

·临床研究·

细丝蛋白A在结直肠腺癌中的特异性表达*

史建伟 王贵英 张鸿滨^① 于跃明 王小玲^② 杨会钗^② 王士杰^③

摘要 目的:研究细丝蛋白A(FLN_a)在结直肠腺癌组织中的表达情况,探讨FLN_a在结直肠腺癌发生发展中的作用。方法:选择2009年1月~9月河北医科大学第四医院外二科60例患者手术切除的结直肠腺癌组织和正常结直肠组织。癌组织取自肿瘤中心处,正常组织取自距肿瘤边缘至少10cm处。采用RT-PCR法和Western blot法检测60例结直肠腺癌患者癌组织和结直肠正常组织中FLN_a的mRNA和蛋白质的表达情况。同时采用免疫组化法检测FLN_a在结直肠癌组织和结直肠正常组织中的分布,并分析组间的FLN_a阳性率表达差异。所有病例均经病理诊断确诊,均无其他部位原发肿瘤,术前无化疗、放疗和免疫治疗史。结果:结直肠癌组织中FLN_a mRNA的表达水平(0.22±0.02)较结直肠正常组织低(0.94±0.04)($P=0.018$);Western blot法检测显示:FLN_a蛋白在结直肠癌组织中的表达水平(0.34±0.03)也较结直肠正常组织低(0.85±0.02)($P=0.028$);Pearson相关分析显示:FLN_a mRNA和蛋白水平呈正相关($r=0.654$, $P<0.05$)。FLN_a免疫组化阳性染色产物位于细胞质。FLN_a在结直肠癌组织组和结直肠正常组织组的阳性表达率分别为50.00%、91.67%,癌组织组明显低于正常组织组($\chi^2=50.037$, $P=0.000$)。结论:FLN_a的特异性低表达与结直肠腺癌的发生、发展具有高度相关性,有望成为新的肿瘤标志物,为临床诊治提供的新靶点。

关键词 结直肠肿瘤 细丝蛋白A 免疫组织化学 RT-PCR Western blot

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2010.23.006

Specific Expression of FLN_a in Colorectal Adenocarcinoma

SHI Jianwei¹, WANG Guiying¹, ZHANG Hongbin², YU Yueming¹, WANG Xiaoling³, YANG Huichai³, WANG Shijie⁴

Corresponding author: WANG Shijie; E-mail: tizq12@vip.163.com

¹The Second Department of Surgery, The Fourth Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

²The Third Department of Surgery, The Fourth Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

³Department of Surgery, The Fourth Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

⁴Cancer Institute, The Fourth Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

Grant support: Fund of Hebei Provincial Health Department for Significant Task of Medical Sciences (No.20090010), and the Construction Fund of Hebei Provincial Program for the Subjects with High Scholarship and Creative Research Potential in Higher Education Institutions [Jigaojiao [2005]52]

Abstract Objective: To study the expression of filamin-a (FLN_a) in human colorectal adenocarcinoma, and determine the role of FLN_a in the pathogenesis of colorectal adenocarcinoma. **Methods:** The samples of colorectal adenocarcinoma and normal colorectal tissues were collected from 60 patients who underwent colorectal resection. Colorectal adenocarcinoma tissues were obtained from the central part of the tumor, while normal colorectal tissues were collected from the site which was at least 10 cm away from the edge of the lesion. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot method were used to detect the expressions of FLN_a mRNA and protein in the 60 specimens with colorectal adenocarcinoma and normal colorectal tissues. At the same time, immunohistochemistry was conducted to detect the distribution of FLN_a protein in colorectal adenocarcinoma and normal colorectal tissues, and to analyze the differences between two groups. All cases were confirmed by pathological diagnosis, and primary tumors were not found at other sites. No medical records of preoperative radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy were found in the groups. **Results:** The expression of FLN_a mRNA was lower in colorectal adenocarcinoma than in normal colorectal tissues ($P=0.018$, <0.05). Western blot analysis revealed that the expression of FLN_a protein was also lower in colorectal adenocarcinoma than in the normal colorectal tissues ($P=0.028$, <0.05). Pearson correlation analysis showed that the mRNA level was in positive correlation with the protein level ($r=0.645$, $P<0.05$). The positively stained particles were distributed in the cytoplasm. Of the 60 colorectal adenocarcinoma samples, 30 (50%) cases were positive for FLN_a expression. And of the 60 normal colorectal samples, 55 (91.67%) cases were positive for FLN_a expression. The positive rate of FLN_a expression was lower in colorectal adenocarcinoma samples than in the normal colorectal samples ($\chi^2=50.037$, $P=0.000<0.05$). Immunohistochemical analysis

