

# pERK 在胃癌中的表达及临床意义

朱琪伟,吴志军,王建红,杨书云,徐薇薇,杨磊

(南通大学附属肿瘤医院,江苏 南通 226361)

**摘要:** [目的] 研究磷酸化细胞外信号调节激酶(pERK)在胃腺癌、慢性萎缩性胃炎及浅表性胃炎组织中的表达及意义。[方法] RT-PCR 法检测胃腺癌、慢性萎缩性胃炎和浅表性胃炎新鲜组织中 pERK mRNA 表达;免疫组化法分别检测胃腺癌、慢性萎缩性胃炎和浅表性胃炎组织中 pERK 蛋白表达,并分析其蛋白表达与胃癌临床病理参数间的相关性。[结果] RT-PCR 半定量结果显示,胃癌组织中 pERK mRNA 的相对表达水平( $2.35 \pm 0.36$ )明显高于慢性萎缩性胃炎组织( $1.18 \pm 0.25$ )及浅表性胃炎组织( $0.68 \pm 0.10$ ) ( $P$  均  $< 0.01$ )。免疫组织化学结果显示,pERK 蛋白在胃癌组织中的阳性表达率(88.3%)高于慢性萎缩性胃炎(43.3%)及浅表性胃炎组织(5.0%) ( $P$  均  $< 0.01$ )。胃癌组织中 pERK 蛋白表达与胃癌分化程度、分期、淋巴结转移等明显相关。[结论] pERK 在胃癌中高表达,pERK 在正常细胞向恶性细胞转化的过程中可能扮演了重要角色,检测 pERK 表达可能有助于胃腺癌的预防及早期诊断。

**关键词:** 磷酸化细胞外信号调节激酶;胃癌;慢性萎缩性胃炎;浅表性胃炎

**中图分类号:** R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2014)10-0865-04

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2014.10.A016

## Expression of pERK in Gastric Carcinoma and Its Clinical Significance

ZHU Qi-wei, WU Zhi-jun, WANG Jian-hong, et al.

(Nantong University Affiliated Tumor Hospital, Nantong 226361, China)

**Abstract:** [Purpose] To investigate the expression of extracellular signal-regulated protein kinase (pERK) in gastric adenocarcinoma, chronic atrophic gastritis and superficial gastritis and its significance. [Methods] pERK were measured in gastric adenocarcinoma, chronic atrophic gastritis and superficial gastritis tissues. The levels of pERK mRNA in different tissues were detected by RT-PCR assay. The relationship between pERK expression and clinical features were analyzed. [Results] The expression level of pERK mRNA in gastric adenocarcinoma ( $2.35 \pm 0.36$ ) was significantly higher than that in chronic atrophic gastritis ( $1.18 \pm 0.25$ ) and superficial gastritis ( $0.68 \pm 0.10$ ) (all  $P < 0.01$ ), with positive rates of pERK expression of 88.3%, 43.3% and 5.0%, respectively. The pERK expression levels in different tissues were significantly different ( $P < 0.01$ ), and the pERK expression was positively correlated with differentiation, disease stage and lymph node metastasis. [Conclusion] pERK is overexpression in patients with gastric adenocarcinoma. The pERK might play an important role in the transition from normal gastric cells to malignant cells. To determine the expression of pERK might be helpful for the prevention and early diagnosis of gastric carcinoma.

**Key words:** extracellular signal-regulated protein kinase; gastric carcinoma; chronic atrophic gastritis; superficial gastritis

细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated protein kinase, ERK)通路是介导细胞增殖和肿瘤形成的一条重要通路,pERK(phospho-ERK)是 ERK 的活化形式<sup>[1]</sup>。ERK 是 MAPK 家族的重要成员,ERK 活化后,即为 pERK,进入细胞核作用于 Elk-1、c-

myc、c-fos、c-jun、ATF、NF- $\kappa$ B 和 AP-1 等转录因子来调节相关基因的转录,进而参与细胞生长、发育、分裂及细胞间的功能同步等多种生理过程,并在细胞恶性转化等病理过程中起重要作用<sup>[2-4]</sup>。本研究采用 RT-PCR 法检测 pERK mRNA 表达,用免疫组织化学法检测其蛋白表达,并探讨其表达与各临床病理因素间的关系。

收稿日期:2014-04-13;修回日期:2014-05-30

基金项目:南通市科技局指令性课题(S2010014)

