

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.05.017

食管鳞状细胞癌中 ERK 的表达及其临床意义

Expression and clinical significance of ERK in esophageal squamous cell carcinoma

赵萌,刘月平,刘世正,王小玲(河北医科大学第四医院 病理科,河北 石家庄 050000)

[摘要] 目的:研究食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)及癌旁黏膜组织中的细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)mRNA 的表达,探讨 ERK 在 ESCC 发生、发展中的作用及其意义。方法:收集河北医科大学第四医院胸外科 40 例 ESCC 患者癌组织标本及 25 例患者的癌旁组织标本,RT-PCR 检测 ESCC 与癌旁组织中 ERK mRNA 的表达情况,分析其与 ESCC 临床病理特征的关系。结果:ESCC 组织中 ERK mRNA 的表达明显增高,而在癌旁组织中呈现低表达(0.656 ± 0.055 vs 0.450 ± 0.070 , $P < 0.01$)。ESCC 组织中 ERK mRNA 的表达与 ESCC 患者的年龄、性别和组织分化程度无关($P > 0.05$),而与临床分期、淋巴结转移显著相关($P < 0.05$)。结论:ESCC 组织高表达 ERK mRNA, ERK 可能在 ESCC 发生、发展中起重要的作用。

[关键词] 食管鳞状细胞癌;ERK;RT-PCR

[中图分类号] R735.1; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)05-0552-03

食管癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,1999 年 WHO 资料中显示,中国的食管癌患者占全球的 46.6%,其中 90% 的食管癌为食管鳞状细胞(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC),5%~10% 为腺癌。细胞外信号调节激酶(extracellular regulated kinase, ERK)为丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号转导通路家族成员之一,是一种保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可被多种丝裂原信号和癌基因产物激活,转导信号至细胞核内,通过磷酸化活化转录因子而调控特定基因的表达,诱导细胞增殖、分化等多种生理活动,并参与细胞的恶性转化^[1]。近年的研究^[2]表明,ERK 在乳腺癌、胃癌等恶性肿瘤中均呈现过表达,ERK 信号系统的异常与肿瘤发生、发展有关。为了进一步研究 ERK 与 ESCC 发生发展的关系,本研究采用 RT-PCR 检测 ESCC 组织和癌旁黏膜组织中 ERK 的表达,并分析其与 ESCC 临床病理特征的关系,探讨其在 ESCC 发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集河北医科大学第四医院胸外科 40 例 ESCC 新鲜组织和相应的 25 例患者癌旁黏膜组织(对照组,距 ESCC 病灶边缘不少于 5 cm)25 例。所有 ESCC 组织经病理诊断均为食管鳞状细胞癌。所有患者均未经放、化疗治疗。患者年龄在 50~73 岁,中位年龄为 60 岁。40 例 ESCC 患者中,男性 27 例、女

性 13 例;年龄 ≥ 60 为 20 例, < 60 为 20 例;组织学分级分为:高、中分化 32 例,低分化 8 例;临床病理证实有淋巴结转移者 7 例、无淋巴结转移者 33 例;TNM 分期(分期标准参照 UICC 标准):I~II 期 33 例,III~IV 期 7 例。

1.2 主要试剂

TRIzol、氯仿、异丙醇、DEPC、MLV 反转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒 PCR 引物均购自上海生工生物工程技术有限公司。ERK 正义链:5'-AAAATT-GAGCAGGTGATCGG-3', ERK 反义链:5'-TCACAG-GTGTGCTCTTGGTC-3'(223 bp);内参 β -actin 正义链:5'-ATCTGGCACCACCTTCTACAATGAGCTGC G-3', β -actin 反义链:5'-CGTCATACTCCCTGCTT-GCTGATCCACATCTGC-3'(838 bp)。

1.3 RT-PCR 检测 ESCC 组织 ERK mRNA 的表达

将组织置于 1 ml TRIzol 中,采用 TRIzol 一步法提取组织总 RNA,电泳后可见清晰的 28、18、5 s 条带。在 25 μ l 的体系中用逆转录试剂盒合成 cDNA 第一链。以逆转录产物为模板进行 PCR 反应,反应条件如下:95 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,61 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C

[基金项目] 河北省自然科学基金资助项目(No. C2009001209)。Project supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. C2009001209)

[作者简介] 赵萌(1982-),女,河北省石家庄市人,硕士,主要从事肿瘤病理方面的研究。E-mail:coconut09@163.com

[通信作者] 王小玲(WANG Xiao-ling, corresponding author),E-mail:wangxiaoling5412@163.com

30 s;循环 35 次以后 72 °C 延伸 7 min。PCR 扩增产物在 2% 琼脂糖中电泳,通过凝胶成像分析系统进行 DNA 电泳条带扫描,并用分析系统测出各泳带的灰度值。 ERK mRNA 相对表达量 = ERK 灰度值/ β -actin 灰度值。

