●论　著

大肠癌组织中 FAT4 和 YAP 的表达及其与临床病理特征和预后的关系

吴丽娜　朱峰　徐铖　叶恩如

【摘要】 **目的**　探讨脂肪非典型钙黏蛋白 4(FAT4)和 Yes 相关蛋白(YAP)在大肠癌组织中的表达及其与临床病理特征和预后的关系。**方法**　采用免疫组化 En Vision 法检测 80 例大肠癌组织及对应癌旁正常组织中 FAT4 和 YAP 的表达情况,并分析大肠癌组织中 FAT4 和 YAP 表达的相关性及其与临床病理特征和预后的关系。**结果**　大肠癌组织中 FAT4 阳性表达率为 32.50%,明显低于癌旁正常组织的 66.25%,差异有统计学意义(P<0.01)。大肠癌组织中 YAP 阳性表达率为 61.25%,明显高于癌旁正常组织的 13.75%,差异有统计学意义(P<0.01)。FAT4 阳性表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期均有关(均 P<0.01),YAP 阳性表达与肿瘤浸润深度和淋巴结转移均有关(均 P<0.01)。大肠癌组织中 FAT4 的表达和 YAP 的表达呈负相关(r=-0.434,P<0.01)。FAT4 表达阳性者 3 年生存率为 84.62%,明显高于 FAT4 表达阴性者的 48.15%,差异有统计学意义(P<0.01);YAP 表达阳性者 3 年生存率为 44.89%,明显低于 YAP 表达阴性者的 83.87%,差异有统计学意义(P<0.01)。**结论**　大肠癌组织中 FAT4 表达降低,而 YAP 表达升高,两者异常表达可能与大肠癌的发生、发展及预后密切相关。

【关键词】 大肠癌　脂肪非典型钙黏蛋白 4　Yes 相关蛋白　预后

Expression of FAT4 and YAP in colorectal cancer and their relationship with clinicopathological features and prognosis of patients

WU Lina, ZHU Feng, XU Cheng, et al. Department of Pathology, Taizhou Hospital, Taizhou 318000, China

【Abstract】 **Objective**　To investigate the expression of fat atypical cadherin 4 (FAT4) and Yes-related protein (YAP) in colorectal cancer and their relationship with clinicopathological features and prognosis of patients. **Methods**　The expression of FAT4 and YAP was detected by immunohistochemistry in 80 specimens of colorectal cancer and corresponding normal colorectal tissues. The correlation of FAT4 and YAP expression with clinicopathological features and prognosis of patients was analyzed. **Results**　The positive expression rate of FAT4 in colorectal cancer was significantly lower than that in normal tissues adjacent to the cancer (32.50% vs 66.25%, P<0.01). The positive expression rate of YAP in colorectal cancer tissues was significantly higher than that in normal tissues (61.25% vs 13.75%, P<0.01). The expression of FAT4 was correlated with clinical stage, depth of invasion and lymph node metastasis(all P<0.01). The expression of YAP was correlated with the depth of invasion and lymph node metastasis(both P<0.01). The expression of FAT4 in colorectal cancer tissues was negatively correlated with and the expression of YAP (r=-0.434, P<0.05). The 3-year survival rate in patients with positive expression of FAT4 was 84.62%, which was higher than that in patients with negative expression of FAT4(48.15%)(P<0.05). The 3-year survival rate in patients with positive expression of YAP was 44.89%, which was lower than that in patients with negative expression of YAP(83.87%)(P<0.05). **Conclusion**　The expression of FAT4 in colorectal cancer tissues is decreased, while the expression of YAP is increased. The abnormal expression of both proteins may be closely related to the occurrence, development and prognosis of colorectal cancer.

【Key words】 Colorectal cancer　FAT4　YAP　Prognosis

大肠癌是世界范围内最常见的癌症类型之一,中国每年有 200 万新诊断病例。近年来,虽然在卫生保健和筛查手段方面有所改进,但是大肠癌相关死亡的新病例数量却在逐年增加[1-2]。大肠癌的高发病率和高死亡率提示,研究其发病机制对于改善大肠癌治疗现状具有重要的临床意义。脂肪非典型钙黏蛋白 4(fat atypical cadherin,FAT4)属于钙黏蛋白超家族成员之一,作为跨膜

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.9.2018-3173

作者单位:318000　浙江省台州医院病理科(吴丽娜、徐铖、叶恩如),神经内科(朱峰)

