论著

文章编号:1000-5404(2009)02-0136-04

细胞外信号调节激酶信号通路与基质金属蛋白酶-26在肺腺癌表达中的关系

黎 联[1],梅同华[1],周向东[1],张新高[2],车德亚[2] ([1]重庆医科大学附属第二医院呼吸内科,重庆 400010;[2]四川省自贡市第一人民医院呼吸内科,四川 自贡 643000)

摘 要:目的 研究细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)通路与基质金属蛋白酶-26(matrix metalloproteinase-26,MMP-26)在肺腺癌表达的相关性及意义。**方法** 应用免疫组织化学(S-P)法检测pERK、pp38MAPK及MMP-26在44例肺腺癌组织中的表达。Western blot检测U0126阻断ERK信号通路后肺腺癌A549细胞MMP-26蛋白表达水平的变化。分析pERK和MMP-26表达与肺腺癌预后的关系。**结果** pERK、pp38MAPK及MMP-26蛋白在肺腺癌组织中高表达率分别为59.1%、20.4%、54.5%,pERK与MMP-26表达存在正相关($r=0.63$,$P<0.05$),并与肺腺癌的临床分期及淋巴转移状况有统计学差异($P<0.05$),而与患者年龄、肿瘤大小无统计学差异($P>0.05$)。pp38MAPK与MMP-26表达无关($r=0.01$, $P>0.05$),与患者年龄、淋巴转移、肿瘤大小、临床分期均无统计学差异($P>0.05$)。用ERK阻断剂U0126阻断ERK信号通路可降低MMP-26蛋白表达水平,并且随U0126浓度升高MMP-26蛋白表达水平逐渐降低。肺腺癌组织pERK、MMP-26蛋白的表达与肿瘤的预后显著相关(分别为Log-Rank=5.52、Log-Rank=7.01,$P=0.019$、$P=0.008$)。**结论** ERK信号通路可能通过上调MMP-26的表达促进肺腺癌的恶性进展,ERK信号通路可能是肺腺癌侵袭和转移的重要途径,pERK和MMP-26的表达可辅助用于肺腺癌的预后评估。

关键词: ERK; 信号通路;MMP-26;肺腺癌

中图法分类号: R446.8;R730.23;R735.9 **文献标识码:** A

Correlation of extracellular signal-regulated kinase signal transduction pathway with MMP-26 expression in lung adenocarcinoma

LI Lian[1], MEI Tong-hua[1], ZHOU Xiang-dong[1], ZHANG Xin-gao[2], CHE De-ya[2] ([1]Department of Respiratory Diseases, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010; [2]Department of Respiratory Diseases, Zigong First People's Hospital, Zigong 643000, Sichuan, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) with matrix metalloproteinase-26 (MMP-26) and its significance in lung adenocarcinoma. **Methods** SP immunohistochemistry was used to test the expressions of pERK, pp38MAPK and MMP-26 in 44 specimens of lung adenocarcinoma. Western blotting was used to detect the protein levels of MMP-26 in A549 cells after blocking ERK signal transduction pathway with U0126. The correlation of pERK and MMP-26 expressions with prognosis of lung adenocarcinoma was analyzed. **Results** The positive rates of pERK, pp38MAPK and MMP-26 proteins in lung adenocarcinoma tissues were 59.1%, 20.4% and 54.5%, respectively. The expression of pERK was positively correlated to the expression of MMP-26 ($r=0.63$, $P<0.05$), and the expression of pp38MAPK was not related to MMP-26 expression ($r=0.01$, $P>0.05$). The expression of pERK was correlated to lymph node metastasis and TNM stage ($P<0.05$), but not to age and tumor size ($P>0.05$). pp38MAPK was not correlated to age, lymph node metastasis, tumor size or TNM stage ($P>0.05$). U0126 concentration-dependently inhibited ERK pathway and reduced MMP-26 protein expression. The expressions of pERK and MMP-26 were negatively correlated to prognosis of lung adenocarcinoma (Log-Rank=5.52, 7.01; $P=0.019$, 0.008).

