

· 论 著 ·

ERK 信号通路与 MMP-9 在肺腺癌表达中的相关性*

黎 联¹, 李 敏², 周向东³

(1. 重庆市江津区人民医院呼吸内科 402260; 2. 重庆市江津区人民医院病理科 402260;

3. 重庆医科大学附属第二医院呼吸内科 400010)

摘要:目的 研究细胞外信号调节激酶(ERK)通路与基质金属蛋白酶-9(MMP-9)在肺腺癌表达中的相关性及其意义。方法 应用免疫组织化学(SP)法检测磷酸化细胞外信号调节激酶(pERK)、MMP-9 在 67 例肺腺癌组织中的表达。Western blot 检测 PD98059 阻断 ERK 信号通路后肺癌细胞 MMP-9 蛋白表达水平的变化。结果 pERK 蛋白在肺腺癌组织和正常组织中高表达率分别为 65.6%、14.3%;MMP-9 蛋白在肺腺癌组织和正常组织中高表达率分别为 73.1%、21.4%。pERK 与 MMP-9 表达存在正相关($r=0.57, P<0.05$)。pERK、MMP-9 的表达均与肺腺癌的 TNM 分期及淋巴转移状况相关($P<0.05$),而与患者年龄、肿瘤大小无明显相关性($P>0.05$)。用 ERK 阻断剂 PD98059 阻断 ERK 信号通路可降低 MMP-9 蛋白表达水平,并且随 PD98059 浓度升高 MMP-9 蛋白表达水平逐渐降低。结论 ERK 信号通路可能通过上调 MMP-9 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。

关键词:ERK; 信号通路;MMP-9; 肺腺癌

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.17.007

中图分类号:R734.1;R730.45

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)17-2256-02

Correlation of ERK signal transduction pathway with MMP-9 expression in lung adenocarcinoma*

LI Lian¹, LI Ming², ZHOU Xiang-dong³

(1. Department of Respiratory Medicine, Jiangjin District People's Hospital, Jiangjin, Chongqing 402260, China;

2. Department of Pathology, Jiangjin District People's Hospital, Jiangjin, Chongqing 402260, China;

3. Department of Respiratory Medicine, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) with matrix metalloproteinase-9(MMP-9) and its significance in lung adenocarcinoma. **Methods** SP immunohistochemistry was used to test the expression of pERK and MMP-9 in 67 specimens of lung adenocarcinoma. Western blot was used to detect the protein levels of MMP-9 in lung adenocarcinoma SPC-A-1 cells after blocking ERK signal transduction pathway by PD98059. The correlation of pERK and MMP-9 expression was also analyzed. **Results** The high expression rate of pERK proteins was higher in lung adenocarcinoma tissues than in the normal tissues (65.6% vs 14.3%). The high expression rate of MMP-9 protein was higher in lung adenocarcinoma tissues than in the normal tissues (73.1% vs 21.4%). The high expression rate of pERK was positively correlated to the high expression rate of MMP-9 ($r=0.57, P<0.05$). The high expression rate of pERK was correlated to lymph node metastasis and TNM stage ($P<0.05$), but not to patients' age and tumor size ($P>0.05$). The high expression rate of MMP-9 was correlated to lymph node metastasis and TNM stage ($P<0.05$), but not to patient's age and tumor size ($P>0.05$). PD98059 concentration-dependently inhibited ERK pathway and reduced MMP-9 protein expression. **Conclusion** ERK signal transduction pathway might promote lung adenocarcinoma progression by up-regulating MMP-9 expression, and might be an important route in invasion and metastasis of lung adenocarcinoma.

Key words: ERK; signal transduction pathway; MMP-9; 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的重点。目前研究证实基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)在多种癌组织中的表达明显高于正常组织,在癌的发生、发展中起着重要作用,然而很少有关于 MMP-9 表达与信号转导通路关系的研究。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、转移过程而倍受关注。为此,本研究检测磷酸化细胞外信号调节激酶(pERK)、MMP-9 在肺腺癌组织中的表达,并进一步在体外研究 pERK、MMP-9 在肺腺癌细

