

文章编号:1005-6947(2004)04-0257-04

· 实验研究 ·

结直肠癌中 MEK2/ERK 信号传导通路的研究

张辉¹, 张有成¹, 王杉², 叶颖江², 崔志荣²

(1. 兰州医学院附属第二医院 普外科, 甘肃 兰州 730050; 2. 北京大学人民医院 外二科, 北京 100044)

摘要:目的 研究丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)中 MEK2/ERK 信号传导通路在结直肠癌发生发展中的作用。方法 (1)采用 Western blot 检测 52 例结直肠癌组织及其邻近肠黏膜中 MEK2 蛋白的表达。(2)用丝裂原细胞外激酶(MEK)抑制剂作用于结肠癌细胞系 SW480, 然后以 MTT 法检测细胞增殖状态;用 Western blot 检测 MEK2, p-ERK 及其靶基因产物 C-myc 的表达。结果 结直肠癌组织中 MEK2 蛋白表达水平明显高于邻近的肠黏膜 ($P < 0.05$), 且与肿瘤的分化、Dukes 分期及淋巴结转移有关 ($P < 0.05$)。应用 MEK 的抑制剂后 SW480 细胞中 MEK2, p-ERK, C-myc 表达水平随作用时间延长而下降。结论 MEK2 活性增高与结直肠癌细胞侵袭力有关, 阻断 MEK2/ERK 信号传导通路可以抑制结肠癌细胞的增殖, 促进其凋亡。

关键词: 结直肠肿瘤/病理学; 丝裂原活化蛋白激酶; 蛋白表达; MEK2/ERK 信号传导通路

中图分类号: R735.35; R730.3

文献标识码: A

Study of MEK2/ERK signal transduction pathway in the colorectal cancer

ZHANG Hui¹, ZHANG You-cheng¹, WANG Shan², YE Ying-jiang², CUI Zhi-rong²

(1. Department of General Surgery, The Second Affiliated Hospital, Medical College, Lanzhou 730050, China; 2. Department of Surgery, People's Hospital of Beijing University, Beijing 100044, China)

Abstract: Objective To study the role of MEK2/ERK signal transduction pathway in the development of colorectal cancer. **Methods** (1) Western blot analysis was performed on cancerous tissues and adjacent colonic tissues in 45 patients with colorectal cancers. (2) Human colorectal cancer cell line SW480 was treated with MEK inhibitor, and then MTT assay was used to measure the SW480 cells proliferation; and the expression of MEK2, p-ERK and C-myc in SW480 cells were measured by western blot. **Results** MEK2 protein level was increased in colorectal cancer compared with adjacent mucosa ($P < 0.05$). The overexpression of MEK2 in cancerous tissue was related to the Dukes stage, differentiation and lymph nodes metastasis ($P < 0.05$). There were significant correlation between MEK2 expression and clinicopathological parameters such as tumor size, serosa invasion and distant metastasis. SW480 treated with MEK inhibitor PD98059 resulted in significant growth inhibition and downregulation of MEK2, p-ERK and C-myc. **Conclusions** The increase of MEK2 may correlate with the invasive potentation of colorectal cancer. Blocking MEK2/ERK signal transduction pathway could inhibit the growth of SW480 cells.

Key words: COLORECTAL NEOPLASMS/pethol; MITUGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES; PROTEIN EXPRESSION; MEK2/ERK SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAY

CLC number: R735.35; R730.3

Document code: A

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 级联是细胞信号转导的重要途径, 能将募集的多种细胞外信号 (如生长因子、细胞因

子、肿瘤启动因子等) 通过磷酸化活化逐级转递至细胞核, 并激活多种核转录因子, 如 C-myc, C-jun 等, 参与细胞生长、发育、分裂及分化等多种生理过程, 并在细胞恶性转化及演进中起重要作用^[1]。作为 MAPK 信号传导通路中的重要一环——丝裂原细胞外激酶 (mitogen extracellular kinase, MEK), 可被多种炎症因子、生长因子和环境应激反应等激活, 导

收稿日期: 2003-03-07; 修订日期: 2003-12-18。

作者简介: 张辉 (1971-), 男, 甘肃天水人, 兰州医学院附属第二医院 (现在甘肃省兰州市第一人民医院) 主治医师, 主要从事结直肠肿瘤分子生物学方面的研究。