通讯作者:杨磊,E-mail:leiyang.53@163.com

# 1 资料与方法

## 1.1 临床资料

收集 2010 年 1 月至 2012 年 2 月在南通市肿瘤医院就诊的胃腺癌、慢性萎缩性胃炎及浅表性胃炎患者各 60 例,胃癌病例手术前未行放、化疗和其他抗肿瘤治疗,全部标本的病理切片均经两位病理学专家验证。其中 25 例胃腺癌、慢性萎缩性胃炎及浅表性胃炎收集到新鲜组织,用于 RT-PCR 检测。60 例胃癌患者中男性 42 例,女性 18 例;平均年龄  $61.32 \pm 6.15$  岁;均经病理检查确诊,其中分化程度:高分化 8 例,中分化 41 例,低分化 11 例;浸润深度:侵及黏膜下层 8 例,侵及肌层 32 例,侵达浆膜层 20 例;TNM 分期:I 期 7 例,II 期 29 例,III 期 24 例;淋巴结转移 39 例,无淋巴结转移 21 例。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 RT-PCR 检测 pERK mRNA 表达

以 TRIzol 试剂 (GIBCO 公司) 提取 25 例胃腺癌、慢性萎缩性胃炎及浅表性胃炎新鲜组织总 RNA。pERK 及内参  $\beta$ -actin 上、下游引物分别为: pERK 上游: 5'-CTCACAGGCAAAGGAAGGAG-3', 下游: 5'-AACAACCTCCAAAGCCACCAC-3', 产物大小 179bp;  $\beta$ -actin 上游: 5'-GTTTGAGACCTTCAACAC-CCC-3', 下游: 5'-GTGGCCATCTCTCTTGTCTCGAAGTC-3', 产物大小 320bp。PCR 扩增条件均为: 94℃变性 1min, 56℃退火 40s, 72℃延伸 30s, 30 个循环后, 72℃再延伸 10min。RT-PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 照像保存。Kodak1D 电泳成像系统进行扫描分析, 计算 pERK mRNA 的相对表达水平。pERK mRNA 相对表达水平 = pERK 条带灰度值/ $\beta$ -actin 条带灰度值。

### 1.2.2 免疫组织化学染色

免疫组化染色超敏试剂盒 (S-P 法) 和 DAB 显色试剂盒均购自上海凯博生物有限公司。将石蜡包埋的组织制成 4 $\mu$ m 的连续切片, 行免疫组化染色, 将切片脱蜡至水化, 高温高压修复; 将鼠抗人 pERK 单克隆抗体 (上海瑞齐生物科技有限公司) 稀释至 1:100, 取已知阳性组织作阳性对照, PBS 替代一抗作阴性对照。DAB 显色, 用苏木精复染、脱水、透明, 封片。

### 1.2.3 免疫组织化学结果判断标准

pERK 蛋白阳性表达位于细胞核, 呈黄色或棕黄色颗粒; 根据细胞中 pERK 蛋白的着色范围评分:

阴性为 0 分, 1%~10% 为 1 分, 11%~50% 为 2 分, 51%~80% 为 3 分, 81%~100% 为 4 分。染色的强度分: 阴性为 0 分, 弱为 1 分, 中为 2 分, 强为 3 分。以上两项的乘积为最后得分: 0 分为 (-), 1~4 为 (+), 5~8 分为 (++) , 9~12 分为 (+++); <5 分为低表达组 (阴性组),  $\geq 5$  分为高表达组 (阳性组)。

## 1.3 统计学处理

所有数据应用 Stata 8.0 统计软件处理, 各组间 pERK mRNA 表达半定量结果间比较采用方差分析; 各组间 pERK 蛋白表达阳性率间的比较及 pERK 蛋白表达阳性率在各临床病理参数间的比较均采用  $\chi^2$  检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 pERK mRNA 及蛋白在各组胃组织中的表达

半定量 RT-PCR 结果显示, 胃癌组织中 pERK mRNA 的相对表达水平 ( $2.35 \pm 0.36$ ) 明显高于慢性萎缩性胃炎组织 ( $1.18 \pm 0.25$ ) 及浅表性胃炎组织 ( $0.68 \pm 0.10$ ) ( $P$  均 < 0.01), 且在慢性萎缩性胃炎组织与浅表性胃炎组织间亦存在统计学差异 ( $P < 0.01$ ) (Table 1)。