基金项目: 四川省重点科技基金(07FG004-002)

Supported by the Key Sci & Tech Project of Sichuan Province (07FG004-002)

作者简介: 黎 联,男,四川省自贡市人,博士研究生,副主任医师,主要从事肺癌方面的研究,现在自贡市第一人民医院呼吸科。E-mail:lilian19700925@163.com

通信作者: 梅同华,电话:(0791)6996333,E-mail:meith@163.com

周向东,电话:(023)63693094,E-mail:zxd999@263.net

收稿日期: 2008-04-25;**修回日期:** 2008-08-04

Conclusion　ERK signal transduction pathway might promote lung adenocarcinoma progression by up-regulating MMP-26 expression, and might be an important route in invasion and metastasis of lung adenocarcinoma. pERK and MMP-26 expressions might help make prognosis of lung adenocarcinoma.

Key words: extracellular signal-regulated kinase; signal transduction pathway; MMP-26; lung adenocarcinoma

肺癌发病率高,常发生浸润和转移,因此与肺癌侵袭转移相关的因子一直是研究重点。目前研究证实基质金属蛋白酶-26(matrix metalloproteinase-26,MMP-26)在几种癌的发生、发展中起着重要作用。我们前期研究也发现 MMP-26 蛋白在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)中表达显著高于非典型增生和正常肺组织的表达[1]。细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族的重要成员。最近, ERK 信号通路以正性调节的方式参与肿瘤的侵袭、转移过程而备受关注。为此,本研究检测磷酸化细胞外信号调节激酶(pERK)、磷酸化 P38 蛋白(pp38MAPK)及 MMP-26 在 NSCLC 肺腺癌组织中的表达,并进一步在体外研究 pERK、MMP-26 在肺癌细胞中的表达,分析 ERK 信号通路对肺腺癌细胞 MMP-26 蛋白表达的影响,评价其临床应用价值,为 ERK 抑制剂应用于肺腺癌治疗提供相应的理论依据。

1　材料与方法

1.1　临床资料

选择本院和四川省自贡市第一人民医院 44 例肺腺癌患者手术切除的肺癌蜡块(1999 年 3 月至 2004 年 3 月)。所有标本经 10% 甲醛固定,石蜡包埋,5 μm 厚连续切片。男: 女为 30∶14,年龄 40 ~ 82 岁, >60 岁的 29 例, ≤60 岁的 15 例。病灶 >3 cm 的 28 例,病灶≤3 cm 的 16 例。伴淋巴结转移 18 例,不伴淋巴结转移 26 例。所有病例术前未行放化疗,有完整的病历资料。据美国联合癌症分类委员会(AJCC)和国际抗癌联盟(UICC)2002 年制定的肺癌临床分期标准[2]: Ⅰ ~ Ⅱ期 24 例, Ⅲ ~ Ⅳ期 20 例。

1.2　细胞系

人肺腺癌 A549 由重庆医科大学基础医学研究所已有的细胞复苏而得,细胞在 37 ℃、5% CO_2,含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中培养,0.1% 胰酶消化传代。

1.3　主要试剂

RPMI1640 培养液购自 Gibco 公司,胎牛血清购自天津 TBD 公司,鼠抗人 pERK、pp38MAPK 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,兔抗人 MMP-26 多克隆抗体购自 Sigma 公司,U0126 购自碧云天公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、羊抗鼠二抗、兔抗人 β-actin 多克隆抗体、S-P 超敏免疫组化试剂盒、DAB 酶底物显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.4　免疫组织化学检测

按照免疫组化试剂盒说明书步骤进行 pERK(1∶50)、pp38MAPK(1∶50)、MMP-26(1∶100)免疫组化染色,设正常肺组织对照组,同时用与一抗相应的免疫前血清 IgG 代替一抗作为阴性对照, 用已知阳性的切片作阳性对照,结果判定参考张云嵩等[3]的方法。阳性率 <25% 为低表达组, ≥25% 为高表达组。

