

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.03.04

❖ 基础研究 ❖

细胞外信号调节激酶 1/2 在肾癌中的表达及临床意义

李峰, 赵涛, 邵继春

(核工业四一六医院泌尿外科, 四川 成都 610051)

【摘要】目的: 探讨细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2) 及其磷酸化状态 (p-ERK1/2) 在肾癌中的表达及临床意义。**方法:** 选取 78 例肾癌患者的肾癌组织及距离病灶超过 3 cm 的癌旁组织, 免疫组织化学法检测 ERK1/2 及 p-ERK1/2 表达情况, 比较性别、年龄、肿瘤直径、临床分期、淋巴结转移、远处转移、病理 Fuhrman 分级与癌组织 ERK1/2 及 p-ERK1/2 的关系, 并通过 Kaplan-Meier 生存分析癌组织中 ERK1/2、p-ERK1/2 与肾癌患者生存情况的相关性。**结果:** 肾癌组织中 ERK1/2 及 p-ERK1/2 阳性表达率均高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。不同性别、年龄、肿瘤直径患者癌组织 ERK1/2 及 p-ERK1/2 阳性表达率之间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 临床分期为 III-IV 期、有淋巴结转移、远处转移、病理 Fuhrman 分级为 G2 + G3 者的癌组织中 ERK1/2 及 p-ERK1/2 阳性表达率分别高于临床分期 I-II 期、无淋巴结转移、远处转移、病理 Fuhrman 分级为 G1 者 ($P < 0.05$)。Kaplan-Meier 生存分析结果显示, 相较于 ERK1/2、p-ERK1/2 阴性表达者, 肾癌组织中 ERK1/2、p-ERK1/2 阳性表达的患者生存情况较差 ($P < 0.001$)。**结论:** ERK1/2 及 p-ERK1/2 在肾癌组织高表达, 且与患者临床分期、淋巴结转移、远处转移、病理 Fuhrman 分级及生存期相关。

【关键词】 肾癌; 细胞外信号调节激酶 1/2; 磷酸化状态; 临床意义

【中图分类号】 R737.11; R730.26 **【文献标志码】** A

Expression of extracellular signal-regulated kinase 1/2 in renal carcinoma and its clinical significance

LI Feng, ZHAO Tao, SHAO Ji-chun

(Department of Urology, 416 Hospital of Nuclear Industry, Chengdu 610051, Sichuan, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the expression and clinical significance of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and its phosphorylation state (p-ERK1/2) in renal carcinoma. **Methods:** The resected renal cell carcinoma and the adjacent tissue more than 3 cm away from the lesion were taken from 78 patients with renal cell carcinoma. The expressions of ERK1/2 and p-ERK1/2 in different tissues were detected by immunohistochemistry (three-step method), and their relationship with different gender, age, tumor diameter, clinical stage, lymph node metastasis, distant metastasis and pathological Fuhrman grade were compared. The correlation between the expression of ERK1/2, p-ERK1/2 and the survival of patients with renal cell carcinoma was also analyzed by Kaplan Meier survival analysis. **Results:** The positive expression rates of ERK1/2 and p-ERK1/2 in cancer tissue were significantly higher than those in adjacent tissues ($P < 0.05$). There was no significant difference in the positive rates of ERK1/2 and p-ERK1/2 between patients with different gender, age and tumor diameter ($P > 0.05$). The positive expression rates of ERK1/2 and p-ERK1/2 in patients with clinical stage III-IV, lymph node metastasis, distant metastasis and pathological Fuhrman grade G2 + G3 were obviously higher than those with clinical stage I-II, no lymph node metastasis, no distant metastasis, pathological Fuhrman grade G1, respectively ($P < 0.05$). Kaplan Meier survival analysis showed that compared with the negative expression of ERK1/2 and p-ERK1/2, the survival of patients with positive expression of ERK1/2 and p-ERK1/2 was worse ($P < 0.001$). **Conclusion:** ERK1/2 and p-ERK1/2 are highly expressed in renal carcinoma tissue, and their expression levels are correlated with clinical stage, lymph node metastasis, distant metastasis, pathological Fuhrman grade and survival time.