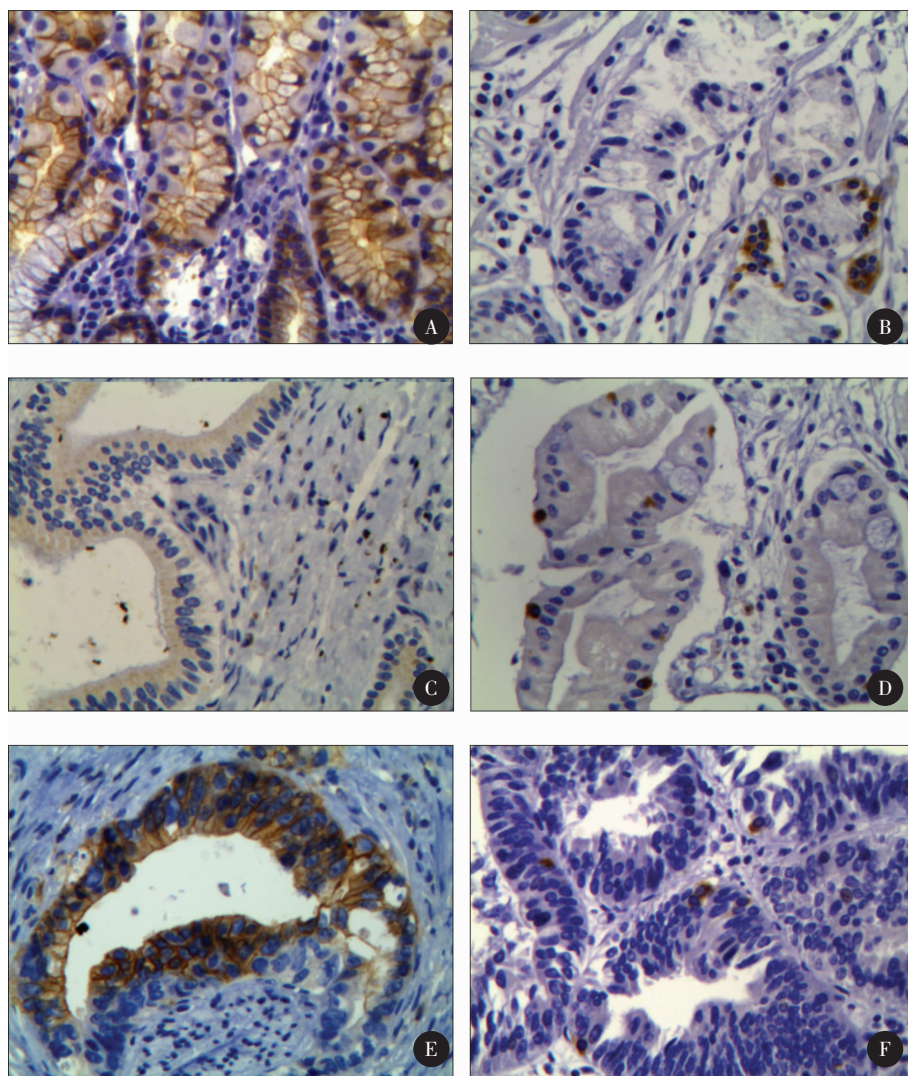
pERK 蛋白阳性信号定位于细胞核, 呈黄色或棕黄色颗粒 (Figure 1)。胃癌、慢性萎缩性胃炎及浅表性胃炎组织中 pERK 蛋白的阳性表达率 (88.3%、43.3%、5.0%) 间两两比较, 差异均有统计学意义 ( $P$  均 < 0.01) (Table 1)。

Table 1 The expression of pERK in different gastric tissues

| Group                      | mRNA |                     | Protein |              |
|----------------------------|------|---------------------|---------|--------------|
|                            | n    | ( $\bar{x} \pm s$ ) | n       | Positive (%) |
| Gastric cancer             | 25   | $2.35 \pm 0.36$     | 60      | 50(83.3)     |
| Chronic atrophic gastritis | 25   | $1.18 \pm 0.25$     | 60      | 26(43.3)     |
| Superficial gastritis      | 25   | $0.68 \pm 0.10$     | 60      | 3(5.0)       |