通信作者:吴丽娜,E-mail:757935416@qq.com

浙江医学杂志社官方网站网址:www.zjyxzz.com

蛋白受体可以将上游 Hippo 信号通路的细胞外信号传导至细胞内。研究证实 FAT4 对恶性肿瘤有抑制作用，FAT4 基因失活可能与启动子的甲基化有关[3]，外周血白细胞 FAT4 异常甲基化和基因-环境相互作用与胃癌的风险相关[4]。Yes 相关蛋白（Yes-associated protein，YAP）是 Hippo 信号通路的关键组成部分，在人体生长、发育、修复和体内平衡中起重要作用[5-6]。越来越多的证据表明 YAP 在胃癌[7]、乳腺癌[8]等多种恶性肿瘤中高表达，并与肿瘤的进展有关。本研究采用免疫组化 En Vision 法检测 FAT4 和 YAP 在大肠癌组织和癌旁正常组织中的表达情况，分析大肠癌组织中 FAT4 和 YAP 的表达及其与临床病理特征和预后的关系，旨在探讨 FAT4 和 YAP 的表达是否参与大肠癌的发生、发展过程及对预后的影响。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2012 年 1 月至 2014 年 12 月在本院行手术切除的大肠癌标本 80 例，术后均经病理明确诊断，术前均未接受放疗、化疗及生物治疗。80 例患者中男 45 例，女 35 例；年龄 31~79（61.46±10.25）岁；肿瘤直径≥5.0cm 31 例，<5.0cm 49 例；组织学分级：高中分化 55 例，低分化 25 例；浸润深度：未侵及浆膜 30 例，侵及浆膜 50 例；淋巴结转移 36 例，无转移 44 例；参照 2010 年国际抗癌联盟/美国癌症联合委员会修订的 TNM 分期：Ⅰ~Ⅱ期 32 例，Ⅲ~Ⅳ期 48 例。同时以癌旁（距肿瘤原发灶>5cm）组织作对照，病理检查证实均为正常大肠组织。

1.2 主要试剂 兔抗人 FAT4 多克隆抗体购自美国 Novus Biologicals 公司，鼠抗人 YAP 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司，En Vision 通用试剂盒和 DAB 显色剂均购自丹麦 Dako 公司。

1.3 检测方法 大肠癌组织和癌旁正常组织标本离体后立即用 10%中性甲醛溶液固定，常规脱水、石蜡包埋。采用免疫组化 En Vision 法进行染色，严格按照说明书要求进行操作。高压锅及柠檬酸修复液（pH 6.0）抗原修复，正常山羊血清封闭 30min，一抗 4℃过夜，二抗孵育 30min，DAB 显色，苏木素复染，中性树胶封片，显微镜下观察。用已知阳性片作阳性对照，以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定 FAT4 和 YAP 染色阳性信号为出现黄色或棕褐色颗粒，FAT4 定位于细胞质或细胞核，YAP 定位于细胞核。选取 5 个以上高倍视野（×400），观察并记录每张切片的染色强度和面积，通过半定量积分法进行判定。染色强度：无显色为 0 分，淡黄色为 1 分，棕黄色为 2 分，棕褐色为 3 分。阳性细胞数百分比：阳性细胞数百分比≤5%为 0 分，6%~10%为 1 分，11%~50%为 2 分，>50%为 3 分。细胞染色强度与阳性细胞百分比计分的乘积为每例的最终积分。<2 分为阴性，≥2 分为阳性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示；计数资料组间比较采用 χ^2 检验。采用 Spearman 等级相关分析 FAT4 和 YAP 表达的相关性。采用 Kaplan-Menier 法计算生存率，以 log-rank 法比较组间生存率的差异。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大肠癌组织和癌旁正常组织中 FAT4 和 YAP 的表达 FAT4 阳性表现为细胞质或细胞核出现黄色或棕褐色颗粒，YAP 阳性表现为细胞核内出现黄色或棕褐色颗粒，见图 1。大肠癌组织中 FAT4 阳性表达率为 32.50%（26/80），明显低于癌旁正常组织的 66.25%（53/80），差异有统计学意义（χ^2=18.227，P<0.01）。大肠癌组织中 YAP 阳性表达率为 61.25%（49/80），明显高于癌旁正常组织的 13.75%（11/80），差异有统计学意义（χ^2=38.506，P<0.01）。