作者单位:河北医科大学第四医院外二科(石家庄市050011);①外三科;②病理科;③肿瘤研究所

* 本文课题受河北省卫生厅医学科学研究重点课题计划(编号:20090010)和河北省普通高校强势特色学科建设基金资助(编号:冀高教[2005]52号)

通讯作者:王士杰 tizq12@vip.163.com

showed the same results as RT-PCR and Western blot. **Conclusion:** The specific low expression of the FLNa protein is in a high correlation with the pathogenesis of colorectal adenocarcinoma. FLNa is expected to be a new tumor marker and the new target for clinical therapy.

Keywords Colorectal adenocarcinoma; FLNa; Immunohistochemistry; RT-PCR; Western blot

细丝蛋白A(filamin A, FLNa)属于肌动蛋白结合蛋白,是主要分布在细胞质的大分子蛋白质,能够约束纤维状肌动蛋白,参与细胞骨架的形成,同时能为蛋白质-蛋白质相互作用提供界面,与涉及细胞的增殖、粘附、迁移、侵袭以及肿瘤发生发展的多条信号转导途径密切相关^[1]。本研究应用RT-PCR、Western blot和免疫组化法检测60例结直肠癌常见类型-腺癌患者癌组织和结直肠正常组织中FLNa的表达情况,探索其表达差异的意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料

收集河北医科大学第四医院外二科2009年1月~9月60例患者手术切除的结直肠癌组织和正常结直肠组织。癌组织取自肿瘤中心处,正常组织取自距肿瘤边缘至少10cm处。其中男36例,女24例;年龄25~80岁,中位年龄56岁。所有病例均经病理诊断确诊,均无其他部位原发肿瘤,术前无化疗、放疗和免疫治疗史。标本取材后,部分置于液氮中速冻,然后转至-80℃冰箱内保存;部分标本用10%甲醛固定,石蜡包埋,作免疫组化染色。

1.2 主要试剂

总RNA提取试剂购自Solarbio公司。反转录试剂盒购自Fermentas公司。引物由上海生工生物工程公司合成。RIPA试剂购自Solarbio公司。兔抗人FLNa单克隆一抗购于Epitomics公司。兔抗人GAPDH多克隆一抗购于Santa Crue公司。羊抗兔二抗购于KPL公司。SDS-PAGE标准指示剂购于Fermentas公司。BCA蛋白定量试剂盒购自BestBio公司。DAB显色剂购于TIANGEN公司。免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方法及结果判定

1.3.1 RT-PCR法 使用总RNA提取试剂抽提组织中的总RNA,测定浓度。根据GenBank中人源FLNa和GAPDH(作内参)cDNA全长设引物。FLNa的上游引物5'-AGCCTCCACGAGACATCATC-3',下游引物5'-CCAGTGTGTACTCCCCCTTG-3'。内参GADPH的上游引物5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',下游引物5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'。取总RNA 1μg,加入随机引物1μL,5×RT-PCR Buffer 4μL, RNA酶抑制剂1μL, dNTP 2μL, 逆转录酶1μL,加DEPC处理的水至总体积20μL。30℃ 10min, 45℃

5min,反应结束后,95℃ 5min。取cDNA 2μL,上、下游引物各1μL, 10×PCR Buffer 2.5μL, Taq DNA聚合酶0.2μL, dNTP 0.5μL,加DEPC处理的水至总体积25μL。95℃预变性5min, 94℃ 30s, 64℃ 30s, 72℃ 30s进行35个循环,于72℃延伸7min。FLNa和GAPDH的PCR产物大小分别为310bp和220bp。应用Gel Pro-Analyzer 3.1软件进行密度定量分析。

1.3.2 Western blot法 使用RIPA试剂,采用匀浆处理组织,提取总蛋白,定量。取蛋白样品50μg,加入5×上样缓冲液(体积比4:1),煮沸5min后上样。经SDS-PAGE电泳、转膜,将蛋白质转至PVDF膜。将膜置于含5%脱脂奶粉的TBST液中,室温封闭1h,加入特异性的一抗(FLNa为1:2 000;GAPDH为1:200)-4℃孵育过夜,次日用TBST液洗膜3次,每次10min。羊抗兔二抗(1:2 000)37℃孵育1h。TBS液洗膜3次,每次10min。使用DAB试剂盒显色,拍照记录实验结果。应用Gel Pro-Analyzer 3.1软件进行密度定量分析。

