

接头蛋白 Crk I 在喉鳞癌中的表达及意义

于明¹, 姚芝芬², 龚正鹏²

(1. 贵州医科大学附属白云医院 耳鼻咽喉科, 贵州 贵阳 550014; 2. 贵州医科大学附院 耳鼻咽喉科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨接头蛋白 Crk I 在喉鳞癌组织中的表达及意义; 方法: 采用免疫组化 SP 法, 对 54 例喉鳞癌手术切除标本和 22 例癌旁正常组织进行检测, 观察 Crk I 在 2 种组织中的表达, 分析 Crk I 的表达与鳞癌临床分期、病理分级、肿瘤转移及生存时间的关系。结果: Crk I 在喉癌组织中主要表达于细胞质、细胞核可见少量表达、阳性率达 64.8%, 在癌旁正常组织中少量表达或无表达, 2 种组织中 Crk I 表达阳性率比较, 差异有统计学意义($\chi^2 = 24.149, P < 0.01$); 喉鳞癌组织中, 有淋巴结转移者 Crk I 蛋白阳性表达率为 91.7%, 与无淋巴结转移者的 54.8% 比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 但 Crk I 蛋白的阳性表达率在各年龄组、不同临床分期、病理分级及不同预后的喉鳞癌患者中比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 接头蛋白 Crk I 可能在喉鳞癌细胞的发生、发展和转移中有重要意义。

[关键词] 喉鳞癌; 接头蛋白 Crk I; 免疫组织化学染色; 肿瘤; 病理分级; 基因表达

[中图分类号] R739.65 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)05-0568-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.05.015

Expression and Significance of Crk I in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma

YU Ming¹, YAO Zhifen², GONG Zhengpeng²

(1. Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, the Affiliated Baiyun Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550014, Guizhou, China; 2. Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, the Affiliated Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and significance of Crk I in laryngeal squamous cell carcinoma. **Methods:** Fifty-four cases with laryngeal cancer were detected by immunohistochemistry S-P method and the ablated laryngeal squamous cell carcinoma samples and the normal para-carcinoma tissues were analyzed. **Results:** Analysis showed that the expression of Crk I gene in laryngeal squamous cell carcinoma was up-regulated. The difference of Crk I in the tissues and laryngeal carcinoma of the control group was statistically significant. There was significant difference in lymph node metastasis. **Conclusion:** Over-expression of Crk I may play an important role in the oncogenesis, progression and metastasis of laryngeal carcinoma.

[Key words] laryngeal squamous cell carcinoma; Crk I; immunohistochemistry; neoplasms; pathological grading; gene expression

喉癌是发生于喉腔黏膜的恶性肿瘤, 占全身恶性肿瘤的 1% ~ 5%, 占头颈肿瘤的 30% ~ 50%^[1], 占我国南方地区耳鼻咽喉头颈肿瘤的第 2 位^[2]。最新的流行病学调查显示, 2017 年喉癌在美国的

新发病例约 13 360 例, 死亡病例约 3 360 例^[3]; 2015 年中国癌症统计显示, 喉癌的新发病例约 26 400 例, 死亡病例约 14 500 例^[4]。目前喉癌的治疗仍是以手术为主的综合治疗, 但中晚期喉癌由

于复发及转移的原因,致死率较高,而且多数患者失去语言功能^[5-6]。因此,对于喉癌分子生物学机制的探讨和研究十分重要。接头蛋白 Crk (CT10 regulated kinase) 最初作为一种癌基因产物发现于禽类肉瘤病毒 CT10 (chicken tumor 10) 中,它主要由 SH2 (src homology 2) 和 SH3 (src homology 3) 结构域组成^[7]。细胞内 Crk 的 mRNA 通过选择性剪切,表达形成由 1 个 SH2 和 1 个 SH3 结构域组成的 Crk I、和由 1 个 SH2 和 2 个 SH3 结构域组成的 Crk II^[8]。已有研究发现,在多种恶性肿瘤中 Crk 上调,并促使肿瘤细胞增殖、转移和侵袭^[9]。查阅文献发现,虽然 Crk 在多种肿瘤中有表达,但在喉鳞癌中的表达未见报道。本研究通过免疫组化 SP 方法检测 Crk I 在喉鳞癌中的表达,并对其生物学行为的关系进行分析,了解到它与喉鳞癌侵袭转移有关,报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本及试剂