【Key words】 Renal carcinoma; Extracellular signal-regulated kinase 1/2; Phosphorylation state; Clinical significance

肾癌属于泌尿系统恶性肿瘤。据统计, 全球范围内每年新增肾癌患者约 27 万例肾癌, 死亡人数接近 11.6 万, 目前发病率呈上升趋势, 可能与生活环境、饮食习惯的改变及诊断技术的改进有关^[1]。临

床研究证实, 肾癌患者对放疗、化疗不敏感, 手术是治疗早期肾癌的首选方式^[2], 但仍有很大一部分患者术后复发、预后较差。随着研究的不断深入, 多种基因的异常表达已被证实参与恶性肿瘤的侵袭与转

移。细胞外调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2) 为丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 家族成员, 是通过上游 MAPK 1/2 磷酸化而激活的蛋白激酶/苏氨酸激酶, 该信号通路是由各种细胞外刺激和细胞内信号传导启动的, 并最终作用于多种生理和病理途径^[3]。近期, Hoerner 等^[4]指出, 磷酸化的 ERK1/2 (p-ERK1/2) 的作为一种关键的癌症信号蛋白, 与肾癌的发生及发展密切相关; Lee 等^[5]也证实 ERK1/2 在肾透明细胞癌中的表达水平与患者预后相关。本研究通过检测 78 例肾癌患者癌组织及癌旁组织中 ERK1/2 及 p-ERK1/2 的表达情况, 结合患者临床资料分析其临床意义, 探讨其在肾癌发生发展中的作用, 为探寻肾癌致病分子机制及治疗方向积累数据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2015 年 6 月至 2019 年 1 月于核工业四一六医院行手术切除的 78 例肾癌患者为研究对象。入组标准: (1) 符合《中国肾癌临床治疗指南: 2015 版》中肾癌诊断标准^[6]经术后病理切片确认; (2) 首次行手术切除治疗; (3) 术前均未接受放疗、化疗; (4) 临床资料完整。排除标准: 合并其他恶性肿瘤患者。78 例肾癌患者中, 男性 50 例, 女性 28 例; 年龄 42 ~ 80 岁, 平均 (61.35 ± 18.28) 岁; 临床分期 I - II 期患者 46 例, III - IV 期患者 32 例; 淋巴结转移患者 20 例, 远处转移患者 16 例; 病理 Fuhrman 分级为 G1 者 33 例, G2 + G3 者 45 例。78 例肾癌患者经门诊或电话随访 12 ~ 60 个月, 随访截止日期为 2020 年 1 月 31 日。本研究经医院伦理委员会批准, 患者自愿参加试验并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 小鼠抗人 ERK1/2 单克隆抗体、小鼠抗人 p-ERK1/2 单克隆抗体 (货号: AM2189b) 购自美国 ABGENT 公司, 兔抗小鼠二抗 (货号: PAB9358) 购自上海群己生物科技有限公司, DAB 显色试剂盒 (货号: AR1022) 购自武汉博士德生物工程有限公司。ERK1/2 及 p-ERK1/2 阳性对照为已知染色阳性的肾癌组织切片, 以磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 代替一抗为阴性对照。

1.2.2 免疫组化法 (三步法) 测定 ERK1/2 及 p-ERK1/2 表达 将手术切除的肾癌及距离病灶超过 3 cm 的癌旁组织, 采用 10% 的甲醛溶液固定, 制成石蜡标本, 将标本制备成厚度为 4 μm 的组织切片; 采用二甲苯进行脱蜡, 15 min × 3 次; 采用浓度为

90%、85%、75%、70% 的乙醇依次浸片, 每次 5 min; 为避免内源性过氧化物酶造成影响, 采用 3% 的 H₂O₂/甲醇溶液浸泡 10 min; 采用 0.125% 的乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 胰蛋白酶抗修复液进行 30 min 的修复; 采用胎牛血清封闭 30 min, 加入一抗小鼠抗人 ERK1/2/p-ERK1/2 单克隆抗体 (1:150) 于 4 °C 条件下孵育过夜; 于次日加入标记生物素的二抗羊抗兔 IgG (1:5 000) 室温条件下孵育 30 min, 加入二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 显色液, 采用自来水充分冲洗后, 采用苏木素染色、脱水、透明、中性树胶封固。

1.2.3 结果判定 采用双盲阅片法, 由病理科医师于光镜下对阳性细胞的数量进行观察, ERK1/2 及 p-ERK1/2 阳性表达均为细胞核或细胞质内出现黄色或棕黄色颗粒。随机选取 10 个高倍视野 (×400) 对阳性细胞进行计数, 参照 Beeskey 分级方法, 每个视野选取 100 个细胞, 以阳性细胞数 ≥ 10% 为阳性, 以无阳性细胞或阳性细胞数 < 10% 为阴性。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 计数资料以 [*n* (%)] 表示, 组间比较采用 χ^2 分析。采用 Kaplan-Meier 法绘制肾癌患者的生存曲线。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾癌组织与癌旁组织中 ERK1/2 及 p-ERK1/2 表达情况比较

