

## 论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.05.014

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201126.1521.018.html\(2020-11-27\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201126.1521.018.html(2020-11-27))

## 黏附连接蛋白 Afadin 在结直肠癌组织中的表达及临床意义\*

桂林<sup>1</sup>, 卞红磊<sup>1</sup>, 于溯洋<sup>1</sup>, 程敏静<sup>1</sup>, 梁春慧<sup>2△</sup>

(河北医科大学第三医院:1. 肛肠一科;2. 药剂科, 石家庄 050051)

**[摘要]** **目的** 分析结直肠癌(CRC)组织中 Afadin 表达水平与临床病理学因素及预后的相关性。**方法** 利用免疫组织化学及蛋白免疫印迹(Western blot)对 CRC 组织中 Afadin 的表达水平进行检测,比较肿瘤组织及非肿瘤组织间的表达差异;免疫组织化学检测 CRC 组织中 Afadin 表达水平,计算免疫组织化学染色评分,并与临床病理学因素和预后资料进行相关性分析。**结果** CRC 组织中 Afadin 的表达水平较非肿瘤组织明显降低,并且 Afadin 表达水平与肿瘤的浸润深度、淋巴结转移状况相关,Afadin 低表达患者总生存率较 Afadin 高表达患者降低。**结论** CRC 存在 Afadin 表达水平降低的现象,Afadin 的表达水平和 CRC 的进展和预后相关。

**[关键词]** 结直肠肿瘤; Afadin; 临床病理; 预后**[中图分类号]** R735.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2021)05-0780-04

## Expression of Afadin in colorectal cancer and its relationship with clinical pathological features\*

GUI Lin<sup>1</sup>, BIAN Honglei<sup>1</sup>, YU Suyang<sup>1</sup>, CHENG Minjing<sup>1</sup>, LIANG Chunhui<sup>2△</sup>

(1. First Department of Colorectal Surgery; 2. Department of Pharmacy, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression of Afadin, and its relationship with clinical pathological features and prognosis in patients with colorectal cancer (CRC). **Methods** The expression of Afadin in 20 CRC specimens was examined by immunohistochemistry staining and Western blot, the results were compared with paired non-tumor tissues. Immunohistochemistry was used to detect the expression level of Afadin in CRC tissues, the immunohistochemical staining score was calculated, and its relationships with clinicopathological factors and prognostic data were analyzed. **Results** The expression of Afadin was down-regulated in human CRC tissues when compared with the non-tumor tissues, the expression level of Afadin was significantly associated with depth of tumor invasion and lymph node metastasis. The overall survival rate of patients with low Afadin expression was lower than that of patients with high Afadin expression. **Conclusion** The expression level of Afadin in CRC is reduced. The expression level of Afadin is related to the progression and prognosis of CRC.

**[Key words]** colorectal neoplasms; Afadin; clinical pathological features; prognosis

Afadin 是近期发现的一种黏附连接蛋白,在细胞内与连接素(Nectins)、上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)及纤维状肌动蛋白(F-actin)等构成黏附连接,参与调控细胞定向移动、增殖等多种功能<sup>[1-3]</sup>。与此同时,多种肿瘤中存在 Afadin 编码基因的异常融合,在某些类型的肿瘤,例如乳腺癌<sup>[4]</sup>、子宫内膜癌<sup>[5]</sup>及胰腺癌<sup>[6]</sup>中,还存在 Afadin 表达水平的改变,本研究将检测 Afadin 在结直肠癌(colorectal cancer, CRC)中的表达情况,结合临床资料分析其临床意义。

### 1 资料与方法

#### 1.1 一般资料

本研究已经通过本院临床研究伦理学会委员会批准(批准号:H2016-008-1)。所有患者均在本院肛肠一科手术,术前都未接受新辅助治疗。第一组病例包含 2017 年 1—12 月 20 例 CRC 患者,分别留取肿瘤组织及相对应的非肿瘤组织,进行蛋白免疫印记(Western blot)和免疫组织化学染色检测;第二组病例包含 2010 年 1 月至 2013 年 1 月共 118 例 CRC 患

