

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.03.015

· 临床研究 ·

前列腺癌细胞和组织中 Axl 及其配体蛋白的表达与临床意义

黄 钢, 侯建国, 许传亮, 高 旭, 曾 锐, 孙颖浩* (第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433)

[摘要] 目的: 探讨受体酪氨酸激酶 Axl 及其配体 Gas6 蛋白在前列腺癌细胞系和前列腺癌组织中的表达及其与前列腺癌病理特征的关系。方法: 收集自 2007 年-2008 年在第二军医大学长海医院泌尿外科接受手术或病理穿刺的前列腺癌组织标本 45 例和良性前列腺增生组织标本 32 例。Western blotting 分析前列腺癌细胞系 LNCaP、PC-3 及 DU-145 中 Axl 及其配体 Gas6 的表达; 免疫组化方法检测前列腺癌及良性前列腺增生组织中 Axl 及其配体 Gas6 的表达。结果: Western blotting 检测结果显示, 高侵袭性前列腺癌细胞 DU-145 和 PC-3 中 Axl 的表达显著强于低侵袭性细胞 LNCaP, Gas6 的表达在 3 个细胞系中无明显差异。免疫组化结果显示, 前列腺癌组织中 Axl 蛋白强阳性表达显著高于良性前列腺增生组织(68.9% vs 21.9%, $P < 0.01$); 前者 Gas6 蛋白的表达也显著高于后者(53.3% vs 15.6%, $P < 0.01$)。前列腺癌组织中, Axl 和 Gas6 蛋白的强阳性表达与 Gleason 评分及远处转移密切相关($P < 0.05$)。结论: 前列腺癌组织中 Axl 和 Gas6 高表达, 该两者的表达与前列腺癌恶性程度及肿瘤转移密切相关。

[关键词] 前列腺肿瘤; Axl; 生长抑制特异性蛋白 6

[中图分类号] R737.25; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)03-0282-05

Expression of receptor tyrosine kinase Axl and its ligand in prostate cancer and its clinical significance

HUANG Gang, HOU Jian-guo, XU Chuan-liang, GAO Xu, CENG Rui, SUN Ying-hao* (Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To examine the expression of receptor tyrosine kinase (RTK) Axl and its ligand Gas6 (growth arrest-specific gene 6) protein in prostate cancer (PCa) tissues and their relation with pathological characteristics of PCa. **Methods:** Forty-five PCa tissues and 32 benign prostatic hyperplasia tissues (2007 to 2008, Changhai Hospital) were obtained during surgery or kidney puncture. Expression of Axl and Gas6 protein in PCa cell lines LNCaP, PC-3 and DU-145 was analyzed by Western blotting. Expression of Axl and Gas6 protein in PCa tissues or benign prostatic hyperplasia tissues was examined by immunohistochemistry. **Results:** Axl expression was higher in highly invasive DU-145 and PC-3 cells than that in lowly invasive LNCaP cells. Expression of Gas6 in DU-145, PC-3 and LNCaP cells was similar. Expression of Axl and Gas6 protein in PCa tissues was significantly higher than that in benign prostatic hyperplasia tissues as detected by immunohistochemistry (68.9% vs 21.9%; 53.3% vs 15.6%, all $P < 0.01$). Expression of Axl and Gas6 protein in PCa tissues was closely correlated with Gleason scores and metastasis of PCa ($P < 0.05$). **Conclusion:** Expression of Axl and Gas6 in PCa is closely correlated with the malignancy degree and metastasis of PCa.