1.3.3 免疫组织化学染色法 采用链霉素亲和生物素-过氧化物酶免疫组化方法(SP法)。将组织蜡块切成4μm厚的组织切片,脱蜡水化后放入盛有枸橼酸缓冲液的容器中,置微波炉内(95℃, 15min)行抗原修复,3%过氧化氢室温孵育20min,经PBS冲洗后,用试剂盒中的正常山羊血清封闭,滴加兔抗人FLNa单克隆抗体(1:150稀释),置4℃冰箱过夜。PBS冲洗后,滴加试剂盒中的生物素标记的二抗,室温30min;PBS冲洗后,滴加试剂盒中的辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素,室温30min, PBS冲洗后, DAB显色,自来水冲洗,苏木精复染,梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。以人子宫组织着色作为阳性对照,以PBS代替一抗进行染色作为阴性对照。结果判定标准:光学显微镜下观察,在高倍镜下选择5个视野计数,每个高倍视野下计数200个细胞,计算出平均细胞阳性率。染色强度分为浅染、淡黄、棕黄和棕褐4个等级,颗粒状态又分为无明显颗粒、稀疏颗粒、一定量颗粒和弥漫性颗粒4种情况。综合分析每张切片的阳性率及染色强度,将免疫组织化学染色结果分为4级:阳性细胞数<25%,染色较淡,未见明显颗粒者定为(-);阳性细胞数25%~50%,染色淡,可见稀疏颗粒者定为(+);阳性细胞数50%~75%,染色棕黄,可见一定量颗粒者定为(++);阳性细胞数≥75%,染色棕褐,可见弥漫性颗粒定为(+++)。由2名

有经验的临床病理医师阅片,确定判定结果。

1.4 统计学分析

应用SPSS 13.0统计软件进行分析,数据采用 χ^2 检验、 t 检验和Pearson相关分析。设检验水平 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FLNa的RT-PCR检测结果

以GAPDH作内参照,以FLNa/GAPDH值来定量。结果显示,癌组织中FLNa mRNA的表达水平

(0.22 ± 0.02)较正常组织(0.94 ± 0.04)低,两组间差异具有统计学意义($P=0.018$),见图1。

2.2 FLNa的Western blot检测结果

以GAPDH作内参照,以FLNa/GAPDH值进行定量。结果显示,FLNa蛋白在癌组织中的表达水平(0.34 ± 0.03)较正常组织低(0.85 ± 0.02),两组间差异具有统计学意义($P=0.028$),见图2。RT-PCR与Western blot结果的相关分析显示,二者呈明显的相关性($r=0.654$, $P<0.05$)。

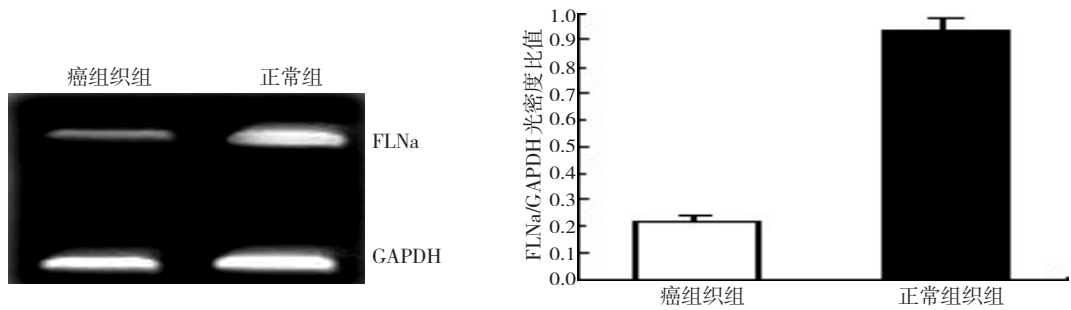


图1 RT-PCR检测结直肠腺癌组织及正常组织中FLNa mRNA的表达
Figure 1 RT-PCR analysis of FLNa mRNA expression in colorectal adenocarcinoma and normal colorectal tissue