致细胞的增殖^[2,3]。但 MEK2/ERK 与结直肠癌增殖、分化、凋亡和发生发展的关系目前仍不清楚。本研究检测结直肠癌组织及其邻近肠黏膜中 MEK2 蛋白的表达,并探讨 MEK2/ERK 信号传导通路 with 结肠癌细胞增殖规律的关系,分析其在结直肠癌发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 标本来源及处理

连续收集北京大学人民医院外二科 2001 年 2 月~2002 年 7 月经手术切除的结直肠癌标本 52 例。男 27 例,女 25 例。年龄 35~81 岁,中位年龄 66 岁。组织学类型:高分化结直肠癌 15 例,中分化结直肠癌 23 例,低分化结直肠癌 14 例。Dukes 分期:A 期 3 例,B 期 26 例,C 期 16 例,D 期 7 例。于肿瘤切除后 30 min 内采集结直肠癌组织,同时取距肿瘤边缘大于 5 cm 的肠黏膜组织作为对照。所有标本立即置于液氮中保存。

1.2 细胞培养

人结肠癌细胞系 SW480 购于中国协和医科大学基础部。用含有 10% 胎牛血清的(美国 HyClone 公司) RPMI1640 培养基(美国 GIBCOBRL 公司)于 37℃ 细胞孵箱中传代培养。

1.3 细胞增殖状态检测(MTT 法)

接种细胞于 96 孔板,贴壁后,无血清培养细胞 16~24 h,使细胞同步化。空白对照组加无血清培养基。信号阻断组加入 MEK 抑制剂 PD980590,分别为 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$;第 0, 1, 2, 3 天分别加入 MTT 5 mg/ml(美国 Sigma 公司),继续培养 4 h;每孔加入 DMSO 200 μl ;酶标仪测定 540 nm 吸收值,绘制生长曲线。

1.4 细胞核蛋白及组织总蛋白提取与 Western blot 检测

1.4.1 细胞核蛋白提取 根据 Kim^[4] 方法提取 SW480 细胞核蛋白。

1.4.2 组织总蛋白提取 参照 Santa Cruz 公司蛋白提取方法,应用 RIPA 缓冲液分别裂解结直肠癌与对照肠黏膜组织得到组织总蛋白。

1.4.3 蛋白浓度测定方法(Bradford 法) 以牛血清蛋白(BSA)作为标准品,根据蛋白定量试剂盒

(美国 Bio-Rad 公司)的说明绘制蛋白定量标准曲线,于分光光度计 595 nm 下测光密度值,计算提取液蛋白浓度。

1.4.4 杂交信号的检测 核蛋白样品(20 μg)经 7.5% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳后,电转移至 PVDF 膜(Millipore 公司);每例组织标本取总蛋白 100 μg ,7.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转移到 PVDF 膜(Millipore 公司),封闭后,加入一抗(MEK2, p-ERK, C-myc 美国 Santa Cruz 公司,工作浓度 1:1 000),二抗(辣根过氧化物酶结合的抗体,英国 Amersham 公司,工作浓度 1:1 000)。用 ECL(英国 Amersham 公司)化学发光试剂盒检测杂交信号。

1.5 光密度测定

用密度扫描仪(ZEISS 全自动图像分析仪,VIDAS 数据分析)测定条带的光密度值(OD 值),以光密度值代表 MEK2 蛋白的相对表达量。计算每例标本中肿瘤与对照肠黏膜组织光密度的比值(MEK2_{肿瘤}/MEK2_{对照肠黏膜})。

1.6 统计方法

使用 SPSS 10.0 统计学软件,数据处理采用独立样本 *t* 检验、配对样本 *t* 检验,单因素方差分析, $P < 0.05$ 时为有统计学差异。

2 结果

2.1 MEK2 表达水平

52 例结直肠癌标本中,MEK2 蛋白平均表达水平明显高于对照肠黏膜($t = 3.343$, $P = 0.002$),平均为对照肠黏膜的 2.45 倍;其中 33 例(63.5%)结直肠癌组织的 MEK2 蛋白表达水平高于对照肠黏膜(表 1)。

表 1 MEK2 在结直肠癌中的表达

| 项目 | 例数 | MEK2 OD 值 | <i>F</i> (<i>t</i>) 值 | <i>P</i> 值 |
|------|----|--------------------|-------------------------|------------|
| 结直肠癌 | 52 | 140930 \pm 95033 | 3.343 | 0.002 |
| 对照黏膜 | 52 | 98651 \pm 69366 | | |