\* 基金项目:河北省重点研发计划项目(17277738D);河北省卫生厅指导项目(20170634)。 作者简介:桂林(1973—),副主任医师,博士,主要从事结直肠疾病的研究。 △ 通信作者, E-mail:2069912719@qq.com。

者,每例患者均拥有较为完整的病例资料和随访信息,肿瘤组织切片进行免疫组织化学染色评分,并与临床病理资料和预后资料进行相关性分析。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 主要试剂

兔抗人 Afadin 多克隆抗体购于美国 Abcam 公司,SP 试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒及电化学发光(ECL)试剂盒购于上海碧云天生物技术公司。

#### 1.2.2 Western blot

提取总蛋白,采取 BCA 法进行蛋白定量,每组上样 20  $\mu\text{g}$ ,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,转膜,一抗孵育过夜,二抗孵育 1.5 h,ECL 显影,以 GAPDH 为内参计算 Afadin 的表达水平。

#### 1.2.3 免疫组织化学染色及结果判定

切片脱蜡入水,热修复法进行抗原修复,滴加一抗后 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 12 h,此后依次滴加二抗和辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素,DAB 显色,复染后脱水透明封片。由两位病理科医师单独进行结果评分。密度评分分为:0 分(阴性,无黄色),1 分(弱阳性,呈浅黄色),2 分(中等阳性,呈棕黄色),3 分(强阳性,呈棕色),阳性细胞比例评分分为:0 分(未见阳性细胞),1 分(阳性细胞百分比小于 25%),2 分(阳性细胞百分比 25%~50%),3 分(阳性细胞百分比大于 50%),两个评分相乘即获得免疫组织化学染色评分。

### 1.3 统计学处理

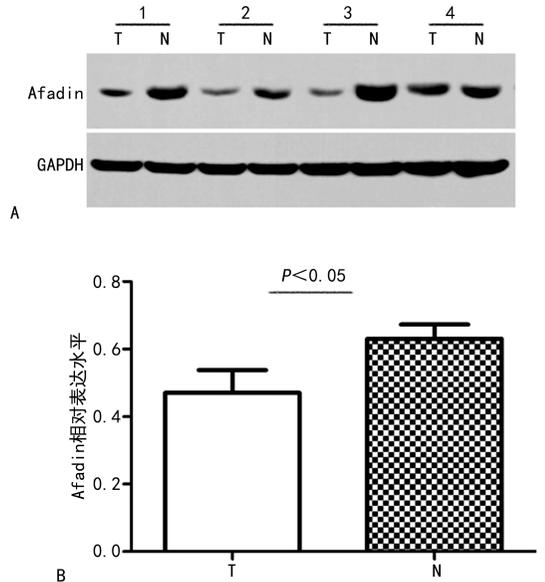
采用 SPSS20.0 软件进行分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验,计数资料以例数( $n$ )表示,比较采用  $\chi^2$  检验。利用 Kaplan-Meier 进行生存分析,用 Log-rank 检验比较 Afadin 高表达和低表达两组 CRC 患者的生存率。采用 Cox 比例风险模型,以向前-条件法筛选变量,进行 CRC 总生存的多因素分析。 $t$  检验、 $\chi^2$  检验及 Log-rank 检验的检验水准选择  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义,在