胞中的表达,分析 ERK 信号通路对肺腺癌细胞 MMP-9 蛋白表达的影响,评价其临床应用价值。

1 临床资料

1.1 一般资料 选择重庆医科大学附属第二医院和重庆市江津区人民医院 67 例肺腺癌患者手术切除的肺癌蜡块(2000 年 3 月至 2004 年 3 月),14 例癌旁正常组织标本。所有标本均经 10% 甲醛固定,石蜡包埋,5 μ m 厚连续切片。男 55 例,女 12 例,年龄 40~82 岁, >60 岁的 42 例, \leq 60 岁的 25 例。病灶大于 3 cm 的 40 例,病灶小于或等于 3 cm 的 27 例。伴淋巴结转移 28 例,不伴淋巴结转移 39 例,所有病例术前未行放疗。据美国联合癌症分类委员会(AJCC)和国际抗癌联盟(UICC)

* 基金项目:重庆市卫生局 2009 年度医学科研计划资助项目(2009-2-429)。

2002 年制订的肺癌 TNM 分期标准^[1]: I ~ II 期 37 例, III ~ IV 期 30 例。

1.2 细胞系 人肺腺癌 SPC-A-1 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 °C、5% CO₂、含 10% 小牛血清的 RPMI1640 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 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, 兔抗人 MMP-9 多克隆抗体购自 Sigma 公司, PD98059 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、SP 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。

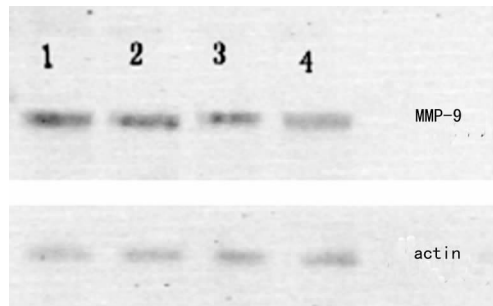
1.4 免疫组织化学 按照免疫组化试剂盒说明书步骤进行 pERK(1:50)、MMP-9(1:50)免疫组化染色, 用与一抗相应的免疫前血清 IgG 代替一抗作为阴性对照, 用已知阳性的切片作阳性对照, 结果判定参考文献^[2]方法, 0~1 分为低表达组, ≥2 分为高表达组。

1.5 蛋白质印迹(Western blot) 待培养的细胞至 90% 汇合状态时, 用 4 °C 的 PBS 冲洗细胞两次, 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 3~5 min, EP 管分装冻存。不同浓度的 PD98059(0、4、8、12 μmol/L) 处理腺癌 SPC-A-1 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 40 μg 蛋白上样, 60 V 恒压电泳, 湿式电转移入醋酸纤维膜(PVDF)。5% 脱脂奶粉封闭液封闭 1 h, 一抗(抗 MMP-9、pERK)用抗体稀释液(TBST)按 1:500 稀释, 4 °C 孵育过夜, 相应二抗 37 °C 孵育 1.5 h, 化学发光法(ECL)检测条带, 试验重复 3 次。

1.6 统计学处理 采用 SAS8.2 统计软件, 行 χ² 检验, 当样本量较小时采用 Fisher's 精确检验, Spearman 相关分析, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 pERK、MMP-9 在肺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胞浆和胞核, 呈棕黄色颗粒, 高表达率为 65.6%(44/67), 正常组织高表达率为 14.3%(2/14); MMP-9 蛋白主要位于癌细胞细胞质, 呈棕黄色颗粒, 高表达率为 73.1%(49/67), 正常组织高表达率为 21.4%(3/14)(封 2 图 1)。在 49 例 MMP-9 高表达病例中 pERK 高表达 42 例(62.6%), 而 18 例 MMP-9 低表达病例中 pERK 高表达只有 2 例(4.5%), 因此, pERK 与 MMP-9 表达呈明显正相关(r=0.57, P=0.001)。



1:0 μmol/L; 2:4 μmol/L; 3:8 μmol/L; 4:12 μmol/L
 图 2 PD98059 处理 SPC-A-1 细胞 24 h 后 MMP-9 蛋白表达变化

2.2 肺腺癌组织 pERK、MMP-9 表达与临床病理特征的关系

统计结果显示, pERK、MMP-9 高表达率在伴淋巴结转移的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-9 表达与患者的年龄、肿瘤大小无明显相关性(P>0.05), 见表 1。

