

p-ERK-1 及相关因子在子宫内膜癌中的表达及意义

孔卫平¹, 孙冬霞¹, 时志民^{2*}, 吴彩花³, 李淑敏³

摘要: 目的 检测子宫内膜癌组织中 p-ERK-1、p-p38 和 ERK-1 mRNA 表达情况并探讨其意义。方法 采用原位分子杂交方法和免疫组织化学 S-P 法检测 60 例子宫内膜癌、32 例正常子宫内膜组织中三者的表达情况。结果 子宫内膜癌组织中 p-ERK-1 和 p-p38 表达定位于细胞核, ERK-1 mRNA 的表达于细胞浆, 其阳性表达率分别为 68.33% (41/60)、55.00% (33/60) 和 78.33% (47/60), 明显高于正常子宫内膜组织 ($P < 0.05$)。p-ERK-1、p-p38 蛋白和 ERK-1 mRNA 的表达与淋巴结转移、临床分期及病理分期有关 ($P < 0.05$), 在子宫内膜癌组织中 p-ERK-1 蛋白和 ERK-1 mRNA 表达存在一致性 ($P < 0.05$), 三者之间表达呈正相关 ($P < 0.05$)。结论 p-ERK-1、p-p38 蛋白和 ERK-1 mRNA 在子宫内膜癌呈高表达, 且与子宫内膜癌的发生、发展和转移密切相关。

关键词: 子宫内膜癌; p-ERK-1; p-p38; ERK-1 mRNA; 免疫组化; 原位分子杂交
中图分类号: R737.33 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2013)3-270-04

Expression and significance of p-ERK-1 in endometrial carcinoma. KONG Wei-ping¹, SUN Dong-xia¹, SHI Zhi-min² et al. (1. Handan Municipal Maternal and Child Health hospital, Handan 056002; 2. Hebei Engineering University Medical College, Handan 056001, Hebei, P. R. China; Corresponding author: SHI Zhi-min, E-mail: shizhimin1980@163.com)

Abstract: Objective To determine the expression of p-ERK-1, p-p38 and ERK-1 mRNA in the endometrial carcinoma and the significance. Methods The expressions of p-ERK-1, p-p38 and ERK-1 mRNA in 60 endometrial cancer cases and 32 normal endometrial tissues were detected by immunohistochemistry S-P. Results The expressions of p-ERK-1 and p-p38 were located with the cell nucleus and the endometrial. The expressions of ERK-1 mRNA was located with the cell plasma. The positive expression rates were 68.33% (41/60), 55.00% (33/60) and 78.33% (47/60) which were significantly higher than that in normal endometrial tissue in 0.0 ($P < 0.05$). All their expressions were related with myometrial invasion, lymph node metastasis, clinical stage and pathological phasing ($P < 0.05$). In endometrial carcinoma, the expressions of p-ERK-1, p-p38 and ERK-1 mRNA were positively correlated with each other ($P < 0.05$). Conclusions p-ERK-1, p-p38 and ERK-1 mRNA were highly expressed in the endometrial carcinoma cases and their expressions were related with the occurrence, development and metastasis of endometrial carcinoma.

Key words: Endometrial carcinoma; p-ERK-1; p-p38; ERK-1 Mrna; immunohistochemistry; In situ hybridization

子宫内膜癌为女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一,发病率仅次于子宫颈癌,在我国位于女性恶性肿瘤的第二位^[1]。本研究拟用原位分子杂交方法和免疫组化 S-P 检测正常子宫内膜、子宫内膜癌组织中 p-ERK-1 (磷酸化的 ERK-1)、p-p38 蛋白 (磷酸化的 p38) 和 ERK-1 mRNA 表达情况,分析这两种基因蛋白表达与子宫内膜癌生物学行为的关系,探讨这些因素对子宫内膜癌早期诊断和鉴别诊断的价值并结合临床指标进行分析,为临床进行早期诊断、病情监测和评估预后提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 选取 2009 年 1 月至 2012 年 3 月邯郸市妇幼保健院妇科子宫内膜癌手术切除子宫标本 60 例,平均年龄 52.22 岁,所有子宫内膜癌患者术前均未行放、化疗及激素治疗,取因子宫肌瘤或子宫脱垂