1.1.1 组织来源 标本均来自贵州医科大学附属医院 2006 年 6 月~2012 年 10 月病理科石蜡存档标本,经病理诊断喉癌鳞状细胞癌,患者术前均未行放疗及化疗。标本共 54 例,男 53 例,女 1 例,36~73 岁,平均 57 岁。按 UICC (2002) TNM 分期标准分为 I 期 18 例,II 期 12 例,III 期 9 例,IV 期 15 例。按 WHO 肿瘤分型标准,病理分级为高分化 40 例、中分化 11 例及低分化 3 例,有颈淋巴结转移者 12 例。选取 22 例癌旁正常组织作为对照。所有标本均经 10% 福尔马林固定,石蜡包埋,4 μm 连续切片。

1.1.2 主要试剂 兔抗人 Crk I 多克隆抗体购于北京博奥森生物技术有限公司, DAB kit 及 PV-6001 购于北京中衫金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 检测方法 链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶 (SP) 法,抗体浓度 1:130,阴性对照以 PBS 代替一抗。具体步骤:(1)石蜡切片置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱,烤片 60 min;(2)二甲苯 I、II、III 号中分别浸泡 10 min 脱蜡;(3)100%、95%、80% 乙醇中各浸泡 5 min 至水,蒸馏水洗 3 次,各 5 min;(4)3% H_2O_2 去离子水室温孵育 10 min 清除内源性过氧化物的活性,PBS 洗 3 次,各 5 min;(5)抗原修复:切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲液中,高压锅加热

至沸腾,小阀门升起后 3 min,PBS 洗 3 次,各 5 min;(6)山羊血清按 1:10 稀释、封闭、室温孵育 20 min;(7)滴加一抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBS 洗 3 次,各 5 min;(8)孵育二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水箱 20 min,PBS 洗 3 次,各 5 min;(9)DAB 显色,在白色背景下一旦变成棕色立即自来水冲洗终止反应,蒸馏水冲洗 10 min;(10)复染、脱水、透明、封片。

1.2.2 结果判定 Crk I 蛋白主要在细胞质表达,细胞核可见少量表达,因此以细胞质或(和)胞核内出现棕黄色颗粒视为阳性细胞。评分方法:(1)选择 5 个高倍视野(400 \times)计数肿瘤细胞总数和阳性细胞个数,得出阳性细胞百分率, $\leq 5\%$ 计 0 分,6%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分, $> 75\%$ 为 4 分;(2)着色强度为细胞无染色为 0 分,浅棕色为 1 分,棕色为 2 分,深棕色为 3 分;(3)2 项评分相加为综合评分,0~1 分为阴性(-),2~3 分为弱阳性(+),4~5 分为中度阳性(++),6~7 分为强阳性(+++)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 进行统计学分析,计数资料用率(%)表示,差异性分析采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 接头蛋白 Crk I 表达

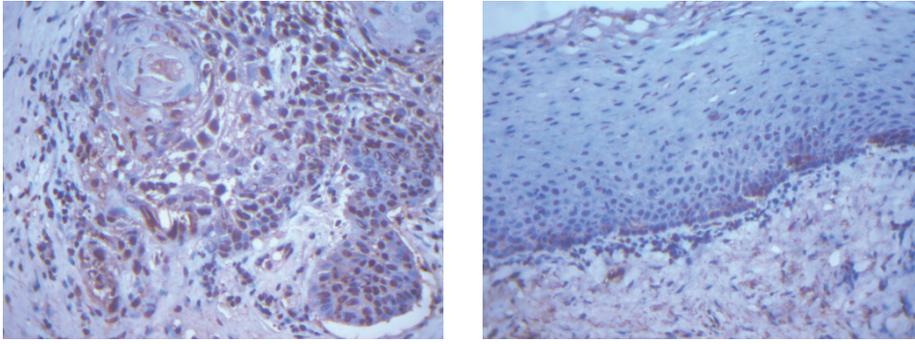
免疫组化结果显示,Crk I 在喉癌组织中主要表达于细胞质,细胞核可见少量表达,阳性率达 64.8%;在癌旁正常组织中少量表达或无表达,与癌组织 Crk I 表达阳性率比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 24.149, P < 0.01$),见图 1 和表 1。