1.4 统计学处理

所有计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 软件对数据进行 t 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ESCC 及癌旁组织中 ERK mRNA 的表达

RT-PCR 结果(图 1)显示:ESCC 组织中 ERK mRNA 的表达显著高于癌旁组织,ESCC 组织中 ERK mRNA 的相对表达量为 0.656 ± 0.055 ,癌旁组织为 0.450 ± 0.070 ,两者差异有统计学意义($P < 0.01$)。

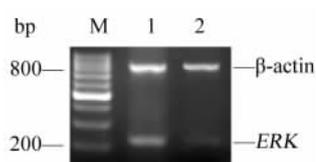


图 1 ESCC 组织及癌旁组织中 ERK mRNA 的表达

M:Marker; 1:ESCC 组织; 2:癌旁组织

2.2 ERK mRNA 的表达与 ESCC 病理特征的关系

分析结果(表 1)显示: ERK mRNA 在 ESCC 患者的年龄(≥ 60 与 < 60)、性别(男与女)和组织分化程度(高中分化与低分化)各组间的表达差异无统计学意义($P > 0.05$),而在临床分期、淋巴结转移各组间差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且 III-IV 期患者 ERK mRNA 基因的表达强度显著高于 I-II 期患者(0.717 ± 0.049 vs 0.643 ± 0.067 , $P < 0.01$);ESCC 淋巴结转移患者 ERK mRNA 的表达强度显著高于无淋巴结转移者(0.705 ± 0.071 vs 0.645 ± 0.066 , $P < 0.05$)。

3 讨论

MAPK 是真核生物中广泛存在的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是介导细胞外刺激的重要信号转导系统,调节细胞的增殖、分化、凋亡和细胞间相互作用^[3]。基于序列的同源性和功能的不同,MAPK 家族分为 4 个成员:ERK(P42/P44MAPK)、SAPK/JNK、p38MAPK 及 ERK5。其中 ERK 通路与恶性肿

瘤发生、发展关系密切。 ERK 是 1994 年 Kiyokawa 等^[4]从构建的胃癌组织 cDNA 文库中筛选出的基因,定位于染色体 1p34-35,cDNA 全长 3 118 bp,开放阅读框编码 978 个氨基酸残基。ERK 蛋白分子包括 3 个结构区,即细胞外的配体结合区、细胞内具有氨酸激酶活性的区域及连接这两个区域的跨膜结构区。

表 1 ESCC 组织中 ERK mRNA 的表达与临床病理特征的关系($\bar{x} \pm s$)

病理参数	n	ERK	
		相对表达量	P 值
年龄(岁)			
≥60	20	0.668 ± 0.073	0.279
<60	20	0.644 ± 0.066	
性别			
男	27	0.656 ± 0.067	0.991
女	13	0.656 ± 0.077	
临床分期			
I-II 期	33	0.643 ± 0.067	0.009
III-IV 期	7	0.717 ± 0.049	
淋巴结转移			
无转移	33	0.645 ± 0.066	0.039
有转移	7	0.705 ± 0.071	
分化程度			
高中分化	32	0.647 ± 0.069	0.105
低分化	8	0.692 ± 0.064	

当细胞受到刺激后,细胞外刺激物(如生长因子)通过与相应受体结合后,诱导生长因子受体结合蛋白 2(growth factor receptor bound protein 2, Grb2)与激活的受体结合,再与 GTP-GDP 交换因子 SOS 的 C 端富含脯氨酸的序列相互作用,形成受体-Grb2-SOS 复合物,催化 Ras 蛋白的活化,最终激活 ERK。激活的 ERK 可促进细胞质靶蛋白磷酸化或调节其他蛋白激酶的活性,更重要的是持续激活的 ERK 可进入细胞核内,激活或灭活其他信号转导途径的关键效应分子(如 NF- κ B、Akt、CREB 等)以及重要的转录因子(如 AP-1、c-myc 等),并能调节细胞周期相关因子(如 cyclin D1、p21 等)和凋亡分子(如 Bcl-2、Bcl-XL、FasL 等)的表达^[5],参与细胞的生长、分

化及凋亡等生理过程,并在肿瘤发生中起重要作用。在许多人类的癌症,如口腔癌^[6]、黑素瘤^[7]、乳腺癌^[8]等中都可发现 ERK 的过度表达。ERK 通路抑制剂可以明显抑制多种肿瘤细胞的增殖,如鼻咽癌^[9]、乳腺癌^[10]等。阻断 ERK 通路的抑制剂已广泛应用于 ESCC 的治疗中,对 ERK 与 ESCC 相关性的研究是一大研究热点。