## 2.2 胃腺癌组织中 pERK 表达与临床病理参数间的关系

胃腺癌组织细胞中 pERK 表达与年龄、性别无关, 与肿瘤浸润深度、分化程度、分期和淋巴结转移明显相关, 浆膜层组和肌层的 pERK 表达水平高于侵及黏膜层组 ( $P$  均 < 0.05)。分化越低, pERK 的表达水平就越高, 高分化组与中、低分化组比较有显著性差异 ( $P$  均 < 0.01); II 期的 pERK 表达水平与 I 期相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 有淋巴结转移者的 pERK 表达水平明显高于无淋巴结转移者 ( $P < 0.001$ ) (Table 2)。



(A, Superficial gastritis pERK+; B, Superficial gastritis pERK-; C, Chronic atrophic gastritis pERK+; D, Chronic atrophic gastritis pERK-; E, Gastric cancer pERK+; F, Gastric cancer pERK-)

**Figure 1 Expression of pERK in different gastric tissues( $\times 400$ )**

### 3 讨论

目前认为,胃黏膜在有害因素作用下产生损伤,黏膜细胞分裂、增生以修复损伤,如损伤修复,胃黏膜恢复正常,如损伤不能修复,可启动细胞凋亡,受损细胞的凋亡对于清除具有遗传缺陷的细胞具有重要意义,在胃癌发生发展过程中,内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)、细胞的修复及凋亡是重要的病理生理过程。ERS表现为由各种刺激引起的内质网腔内错误折叠、未折叠蛋白质聚集以及细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  平衡紊乱,其与细胞的损伤或凋亡直接相

关。正常情况下,ERK 与内质网腔中的分子伴侣葡萄糖调节蛋白 78(glucose-regulated proteins 78, GRP78)<sup>[5,6]</sup> 牢牢结合。而肿瘤在其发生发展过程中多处于缺血、缺氧及低糖的微环境下,在该条件下肿瘤细胞多处于应激状态,此时 pERK 与 GRP78 分离,并磷酸化激活,ERK 被激活后通过磷酸化真核细胞起始因子 2(eukaryotic initiation factor 2, eIF2) 抑制蛋白质合成。PERK/eIF2 $\alpha$  信号通路在降低内质网对新合成蛋白折叠需求压力的同时,还通过精细的调节机制,特异性的提高某些基因的转录水平,参与细胞的整合应激反应并诱导 GRP78 合成<sup>[7-9]</sup>。而 GRP78 是内质网应激诱导表达的关键蛋白。其意义在于能促进错误与未折叠蛋白恢复正常构像,使蛋白质能够在细胞应激状态下继续正确

合成,减少肿瘤细胞发生凋亡。

因此,研究 pERK 在此过程中的作用具有重要意义。目前认为,pERK 在乳腺癌、肝癌、头颈部鳞癌以及前列腺癌等多种肿瘤组织与细胞系中异常表达或活性增强<sup>[10,11]</sup>,表明 pERK 调控异常与肿瘤发生、发展密切相关。本组病例显示:胃癌组织中 pERK 阳性率为 83.3%,高于慢性萎缩性胃炎组织的 43.3%。而在浅表性胃炎组织中 pERK 阳性率为 5.0%。3 组间 pERK 蛋白的表达具有显著性差异。胃癌组织 pERK mRNA 的相对表达水平( $2.35 \pm 0.36$ )也明显高于浅表性胃炎组织( $0.68 \pm 0.10$ )( $P < 0.01$ );慢性



**Table 2 Relationship between expression of pERK and clinical characteristics of gastric cancer**

| Clinical characteristics    | n  | pERK     |          |        |
|-----------------------------|----|----------|----------|--------|
|                             |    | Positive | $\chi^2$ | P      |
| Age(years)                  |    |          |          |        |
| <60                         | 28 | 23       | 0.0536   | 0.817  |
| ≥60                         | 32 | 27       |          |        |
| Gender                      |    |          |          |        |
| Male                        | 48 | 40       | <0.001   | 1.000  |
| Female                      | 12 | 10       |          |        |
| Infiltration depth          |    |          |          |        |
| Inferiormucosemb-rane layer | 8  | 4        | 8.764    | 0.0545 |
| Muscular layer              | 32 | 28       |          |        |
| Serous layer                | 20 | 18       |          |        |
| Differentiation level       |    |          |          |        |
| Well differentiated         | 8  | 2        | 4.613    | 0.0083 |
| Mid-differentiated          | 41 | 38       |          |        |
| Poorly differentiated       | 11 | 10       |          |        |
| TNM stage                   |    |          |          |        |
| I                           | 7  | 4        | 4.2916   | 0.038  |
| II                          | 29 | 26       |          |        |
| III                         | 24 | 20       |          |        |
| Lymphatica metastasis       |    |          |          |        |
| Yes                         | 39 | 37       | 10.6913  | 0.001  |
| No                          | 21 | 13       |          |        |