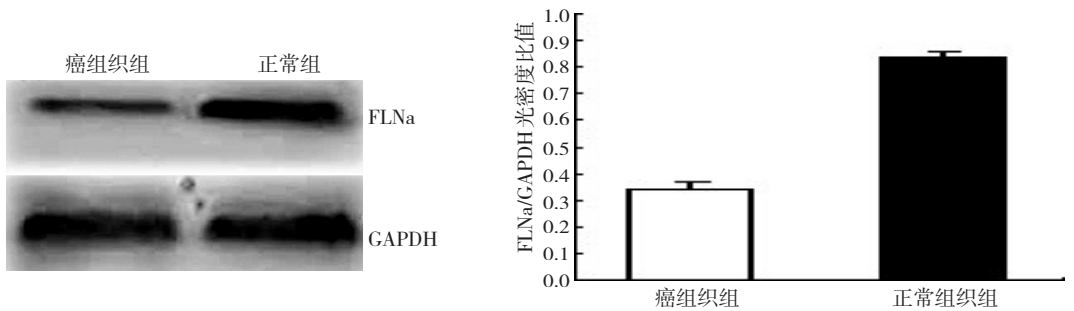
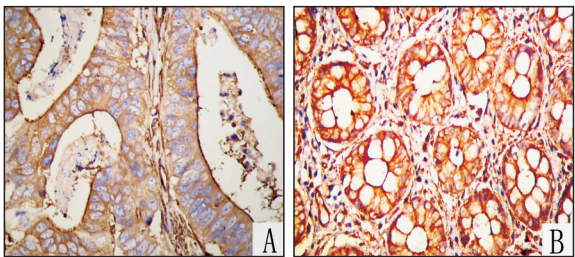


图2 Western blot检测结直肠腺癌组织及正常组织中FLNa蛋白的表达
Figure 2 Western blot analysis of FLNa protein expression in colorectal adenocarcinoma and normal colorectal tissue

2.3 FLNa的免疫组化染色检测结果

FLNa免疫组化阳性染色产物位于细胞质。癌组织中FLNa的表达低于癌旁正常组织(图3)。FLNa在癌组和正常组表达的阳性率分别为50.00%、91.67%,癌组明显低于正常组($P=0.000$),见表1。



A: FLNa在腺癌组织中呈低表达; B: FLNa在正常组织中呈高表达

图3 免疫组化检测结直肠腺癌组织及正常组织中FLNa蛋白的表达 SP×200

Figure 3 Immunohistochemical staining of FLNa protein expression in colorectal adenocarcinoma and normal tissue SP×200

表1 FLNa蛋白在结直肠腺癌组织及正常组织中的表达 例(%)

Table 1 Expression of FLNa protein in colorectal adenocarcinoma and normal tissue (%)

分组	例数	FLNa蛋白				χ^2	P值
		-	+	++	+++		
癌组织组	60	30(50.00)	16(26.67)	13(21.67)	1(1.67)	50.037	0.000
正常组织组	60	5(8.33)	7(11.67)	17(28.33)	31(51.67)		

3 讨论

结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一,其发病率呈逐年上升趋势^[2],近25年的结直肠癌5年生存率徘徊在50%~60%左右^[3]。肿瘤的复发和远处转移是结直肠癌患者预后不良的主要原因。

细丝蛋白A(filamin A, FLNa)基因结构高度保守,表达广泛,对哺乳动物的生长发育具有重要的作用。FLNa蛋白二聚体亚基相对分子质量为280KDa、长度约为80nm,包括氨基端的肌动蛋白结合结构域(ABD)和由24个串联的重复序列形成的棒状结构