肾癌组织中, ERK1/2 及 p-ERK1/2 阳性表达率均高于癌旁组织, 差异具有统计学意义 (*P* < 0.05), 见表 1、图 1。

表 1 肾癌组织与癌旁组织中 ERK1/2 及 p-ERK1/2 表达情况比较 [*n* (%)]

	肾癌组织	癌旁组织	χ^2 值	<i>P</i> 值
ERK1/2 阳性	23 (29.49)	12 (15.38)	4.457	0.035
p-ERK1/2 阳性	47 (60.26)	22 (28.21)	16.242	< 0.001

2.2 不同病理特征肾癌患者癌组织中 ERK1/2 及 p-ERK1/2 表达情况比较

不同性别、年龄、肿瘤直径患者癌组织 ERK1/2 及 p-ERK1/2 阳性表达率比较, 差异无统计学意义 (*P* > 0.05); 临床分期为 III - IV 期、有淋巴结转移、远处转移、病理 Fuhrman 分级为 G2 + G3 者癌组织中 ERK1/2 及 p-ERK1/2 阳性表达率分别高于临床分期 I - II 期、无淋巴结转移、远处转移、病理 Fuhrman 分级为 G1 者, 差异具有统计学意义 (*P* < 0.05)。见表 2。

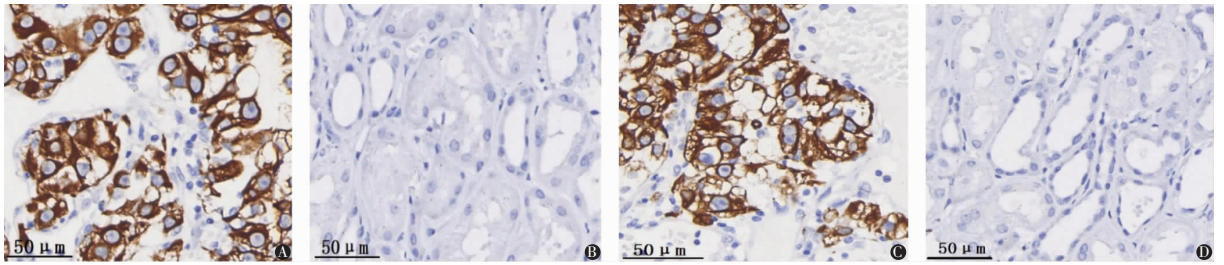


图 1 肾癌组织与癌旁组织中 ERK1/2 及 p-ERK1/2 蛋白表达

A.ERK1/2 阳性表达;B.ERK1/2 阴性表达;C.p-ERK1/2 阳性表达;D.p-ERK1/2 阴性表达。

表 2 不同分期肾癌患者癌组织中 ERK1/2 及 p-ERK1/2 表达情况比较 [n (%)]

指标	例数	ERK1/2 阳性	χ^2 值	P 值	p-ERK1/2 阳性	χ^2 值	P 值
性别			0.018	0.894		0.177	0.674
男	50	15(30.00)			31(62.00)		
女	28	8(28.57)			16(57.14)		
年龄(岁)			0.053	0.818		1.306	0.253
>60	49	14(28.57)			28(57.14)		
≤60	29	9(31.03)			21(72.41)		
肿瘤直径(cm)			0.347	0.556		0.193	0.661
>5	30	10(33.33)			19(63.33)		
≤5	48	13(27.08)			28(58.33)		
临床分期			7.890	0.005		4.925	0.026
I - II 期	46	8(17.39)			23(50.00)		
III - IV 期	32	15(46.88)			24(75.00)		
淋巴结转移			8.420	0.004		4.378	0.036
有	20	11(55.00)			16(80.00)		
无	58	12(20.69)			31(53.45)		
远处转移			10.551	0.001		6.239	0.013
有	16	10(62.50)			13(87.50)		
无	52	13(20.97)			34(53.23)		
病理 Fuhrman 分级			5.654	0.017		10.396	0.001
G1	33	5(15.15)			13(39.39)		
G2 + G3	45	18(40.00)			34(75.56)		