2.2 接头蛋白 Crk I 与喉鳞癌各临床指标

在喉鳞癌组织中,有淋巴结转移患者 Crk I 蛋白阳性表达率为 91.7%,与无淋巴结转移的 54.8% 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);但 Crk I 蛋白的阳性表达率在各年龄组、不同临床分期、不同病理分级及不同预后的喉鳞癌患者中的阳性表达率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

3 讨论

Crk I 是一种重要的细胞内信号接头蛋白,自身并不具有任何酶活性,是通过自身 SH2 和 SH3 结构域连接上下游信号转导分子,使不能直接相互



喉鳞癌组织

癌旁正常组织

图 1 Crk I 在喉癌组织及癌旁正常组织的表达(SP, ×200)

Fig. 1 Expression of Crk I in laryngeal carcinoma tissues and adjacent normal tissues

表 1 Crk I 在喉癌组织和癌旁正常组织中的表达

Tab. 1 Expression of Crk I in laryngeal carcinoma tissues and adjacent normal tissues

标本	n	Crk I 表达阳性(n,%)	χ^2	P
喉鳞癌组织	54	35(64.8)	24.149	<0.01
癌旁正常组织	22	1(4.5)		

表 2 不同临床指标喉鳞癌患者
接头蛋白 Crk I 表达情况

Tab. 2 Expression of Crk I in laryngeal carcinoma patients with different clinical parameters

组别	n	Crk I 表达阳性(n,%)	χ^2	P
年龄				
≥60	26	18(69.2)	0.148	0.70
<60	28	18(64.3)		
临床分期				
I	18	12(66.6)	0.3	0.96
II	12	9(75.0)		
III	9	6(66.6)		
IV	15	10(66.6)		
病理分级				
高分化	40	20(50.0)	1.964	0.38
中分化	11	8(72.7)		
低分化	3	2(66.6)		
淋巴结转移				
有	12	11(91.7)	5.451	0.02
无	42	23(54.8)		
术后 5 年生存率				
≥5 年	42	28(66.7)	0.000	1.00
<5 年	12	8(66.7)		

作用的信号分子以 Crk I 为媒介传递信号^[10]。Crk I 在信号传递过程中不仅承上启下,且对信号强弱还有着调控作用^[11],其通过与不同的蛋白信号分子结合,广泛参与细胞内不同信号途径的信号转导。有越来越多的研究证明,Crk I 通过调节癌细胞的生物学行为,包括增殖、分化和侵袭,参与了实体肿瘤的癌变^[12-14]。它表达的上调参与了一些人类癌症的发生发展,包括卵巢癌^[15]、肺癌^[16]和胃癌^[17]等,它增加肿瘤的扩散和入侵^[18-20]。但是,它在人喉鳞癌中的生物学行为和临床意义未见报道。

为了研究 Crk I 在喉鳞癌中的表达及意义,本研究进行了该实验研究,结果证实 Crk I 在喉鳞癌组织中高表达(阳性率 64.8%),其表达与癌旁正常黏膜组织(阳性率 9.1%)比较有明显差异,且在有无淋巴结转移的分组中差异有统计学意义。在课题组前期的实验中,证实了 Crk II 在喉鳞癌组织中高表达,且在喉鳞癌病人的临床分期、病理分级及淋巴结转移组中与癌旁正常黏膜组织比较,差异有统计学意义。本研究发现,既然 Crk I 与 Crk II 是同一基因被特异性剪切成的不同的片段,那应该具有相同的功能,但在对喉癌生物学行为的作用有所不同,猜想它们之间存在一定的分工与合作,在之后的实验中可以进一步证实。

综上所述,Crk I 蛋白参与了喉鳞癌的发生发展,并在促进喉鳞癌细胞的侵袭、转移中发挥一定作用。基于这一理论基础,可以为喉鳞状细胞癌治疗提供一些新的思路,但具体的作用机制仍有待进一步研究。