2.2 大肠癌组织中 FAT4 和 YAP 表达与临床病理特征

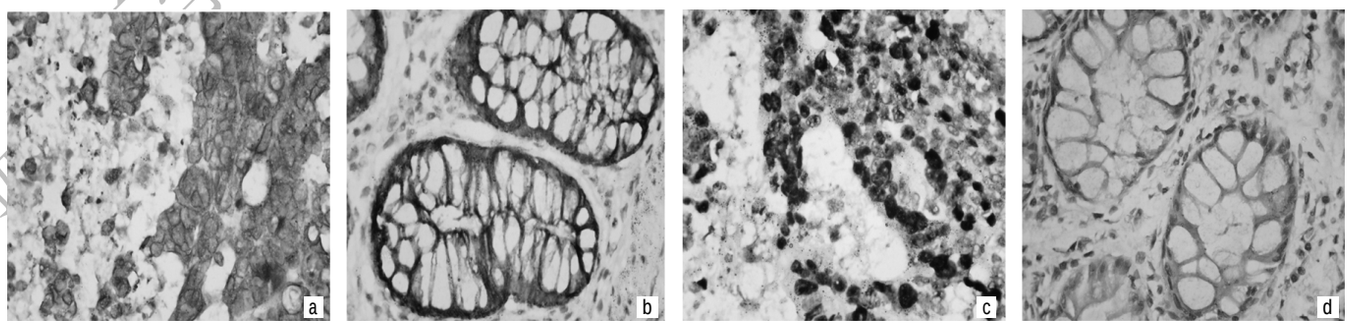

图 1 大肠癌组织和癌旁正常组织中 FAT4 和 YAP 的表达（a：FAT4 在大肠癌组织中阳性表达；b：FAT4 在癌旁正常组织中阳性表达；c：YAP 在大肠癌组织中阳性表达；d：YAP 在癌旁正常组织中阴性表达；En Vision 染色，×400）

浙江医学杂志官方网站网址：www.zjyxzz.com

的关系　FAT4 阳性表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期均有关(均 P<0.01),而与患者性别、年龄、肿瘤直径和分化程度均无关(均 P>0.05)。YAP 阳性表达与肿瘤浸润深度和淋巴结转移均有关(均 P<0.01),而与患者性别、年龄、肿瘤直径、分化程度和 TNM 分期均无关(均 P>0.05),见表 1。

表 1　大肠癌组织中 FAT4 和 YAP 表达与临床病理特征的关系

临床病理特征	n	FAT4 阳性[n(%)]	χ^2 值	P 值	YAP 阳性[n(%)]	χ^2 值	P 值
性别							
男	45	13(28.89)	0.611	0.434	29(64.44)	0.442	0.506
女	35	13(37.14)			20(57.14)		
年龄							
≥60 岁	47	14(29.79)	0.382	0.536	30(63.83)	0.319	0.572
<60 岁	33	12(36.36)			19(57.58)		
肿瘤直径							
≥5.0cm	31	9(29.03)	0.277	0.598	21(67.74)	0.899	0.343
<5.0cm	49	17(34.69)			28(57.14)		
分化程度							
高中分化	55	20(36.36)	1.198	0.274	31(56.36)	1.771	0.183
低分化	25	6(24.00)			18(72.00)		
浸润深度							
未侵及浆膜	30	16(53.33)	9.497	0.002	12(40.00)	9.132	0.002
侵及浆膜	50	10(20.00)			37(74.00)		
淋巴结转移							
有	36	5(13.89)	10.334	0.001	29(80.56)	10.278	0.001
无	44	21(47.73)			20(45.45)		
TNM 分期							
Ⅰ~Ⅱ期	32	18(56.25)	13.713	0.000	17(53.13)	1.483	0.223
Ⅲ~Ⅳ期	48	8(16.67)			32(66.67)		

2.3　大肠癌组织中 FAT4 和 YAP 表达的相关性　经 Spearman 等级相关分析,大肠癌组织中 FAT4 的表达和 YAP 的表达呈负相关(r=-0.434,P<0.01),见表 2。

表 2　80 例大肠癌组织中 FAT4 和 YAP 表达的相关性(例)

FAT4	YAP	
	阳性表达	阴性表达
阳性表达	8	18
阴性表达	41	13

2.4　大肠癌组织中 FAT4 和 YAP 的表达与患者预后的关系　80 例大肠癌患者均采用电话随访 3 年，存活 48 例，死亡 32 例。FAT4 表达阳性者 3 年生存率为 84.62%,明显高于 FAT4 表达阴性者的 48.15%,差异有统计学意义(χ^2=9.720,P<0.01);YAP 表达阳性者 3 年生存率为 44.89%，明显低于 YAP 表达阴性者的 83.87%,差异有统计学意义(χ^2=12.020,P<0.01)。