2.3 癌组织中 ERK1/2、p-ERK1/2 表达情况与肾癌患者生存情况的相关分析

Kaplan-Meier 生存分析结果显示,相较于 ERK1/2、p-ERK1/2 阴性表达者,肾癌组织中 ERK1/2、p-ERK1/2 阳性表达的患者生存情况较差 ($\chi^2 = 20.207, P < 0.001; \chi^2 = 17.132, P < 0.001$)。见图 2。

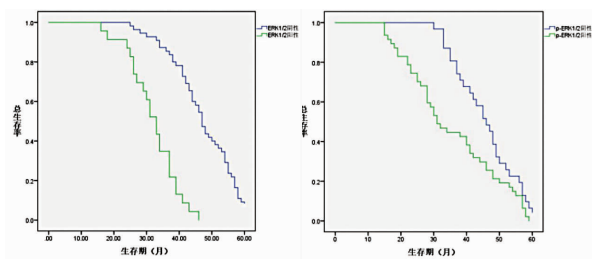


图 2 基于 ERK1/2 和 p-ERK1/2 表达的肾癌患者 Ka-plan-Meier 生存曲线

3 讨论

肾脏恶性肿瘤占恶性肿瘤的 2%^[7],是世界上第 13 位最常见的恶性肿瘤,肾癌的发病率在发达国家较高,欧洲和北美的发病率普遍高于印度、非洲和中国^[8]。肾癌的发生发展涉及多种因素,随着表观遗传学研究的不断深入,MAPK/ERK 信号通路在一定程度上决定了细胞分裂、分化及凋亡,与恶性肿瘤的发生及发展密切相关,ERK1/2 是该通路上较多的蛋白激酶,也是 MAPK/ERK 信号通路的主要调节因子,正常情况下,位于胞浆内的 ERK1/2 处于静止状态,磷酸化后的 ERK1/2 被激活后成为 p-ERK1/2,可快速转移至细胞核,对转录因子活性进行调节,最终改变细胞代谢与功能,参与形成恶性肿瘤细胞特定的恶性生物学过程^[9-10]。本研究中,78 例患者癌组织中 ERK1/2 及 p-ERK1/2 阳性表达率均高于癌旁组织 ($P < 0.05$),提示其与肾癌的发生密切相关。刘玉等^[11]发现 ERK1/2 在食管鳞癌石蜡标本癌组织中阳性表达率显著高于对应癌旁组织;Sinha 等^[12]发现人透明细胞肾细胞癌细胞内 ERK1/2 激活,两者均与本文研究结论基本一致。

通过进一步分析发现,临床分期为 III-IV 期、有淋巴结转移、远处转移、病理 Fuhrman 分级为 G2 + G3 者的癌组织中 ERK1/2 及 p-ERK1/2 阳性表达率更高。仝伟兵等^[13]发现,p-ERK1/2 阳性表达与患者临床分期、肿瘤分化程度以及淋巴结转移情况密切相关;王艳军等^[14]表明,ERK1/2 蛋白表达水平增加可能参与肝内胆管细胞癌进展;程杨等^[15]证实 ERK1/2 激活后,宫颈癌细胞株 SiHa 细胞侵袭能力明显增强。本研究中 Kaplan-Meier 生存分析结果显示,肾癌组织中 ERK1/2、p-ERK1/2 阳性表达的患者生存情况较差。Zhao 等^[16]指出,p-ERK1/2 的表达被抑制后,肾癌细胞的增殖、迁移和侵袭活性随之受到抑制;Gao 等^[17]指出,p-ERK1/2 高表达的肝癌患者的总生存期及无复发生存期均较差;Zhao 等^[18]发现,ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白的阳性表达与非小细胞肺癌患者不良预后相关;Fan 等^[19]指出,在首

次确诊的多发性骨髓瘤患者中,p-ERK1/2 的高表达与总生存期及无复发生存期缩短显著相关;Lee 等^[5]发现 p-ERK1/2 的高表达与无进展生存期缩短相关,不良预后风险较高,以上均与本研究结论一致。但是,本研究样本量较少,研究结论仍需大样本多中心试验进行验证,ERK1/2 能否作为肾癌的治疗靶点,仍需进一步分析。

综上所述,肾癌组织中存在 ERK1/2 及 p-ERK1/2 的高表达,且其表达水平与患者临床分期、淋巴结转移、远处转移、病理 Fuhrman 分级及生存期相关。