2.3 PD98059 阻断 ERK 信号通路后肺腺癌细胞 MMP-9 蛋白表达的变化 将不同浓度的 PD98059(0、4、8、12 μmol/L) 处理人肺腺癌 SPC-A-1 细胞 24 h 后, Western blot 检测显示, SPC-A-1 细胞 MMP-9 蛋白表达水平随着 PD98059 浓度升高而逐渐下降, 见图 2。

表 1 pERK、MMP-9 表达与肺腺癌临床病理特征的关系

变量	n	高表达[n(%)]		P	
		pERK	MMP-9	pERK	MMP-9
分期					
I+II	37	20(54.1)	23(62.1)	0.026	0.024
III+IV	30	24(80.0)	26(86.6)		
肿瘤大小(cm)					
>3	40	27(67.5)	29(72.5)	0.701	0.886
≤3	27	17(62.9)	20(74.0)		
年龄(岁)					
>60	42	28(66.6)	30(71.4)	0.824	0.683
≤60	25	16(64.0)	19(76.0)		
淋巴转移					
无	39	21(53.8)	24(61.5)	0.016	0.011
有	28	23(82.1)	25(89.2)		

3 讨 论

MMP-9 是 MMPs 家族中相对分子质量最大的酶, 主要功能是降解、破坏细胞外基质中最主要的组份 IV、V 型胶原和明胶。有研究证明 MMP-9 在多种癌组织中的表达明显高于正常组织^[3-5], 在肿瘤侵袭和血管发生方面有重要而独特的功能, 高表达预示侵袭、转移能力强、预后不良。但是对于其表达与信号转导通路的关系研究很少。

ERK 为 MAPK 家族中最重要的成员, pERK 是其活化形式, 可将胞外的各种刺激信号通过一系列的级联反应传至核内, pERK 在核内促进多种转录因子磷酸化, 增强转录活性, 对肿瘤的发生、增殖及凋亡起调节作用^[6-7], 在许多人类癌症(如口腔癌、黑色素瘤、乳腺癌、肺癌等)中都可发现 ERK 表达高于正常组织, 呈现过度激活。然而 ERK 通路是否参与了 MMP-9 的表达调控? 它们的关系如何? Santibdiez 等^[8]研究表明, ERK 的激活可诱导 NIH3T3 细胞中尿激酶的蛋白水解活性, 增加角化上皮细胞内 MMP-9 的分泌; Chung 等^[9]研究发现乳腺癌细胞及肝细胞肝癌的细胞中 ERK 信号途径的活化能使 MMP-9 基因转录; Bartsch 等^[10]研究发现乳腺癌细胞中 ERK 可活化 MMP-9, ERK 抑制剂 PD98059 剂量依赖性抑制 MMP-9 表达, 表明 MMP-9 可能是 ERK 信号途径的下游分子。本研究结果显示, 67 例肺腺癌组织中 pERK 和 MMP-9 的高表达率远高于正常组织, 且与 TNM 分期及淋巴结转移有关, 提示 pERK 和 MMP-9 表达与肺腺癌的恶性进展、侵袭、转移及预后有关。统计学分析显示, 肺腺癌组织中 pERK 和 MMP-9 表达存在正相关, 表明 MMP-9 蛋白表达可能受 ERK 信号通路的调控。为了进一步研究二者之间的相互作用(下转第 2261 页)

的意义。

参考文献:

- [1] Pecherzewska R, Nawrot B. FHIT-tumor suppressor protein involved in induction of apoptosis and cell cycle regulation[J]. *Postepy Biochem*, 2009, 55(1):66.
- [2] Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Maitra A, et al. 5' CpG Island Methylation of the FHIT Gene Is Correlated with Loss of Gene Expression in Lung and Breast Cancer[J]. *Cancer Res*, 2001, 61:3581.
- [3] 张生军, 张才全. FHIT 基因结构、功能及其应用研究进展[J]. *重庆医学*, 2004, 33(9):1411.
- [4] Leal MF, Lima EM, Silva PN, et al. Promoter hypermethylation of CDH1, FHIT, MTAP and PLAGL1 in gastric adenocarcinoma in individuals from Northern Brazil[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(18):2568.
- [5] Fukushima T, Takenoshita S. Colorectal carcinogenesis[J]. *Fukushima J Med Sci*, 2001, 47(1):1.
- [6] Huiping C, Kristjansdottir S, Bergthorsson JT, et al. High frequency of LOH, MSI and abnormal expression of FHIT in gastric cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2002, 38(5):728.
- [7] Lee SH, Kim WH, Kim HK, et al. Altered expression of the fragile histidine triad gene in primary gastric adenocarcinomas[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 284(3):850.