1.5　Western blot 检测

待培养的细胞至 90% 汇合状态时,用 4 ℃的 PBS 冲洗细胞 2 次, 加入裂解液 200 μl,冰上振荡 30 min, 用细胞刮充分刮取细胞,离心提取上清总蛋白,按 1∶4 加上样缓冲液后水煮沸 3 ~ 5 min,EP 管分装冻存。不同终浓度的 U0126(0、2、5、10 μmol/L)处理 A549 细胞 24 h 后,按上述方法提取蛋白。用 Bradford 法测蛋白浓度。以每孔 60 μg 蛋白上样,60 V 恒压电泳, 然后 250 mA 电流湿式电转移仪将蛋白质转入 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉封闭液封闭 1 h,一抗(抗 MMP-26、pERK)用 TBST 按 1∶500 稀释, 4 ℃孵育过夜,相应二抗 37 ℃孵育 1.5 h,化学发光法(ECL)显色,用 Bio-Rad 公司的 Quantity One 软件进行分析,实验重复 3 次以上。

1.6　统计学分析

采用 SAS 8.2 统计软件,行 χ^2 检验,当样本量较小时采用 Fisher's 精确概率法、Spearman 相关分析,绘制 Kaplan-Meier 无复发生存曲线,无复发生存率差异检验采用 Log-Rank 检验。

2　结果

2.1　pERK、pp38MAPK、MMP-26 在腺癌组织中的表达及相关性

免疫组化结果显示,pERK 蛋白主要位于癌细胞细胞质和细胞核,呈棕黄色颗粒,高表达组占 59.1%(26/44);pp38MAPK 蛋白主要位于癌细胞细胞质和细胞核,呈棕黄色颗粒,高表达组占 20.5%(9/44);MMP-26 蛋白主要位于癌细胞细胞质,呈棕黄色颗粒,高表达组占 54.5%(24/44)(图 1)。在 24 例 MMP-26 高表达病例中 pERK 高表达 23 例(52.3%),而 20 例 MMP-26 低表达病例中 pERK 高表达只有 3 例(6.8%),因此, pERK 与 MMP-26 表达呈明显正相关($r = 0.63$, $P = 0.001$);在 24 例 MMP-26 高表达病例中 pp38MAPK 高表达 5 例(11.4%),而 20 例 MMP-26 低表达病例中 pp38MAPK 高表达为 4 例(9.1%),pp38MAPK 与 MMP-26 表达无明显相关性($r = 0.01$, $P = 0.945$)。

2.2　肺腺癌组织 pERK、pp38MAPK、MMP-26 表达与临床病理特征的关系

统计结果显示,pERK、MMP-26 表达水平在伴淋巴结转移

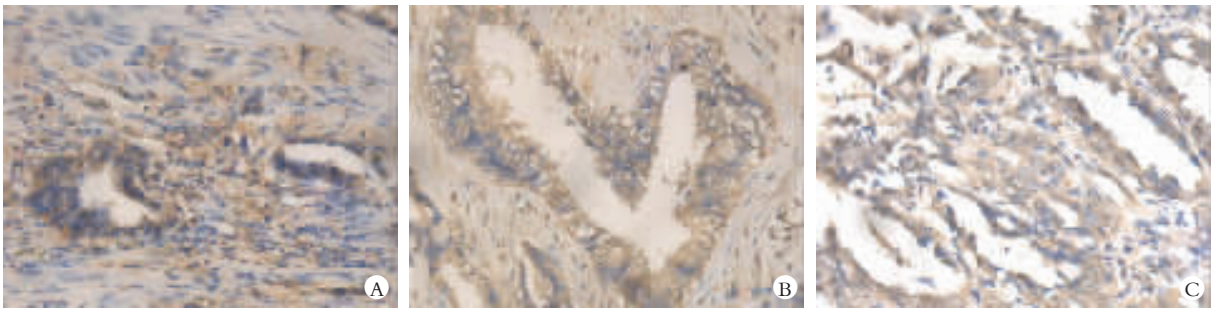


图1 pp38MAPK(A)、pERK(B)和MMP-26(C)在肺腺癌组织中的表达 (S-P×200)