而手术切除子宫的正常子宫内膜标本 32 例,平均年龄 48.25 岁。按 2000 年 FIGO 标准进行临床病理分期及组织分级: Ⅰ期 15 例, Ⅱ期 24 例, Ⅲ期 12 例, Ⅳ期 9 例; G1 级 36 例, G2 级 13 例, G3 级 11 例。病灶局限于黏膜层及浸润 $\leq 1/2$ 肌层 44 例, 浸润 $> 1/2$ 肌层 16 例。

1.2 试剂与方法 常规免疫组化试剂盒 S-P、二硝基联苯胺 (DAB) 显色液及鼠抗人 p-ERK-1 和 p-p38 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。采用 SP 免疫组化法,方法操作按试剂盒说明书进行,取已知切片作为阳性对照,以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.3 原位杂交染色 ERK-1 原位杂交检测试剂盒购自武汉博士德生物有限公司。实验步骤: 石蜡切片制作至常规脱蜡、进水,用 3% 双氧水室温处理 10min, 双蒸水水洗 2 次,充分暴露 mRNA 核酸片段, 3% 胃蛋白酶室温消化 20min, 0.5mol/LPBS 洗 3 次, 每次

基金项目 河北省教育厅自然科学基金 (Q2012095)

作者单位: 1. 邯郸市妇幼保健院 河北 邯郸 056000; 2. 河北工程大学医学院 河北 邯郸 056001; 3. 邯郸市传染病医院 河北 邯郸 056002

作者简介: 孔卫平 (1976~), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 妇产科。

* 通讯作者 Email: shizhimin1980@163.com

5min ,然后水洗 1 次 ,放置于干的杂交盒中 ,每张切片加预杂交液 20 μ l ,42 $^{\circ}$ C 恒温箱 3h ,不洗 ,吸去多余液体 ,每张切片加杂交液 20 μ l ,专用盖玻片盖在切片上 ,42 $^{\circ}$ C 恒温箱过夜 ,37 $^{\circ}$ C SSC 洗涤 2 次 ,每次 5min ,37 $^{\circ}$ CSSC 洗涤 15min ,加封闭液 37 $^{\circ}$ C30min ,不洗 ,吸去多余液体 ,每张切片加生物素化鼠地高辛 2530min ,PBS 洗涤 4 次 ,每次 5min ,滴加过氧化物酶 37 $^{\circ}$ C20min ,PBS 洗涤 4 次 ,每次 5min ,DAB 显色 ,苏木素复染 ,水洗 ,脱水 ,透明 ,封片 ,采用预杂交液做阴性对照。

1.4 结果判断 p-ERK-1 和 p-p38 阳性定位于细胞核 ,ERK-1 mRNA 阳性信号分布于细胞浆 ,以各种抗体在细胞内出现棕黄色颗粒为阳性信号。参照 Parenti 等^[2]的标准 ,每张切片均随机观察 5 个高倍视野(\times 400) ,阳性细胞数 <5%为 (-) ,5%~25%为(+) ,25%~50%为(++) ,>50%为(+++)。以 +~+++ 均视为阳性表达 , - 视为阴性表达。

1.5 统计学分析 应用 SPSS 12.0 统计软件 ,计数资料采用 χ^2 检验。相互关系用等级相关分析 $P<0.05$ 为

差异有统计学意义。

2 结果

2.1 p-ERK-1、p-p38 和 ERK-1mRNA 在正常子宫内膜、子宫内膜癌组织中的表达情况 32 例正常子宫内膜组织 p-ERK-1、p-p38 和 ERK-1mRNA 表达分别有 4 例、0 例和 6 例阳性表达 ,60 例子官内膜癌组织中三者阳性表达有 41 例、33 例和 47 例(见表 1)。