- [8] 肖玉平, 韩坤波, 李锦毅, 等. 胃癌 FHIT 基因杂合性缺失及微卫星不稳定性的研究[J]. *中国医科大学学报*, 2006, 35(2):122.
- [9] Lee CL, Hsieh KS, Chen YL, et al. Identification of candidate genes for congenital ventricular septal defects with HSA22q11 loss of heterozygosity[J]. *Rev Esp Cardiol*, 2009, 62(3):263.
- [10] Perez RO, Jacob CE, D'Ottaviano FL, et al. Microsatellite instability in solitary and sporadic gastric cancer[J]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*, 2004, 59(5):279.
- [11] Castagnaro A, Marangio E, Verduri A, et al. Microsatellite analysis of induced sputum DNA in patients with lung cancer in heavy smokers and in healthy subjects[J]. *Exp Lung Res*, 2007, 33(6):289.
- [12] Leal MF, Lima EM, Silva PN, et al. Promoter hypermethylation of CDH1, FHIT, MTAP and PLAGL1 in gastric adenocarcinoma in individuals from Northern Brazil[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(18):2568.
- [13] Roa JC, Anabalón L, Roa I, et al. Promoter methylation profile in gastric cancer[J]. *Rev Med Chil*, 2005, 133(8):874.
- [14] 戴观荣, 景洪标, 邓鉴文, 等. FHIT 基因在胃癌中的异常甲基化及其表达[J]. *第二军医大学学报*, 2005, 26(11):1304.

(收稿日期:2009-11-27 修回日期:2010-02-14)

(上接第 2257 页)

关系,本研究在体外研究了肺腺癌细胞中 ERK 信号通路与 MMP-9 蛋白表达的关系。Western blot 检测显示,PD98059 以浓度依赖方式降低肺腺癌 SPC-A-1 细胞 MMP-9 蛋白表达,表明肺腺癌细胞 MMP-9 蛋白表达可能通过 ERK 信号通路来调控。

综上所述,ERK 信号通路通过上调 MMP-9 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。本试验结果可为 ERK 信号通路作为肺腺癌治疗的靶点提供理论依据。

参考文献:

- [1] 王吉耀. 内科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:119.
- [2] 黎联,梅同华,周向东,等. 基质金属蛋白酶 26 蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达及其意义[J]. *癌症*, 2009, 28(1):76.
- [3] Nagakawa Y, Aoki T, Kasuya K, et al. Histologic features of venous invasion, expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9, and the relation with liver metastasis in pancreatic cancer[J]. *Pancreas*, 2002, 24(2):169.
- [4] 孔灵玲,王学春,崔文,等. 宫颈鳞癌组织中基质金属蛋白酶 9 表达的意义[J]. *第四军医大学学报*, 2008, 29(3):242.

- [5] 张尧,吴小候,孙先禹,等. 肾细胞癌 MMP-9、VEGF 的表达及其临床意义[J]. *重庆医学*, 2007, 36(13):1298.
- [6] Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases[J]. *Science*, 2002, 298(5600):1911.
- [7] Ling H, Zhang LY, Su Q, et al. Erk is involved in the differentiation induced by diallyl disulfide in the human gastric cancer cell line MGC803[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2006, 11(3):408.
- [8] Santibdiez JF, Guerero J, Quintanilla M, et al. Transforming growth factor-beta1 modulates matrix metalloproteinase-9 production through the Ras/MAPK signaling pathway in transformed keratinocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296(2):267.
- [9] Chung TW, Lee YC, Kim CH. Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERKs and PI-3K/AKT pathways: Involvement of invasive potential[J]. *FASEB J*, 2004, 18(10):1123.
- [10] Bartsch JE, Staten ED, Appert HE. Matrix metalloproteinase expression in breast cancer[J]. *J Surg Res*, 2003, 110(2):383.

(收稿日期:2009-09-29 修回日期:2010-02-20)