[Key words] prostatic neoplasm, Axl, growth arrest-specific gene 6

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(3): 282-286]

前列腺癌是一种老年男性高发疾病,在西方国家,前列腺癌是男性第二大恶性肿瘤,仅次于肺癌^[1]。我国前列腺癌发病率也逐年上升,已居泌尿系肿瘤的第3位,并且发病年龄也日趋年轻化^[2]。近年来研究发现,受体酪氨酸激酶家族(receptor tyrosine kinases, RTKs)中的亚族 Axl 及其配体生长抑制特异性蛋白 6(growth arrest-specific 6, Gas6)对基因转录调节起重要作用,并参与对细胞存活、增

殖、黏附、迁移及抗凋亡的调节^[3]。1996年 Robison 等^[4]首先报道前列腺癌组织中有 Axl 的表达。但国

[基金项目] 上海市科学技术委员会基金(No. 06JC14086)。Supported by Shanghai Science and Technology Committee Foundation (No. 06JC14086)

[作者简介] 黄 钢(1981-),男,上海市人,硕士生,主要从事前列腺癌的诊疗与治疗方面的研究。E-mail: Louy_028@qq.com

* 通讯作者(Corresponding author). E-mail: Sunyh@medmail.com.cn

内尚无 Axl 基因研究相关的文献报道。本研究应用 Western blotting 技术检测了前列腺癌细胞系 LNCaP、PC-3、DU-145 中 Axl 及其配体 Gas6 的蛋白表达情况;应用免疫组化技术检测了 45 例前列腺癌和 32 例良性前列腺增生组织中 Axl 及其配体蛋白 Gas6 的表达情况,并结合临床病理资料进行分析,探讨其与前列腺癌发生、发展的关系,以及将其作为前列腺癌转移和预后标志物的可能性。

1 材料与方法

1.1 主要材料

雄激素依赖性前列腺癌 LNCaP 细胞系由德国洪堡大学 Charite 医学院泌尿外科 Jung 教授惠赠,高侵袭性前列腺癌 PC-3 及 DU-145 细胞系由第二军医大学长海医院泌尿外科保存。前列腺组织标本 77 例,收集自 2007 年 2 月至 2008 年 6 月在第二军医大学长海医院泌尿外科接受手术或病理穿刺的患者,其中前列腺癌 45 例(均通过前列腺穿刺活检病理确诊),年龄(73 ± 5.3)岁;良性前列腺增生 32 例,年龄(66 ± 7.6)岁。

免疫组化染色试剂盒购自 Santa Cruz 公司(ABC 法)。山羊抗人 Axl 及其配体 Gas6 多克隆抗体(1:1 000)购自 Rockland 公司。

1.2 Western blotting 检测前列腺细胞系中 Axl、Gas6 的表达情况

取 1×10^6 细胞加 0.5 ml 蛋白裂解液,4 ℃ 高速离心($12\ 000 \times g$, 10 min)取上清,测定蛋白浓度。取总蛋白 20 μg 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳、电转移(100 V, 1 h)、封闭,在 Axl 及 Gas6 多克隆抗体中室温反应 180 min、洗膜,抗山羊 IgG/HRP 中反应 45 min、洗膜,用 SuperSignal ECL 试剂孵育 1 min、X 线胶片感光、显影、定影。

1.3 免疫组化染色检测前列腺良、恶性组织中 Axl、Gas6 的表达

免疫组化染色程序按 Santa Cruz 公司试剂盒(ABC 法)说明书操作,使用山羊抗人 Axl 及其配体 Gas6 多克隆抗体,PBS 代替一抗作阴性对照。Axl 阳性信号为胞膜上棕黄色颗粒,Gas6 阳性信号为胞质内的棕黄色颗粒。阳性判断标准参照文献[3]。染色强度判定标准为:无染色记为 0 分,染色浅(即稍高于背景)记为 1 分,中等染色(明显高于背景)记为 2 分,强染色记为 3 分,极强染色记为 4 分。光镜下分别计数 3×100 个细胞,并计算阳性细胞百分数。阳性细胞数积分: $\leq 10\%$ 记为 0 分,11% ~ 25% 记为 1 分,26% ~ 50% 记为 2 分,51% ~ 75%

记为 3 分, >75% 记为 4 分。然后将两项积分相加,7~8 分为强阳性(卅),4~6 分为阳性(++),2~3 分为弱阳性(+),0~1 分为阴性(-)。