本研究通过 RT-PCR 检测发现,在 ESCC 组织中 ERK mRNA 的表达高于癌旁组织,提示 ERK 与 ESCC 有密切关系。为了进一步探讨 ERK 与 ESCC 进展的关系,本研究分别从患者的年龄、性别、临床分期、淋巴结有无转移、分化程度等多角度对 ERK mRNA 的表达进行了分析。结果显示,ERK mRNA 的表达与 ESCC 患者的年龄、性别、组织分化程度无关($P > 0.05$),而与临床分期、淋巴结转移相关。III-IV 期患者 ERK mRNA 的表达强度显著高于 I-II 期患者,ESCC 淋巴结转移患者 ERK mRNA 的表达强度显著高于无淋巴结转移者,这与王天祥等^[12]的研究结果一致。

本研究发现,ERK 的过表达与 ESCC 发生、发展有密切关系,并对分析 ESCC 预后有着重要的参考价值,提示 ERK 可以作为 ESCC 恶性程度及进展的标记物,其作用机制可能与 ERK 抑制肿瘤细胞凋亡、促肿瘤细胞增殖相关^[13]。Leu 等^[14]的研究发现,表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)通过激活 ERK1/2 上调凋亡抑制基因 *mcl-1* 表达,抑制 ESCC 细胞凋亡,说明 ERK1/2 过度活化与 ESCC 细胞凋亡减少有关。Pages 等^[15]应用 ERK1 的显性失活形式和反义 cDNA,观察到肿瘤细胞数量下降,肿瘤细胞增殖能力降低,也证明了 ERK 水平与肿瘤细胞增殖之间的关系。但恶性肿瘤发生、发展被认为是一个多因素、多阶段、多基因变异积累及其相互作用的结果,因而 ERK 可能不是唯一的影响恶性肿瘤“分化程度”的因素。

综上所述,ERK 在 ESCC 组织中高表达,可能是 ESCC 发生、发展的一个预见性和预后性的重要因素,进一步研究 ESCC 组织中 ERK/MAPK 的分子传导机制,将会为 ESCC 的诊断和治疗提供新靶点。

[参考文献]

[1] Bailly C. Homocamptothecins: Potent topoisomerase I inhibitors and promising anticancer drugs [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2003, 45(1): 91-108.

- [2] Wang Y, Kristensen GB, Helland A, et al. Protein expression and prognostic value of genes in the erb-b signaling pathway in advanced ovarian carcinomas [J]. Am J Clin Pathol, 2005, 124(3): 392-401.
- [3] Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK and p38 protein kinases [J]. Science, 2002, 298(5600): 1911-1912.
- [4] Kiyokawa E, Takai S, Tanaka M, et al. Overexpression of ERK, an EPH family receptor protein tyrosine kinase, in various human tumors [J]. Cancer Res, 1994, 54(14): 3645-3650.
- [5] Chang F, Steehlan LS, Mc Cubrey JA, et al. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: Potential targeting for therapeutic intervention [J]. Leukemia, 2003, 17(7): 1263-1293.
- [6] Mishima K, Inoue K, Hayashi Y. Overexpression of extracellular-signal regulated kinases on oral squamous cell carcinoma [J]. Oral Oncol, 2002, 38(5): 468-474.
- [7] Smalley KS. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma [J]. Int J Cancer, 2003, 104(5): 527-532.
- [8] Santen RJ, Song RX, Mc Pherson R, et al. The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2002, 80(2): 239-256.
- [9] Inamoto T, Azuma H, Sakamoto T, et al. Invasive ability of human renal cell carcinoma cell line Caki-2 is accelerated by gamma-aminobutyric acid, via sustained activation of ERK1/2 inducible matrixmetallo proteinases [J]. Cancer Invest, 2007, 25(7): 574-583.
- [10] Price DT, Rocca GD, Michael CG, et al. Activation of extracellular signal regulated kinase in human prostate cancer [J]. J Urol, 1999, 162(4): 1537-1542.
- [11] Liu JR, Yang BF, Chen BQ, et al. Inhibition of β -ionone on SGC-7901 cell proliferation and upregulation of metalloproteinases-1 and -2 expression [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(2): 167-171.
- [12] 王天祥, 闫征斌, 王秋旭, 等. ERK1 mRNA, ERK2 mRNA 基因在舌鳞癌预后评估中的应用价值 [J]. 黑龙江医药科学, 2008, 31(2): 58-59.
- [13] 叶定伟, 李慧, Priscilla C, 等. 有丝分裂激活蛋白激酶激活与前列腺癌的恶化进展 [J]. 肿瘤防治, 2002, 9(2): 157-159.
- [14] Leu CM, Chang C, Hu C. Epidermal growth factor (EGF) suppresses staurosporine induced apoptosis by kinase pathway [J]. Oncogen, 2000, 19(13): 1665-1675.
- [15] Pages G, Lenormand P, LAllemain G, et al. Mitogen-activated protein kinases p42 MAPK and p44 MAPK are required for fibroblast proliferation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(18): 8319-8323.

[收稿日期] 2011-06-12

[修回日期] 2011-08-17

[本文编辑] 韩丹