2.2 p-ERK-1、p-p38 和 ERK-1mRNA 在子宫内膜癌中的表达与临床病理指标的关系 p-ERK-1 和 p-p38 蛋白表达与子宫内膜癌的病理分期、组织学分级、有无淋巴结转移及浸润深度有关($P<0.05$) ,ERK-1mRNA 与子宫内膜癌的病理分期、组织学分级及有无淋巴结转移及浸润深度有关($P<0.05$)(见表 1)。

2.3 p-ERK-1、p-p38 和 ERK-1mRNA 在子宫内膜癌组织中的相关性分析 p-ERK-1、p-p38 和 ERK-1 mRNA 在子宫内膜癌组织中的表达呈明显正相关 ,表明三者 in 子宫内膜癌的发生、发展中起到协同作用(见表 2、3、4)。

表 1 p-ERK-1、p-p38 和 ERK-1 mRNA 在正常子宫内膜及子宫内膜癌中的表达与临床病理关系

Tab 1 The expression of p-ERK-1、p-p38 and ERK-1 mRNA in Normal endometri and Endometrial Carcinoma with clinicopathologic factor

临床病理特征 Clinicopathologic feature(n)	p-ERK-1			p-p38			ERK-1 mRNA		
	+	-	P	+	-	P	+	-	P
正常子宫内膜 Normal endometrium(32)	4	28	<0.05	0	32	<0.05	6	26	<0.05
子宫内膜癌 Endometrial carcinoma(60)	41	19		33	27		47	13	
分级 Grade									
G1(36)	19	17	<0.05	13	23	<0.05	23	13	<0.05
G2-G3(24)	22	2		20	4		24	0	
临床分期 Clinical stag									
I-II(39)	22	17	<0.05	13	26	<0.05	33	6	<0.05
III-IV(21)	19	2		20	1		14	7	
淋巴结转移 Lymphnode metastasis									
+(36)	35	1	<0.05	28	8	<0.05	33	3	<0.05
-(24)	6	18		5	19		14	10	
肌层浸润 Myometrial invasion									
0 及 <1/2(44)	26	18	<0.05	18	26	<0.05	36	8	>0.05
>1/2(16)	15	1		15	1		11	5	
组织学亚型 Histological subtype									
内膜腺癌 Endometrioid adenocarcinoma(50)	35	15	>0.05	29	21	>0.05	41	9	>0.05
非内膜腺癌 Nonendometrioid adenocarcinoma(10)	6	4		4	6		6	4	

表 2 p-ERK-1 和 ERK-1 mRNA 在子宫内膜癌组织中表达的相关性分析

Table 2 Correlation of the expression between p-ERK-1and ERK-1 mRNA in Endometrial Carcinoma

p-ERK-1(41)	ERK-1 mRNA(47)	
	+	-
+	41	0
-	6	7

R=0.628 $P=0.000$

表 3 p-ERK-1 和 p-p38 在子宫内膜癌组织中表达的相关性分析

Table 3 Correlation of the expression between p-ERK-1and p-p38 in Endometrial Carcinoma

p-ERK-1(41)	p-p38(33)	
	+	-
+	29	12
-	4	15

R=0.465 $P=0.000$

表 4 p-p38 和 ERK-1 mRNA 在子宫内膜癌组织中表达的相关性分析

Table 4 Correlation of the expression between p-p38 and ERK-1 mRNA in endometrial carcinoma p-p38(33)