萎缩性胃炎组织(1.18±0.25)高于浅表性胃炎组织( $P<0.05$ )。进一步证实 pERK 在 3 种胃组织中的表达差异,其中胃癌组织中低分化组阳性率高于中、高分化组( $P<0.01$ );TNM 分期中,Ⅱ期阳性率高于Ⅰ期阳性率( $P<0.05$ );Ⅲ期阳性率高于Ⅰ期阳性率,但差异无统计学意义,可能与例数较少有关,但仍提示随着分期增高 pERK 表达明显增高的趋势。有淋巴结转移组阳性率高于无淋巴结转移组( $P<0.01$ )。表明 pERK 在胃癌中高表达,且与分化程度、分期和淋巴结转移有明显相关性,pERK 在胃癌侵袭、转移进展中起着促进作用,预示着 pERK 可能是胃癌患者预后不良的指标。

综上所述,研究表明 pERK 在胃癌中高表达,与胃癌的分化、进展、转移密切相关。

参考文献:

[1] Liu HX,Sun YM,Wang HB. et al. Expression of pERK and MMP-9 in non-small cell lung cancer and the clinic significance [J]. Chin J Clin Oncol,2008,35 (14):819-

823. [刘宏侠,孙玉满,汪宏斌,等.pERK 和 MMP-9 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义 [J].中国肿瘤临床,2008,35(14):819-823.]

[2] Qi M,Elion EA. MAP kinase pathways[J]. J Cell Sci,2005,118(16):3569-3572.

[3] You JZ,Wang HB,Yang ZW,et al. Signal transduction pathways involved in promotion of proliferation and migration via p-ERK in high metastasis potential breast cancer cells [J]. Chin J Biochem Mol Biol,2006,22 (12):1007-1013. [尤嘉琮,汪宏斌,杨宗伟,等.高转移倾向乳腺癌细胞中 p-ERK 促进增殖和迁移作用的信号转导途径[J].中国生物化学与分子生物学报,2006,22(12):1007-1013.]

[4] Uzgar AR. Kaplan PJ,Greenberg NM. Differential expression and/or activation of P38MAPK,erk1/2,and jnk during the initiation and progression of prostate cancer [J]. Prostate, 2003,55(2):128-139.

[5] Moretti L,Yi Cha,Niermann KJ,et al. Switch between apoptosis and autophagy:Radiation-induced endoplasmic reticulum stress? [J]. Cell Cycle,2007,6(7):793-798.

[6] Xing X,Lai M,Wang Y,et al. Overexpression of glucose-regulated protein 78 in colon cancer [J]. Clin Chim Acta, 2006,364(1-2):308-315.

[7] Lv ZR,Liu XH. The roles of protein kinase R-like ER kinase signal pathway in endoplasmic reticulum stress [J]. Prog Physiol Sciences,2011,42(2):154-157. [吕振嵘,刘秀华. 蛋白激酶 R 样内质网激酶信号通路在内质网应激中作用的研究进展[J].生理科学进展,2011,42(2):154-157.]

[8] Daneshmand S,Quek ML,Lin E,et al. Glucose-regulated protein GRP78 is up-regulated in prostate cancer and correlates with recurrence and survival [J]. Human Pathol, 2007,38(10):1547-1552.

[9] Hsu WM,Hsieh FJ,Jeng YM,et al. GRP78 expression correlates with histologic differentiation and favorable prognosis in neuroblastic tumors [J]. Int J Cancer, 2005,113(6):920-927.

[10] Hua S,Yao M,Vignarajan S,et al. Cytosolic phospholipase A2α sustains pAKT,pERK and AR levels in PTEN-null/mutated prostate cancer cells [J]. Biochem Biophys Acta,2013,1831(6):1146-1157.

[11] Naugelkerke A,Bussink J,Mujcic H,et al. Hypoxia stimulates migration of breast cancer cells via the PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded protein response [J]. Breast Cancer Res,2013,15(1):R2.