1.4 统计学处理

应用统计软件 SPSS 13.0 进行统计分析,频数资料采用百分构成表示,单因素分析采用卡方检验或者 Fisher 精确概率法,模型筛选采用 Enter 法。

2 结果

2.1 前列腺癌细胞系中 Axl 蛋白的表达情况

Western blotting 检测显示,Axl 蛋白为相对分子质量 140 000 的条带,其在前列腺癌细胞系 LNCaP、PC-3 及 DU-145 中均有表达(图 1),但表达量有差异,高侵袭性细胞 DU-145 和 PC-3 的表达显著高于低侵袭性细胞 LNCaP 的表达。

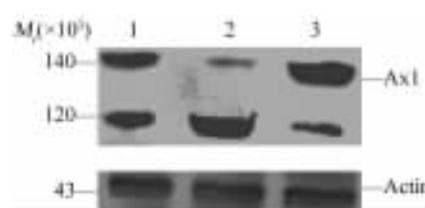


图 1 前列腺癌细胞系中 Axl 蛋白的表达

Fig.1 Expression of Axl protein in different prostate cancer cell lines

1: PC-3; 2: LNCaP; 3: DU-145

2.2 前列腺癌细胞系中 Gas6 蛋白表达情况

Western blotting 检测显示,Gas6 蛋白在前列腺癌细胞系 LNCaP、PC-3 及 DU-145 中均有表达(图 2),表达量差异不明显。

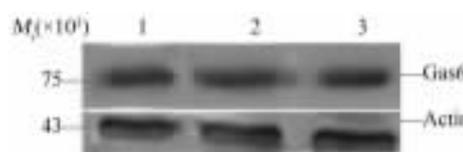


图 2 前列腺癌细胞系中 Gas6 蛋白的表达

Fig.2 Expression of Gas6 protein in different prostate cancer cell lines

1: PC-3; 2: LNCaP; 3: DU-145

2.3 前列腺良、恶性组织中 Axl 蛋白的表达

免疫组化检测结果显示,Axl 阳性信号为胞膜上棕黄色颗粒,32 例良性前列腺增生组织中 Axl 蛋白强阳性表达率为 21.9% (7/32),45 例前列腺癌组织中 Axl 蛋白强阳性表达率为 68.9% (31/45),后者表达率明显高于前者,差异有统计学意义($\chi^2 =$

16.537, $P < 0.01$; 图3, 表1)。

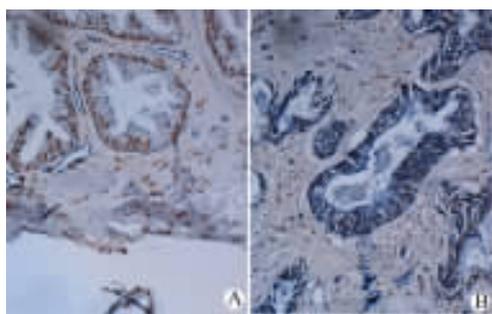


图3 免疫组化检测 Axl 蛋白在良性前列腺增生(A)和前列腺癌组织(B)中的表达(×400)

Fig. 3 Expression of Axl protein in benign prostatic hyperplasia (A) and prostate cancer tissues (B) as detected by immunohistochemistry (×400)

2.4 前列腺良、恶性组织中 Gas6 蛋白的表达

免疫组化检测显示, Gas6 阳性信号为胞质内的棕黄色颗粒, 32 例良性前列腺增生组织中 Gas6 蛋白强阳性表达率为 15.6% (5/32), 45 例前列腺癌组织中 Gas6 蛋白强阳性表达率为 53.3% (24/45), 后者表达率明显高于前者, 且差异有统计学意义 ($\chi^2 = 11.326, P < 0.01$; 图4, 表2)。