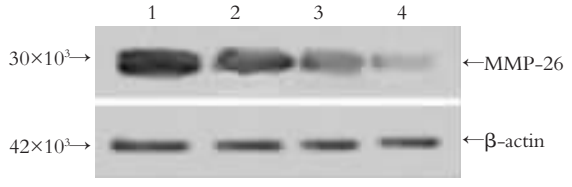
的患者高于无淋巴结转移患者($P<0.05$),在Ⅲ~Ⅳ期患者高于Ⅰ~Ⅱ期患者($P<0.05$);pERK、MMP-26表达与患者的年龄、肿瘤大小无统计学差异;pp38MAPK表达与患者年龄、分期肿瘤大小、淋巴转移无统计学差异($P>0.05$,表1)。

表1 pERK、pp38MAPK及MMP-26表达与肺腺癌临床病理特征的关系

参数	病例	表达率(%)			*P*值		
		pERK	pp38MAPK	MMP-26	pERK	pp38MAPK	MMP-26
临床分期							
Ⅰ~Ⅱ	24	10(41.6)	5(20.8)	9(37.5)	0.010	0.945	0.013
Ⅲ~Ⅳ	20	16(80.0)	4(20.0)	15(75.0)			
肿瘤大小							
>3 cm	28	17(60.7)	7(25)	15(53.5)	0.772	0.322	0.863
≤3 cm	16	9(56.2)	2(12.5)	9(56.2)			
年龄							
>60岁	29	17(58.6)	6(20.69)	16(55.1)	0.929	0.957	0.907
≤60岁	15	9(60.0)	3(20.0%)	8(55.3)			
淋巴转移							
无	26	12(77.7)	6(23.0)	10(38.4)	0.036	0.604	0.010
有	18	14(41.6)	3(16.6)	14(77.7)			

2.3 U0126阻断ERK信号通路后肺腺癌细胞MMP-26蛋白表达的变化

将不同终浓度的U0126(0、2、5、10 μmol/L)处理人肺腺癌A549细胞24 h后,Western blot检测结果显示,A549细胞MMP-26蛋白表达水平下降,且表达水平随着U0126浓度升高而下降(图2)。



1:0 μmol/L;2:2 μmol/L;3:5 μmol/L;4:10 μmol/L

图2 U0126处理A549细胞24 h后MMP-26蛋白表达变化

2.4 pERK、MMP-26表达与肺腺癌无复发生存率的关系

对44例肺腺癌手术患者进行30~60个月的跟踪随访,绘制Kaplan-Meier无复发生存曲线并进行Log-Rank检验,结果表明pERK、MMP-26表达与术后无复发生存率呈负相关(分别为Log-Rank=5.52、Log-Rank=7.01,$P=0.019$、$P=0.008$,图3)。