p-p38(33)	ERK-1 mRNA(47)	
	+	-
+	31	2
-	16	11

R=0.419 $P=0.001$

3 讨论

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK, mitogen-activated protein kinases)是细胞内广泛存在的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,它的主要作用是将细胞外的调节信号传递到细胞核上,所以说活化前的 MAPK 位于胞浆,一旦活化即进入核内激活靶基因,参与细胞的生长、发育等生理过程,在恶性肿瘤细胞发生、浸润等方面也发挥着一定作用^[3]。已发现 4 条 MAPK 信号通路: ERK、JNK、BMK 及 P38MAPK。其中 ERK(细胞外信号调节激酶)途径是 MAPK 中一条主要的和经典的并且与人类癌症关系最为密切的途径^[4-5]。ERK 通路受外界刺激决定细胞命运的关键,近年研究结果发现, ERK-1 的异常与肿瘤的发生发展有关,通过接受外界(多种生长因子、细胞因子等)刺激, ERK-1 有丝分裂原激活发生磷酸化, p-ERK-1 进入细胞核内,参与调节细胞周期及促进多种癌基因相关基因的转录与表达,并且破坏细胞外基质、促进肿瘤血管的生成,帮助肿瘤细胞进行运动而发生转移^[6-8]。本研究结果显示,用 ERK-1 作为探针在肿瘤细胞检测,能够准确的定位,增强特异性等特点,子宫内膜癌组织中 p-ERK-1 蛋白和 ERK-1 mRNA 阳性信号表达高于正常对照组织,提示 p-ERK-1 蛋白和 ERK-1 mRNA 的过表达可能在子宫内膜癌的恶性转化及其的发生发展中起促进作用,与病理分期、组织学分级及有无淋巴结转移及浸润深度有关($P<0.05$),提示 p-ERK-1 过表达在一定程度上可以反映子宫内膜癌的生物学特性,其表达水平越高,肿瘤的侵袭力越强,恶性度就越高。

p38MAPK 是 1993 年 Brewster 等发现,由 360 个氨基酸组成的分子量为 38KDa 的酪氨酸磷酸化蛋白激酶,与 JNK 同属应激活蛋白激酶。p38MAPK 的活化是由多级激酶的级联反应将三肽基结构 TGY(苏氨酸、甘氨酸、酪氨酸)中的苏氨酸和酪氨酸双磷酸化,这个级联反应为 MAPKKK-MKK3/6-p38MAPK^[9]。一旦被激活, p38 发生磷酸化后进入细胞核后调节

转录因子,影响基因转录、蛋白合成和细胞骨架结构改变,介导细胞增殖、分化、凋亡^[10]。本研究采用免疫组织化学分析磷酸化 p38(p-p38)在子宫内膜癌组织中表达情况,结果显示阳性表达主要位于细胞核内,在子宫内膜癌组织中呈过度表达,而在正常子宫内膜组织中不表达,差异有显著性($P<0.05$)。p-p38 与有无淋巴结转移、病理分期、浸润深度及组织学分级有关($P<0.05$),与肿瘤的病理组织类型无关($P>0.05$),提示 p-p38 的过度表达与子宫内膜癌的侵袭、转移及不良预后中密切相关。我们对 p-ERK-1 和 p-p38 在子宫内膜癌组织中表达进行相关性分析,发现 p-ERK-1 和 ERK-1 mRNA 的表达在子宫内膜癌中呈一致性, ERK-1 和 p-p38, ERK-1 mRNA 和 p-p38 经过相关性分析均呈明显正相关($P<0.05$),作用机制可能是通过某些生长因子、细胞因子和肿瘤启动子作用于 MAPK 途径磷酸化 ERK-1 和 p38,活化的后的 ERK-1(p-ERK-1)和 p38(p-p38)两者协同作用,将胞浆内信号导入细胞核,促进多种癌基因、细胞周期转录,导致细胞增殖、转化,已经证实两者共同作用于多种恶性肿瘤中,学者查阅大量文献未发现 p-ERK-1 和 p-p38 在子宫内膜癌组织的报道,通过本研究证实两者共同作用是促进子宫内膜癌发生、发展的生物学机制之一。