2.2 结直肠癌组织中 MEK2 蛋白表达与各临床病理特征的关系

中分化结直肠癌 MEK2 蛋白表达水平明显高于

低分化者 ($P = 0.030$); Dukes C, D 期结直肠癌 MEK2 蛋白表达水平明显高于 A, B 期 ($t = 2.352$, $P = 0.023$); 有淋巴结转移的结直肠癌 MEK2 蛋白表达水平明显高于无淋巴结转移者 ($t = 2.601$, $P = 0.013$) (表 2, 3)。

MEK2 蛋白表达水平与肿瘤大小、浆膜侵犯、年龄、性别以及是否远处转移无关 ($P > 0.05$) (表 3)。

表 2 MEK2 表达情况与结直肠癌分化的关系 ($\bar{x} \pm s$)

| 分化程度 | 例数 | MEK2 平均值 |
|------|----|-----------------------------|
| 高分化 | 15 | 123825 ± 111877 |
| 中分化 | 23 | 172472 ± 86112 [†] |
| 低分化 | 14 | 96508 ± 75408 |

注:†与低分化比较 $P < 0.05$

表 3 MEK2 表达情况与临床病理特征的关系 ($\bar{x} \pm s$)

| | 例数 | MEK2 表达平均倍数 [†] | F (t) 值 | P 值 |
|----------|----|--------------------------|---------|-------|
| Dukes 分期 | | | | |
| C, D 期 | 23 | 3.567 ± 4.172 | 2.352 | 0.023 |
| A, B 期 | 29 | 1.554 ± 0.893 | | |
| 淋巴结 | | | | |
| 有 | 22 | 3.786 ± 4.352 | 2.601 | 0.013 |
| 无 | 30 | 1.557 ± 0.861 | | |
| 侵犯浆膜 | | | | |
| 有 | 27 | 2.269 ± 2.330 | -0.402 | 0.690 |
| 无 | 25 | 2.634 ± 3.612 | | |
| 远处转移 | | | | |
| 有 | 7 | 2.677 ± 1.738 | 0.302 | 0.768 |
| 无 | 45 | 2.414 ± 3.160 | | |
| 肿瘤大小 | | | | |
| >5cm | 24 | 2.170 ± 2.547 | -0.610 | 0.545 |
| <5cm | 28 | 2.715 ± 3.407 | | |
| 年龄 | | | | |
| >65 | 25 | 2.469 ± 3.134 | 0.043 | 0.966 |
| ≤65 | 27 | 2.430 ± 2.928 | | |
| 性别 | | | | |
| 男 | 27 | 1.999 ± 2.126 | -1.041 | 0.306 |
| 女 | 25 | 2.962 ± 3.746 | | |

注:†平均倍数为 MEK2_{肿瘤} / MEK2_{对照肠黏膜} 的平均值

2.3 MEK 抑制剂对 SW480 细胞增殖的影响

加入 MEK 抑制剂 PD98059 后, SW480 细胞增殖水平下降, 而相应空白对照组变化不明显 (图 1, 2)。SW480 细胞增殖水平随 MEK 抑制剂浓度增加而下降 (图 2)。