参考文献

- [1] Al-Bayati O, Hasan A, Pruthi D, *et al.* Systematic review of modifiable risk factors for kidney cancer[J]. *Urol Oncol*, 2019, 37(6): 359 - 371.
- [2] 王振誉, 郑兵, 朱华, 等. 层面解剖在后腹腔镜肾癌根治术中的应用效果[J]. *川北医学院学报*, 2019, 34(6): 690 - 693.
- [3] Collier JB, Schnellmann RG. Extracellular signal - regulated kinase 1/2 regulates NAD metabolism during acute kidney injury through microRNA-34a-mediated NAMPT expression [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(18): 3643 - 3655.
- [4] Hoerner CR, Massoudi R, Metzner TJ, *et al.* Multiregion Quantification of Extracellular Signal-regulated Kinase Activity in Renal Cell Carcinoma[J]. *Eur Urol Oncol*, 2020, 3(3): 360 - 364.
- [5] Lee HJ, Kim DI, Kang GH, *et al.* Phosphorylation of ERK1/2 and prognosis of clear cell renal cell carcinoma [J]. *Urology*, 2009, 73(2): 394 - 399.
- [6] CSCO 肾癌专家委员会. 中国肾癌诊治指南: 2015 版[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 1 - 44.
- [7] Turajlic S, Swanton C, Boshoff C. Kidney cancer: The next decade [J]. *J Exp Med*, 2018, 215(10): 2477 - 2479.
- [8] Diaz de Leon A, Pedrosa I. Imaging and Screening of Kidney Cancer[J]. *Radiol Clin North Am*, 2017, 55(6): 1235 - 1250.
- [9] 李倩, 刘颖, 郭君兰. 红景天苷对人肺癌 A549 细胞裸鼠移植瘤生长的影响及对 MAPK/ERK1/2 信号通路的调控作用[J]. *中医学报*, 2020, 35(7): 1469 - 1476.
- [10] 陈磊, 周茂军, 肖湘成, 等. 甘氨酸脱氧胆酸钠通过 MAPK/ERK1/2 介导 Bel-2 在 Ser70 位点的磷酸化引起人肝细胞癌的抗药[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2020, 36(1): 97 - 102.
- [11] 刘玉, 王子安. 食管鳞癌中 CD151、ERK1/2 及血管生成拟态的表达及临床意义[J]. *肿瘤学杂志*, 2019, 25(4): 330 - 334.
- [12] Sinha S, Dwivedi N, Tao S, *et al.* Targeting the vasopressin type-2 receptor for renal cell carcinoma therapy [J]. *Oncogene*, 2020, 39(6): 1231 - 1245.
- [13] 仝伟兵, 苏秀兰, 贾永峰, 等. ERK1、ERK2 及磷酸化的 ERK1/2 在结直肠癌中的表达及临床意义[J]. *内蒙古医科大学学报*, 2018, 40(1): 11 - 16, 20.
- [14] 王艳军, 王高雄, 黄天从, 等. 高迁移率族蛋白 1 通过调控 Erk1/2、Cyclin D1 及 MMP14 蛋白促进肝内胆管细胞癌进展[J]. *第三军医大学学报*, 2019, 41(5): 430 - 436.
- [15] 程杨, 袁金, 聂妙玲, 等. VEGF-C 激活 ERK1/2 上调 Slug 蛋白表达促进宫颈癌细胞侵袭[J]. *热带医学杂志*, 2018, 18(7): 846 - 849, 868.
- [16] Zhao YW, Tang HC, Zeng X, *et al.* Resveratrol inhibits proliferation, migration and invasion via Akt and ERK1/2 signaling pathways in renal cell carcinoma cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 98: 36 - 44.
- [17] Gao X, Shan W, Liu X, *et al.* JNK1/2 and ERK1/2 provides vital clues about tumor recurrence and survival in hepatocellular carcinoma patients [J]. *Future Oncol*, 2018, 14(24): 2471 - 2481.
- [18] Zhao S, Qiu ZX, Zhang L, *et al.* Prognostic values of ERK1/2 and p-ERK1/2 expressions for poor survival in non-small cell lung cancer [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(6): 4143 - 4150.
- [19] Fan L, Hong J, Huang H, *et al.* High Expression of Phosphorylated Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK1/2) is Associated with Poor Prognosis in Newly Diagnosed Patients with Multiple Myeloma [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23(5): 2636 - 2643.

(收稿日期: 2020 - 05 - 07

修回日期: 2020 - 06 - 19)