进行 CRC 总生存的多因素分析时检验水准选择  $\alpha=0.10$ 。

## 2 结果

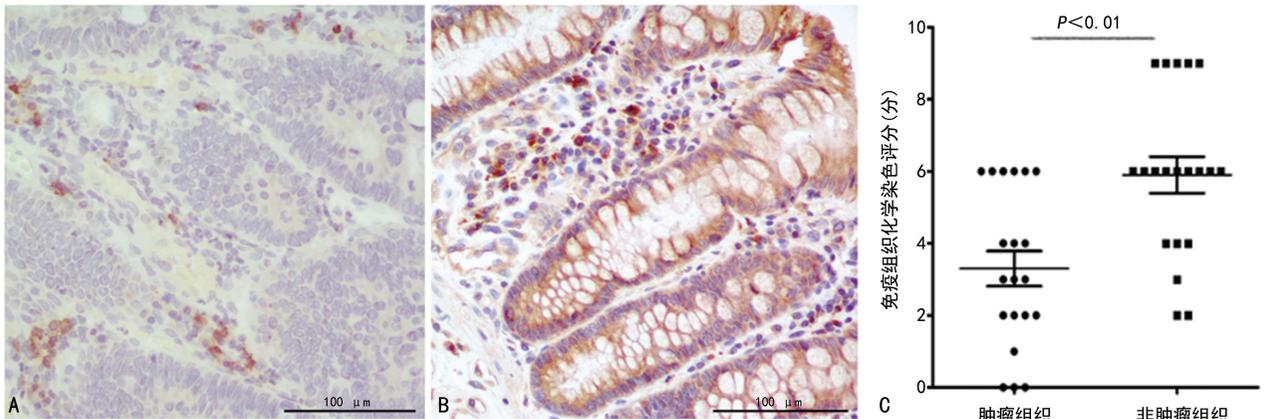
### 2.1 Afadin 在 CRC 组织中的表达

利用 Western blot 对 20 例 CRC 患者的肿瘤组织及相对应非肿瘤组织进行 Afadin 表达水平检测,其中的 15 对标本(75%),肿瘤组织中的 Afadin 表达水平低于相对应的非肿瘤组织( $P<0.05$ ),见图 1。对标本进行了免疫组织化学染色,结果显示,Afadin 阳性细胞呈现细胞膜和细胞质着色。在非肿瘤组织中,Afadin 呈中或强阳性表达(免疫组织化学染色评分大于 4 分)的比例为 70.0%(14/20),而在肿瘤组织中,Afadin 呈中或强阳性表达的比例为 30.0%(6/20),两组比较差异有统计学意义( $P<0.01$ ),见图 2。



A:Western blot 检测结果;B:两组标本表达平均灰度值比较;T:肿瘤组织;N:非肿瘤组织;1、2、3、4 为病例号。

图 1 Western blot 检测 Afadin 在 20 例 CRC 肿瘤组织及相对应的非肿瘤组织中的表达



A:Afadin 在肿瘤组织中低表达( $\times 200$ );B:Afadin 在非肿瘤组织中高表达( $\times 200$ );C:两组间免疫组织化学染色评分比较。

图 2 免疫组织化学检测 Afadin 在 20 例 CRC 肿瘤组织及相对应的非肿瘤组织中的表达

## 2.2 CRC 组织中 Afadin 表达水平与临床病理学因

素之间的相关性分析

为了进一步分析 CRC 组织中 Afadin 表达水平与临床病理因素之间的相关性,笔者利用免疫组织化学染色的方法对 118 例 CRC 患者的肿瘤组织切片进行 Afadin 表达水平检测,根据免疫组织化学染色评分将其分为两组,Afadin 高表达组(IHC 评分大于 4 分)及 Afadin 低表达组(IHC 评分小于或等于 4 分),然后与患者的临床病理资料进行相关性研究,单因素分析结果显示,肿瘤组织中的 Afadin 表达水平与患者年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤大小、病理组织学类型、脉管浸润、神经浸润均无明显相关性( $P > 0.05$ ),但是在浸润深度达到 T3 水平及以上( $P = 0.020$ )或出现淋巴结转移( $P = 0.043$ )的肿瘤组织中,Afadin 低表达的发生率明显升高,见表 1。

表 1 118 例 CRC 患者组织标本 Afadin 表达水平和临床病理因素之间的关系

临床病理因素	n	Afadin 表达		P
		低(n)	高(n)	
年龄(岁)				0.270
<60	33	24	9	
≥60	85	50	35	
性别				0.737
男	56	35	21	
女	62	39	23	
肿瘤部位				0.732
直肠	56	36	20	
结肠	62	38	24	
肿瘤大小(cm)				0.308
<5	65	42	23	
≥5	53	32	21	0.660
病理类型				
低分化+印戒	25	17	8	
高分化+中分化	93	57	36	
浸润深度				0.020
T1+T2	33	11	20	
T3+T4	85	63	24	
淋巴结转移				0.043
无	66	32	34	
有	52	42	10	
脉管浸润				0.134
无	79	42	37	
有	39	32	7	
神经浸润				0.400
无	82	46	36	
有	36	28	8	