总之,子宫内膜癌组织中 p-ERK-1、ERK-1 mRNA 和 p-p38 处于过表达状态,与子宫内膜癌的发生、发展和转移密切相关。本研究结果将有助于进一步解析子宫内膜癌的发病机制,三者表达呈正相关,说明其肿瘤侵袭转移过程中存在某种相互调节作用。联合检测子宫内膜癌组织中三者的表达情况有助于指导临床治疗,为子宫内膜癌防治探索新思路。

参考文献:

- [1] Wu SM, Guo JL, Zhou C, et al. Expression of B-catenin and cyclin D1 in endometrial carcinoma patients and its clinical significance[J]. China Trop Med 2007, 11(7): 1997-1998. (In Chinese) (吴时敏, 郭峻莉, 周晟, 等. B-catenin 和 cyclin D1 在子宫内膜癌中表达及临床意义[J]. 中国热带医学 2007, 11(7): 1997-1998.)
- [2] Parenti A, Leo G, Porzionato A, et al. Expression of survivin p53, and caspase 3 in Barrett's esophagus carcinogenesis [J]. Hum Pathol 2006, 37: 16-22. (In Chinese)
- [3] Feng YD, Hao P, Zhu H, et al. The expression and correlation of ERK1/2 and Survivin in esophageal cancer [J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing (Natural Science) 2009, 29(8): 1085-1103. (In Chinese) (冯亚东, 郝波, 朱宏, 等. ERK1/2 和 Survivin 在食管癌中的表达及其相关性 [J]. 南京医科大学学报(自然科学) (下转第 281 页)

阶段中。Runx2 具有核心作用,因 Runx2 能激活与启动 MSCs 向 OB 系分化并能调节 OB 的成熟,因此 Runx2 作为 OB 特异性转录因子和 OB 分化的关键因子。ALP、BGP 及矿化结节的形成是 OB 的表型特征,Runx2 是 OB 特异性转录因子,这为我们进行细胞鉴定提供了依据。

本文选用三种不同的糖浓度(5.6mmol/l、25mmol/l、50mmol/l),分别代表正常糖浓度、高糖浓度及严重高血糖浓度。相关实验结果显示,随着实验组糖浓度的逐渐升高,OB 标记物 BGP、ALP 及 OB 特异性转录因子 Runx2 的 mRNA 表达均降低,即高血糖抑制 BMSCs 向 OB 分化,这与 Stolzing 等人的结果^[4]相一致。Stolzing 等发现高浓度糖可导致 BMSCs 的过早衰老、凋亡及死亡,抑制增殖。长期高血糖,导致过多的糖基化终末产物的形成。糖基化终末产物可影响蛋白质的理化性质,引起成骨作用降低,同时其还可刺激破骨细胞骨吸收因子 IL26、TNF2 α 的形成,导致骨吸收增加,引起骨量丢失^[5]。高血糖严重损伤了细胞对胰岛素样生长因子 -I (Insulin-like Growth Factor-I, IGF-I) 的应答性^[6,7],胰岛素样生长因子 -I 能明显增加前成骨细胞的形成、并能刺激 OB 的分化、增加骨胶原的合成和基质的沉积、诱导 OB 增殖。通过目前这些相关研究可以推测,机体高血糖状态可通过促进细胞内氧自由基的释放并激活线粒体的程序性凋亡,促使细胞 DNA 合成水平的下降,诱导细胞凋亡明显增加、增殖减少使后期参与分化的细胞减少,使

BMSCs 向 OB 分化减少,从而使 OB 的数量减少。

因此,控制血糖至理想水平,减少高糖毒性,有利于糖尿病患者减少骨量丢失,减少骨质疏松的发生。

参考文献:

- [1] Ren Hong, He Hongzhe, Zhao Rui et al. Diabetic osteoporosis in patients with silent killer[J]. Diabetes new world, 2005, 06: 24225. (任洪, 何红哲, 赵芮, 等. 糖尿病骨质疏松患者的无声杀手[J]. 糖尿病新世界, 2005, 06: 24225.)
- [2] Gimble JM, Zvonic S, Floyd ZE et al. Playing with bone and fat[J]. J Cell Biochem, 2006, 98(2): 251-66.
- [3] Lian JB and Stein GS. 1992. Transcriptional control of vitamin D-regulated proteins[J]. J Cell Biochem, 49: 37-45.
- [4] Stolzing A, Coleman N, Scutt A. Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells [J]. Rejuvenation research, 2006, 9(1): 31-35.
- [5] Yamamoto M. et al. Diabetes mellitus and osteoporosis. Predictive candidate markers for fracture risk in diabetic patients [J]. Clin Calcium, 2012 Sep, 22(9): 1359-65. doi: 10.1007/s12013-012-0365-5.
- [6] Gopalakrishnan V, Vignesh RC, Arunakaran J et al. Effects of glucose and its modulation by insulin and estradiol on BMSC differentiation into osteoblastic lineages[J]. Biochem Cell Biol, 2006 Feb, 84(1): 93-101.
- [7] Cheng H, Zhang YC, Wolfe S et al. Combinatorial treatment of bone marrow stem cells and stromal cell-derived factor 1 improves glycemia and insulin production in diabetic mice [J]. Mol Cell Endocrinol, 2011 Oct 15, 345 (1-2): 88-96. doi: 10.1016/j.mce.2011.07.024. Epub 2011 Jul 27.

收稿日期 2012-12-06 编辑 崔宜庆

(上接第 272 页)

版) 2009, 29(8): 1085-1103.)

- [4] Pao W, Cai B, Yang YX et al. Relationship between ERK1/2 signal transduction pathway and estrogen receptor and progesterone receptor in endometrial carcinoma[J]. J Shanghai Jiaotong University (Med Sci), 2009, 29(1): 5-8. (In Chinese) (鲍伟, 蔡斌, 杨懿霞, 等. 子宫内膜癌中 ERK1/2 信号转导通路与雌、孕激素受体的相关性 [J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2009, 29(1): 5-8.)
- [5] Wei SQ, Sui LH, Wei LH. Progress in research on protein kinase pathway in gynecological tumor mitogen-activated [J]. J Internat Obstetrics Gynecol, 2004, 31(1): 51-53. (In Chinese) (韦淑琴, 隋丽华, 魏丽惠. 丝裂原活化蛋白激酶通路在妇科肿瘤中的研究进展[J]. 国外医学妇产科学分册, 2004, 31(1): 51-53.)
- [6] Liu G, Yu WW. EBV, Ki67, ERK1 expression in breast cancer and their correlation [J]. Pract Clin Med, 2008, 9 (3): 129-133. (In Chinese) (刘刚, 俞微微. EBV、Ki67、ERK1 在乳腺癌中的表达及其相关性

[J]. 实用临床医学, 2008, 9(3): 129-133)

- [7] Maemura K, Shiraishi N, Sakagami K et al. Proliferative effects of gamma aminobutyric acid on the gastric cancer cell line are associated with extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation [J]. Gastroenterol Hepatol, 2009, 24: 688-696.
- [8] Zha Y, Gajewski TF. An adenoviral vector encoding dominant negative Cbl lowers the threshold for T cell activation in post-thymic T cells[J]. Cell Immunol, 2007, 247: 95-102.
- [9] Katsuji Yoshioka. Scaffold proteins in mammalian MAP kinase cascades[J]. J Biochem, 2004, 135(6): 657-661.
- [10] Zhang WJ, Li RS. Mitogen Activated Protein Kinase Pathway and its Research Progress [J]. Med Review, 2007, 13 (9): 663-665. (In Chinese) (张文军, 李荣山. p38 丝裂原活化蛋白激酶通路及其研究进展 [J]. 医学综述, 2007, 13(9): 663-665.)

收稿日期 2012-12-18 编辑 吴中菲