图 1 MEK 抑制剂对 SW480 细胞增殖水平的影响

图 2 不同浓度 MEK 抑制剂对 SW480 细胞增殖水平的影响

2.4 PD98059 对 SW480 细胞中 MEK2, p-ERK 和 C-myc 表达的影响

加入 PD98059 的 SW480 细胞中 MEK2, p-ERK 和 C-myc 表达水平随作用时间延长而下降 (20 μmol/L) (图 3)。

图 3 PD98059 对 SW480 细胞中 (20 μmol/L) 中核蛋白 MEK2, p-ERK 和 C-myc 水平的影响

3 讨论

结直肠癌是常见的恶性肿瘤之一, 在欧美国家有较高的患病率。近年来, 我国结肠癌患病率也迅

速上升。研究发现,细胞内信号传导通路与肿瘤发生发展密切相关,其中 MAPK 信号传导通路受到广泛关注。MAPK 是信号从细胞表面传递到细胞核内部的重要介质,其中 Ras-Raf-MEK-ERK 信号传导通路与细胞的增殖、分化、凋亡密切相关,MEK 是其中的重要一环,它具有酪氨酸、苏氨酸活性,活化其下游的 ERK-1 和 ERK-2,后者进入细胞核,作用于转录因子,进而诱导某些基因的表达,最终导致细胞的增殖^[3]。研究发现^[5],MEK 第 217 位点和第 221 位点的丝氨酸突变为谷氨酸后,MEK 的活性异常增高,结果导致细胞转化。而 MAPKs 中 MEK 的激活在肿瘤细胞的增殖及转移中扮演着重要角色^[6]。有关人结直肠癌中 ERKs 蛋白及其上游激酶 MEKs 蛋白的表达和活性以及此信号传导通路在结直肠癌发生、发展和治疗中的意义的研究尚处于早期阶段^[7]。

本实验发现:结直肠癌组织中 MEK2 蛋白表达水平明显高于对照肠黏膜,为对照组的 2.45 倍。MEK2 表达水平与 Dukes 分期、分化及淋巴结转移有关($P < 0.05$)。提示 MEK2 过度表达可能与结直肠癌恶性度高和预后不良有关。

笔者在用 MTT 法检测细胞增殖状态时发现,加入 MEK 抑制剂后,SW480 细胞增殖水平随时间延长和浓度增加而下降,而相应空白对照组变化不明显。Western blot 检测显示:抑制剂组 SW480 细胞中 MEK2, p-ERK 及 C-myc 表达水平随作用时间延长而下降。提示在结肠癌细胞 SW480 中,MEK/ERK 信号传导通路可能通过调节 C-myc 的表达而影响结肠癌细胞的增殖。Ding^[8]等发现,MAPK 活性及激酶水平与结肠癌细胞分化及凋亡密切相关,用 MEK 抑制剂后可逆转其恶性增殖。Kim^[4]的研究证实,MAPKs 与 NF-kappaB, PPARgamma 交互作用影响了结肠癌细胞的凋亡过程,而其中 MEK/ERK 途径显得尤为突出,本研究结果与之相似。

MEK/ERK 信号通路在人类恶性肿瘤中普遍存在,用 MEK 抑制剂直接阻断其通路,抑制了其靶基因产物 C-myc 的表达,可能在 SW480 细胞增殖抑制的进程中起重要作用。对信号通路阻断的研究

有可能会发现新靶点的抗癌药物^[9]。深入研究 MEK/ERK 信号传导通路作用机制将为判断疾病的预后及治疗提供理论基础,有可能成为结直肠癌治疗的新方向。

本课题主要工作在北京大学人民医院外科肿瘤实验室完成,特此感谢!

参考文献:

- [1] Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinase [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(16):16483 - 16486.
- [2] Zheng CF, Guan KL. Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinase, MEK-1 and MEK-2 [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(15):11435 - 11439.
- [3] Cowley S, Paterson H, Kemp P, *et al*. Activation of MAP kinase is necessary and sufficient for PC-12 differentiation and for transformation of NIH3T3 cell [J]. *Cell*, 1994, 77(6):841 - 852.
- [4] Kim TI, Jin SH, Kang EH, *et al*. The role of mitogen-activated protein kinases and their relationship with NF-kappaB and PPARgamma in indomethacin-Induced apoptosis of colon cancer cells [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 973:241 - 245.
- [5] Fiddes RJ, Janes PW, Sivertsen SP, *et al*. Inhibition of the MAP kinase cascade blocks heregulin-induced cell cycle progression in T-47D human breast cancer [J]. *Oncogene*, 1998, 16(21):2803 - 2813.
- [6] Nakata H, Wang SL, Chung DC, *et al*. Oncogenic ras induces gastrin gene expression in colon cancer [J]. *Gastroenterology* 1998, 115(5):1144 - 1153.
- [7] Cassano A, Bagala C, Battelli C, *et al*. Expression of vascular endothelial growth factor, mitogen-activated protein kinase and p53 in human colorectal cancer [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(4):2179 - 2184.
- [8] Ding Q, Wang Q, Evers BM. Alterations of MAPK activities associated with intestinal cell differentiation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 284(2):282 - 288.
- [9] Wang Q, Ding Q, Dong Z, *et al*. Downregulation of mitogen-activated protein kinases in human colon cancers [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(1A):75 - 83.