2.5 前列腺癌组织中 Axl 和 Gas6 蛋白的表达与临床病理特征的关系

前列腺癌组织中 Axl 蛋白的表达与年龄不相关, 与 Gleason 评分、PSA 及肿瘤转移呈正相关; Gas6 蛋白的表达与年龄及 PSA 不相关, 与 Gleason 评分及肿瘤转移呈正相关(表3)。

表1 Axl 蛋白在良性前列腺增生与前列腺癌组织中表达的比较

Tab.1 Comparison of Axl expression in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer tissues

Group	Staining intensity					Staining area					Positive expression				Strongly positive rate(%)
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	-	+	++	+++	
Benign(32)	2	4	9	8	9	1	8	6	9	8	2	9	14	7	21.9
Malignant(45)	0	0	4	8	33	0	0	9	17	19	0	4	10	31	68.9*

* $P < 0.01$ vs benign group

表2 Gas6 蛋白在良性前列腺增生与前列腺癌组织中表达的比较

Tab.2 Comparison of Gas6 expression in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer tissues

Group	Staining intensity					Staining area					Positive expression				Strongly positive rate(%)
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	-	+	++	+++	
Benign(32)	2	5	2	7	6	2	9	9	8	4	3	7	17	5	15.6
Malignant(45)	0	1	6	18	20	0	5	8	15	17	0	3	18	24	53.3*

* $P < 0.01$ vs benign group

2.6 前列腺癌组织中 Axl 与 Gas6 表达的相关性

前列腺癌组织中 Axl 和 Gas6 的 Pearson 相关性分析提示两者存在正相关表达 ($r = 0.622, P = 0.046$); Axl 和 Gas6 之间卡方检验结果提示两者之间存在显著统计学关联 ($\chi^2 = 17.421, P = 0.000$)。

3 讨论

Axl 属于跨膜受体酪氨酸激酶家族 (receptor tyrosine kinases) 的 Axl 亚族, 于 1991 年被发现并成功克隆, 被证实是一个相对分子质量约 140 000 的

跨膜分子。由于其结构上的特殊性——具备 NCAM 和酪氨酸激酶的双重特征, 推测其可能与调节信号转导与细胞间相互作用相关, 引起了人们广泛的关注^[6]。Pier 等^[7]证实在前列腺癌细胞系 DU-145 和 PC-3 中有 Axl 受体表达, 并且在其重组配体 Gas6 的刺激下影响癌细胞的增殖。作为 Axl 的配体, Gas6 是一个相对分子质量为 75 000 的依赖维生素 K 的分泌蛋白, 由生长抑制特异性基因表达。其氨基末端区域包括多个转录后修饰的羧基谷氨酸 (Gla)^[8], 羧基末端包括球形的性激素结合球蛋白

(SHBG)样区域^[9]。在氨基末端 Gla 的辅助下, Gas6 羧基末端的 SHBG 直接与 Axl 结合并导致受体的二聚化及自身磷酸化,引起激酶功能区域酪氨酸残基的活化,从而继发一系列的信号转导过

程^[10-11]。另有文献^[12]报道,跨膜受体 Axl 的细胞外 NCAM 样结构促进细胞黏连,细胞内酪氨酸激酶功能区有致癌潜能,它们各自发挥作用,并不相互依赖。

表 3 前列腺癌组织中 Axl 和 Gas6 蛋白表达与临床病理指标的关系

Tab. 3 Relationship between Axl expression and clinical pathological characteristics of prostate cancer

Index	Axl expression				Gas6 expression			
	n	(%)	χ^2	P	n	(%)	χ^2	P
Age								
≤70	12	60.0	1.327	0.249	10	50.0	0.161	0.688
>70	19	76.0			14	56.0		
Gleason score								
<7	4	44.4	6.377	0.041	3	33.3	15.313	0.000
=7	11	61.1			5	27.8		
>7	16	88.9			16	88.9		
PSA								
<10	2	6.5	8.83	0.012	2	25.0	4.372	0.112
10~50	9	81.8			5	45.5		
>50	20	76.9			17	65.4		
Metastasis								
-	3	17.6	-	0.000	2	11.8	18.968	0.000
+	28	100.0			22	78.6		