## 2.3 CRC 组织中 Afadin 表达水平对预后的影响

在上述 118 例 CRC 患者中,笔者还进行了 Afadin 表达水平与预后的相关性分析,结果显示,肿瘤组织中 Afadin 低表达患者总的生存率更低( $P < 0.01$ ),见图 3。将年龄、性别及 Afadin 表达水平引入 Cox 多因素回归分析,结果显示,出现淋巴结转移及 Afadin 低表达是 CRC 预后的独立风险因素,见表 2。

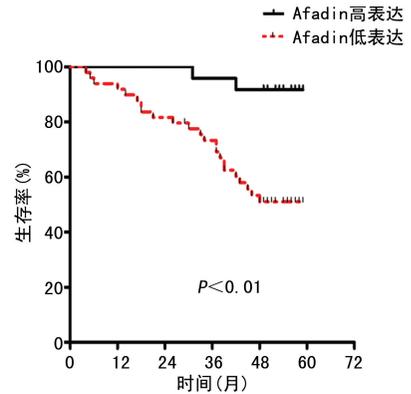


图 3 Afadin 高表达组和低表达组 CRC 患者的生存曲线

表 2 118 例 CRC 患者预后的 Cox 多因素回归分析

风险因素	$\beta$	SE	Wald	Sig.	Exp(B)	Exp(B)95%CI	
						下部	上部
淋巴结转移	1.496	0.387	14.946	0.000	4.465	2.091	9.534
Afadin 低表达	1.824	0.613	8.871	0.003	6.200	1.866	20.596

## 3 讨论

细胞极性的建立对于维持上皮细胞的屏障功能是至关重要的,细胞极性丧失不仅会导致上皮出现渗漏,还在肿瘤的发生发展中发挥着关键性作用,参与上皮间质转化及肿瘤转移的过程,目前,细胞极性丧失已经被看作是进展期上皮性肿瘤的标志之一<sup>[7-8]</sup>。细胞极性的建立是一个多步骤过程,其中之一就是细胞黏附和连接复合体的正确组合,细胞与细胞之间的黏附主要依靠黏附连接(AJs)及紧密连接(TJs)维持。构成黏附连接的几种成分,例如 E-cadherin 和 Catenins,与肿瘤的进展和转移有密切的关系,目前已经成为肿瘤研究领域的关注热点<sup>[9]</sup>。Afadin 作为黏附连接蛋白之一,几乎存在于所有的上皮细胞之中,它捆绑肌动蛋白微丝和 Nectins 构成肌动蛋白骨架,参与调控多种细胞功能。鉴于 Afadin 在维持细胞极性中的关键性作用,它也逐渐受到肿瘤研究领域的关注,逐渐增多的研究结果显示,在多种类型的肿瘤中,存在 Afadin 表达水平的改变,并与肿瘤的恶性表现密切相关,例如 Afadin 与 Claudin-2 协作,共同促进乳腺癌细胞出现转移<sup>[10]</sup>;在三阴乳腺癌对阿霉素耐药的产生机制中,也有 Afadin 的参与<sup>[11]</sup>;对于恶性胶质瘤来说,Afadin 促进了病理性血管形成<sup>[12]</sup>;当胃癌细胞感染幽门螺杆菌后,Afadin 的表达水平下降,同时

伴有上皮间质转化<sup>[13]</sup>；紧密连接蛋白 2 通过下调 Afadin/ERK 信号通路，抑制骨肉瘤细胞转移<sup>[14]</sup>，这些研究都提示，Afadin 可能通过多个途径，广泛参与肿瘤的发生发展过程。

