上;而在 NSCLC 组织中, β -catenin 的阳性强表达于细胞核内,且表达率与分化程度、淋巴结转移、器官转移和 TNM 分期有关。进一步分析发现, β -catenin 与 ILK 的阳性表达率呈正相关。

恶性实体肿瘤的生长离不开新生的血管。新生血管不仅为肿瘤的生长提供了必要的营养物质和氧气,带走其代谢产物;同时,还因新生血管管壁不完整且薄,有利于肿瘤细胞的浸润和转移。肿瘤的血管新生、发展过程也受到多种细胞因子的诱导、细胞间信号通路及细胞外基质的调控。在这些影响血管新生的细胞因子和信号通路中,作为 β -catenin 下游激活转录重要的靶基因的 VEGF 起着最为关键的作用,也是公认的与恶性肿瘤生长、浸润和转移密切相关的指标^[19]。VEGF 表达越高,则提示恶性肿瘤侵袭能力越强,促血管生成的作用越明显,浸润和转移则越早;干预 VEGF 的生成及其作用或阻断 VEGF 与其受体的结合则可抑制恶性肿瘤的血管生成,从而抑制肿瘤的生长、浸润和转移,可为临床治疗恶性肿瘤提供新的思路^[20]。本研究显示,VEGF 主要表达于 NSCLC 的细胞质内,在癌旁组、对照组的表达明显低于 NSCLC 组 ($P < 0.05$),其表达率与分化程度、淋巴结转移、器官转移和临床 TNM 分期有关 ($P < 0.05$)。这些结果显示在 NSCLC 中,VEGF 参与了肿瘤组织的血管生成和淋巴管生成,促进了肺癌细胞的生长、淋巴结转移和血道转移。

本研究结果还表明,在 NSCLC 中,ILK 与 β -catenin、VEGF 之间的表达存在明显的相关性。随着 ILK 表达的升高, β -catenin 和 VEGF 的表达也升高,存在正相关;而随着 β -catenin 表达升高,VEGF 和 ILK 也表达增强,也存在正相关。这些结果表明,ILK 作为多种致瘤相关因子或通路的重要上游交叉点、关键点,在 NSCLC 中一旦被激活,下游的多条信号通路就会被激活,比如 Wnt/ β -catenin 信号通路。该通路一旦启动,则促进了 β -catenin 在细胞核内的聚集,从而激活下游靶基因 VEGF 的表达,最终促进 NSCLC 的生长、浸润和转移。

综上所述,在 NSCLC 的发生、发展、侵袭和转移的过程中,ILK、 β -catenin 和 VEGF 相互协同,相互影响,共同发挥着重要的作用。因此,ILK、 β -catenin 和 VEGF 的联合检测比单一检测更能准确地判断 NSCLC 的恶性程度,对指导 NSCLC 的治疗和评估预后更具有现实意义。

参考文献

- [1] WE Z, ZHONG Q T, LU S, et al. Gene coexpression analysis offers important modules and pathway of human lung adenocarcinoma[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 235(1):11.
- [2] LI Y, WANG D, LI X, et al. MiR-199a-5p suppresses non-small cell lung cancer via targeting MAP3K11[J]. *J Cancer*, 2019, 10(11):2472-2479.
- [3] LIU Q, TAN W, CHE J, et al. 12-HETE facilitates cell survival by activating the integrin-linked kinase/NF- κ B pathway in ovarian cancer[J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10:5825-5838.
- [4] CISZEWSKI W M, SOBIERAJSKA K, WAWRO M E, et al. The ILK-MMP9-MRTF axis is crucial for EndMT differentiation of endothelial cells in a tumor microenvironment[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2017, 1864(12):2283-2296.
- [5] CHANG L H, PAN S L, LAI C Y, et al. Activated PAR-2 regulates pancreatic cancer progression through ILK/HIF- α -induced TGF- α expression and MEK/VEGF-A-mediated angiogenesis[J]. *Am J Pathol*, 2013, 183(2):566-575.
- [6] ZHAO X, XU Z, WANG Z, et al. RNA silencing of integrin-linked kinase increases the sensitivity of the A549 lung cancer cell line to cisplatin and promotes its apoptosis[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(1):960-966.
- [7] PIAO Z, HONG C S, JUNG M R, et al. Thymosin β 4 induces invasion and migration of human colorectal cell through the ILK/AKT/ β -catenin signaling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 452(3):856-864.
- [8] LI J, HU L, ZHOU T, et al. Taxifolin inhibits breast cancer cell proliferation, migration and invasion by promoting mesenchymal to epithelial transition via β -catenin signaling[J]. *Life Sci*, 2019, 232:116617.
- [9] TANG E, WANG Y, LIU T, et al. Gastrin promotes angiogenesis by activating HIF-1 α / β -catenin signaling in gastric cancer[J]. *Gene*, 2019, 704:42-48.
- [10] YOUNES M N, YIGTBASIS O G, YAZICI Y D, et al. Effects of the integrin-linked kinase inhibitor QLT0267 on squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Sur*, 2007, 133(1):15-23.
- [11] ZHENG C C, HU H F, HONG P, et al. Significance of integrin-linked kinase (ILK) in tumorigenesis and its potential implication as a biomarker and therapeutic target for human cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(1):186-197.
- [12] JACKSON B C, IVANOVA I A, DAGNINO L. An ELMO2-RhoG-ILK network modulates microtubule dynamics[J]. *Mol Biol Cell*, 2015, 26(14):2712-2715.
- [13] MELOUANE A, YOSHIOKA M, KANZAKI M, et al. Sparc, an EPS-induced gene, modulates the extracellular matrix and mitochondrial function via ILK/AMPK pathways in C2C12 cells[J]. *Life Sci*, 2019, 229:277-287.
- [14] LIU L, ZHANG S, HU L, et al. HMGA1 participates in MHCC97H cell proliferation and invasion through the ILK/Akt/GSK3 β signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6):9287-9294.
- [15] WANG Z, LI Y, XIAO Y, et al. Integrin α 9 depletion promote β -catenin degradation to suppress triple-negative breast cancer tumor growth and metastasis[J]. *Int J Cancer*, 2019, 145(10):2767-2780.
- [16] PIAO Z, HONG C S, JUNG M R, et al. Thymosin β 4 induces invasion and migration of human colorectal cancer cells through the ILK/AKT/ β -catenin signaling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 452(3):858-864.
- [17] NIU J, LI X M, WANG X, et al. DKK1 inhibits breast cancer cell migration and invasion through suppression of β -catenin/MMP7 signaling pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19:168.
- [18] TANG X, SUN Y, WAN G, et al. Knockdown of YAP inhibits growth in Hep-2 laryngeal cancer cells via epithelial-mesenchymal transition and the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):654.
- [19] BRENNER D R, RUAN Y, ADAMS S C, et al. The impact of exercise on growth factors (VEGF and FGF2): results from a 12-month randomized intervention trial[J]. *Eur Rev Aging Phys Act*, 2019, 16(1):8.
- [20] ZHAO Z, LI Y, SHUKLA R, et al. Development of a biocompatible copolymer Nanocomplex to deliver VEGF siRNA for triple negative breast cancer[J]. *Theranostics*, 2019, 9(15):4508-4524.