4 参考文献

- [1] 卢善婷,魏矿荣,于炳辉,等. 中山市 1970 - 1999 年喉癌发病趋势分析[J]. 现代肿瘤医学, 2004,12(2): 1581.
- [2] CHU E A, KIM Y J. Laryngeal cancer: diagnosis and preoperative work-up[J]. *Otolaryngol Clin North Am*, 2008, 41(4):673 - 695.
- [3] HART I R, FIDLERR I J. Cancer invasion and metastasis[J]. *Q Rev Biol*, 2014,55(1):121 - 142.
- [4] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer Statistics, 2017[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017,67(1):7 - 30.
- [5] CHEN W, ZHENG R, BAADE PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115 - 132.
- [6] CATTARUZZA M S, MAISONNEUVE P, BOYLE P. Epidemiology of laryngeal cancer[J]. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, 1996,32(5):293 - 305.
- [7] MARIONI G, MARCHESE-RAGONA R, CARTEI G, et al. Current opinion in diagnosis and treatment of laryngeal carcinoma[J]. *Cancer Treat Rev*, 2006,32(7):504 - 515.
- [8] MAYER B J, HAMAGUCHI M, HANAFUSA H. A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C[J]. *Nature*, 1988,332(6161):272 - 275.
- [9] MATSUDA M, TANAKA S, NAGATA S, et al. Two species of human CRK cDNA encode proteins with distinct biological activities[J]. *Mol Cell Biol*, 2012,12(8): 3482 - 3489.
- [10] AGRA I M, FERLITO A, TAKES R P, et al. Diagnosis and treatment of recurrent laryngeal cancer following initial nonsurgical therapy[J]. *Head Neck*, 2012,34(5): 727 - 735.
- [11] BIRGE R B, KALODIMOS C, INAGAKI F, et al. Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling[J]. *Cell Commun Signal*, 2009,7(10):1 - 23.
- [12] PEZESHKPOUR G H, MOATAMED F, LEWIS M, et al. CRK SH3N domain diminishes cell invasiveness of non - small cell lung cancer[J]. *Genes Cancer*, 2013, 4(7 - 8):315 - 324.
- [13] KIM Y H, KWEI K A, GIRARD L, et al. Genomic and functional analysis identifies CRKL as an oncogene amplified in lung cancer[J]. *Oncogene*, 2010, 29(10): 1421 - 1430 .
- [14] FATHERS K E, BELLE S, RAJADURAI C V, et al. Crk adaptor proteins act as key signaling integrators for breast tumorigenesis[J]. *Breast Cancer Res*, 2012, 14(3): R74 .
- [15] LIN F, CHENGYAO X, QINGCHANG L, et al. CRKL promotes lung cancer cell invasion through ERK - MMP9 pathway[J]. *Mol Carcinog*, 2015, 54 (Suppl 1): E35 - E44 .
- [16] 沈太敏, 令狐华. 接合物蛋白 Crk 和 CrkL 在上皮性卵巢癌中的表达及意义. *中国全科医学杂志*, 2008, 11(6):940 - 942.
- [17] WANG Y, FU L, WANG E H. Expression and significance of CRKL in human non - small - cell lung cancer[J]. *Prog Anat Sci*, 2013,19(3): 225 - 228.
- [18] WANG J, CHEN X, LI P. CrkL promotes cell proliferation in gastric cancer and is negatively regulated by mir-126[J]. *Chem Biol*, 2013, 206(2):230 - 238.
- [19] WANG Y, DONG Q Z, FU L, et al. Overexpression of CRKL correlates with poor prognosis and cell proliferation in non-small cell lung cancer. *Mol Carcinog*[J], 2013, 52(11): 890 - 899 .
- [20] ZHAO T, MIAO Z, WANG Z, et al. YOU Y and LI J: Overexpression of CRKL correlates with malignant cell proliferation in breast cancer[J]. *Tumour Biol*, 2013,34(5): 2891 - 2897.

(2018-02-08 收稿, 2018-05-02 修回)
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 丁廷森