3　讨论

许多发育基因参与细胞增殖和细胞凋亡的调控失衡。FAT 基因家族是钙黏蛋白超家族的成员,在果蝇发育过程中调控细胞增殖和细胞极性[9]。FAT 家族包含 FAT1、FAT2、FAT3 和 FAT4 4 个成员。FAT4 基因编码超过 5 000 个氨基酸的巨大跨膜蛋白。该基因是 Hippo 信号通路的成员，在调节器官大小方面具有重要作用。该信号通路的下游部分可以诱导转录共激活因子[YAP/具有 PDZ 结合基序(TAZ)]调节细胞增殖,逃避细胞凋亡。此外,FAT4 在多种肿瘤中低表达,是肿瘤的抑制基因[10-12]。与正常对照组织比较,胃腺癌组织中 FAT4 表达减少。FAT4 表达下调与肿瘤分级有关,晚期分级中有较高的抑制作用。FAT4 表达降低及其启动子甲基化增加可能是将正常的胃组织转变为肿瘤组织的有效过程之一[13]。本研究显示,大肠癌组织中 FAT4 阳性表达率明显低于癌旁正常组织，且 FAT4 阳性表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期均有关。生存分析显示,FAT4 表达阳性者 3 年生存率明显高于 FAT4 表达阴性者,提示 FAT4 表达阴性者预后差。表明 FAT4 蛋白表达下降可能在大肠癌的发生、浸润及转移过程中起作用,进一步提示 FAT4 是大肠癌的抑制基因,与上述研究结果类似。

YAP 是 Hippo 信号通路的核心效应因子，在调控细胞增殖和凋亡及组织器官大小方面起着重要作用。YAP 进入细胞核后作为转录共激活因子与 TEA 域家族成员 1(TEAD1)结合,诱导靶基因表达,进而在调节细胞增殖和凋亡、上皮间质转化及癌变过程中起作用[14]。Wang 等[15]发现在肝细胞癌(HCC)组织中,YAP 表达明显增加,并且其过表达与肿瘤分化程度相关。通过小干扰 RNA 沉默 YAP 导致 HCC 细胞生长的抑制，这与促进细胞凋亡有关。YAP 的沉默还降低了 HCC 细胞的侵袭潜力,增加了 HCC 细胞对顺铂的化学敏感性。总之,这些结果表明 YAP 在 HCC 中过表达，并促进 HCC 细胞的增殖、侵袭和耐药性。本研究显示,大肠癌组织中 YAP 阳性表达率明显高于癌旁正常组织，且 YAP 阳性表达与肿瘤浸润深度和淋巴结转移均有关。生存分析显示,YAP 表达阳性者 3 年生存率明显低于 YAP 表达阴性者,提示 YAP 表达阳性者预后差。

在胃癌细胞中采用短发夹状 RNA 沉默 FAT4,发现 FAT4 抑制导致 YAP 的磷酸化和 YAP 核积聚增加,这与促进细胞增殖、迁移和细胞周期进展相关。进一步将

浙江医学杂志社官方网站网址 www.zjyxzz.com

全长 FAT4 转染到 FAT4 沉默细胞中，发现 YAP 磷酸化的减少和细胞周期进程的抑制[16]。表明胃癌组织 FAT4 表达下降，可以抑制 YAP 的磷酸化和促进 YAP 进入细胞核，导致 YAP 在细胞核中表达上调，进而参与胃癌的侵袭、转移。FAT4 和 YAP 在大肠癌的相互作用如何，目前还不清楚。本研究发现大肠癌组织中 FAT4 的表达和 YAP 的表达呈负相关，提示 FAT4 和 YAP 是一对拮抗因素，FAT4 可能通过上调 YAP 的表达，参与大肠癌的发生、发展，这与上述胃癌中的研究结果一致。

综上所述，大肠癌组织中 FAT4 表达降低，而 YAP 表达升高，其异常表达均与大肠癌的浸润、转移有关。FAT4 的表达和 YAP 的表达呈负相关，FAT4 表达阳性者较阴性者预后好，而 YAP 表达阳性者较阴性者预后差，两者异常表达可能与大肠癌的发生、发展及预后密切相关。FAT4 和 YAP 在大肠癌发生、发展过程中如何调控及调控的具体机制如何需要从细胞培养及体外实验进一步阐明。

4 参考文献

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin,2018,68(1):7-30. DOI: 10.3322/caac.21442.

[2] Gao G, Bian Y, Qian H, et al. Gambogic acid regulates the migration and invasion of colorectal cancer via microRNA-21-mediated activation of phosphatase and tensin homolog[J]. Exp Ther Med, 2018, 16(3):1758-1765.DOI: 10.3892/etm.2018.6421.