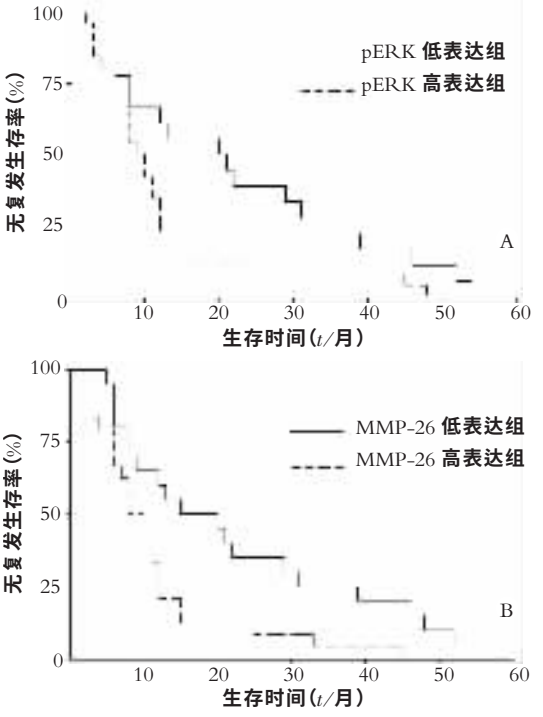


图3 肺腺癌患者pERK(A)、MMP-26(B)高表达组与低表达组的Kaplan-Meier无复发生存曲线

3 讨论

MMP-26又称基质溶解因子-2,是MMPs家族基质溶解因子亚组的新成员,2000年首次从人子宫内膜癌细胞系cDNA文库克隆成功[4,5],呈现一系列不同于MMPs家族其他成员的结构和功能特性。MMP-26可有效裂解纤维蛋白原和细胞外基质(ECM)蛋白,包括纤维连接蛋白、玻璃体结合蛋白、变性胶原、α1-抗胰蛋白酶[6],表明其在肿瘤侵袭和血管发生方面有重要而独特的功能。目前研究证实MMP-26在卵巢癌、食道癌等[7-11]发生和转移中起着重要作用。我们前期研究也发现其在NSCLC表达远高于正常肺组织和非典型增生[1],但是对于其表达与信号转导通路的关系研究尚缺乏。MAPK是细胞内广泛存在的丝/苏氨酸蛋

白激酶超家族,将信号从细胞膜转至细胞核,参与细胞的生长、分化、增殖的恶性转化,与肿瘤的发生、发展密切相关。ERK 是 MAPK 家族的重要成员,调节着细胞的增殖、分化和存活,是多种生长因子的下游蛋白;ERK 和其信号途径在肿瘤侵袭和转移过程中起中介和放大信号的作用,一方面接受大量来自生长因子、丝裂原、环境刺激等的信号,另一方面通过 ERK 信号级联反应作用于核转录因子,调控基因表达。在如口腔癌、黑色素瘤、乳腺癌等中都可发现 ERK 的过度激活。对 NSCLC 的研究发现癌组织中 pERK 的表达明显高于癌旁组织及正常肺组织[12],U0126 对人高转移大细胞肺癌细胞株 ERK1/2 信号转导通路的抑制作用具有剂量和时间依赖性,U0126 剂量依赖性地抑制人高转移大细胞肺癌细胞株体外增殖活力和侵袭能力[13]。然而 ERK 通路是否参与了 MMP-26 的表达调控? 它们的关系如何? 目前尚缺乏关于 ERK 和 MMP-26 在人类肺癌组织中关系的相关报道。p38MAPK 是 MAPK 的另一个重要成员,主要在炎症过程发挥重要作用[14]。因此,本研究在 NSCLC 的肺腺癌组织和细胞中同时检测 pERK、pp38MAPK 和 MMP-26 的表达,并分析 pERK、pp38MAPK 和 MMP-26 表达的相关性。

我们的研究结果显示 44 例肺腺癌组织中 pERK 和 MMP-26 的表达与 TNM 分期及淋巴结转移有关,pERK 和 MMP-26 表达与术后无复发生存率呈负相关,提示 pERK 和 MMP-26 表达与肺腺癌的恶性进展、侵袭转移及预后有关。统计学分析结果显示,肺腺癌组织中 pERK 和 MMP-26 表达存在正相关,表明 MMP-26 蛋白表达可能受 ERK 信号通路的调控。因此,我们又进一步在体外研究了肺腺癌细胞中 ERK 信号通路与 MMP-26 蛋白表达的关系。Western blot 检测结果显示,U0126 以浓度依赖方式降低肺腺癌 A549 细胞 MMP-26 蛋白表达,表明肺腺癌细胞 MMP-26 蛋白表达可能通过 ERK 信号通路来调控。Marchenko 等[15]报道 MMP-26 基因启动子区有 AP-1 等转录因子结合位点,ERK 活化后可磷酸化增强多种核转录因子如 AP-1、NF-κB 等调控基因表达。因此我们推测 ERK 可能通过活化转录因子 AP-1 引起 MMP-26 基因转录增强,MMP-26 产生增多。而 pp38MAPK 的表达与 MMP-26 表达无相关性,说明肺腺癌中 p38MAPK 信号通路不参与 MMP-26 表达的调控。