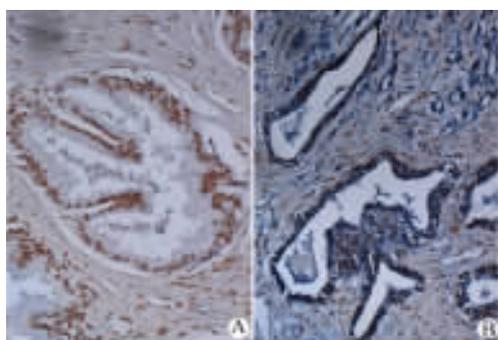


图 4 免疫组化检测 Gas6 蛋白在良性前列腺增生(A) 和前列腺癌(B)组织中的表达(×400)

Fig. 4 Expression of Gas6 protein in benign prostatic hyperplasia (A) and prostate cancer tissues (B) as detected by immunohistochemistry (× 400)

本实验 3 个前列腺癌细胞系中,DU-145 无论是在体内还是在体外其侵袭性都高于 PC-3,而 LNCaP

作为雄激素依赖的前列腺癌细胞,其侵袭性相对最低^[13-14]。实验结果显示,高侵袭性细胞 DU-145 和 PC-3 的 Axl 表达十分显著地高于低侵袭性细胞 LN-CaP 的表达,说明前列腺癌细胞的恶性程度与 Axl 蛋白的表达密切相关。而且, Axl 的过表达被认为是促进细胞增殖的分子事件,特别是在一些不适宜细胞生长的环境中,比如转移组织^[5]。来源于转移性前列腺癌的 DU-145 及 PC-3 细胞系中 Axl 的高表达正好佐证了以上观点。同时,3 个前列腺癌细胞系中均有相对分子量 120 000 的蛋白表达,此结果在以往的文献中未曾报道。分析其可能是非磷酸化无功能的 Axl 蛋白,有待进一步的实验证实。Gas6 在前列腺癌各细胞系中表达量差异不显著,考虑为体外环境下作为分泌蛋白的 Gas6 表达量相对较低。有研究^[7]发现, Gas6/Axl 可保护缺乏血浆的 NIH3T3 细胞免于凋亡。但这种保护作用需要 NIH3T3 细胞表达的内源性 Axl 参与,不表达 Axl 的细胞,即使予以 Gas6,仍然表现凋亡。Axl 高表达时

Gas6 具有分裂原活性, 一般情况下, Gas6 使细胞存活, 抑制凋亡。

绝大多数前列腺癌来自前列腺腺泡, 为腺泡分泌上皮性肿瘤, 并且 70% 前列腺癌位于前列腺外周带。本研究显示, 前列腺癌组织中 Axl 及其配体 Gas6 强阳性表达率均显著高于良性前列腺增生组织, 提示其高表达与前列腺癌关系密切。进一步将其与前列腺癌各临床病理特征结合, 发现在低分化前列腺癌及肿瘤转移病例中 Axl 和 Gas6 表达最强且其表达量与 Gleason 评分及转移呈正相关。提示 Axl 和 Gas6 的高表达与肿瘤恶性程度及肿瘤转移密切相关。Axl 作为调节多种内皮细胞行为(增殖、迁徙、存活和形成血管)的关键因子, 是肿瘤新生血管生成和肿瘤生长所必需的^[15]。由于 Axl 的细胞外区域具有促细胞间及细胞与基质间相互黏附的特性, 使肿瘤细胞在血循环中得以存活并转移到新的器官^[16]。在 Gas6/Axl 的共同作用下促使肿瘤细胞在不适宜其增殖的环境中存活^[16-17]。鉴于 Axl 和 Gas6 的蛋白表达同肿瘤恶性程度及转移的高度相关性, 可以考虑将两者结合用作前列腺癌转移及预后的预测指标。同时, 应用靶向治疗抑制有利于肿瘤发生和肿瘤血管形成的受体酪氨酸激酶, 此方法可能成为极富前景的治疗途径^[18-19]。