[3] Yoshida S, Yamashita S, Niwa T, et al. Epigenetic inactivation of FAT4 contributes to gastric field cancerization[J]. Gastric Cancer, 2017, 20(1):136-145. DOI: 10.1007/s10120-016-0593-5.

[4] Sun H, Zhou H, Zhang Y, et al. Aberrant methylation of FAT4 and SOX11 in peripheral blood leukocytes and their association with gastric cancer risk[J]. J Cancer, 2018, 9(13):2275-2283. DOI: 10.7150/jca.24797.

[5] Cai WF, Wang L, Liu GS, et al. Manipulating the Hippo-Yap signal cascade in stem cells for heart regeneration[J]. Ann Palliat Med, 2016,5(2):125-134. DOI: 10.21037/apm.

[6] Xiao Y, Leach J, Wang J, et al. Hippo/Yap Signaling in Cardiac Development and Regeneration[J]. Curr Treat Options Cardiovasc Med, 2016, 18(6):38. DOI: 10.1007/s11936-016-0461-y.

[7] Zhang J, Wang G, Chu SJ, et al. Loss of large tumor suppressor 1 promotes growth and metastasis of gastric cancer cells through upregulation of the YAP signaling[J]. Oncotarget, 2016, 7(13): 16180-16193. DOI: 10.18632/oncotarget.7568.

[8] Zhang Y, Shen H, Withers HG, et al. VGLL4 Selectively Represses YAP-Dependent Gene Induction and Tumorigenic Phenotypes in Breast Cancer[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):6190. DOI: 10.1038/s41598-017-06227-7.

[9] Sadeqzadeh E, de Bock CE, Thorne RF. Sleeping giants: emerging roles for the fat cadherins in health and disease[J]. Med Res Rev, 2014, 34(1):190-221. DOI: 10.1002/med.21286.

[10] Cai J, Feng D, Hu L, et al. FAT4 functions as a tumour suppressor in gastric cancer by modulating Wnt/beta-catenin signaling[J]. Br J Cancer, 2015, 113 (12):1720-1729. DOI: 10.1038/bjc.2015.367.

[11] Ito T, Taniguchi H, Fukagai K, et al. Inhibitory mechanism of FAT4 gene expression in response to actin dynamic during Src-induced carcinogenesis[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0118336. DOI: 10.1371/journal.pone.0118336.

[12] Jung HY, Cho H, Oh MH, et al. Loss of FAT Atypical Cadherin 4Expression Is Associated with High Pathologic T Stage in Radically Resected Gastric Cancer[J]. J Gastric Cancer, 2015, 15(1): 39-45. DOI: 10.5230/jgc.2015.15.1.39.

[13] Pilehchian Langroudi M, Nikbakhsh N, Samadani AA, et al. FAT4 hypermethylation and grade dependent downregulation in gastric adenocarcinoma[J]. J Cell Commun Signal, 2017, 11(1):69-75. DOI: 10.1007/s12079-016-0355-5.

[14] Serrano I, Mcdonald PC, LOCK F, et al. Inactivation of the Hippo tumour suppressor pathway by integrin-linked kinase[J]. Nat Commun,2013,4:2976. DOI: 10.1038/ncomms3976.

[15] Wang X, Wu B, Zhong Z. Downregulation of YAP inhibits proliferation, invasion and increases cisplatin sensitivity in human hepatocellular carcinoma cells[J]. Oncol Lett, 2018,16(1):585-593. DOI: 10.3892/ol.2018.8633.

[16] Ma L, Cui J, Xi H, et al. Fat4 suppression induces Yap translocation accounting for the promoted proliferation and migration of gastric cancer cells[J].Cancer Biol Ther, 2016,17(1):36-47. DOI: 10.1080/15384047.

（收稿日期：2018-12-19）

（本文编辑：陈丽）

《浙江医学》对计量单位的要求

本刊执行 GB 3100～3102-1993《量和单位》中有关量、单位和符号的规定及其书写规则，具体执行可参照中华医学会杂志社编写的《法定计量单位在医学上的应用》。注意单位名称与单位符号不可混用。组合单位符号中表示相除的斜线多于 1 条时应采用负数幂的形式表示，组合单位中斜线和负数幂亦不可混用，如 ng/kg/min 应采用 $ng \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ 的形式，不宜采用 $ng/kg^{-1} \cdot min^{-1}$ 的形式。在叙述中应先列出法定计量单位数值，括号内写旧制单位数值；如果同一计量单位反复出现，可在首次出现时注出法定与旧制单位换算系数，然后只列法定计量单位数值。血压仍以 mmHg 表示。

本刊编辑部

浙江医学杂志社官方网站网址：www.zjyxzzs.com