综上所述,ERK 信号通路通过上调 MMP-26 的表达促进肺腺癌的恶性进展及侵袭转移,但其确切机制有待进一步研究。目前以细胞信号转导分子为靶点的 MAPK 信号转导通路抑制剂已成为肿瘤治疗的新靶点,本研究结果可为 ERK 信号通路作为肺腺癌治疗的靶点提供理论依据。

(致谢:感谢四川大学华西医院呼吸科刘春涛教授给予的帮助!)

参考文献:

[1] 黎　联, 张新高, 车德亚, 等. 基质金属蛋白酶26 与癌[J]. 国际呼吸杂志, 2008, 28(5): 281 - 284.

[2] 王吉耀. 内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 119 - 120.

[3] 张云嵩, 范士志, 王　东, 等. APE1 在非小细胞肺癌中的表达特点及其与预后的关系[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(9): 776 - 778.

[4] De-Coignac A B, Elson G, Delneste Y, *et al*. Cloning of MMP-26. A novel matrilysin-like proteinase[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(11): 3323 - 3329.

[5] Park H I, Ni J, Gerkema F E, *et al*. Identification and characterization of human endometase (Matrix metalloproteinase-26) from endometrial tumor[J]. J Biol Chem, 2000, 275(27): 20540 - 20544.

[6] Marchenko G N, Ratnikov B I, Rozanov D V, *et al*. Characterization of matrix metalloproteinase-26, a novel metalloproteinase widely expressed in cancer cells of epithelial origin[J]. Biochem J, 2001, 356 (Pt 3): 705 - 718.

[7] Ripley D, Tunuguntla R, Susi L, *et al*. Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitors of metalloproteinase-3 and -4 in normal ovary and ovarian carcinoma[J]. Int J Gynecol Cancer, 2006, 16 (5): 1794 - 1800.

[8] Yamamoto H, Vinitketkumnuen A, Adachi Y, *et al*. Association of matrilysin-2 (MMP-26) expression with tumor progression and activation of MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(12): 2353 - 2360.

[9] Isaka K, Nishi H, Nakai H, *et al*. Matrix metalloproteinase-26 is expressed in human endometrium but not in endometrial carcinoma[J]. Cancer, 2003, 97(1): 79 - 89.

[10] Zhao Y G, Xiao A Z, Newcomer R G, *et al*. Activation of pro-gelatinase B by endometase/matrilysin-2 promotes invasion of human prostate cancer cells[J]. J Biol Chem, 2003, 278(17): 15056 - 15064.

[11] 田　力, 李继昌, 陈奎生. 大鼠基质金属蛋白酶抑制因子-1 pRNAT-U6.2 小干扰 RNA 表达载体的构建[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2007, 42(2): 234 - 236.

[12] 陶卫平, 王志维, 戈　伟, 等. 非小细胞肺癌中细胞外信号调节激酶表达的意义[J]. 临床外科杂志, 2006, 14(9): 568 - 569.

[13] 李　印, 周清华, 孙芝琳, 等. 靶向抑制 ERK1/2 信号传导通路对人高转移大细胞肺癌细胞株 L9981 恶性表型的影响[J]. 中国肺癌杂志, 2005, 8(6): 504 - 509.

[14] 李　静, 许　峰, 胡　兰, 等. 高氧对幼鼠肺组织细胞凋亡及 p38MAPK 丝裂原活化蛋白激酶的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(17): 1598 - 1600.

[15] Marchenko N D, Marchenko G N, Weinreb R N, *et al*. Beta-catenin regulates the gene of MMP-26, a novel metalloproteinase expressed both in carcinomas and normal epithelial cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(5): 942 - 956.

(编辑　邓强庭)