[参 考 文 献]

- [1] Koo JY, Kim HJ, Jung KO, *et al.* Curcumin inhibits the growth of AGS human gastric carcinoma cells *in vitro* and shows synergism with 5-fluorouracil [J]. *J Med Food*, 2004, 7(2): 117-121.
- [2] Aggawal S, Takada Y, Singh S, *et al.* Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor- κ B signaling [J]. *Int J Cancer*, 2004, 111(5): 679-692.
- [3] Yi-Mi W, Dan RR, Hsing-Jien K. Signal pathways in up-regulation of chemokines by tyrosine kinase MER/NYK in prostate cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(10): 7311-7320.
- [4] Robison D, He F, Pretlow T, *et al.* A tyrosine kinase profile of prostate carcinoma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(1): 5958-5962.
- [5] Mattern J, Koomagi R, Volm M. Biological characterization of subgroups of squamous cell lung carcinoma [J]. *Clin cancer Res*, 1999, 5(6): 1459-1463.
- [6] Rescigno J, Mansukhani A, Basilico C. A putative receptor tyrosine kinase with unique structural topology [J]. *Oncogene*, 1991, 6(10): 1909-1913.
- [7] Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, *et al.* Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor [J]. *J Cell Physiol*, 2005, 204(1): 36-44.
- [8] Mann KG, Lawson JH. The role of the membrane in the expression of the vitamin K-dependent enzymes [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 1992, 116(12): 1330-1336.
- [9] Tisi D, Talts JF, Timpl R, *et al.* Structure of the C-terminal laminin G-like domain pair of the laminin alpha2 chain harbouring binding sites for alpha-dystroglycan and heparin [J]. *EMBO J*, 2000, 19(7): 1432-1440.
- [10] Braungar J, Schleithnf L, Schulz AS, *et al.* Intracellular signaling of the Ufo/Axl receptor tyrosine kinase is mediated mainly by a multi-substrate docking-site [J]. *Oncogene*, 1997, 14(22): 2619-2631.
- [11] Sasaki T, Knyazev PG, Clout NJ, *et al.* Structural basis for Gas6-Axl signalling [J]. *Embo J*, 2006, 25(1): 80-87.
- [12] Hatizi S, Dahlbäck B. Signalling and functional diversity within the Axl subfamily of receptor tyrosine kinases [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006, 17(4): 295-304.
- [13] Webber MM, Quader ST, Kleinman HK, *et al.* Human cell lines as an *in vitro/in vivo* model for prostate carcinogenesis and progression [J]. *Prostate*, 2001, 47(1): 1-13.
- [14] Van BA, Varella GM, Korch C, *et al.* Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines [J]. *Prostate*, 2003, 57(3): 205-225.
- [15] Sacha JH, Mark JP, Christian F, *et al.* Multiple roles for the receptor tyrosine kinase Axl in tumor formation [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(20): 9294-9303.
- [16] Markus H, Pjotr K, Ariane A, *et al.* Axl and growth arrest-specific gene 6 are frequently overexpressed in human gliomas and predict poor prognosis in patients with glioblastoma multiforme [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(1): 130-138.
- [17] Hafizi S, Dahlbäck B. Gas6 and protein S vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily [J]. *FEBS J*, 2006, 273(23): 5231-5244.
- [18] Jong DL, Chih CH, Jhy SH, *et al.* Sulfasalazine suppresses drug resistance and invasiveness of lung adenocarcinoma cells expressing AXIL [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(8): 3878-3887.
- [19] Yi-Xiang Z, Peter GK, Yuri V *et al.* Axl is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(7): 1905-1915.

[收稿日期] 2009-03-30

[修回日期] 2009-04-28

[本文编辑] 韩丹