域,中间间隔2个分别含大约30个氨基酸残基形成的铰链结构。每个重复序列形成多个反向平行的 β -片层结构。两条多肽链在羧基端的第24个重复序列末端相连,形成与其功能有关的“V”型同源二聚体^[4]。FLNa最初作为肌动蛋白结合蛋白而被发现和认识,目前大量的研究证明FLNa是非常重要的细胞信号转导支架蛋白,具有整合细胞结构和信号转导的功能,参与了肿瘤的发生发展。Fiori等^[5]发现FLNa能促使表皮生长因子受体(EGFR)与泛素连接酶c-Cb1相互作用,将EGFR泛素化,经蛋白酶体降解,从而调节细胞内EGFR的产量、活性及相应的信号信号途径,同时FLNa通过Ras-GRF1途径而调节Ras/ERK通路,下调细胞内基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的水平^[6],MMP-9是基质金属蛋白酶家族成员之一,是人体内降解IV型胶原和细胞外基质的主要酶,在肿瘤的演进和异质化过程中有重要的作用^[7]。FLNa与G蛋白偶联受体家族的Mu阿片受体(MOPr)结合后,可促进MOPr的活性下调、功能脱敏和内摄作用,进而影响ERK的失活速度^[8],抑制了肿瘤细胞的增殖。癌胚抗原相关细胞黏附分子(CEACAM1)与多种细胞功能有关,如增殖、分化、形态形成和凋亡,根据其在细胞质内尾部的长度不同而分为二个亚型—CEACAM1-L和CEACAM1-S,CEACAM1-L单独表达时促进肿瘤细胞的迁移,而CEACAM1-L与FLNa相互结合后,细胞的迁移率大大减少,并且局部粘附率降低^[9]。异二聚体的转录因子PEBP2/CBF由DNA结合蛋白Runx1/AML1和非DNA结合蛋白PEBP2 β /CBF β 构成。核磁共振和X射线衍射显示,当Runx1与PEBP2 β 形成二聚体时,稳定的Runx1能与DNA的大沟、小沟结合。Runx1与PEBP2二聚体敲除的小鼠表现为相同的表型,即在胚胎发育的过程中造血干细胞发育障碍。FLNa能将PEBP2 β 滞留在细胞质,妨碍其与Runx1结合,阻遏Runx1所诱导的转录^[10]。此外,FLNa还可通过MAPK/ERK^[6,8]、PI3K/Akt通路^[11]和TGF- β 信号转导^[12]等抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭。

本实验采用RT-PCR和Western blot检测FLNa mRNA和蛋白在结直肠腺癌组织及正常组织中的表达情况,结果发现FLNa在腺癌组织中的表达较正常组织低,而且基因和蛋白表达呈明显的相关性。免疫组织化学检测结果与RT-PCR及Western blot的检测结果一致。表明FLNa在结直肠腺癌组织中特异性地低表达,FLNa蛋白的低表达可能与结直肠腺癌的发生发展具有相关性。

本研究与文献结果从不同的侧面说明FLNa与肿瘤发生发展具有高度相关性。对其作用机制的深入研究,将为结直肠癌等恶性肿瘤的诊治提供新的思路。

参考文献

- 1 Feng Y, Walsh CA. The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling[J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(11): 1034–1038.
- 2 张思维,陈万青,孔灵芝,等.中国部分市县1998~2002年恶性肿瘤的发病与死亡[J]. *中国肿瘤*, 2006, 15(7): 430–448.
- 3 Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. *Cancer Statistics*, 2008[J]. *CA Cancer J Clin*, 2008, 58(2): 71–96.
- 4 Nakamura F, Osborn TM, Hartemink CA, et al. Structure basis of filamin A functions[J]. *J Cell Biol*, 2007, 179(5): 1011–1025.
- 5 Fiori JL, Zhu TN, O'Connell MP, et al. Filamin A modulates kinase activation and intracellular trafficking of epidermal growth factor receptors in human melanoma cells[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(6): 2551–2560.
- 6 Zhu TN, He HJ, Kole S, et al. Filamin A-mediated down-regulation of the exchange factor Ras-GRF1 correlates with decreased matrix metalloproteinase-9 expression in human melanoma cells[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(20): 14816–14826.
- 7 刘易欣,赵春歌,赵秀兰,等.MMP-9/EGFR在胃癌Lauren's分型中的表达及意义[J]. *中国肿瘤临床*, 2006, 33(11): 632–635.
- 8 Onoprishvili I, Ali S, Andria ML, et al. Filamin A mutant lacking actin-binding domain restores mu opioid receptor regulation in melanoma cells[J]. *Neurochem Res*, 2008, 33(10): 2054–2061.
- 9 Klaile E, Muller MM, Kannicht C, et al. CEACAM1 functionally interacts with filamin A and exerts a dual role in the regulation of cell migration[J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt 23): 5513–5524.
- 10 Yoshida N, Ogata T, Tanabe K, et al. Filamin A-bound PEBP2beta/CBFbeta is retained in the cytoplasm and prevented from functioning as a partner of the Runx1 transcription factor[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(3): 1003–1012.
- 11 Ravid D, Chuderland D, Landsman L, et al. Filamin A is a novel caveolin-1-dependent target in IGF-I-stimulated cancer cell migration[J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(15): 2762–2773.
- 12 Sasaki A, Masuda Y, Ohta Y, et al. Filamin associates with Smads and regulates transforming growth factor-beta signaling[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(21): 17871–17877.

(2009-12-29收稿)

(2010-05-13修回)

(邢颖校对)