根据上述研究结果，笔者推测，在 CRC 中可能也存在 Afadin 表达水平的改变，为了验证这种推测，本研究首先选择了 20 例 CRC 患者的肿瘤组织及其对应的非肿瘤组织，分别利用 Western blot 及免疫组织化学染色的方法对 Afadin 蛋白表达水平进行了检测，两种检测的结果都显示，与对应的非肿瘤组织比较，CRC 组织中确实存在 Afadin 表达水平下降的现象。随后，为了检验 Afadin 的表达水平是否能够反映肿瘤的恶性程度，本研究又选择了拥有完整病例资料和随访信息的 118 例 CRC 患者，分别对肿瘤组织切片进行免疫组织化学染色评分并与临床病理因素和预后资料进行相关性分析，结果显示，肿瘤组织中 Afadin 的表达水平与肿瘤的浸润深度及淋巴结转移状况密切相关，与 Afadin 高表达的患者比较，Afadin 低表达的患者总生存率明显降低，Afadin 低表达是 CRC 预后的独立风险因素，这些结果提示，Afadin 参与 CRC 的发展与转移，CRC 出现 Afadin 表达水平降低，预后不良。

尽管本研究发现，在 CRC 中存在 Afadin 表达水平的改变，但是这种改变是发生在转录、翻译还是翻译后加工及修饰层面并不明确，笔者将继续进行相关研究；与此同时，笔者还将对 CRC 细胞的 Afadin 表达水平进行干预，观察干预后 CRC 细胞生物学特性的改变，以进一步明确 Afadin 与 CRC 的相关性，为探索 Afadin 是否能够成为治疗 CRC 的新靶点提供依据。

## 参考文献

- [1] TAKAI Y, NAKANISHI H. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions[J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt 1):17-27.
- [2] HARRIS T J, TEPASS U. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(7):502-514.
- [3] MANDAI K, RIKITAKE Y, SHIMONO Y, et al. Afadin/AF-6 and canoe: roles in cell adhesion and beyond[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2013, 116:433-454.
- [4] FOURNIER G, CABAUD O, JOSSELIN E, et al. Loss of AF6/afadin, a marker of poor outcome in breast cancer, induces cell migration, invasiveness and tumor growth[J]. *Oncogene*, 2011, 30(36):3862-3874.
- [5] YAMAMOTO T, MORI T, SAWADA M, et al. Loss of AF-6/afadin induces cell invasion, suppresses the formation of glandular structures and might be a predictive marker of resistance to chemotherapy in endometrial cancer [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15:275.
- [6] XU Y, CHANG R, PENG Z, et al. Loss of polarity protein AF6 promotes pancreatic cancer metastasis by inducing Snail expression[J]. *Nat Commun*, 2015, 6:7184.
- [7] ROYER C, LU X. Epithelial cell polarity: a major gatekeeper against cancer? [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(9):1470-1477.
- [8] LEE M, VASIOUKHIN V. Cell polarity and cancer: cell and tissue polarity as a non-canonical tumor suppressor[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121 (Pt 8):1141-1150.
- [9] GONZALEZ-MARISCAL L, MIRANDA J, ORTEGA-OLVERA J M, et al. Involvement of tight junction plaque proteins in cancer[J]. *Current Pathobiology Reports*, 2016, 4 (3): 117-133.
- [10] TABARIÈS S, MCNULTY A, OUELLET V, et al. Afadin cooperates with Claudin-2 to promote breast cancer metastasis[J]. *Genes Dev*, 2019, 33(3/4):180-193.
- [11] YANG M, LI Y, RUAN Y, et al. CLDN6 enhances chemoresistance to ADM via AF-6/ERKs pathway in TNBC cell line MDAMB231 [J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 443 (1/2): 169-180.
- [12] ZHAI X, LI Y, LIANG P, et al. PI3K/AKT/Afadin signaling pathway contributes to pathological vascularization in glioblastomas[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(2):1893-1899.
- [13] MARQUES M S, MELO J, CAVADAS B, et al. Afadin downregulation by helicobacter pylori induces epithelial to mesenchymal transition in gastric cells[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9:2712.
- [14] ZHANG X, WANG H, LI Q, et al. CLDN2 inhibits the metastasis of osteosarcoma cells via down-regulating the afadin/ERK signaling pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18(1):160.