

# 磷酸化 p38 在非小细胞肺癌中表达的意义

王志强<sup>1</sup>, 谢宗涛<sup>1</sup>, 陈丽达<sup>2</sup>, 汪炳华<sup>2</sup>, 蔡 铭<sup>1</sup>

Expression of Activated p38 in Non-small Cell Lung Cancer and Their Clinical Significance

WANG Zhi-qiang<sup>1</sup>, XIE Zong-tao<sup>1</sup>, CHEN Li-da<sup>2</sup>, WANG Bing-hua<sup>2</sup>, CAI Ming<sup>1</sup>

1. Department of Thoracic Cardiovascular Surgery, The Fourth Affiliated Hospital, Suzhou University, Wuxi 214062, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Wuhan University

**Abstract :Objective** To investigate the expression and activation of mitogen-activated protein kinase p38 and its relationship with clinicopathological characters in nonsmall cell lung cancer. **Methods** Samples were obtained from 52 patients with non-small cell lung cancer. Western blot was used to measure the activation and expression of p38 and P-p38. Immunohistochemistry was used for localization of p38 and P-p38. **Results** In all 52 samples, the expression level of P-p38 in lung cancer tissues increased, which was 2.1 times as high as compared with those in adjacent normal tissues ( $P < 0.01$ ), but there were no difference of the level of p38. The expression level of P-p38 was found no correlativity with tumor size, TNM staging, lymph node metastasis and pathologic type. Immunohistochemistry showed that P-p38 was located in both nucleus and cytoplasm, and p38 was found only in cytoplasm. **Conclusion** The overactivity of p38 may play an important role in the development of human non-small cell lung cancer.

**Key words** : Lung cancer ; p38 ; Western blot ; Immunohistochemistry

**摘 要** :目的 探讨丝裂原活化蛋白激酶 p38 在非小细胞肺癌组织中的表达与活性,以及它与肺癌临床病理特征之间的相关性。方法 应用固定化蛋白质印迹法检测 52 例非小细胞肺癌及癌旁正常肺组织中 p38 和磷酸化 p38 (P-p38) 的表达情况;免疫组织化学法分析其在细胞内的定位。结果 肺癌组织中 p38 的表达水平与癌旁正常组织无明显差别 ( $P > 0.05$ );而所有癌组织标本中 P-p38 的表达水平全部增高,为癌旁组织的 2.1 倍 ( $P < 0.01$ ); P-p38 的表达在鳞癌、腺癌组织中无明显差异,与肺癌肿瘤直径大小、淋巴结转移及 TNM 分期无关。免疫组织化学显示 p38 分布在胞浆内,而 P-p38 在胞浆和胞核内均有表达。结论 p38 的过度激活可能在肺癌的发生、发展过程中起着重要作用。

**关键词** :肺癌 ; p38 ; 固定化蛋白质印迹 ; 免疫组织化学

中图分类号 : R734.2 文献标识码 : A 文章编号 : 1000-8578(2008)06-0406-02

## 0 引言

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases/ MAPKs) 信号转导通路是细胞内重要的信号转导系统,在将胞外刺激信号转导至细胞及其核内、介导细胞生物学反应(如增殖、分化、转化及凋亡等)的过程中具有重要的作用。本研究旨在通过检测 p38 蛋白的表达及其活性,来探讨它们在肺癌的发生、发展中的意义。

## 1 资料和方法

### 1.1 临床资料

收稿日期:2007-07-07;修回日期:2007-11-08

作者单位:1. 214062 江苏无锡市第四人民医院胸心外科 苏州大学附属第四医院胸心外科;2. 武汉大学医学院生物化学与分子生物学系

作者简介:王志强(1977-),男,硕士,主治医师,主要从事胸部肿瘤的基础和临床研究

连续收集我院 2005 年 6 月~2006 年 1 月肺癌根治术切除的标本 52 例,其中男性 29 例,女性 23 例,中位年龄 52 岁(36~70 岁)。采取 1997 年国际抗癌联盟肺癌病理分期标准分为:Ⅰ期 14 例,Ⅱ期 7 例,Ⅲ期 28 例,Ⅳ期 3 例;鳞癌 27 例,腺癌 23 例,大细胞癌 2 例。所有标本均经病理证实。每例标本取癌组织及癌旁正常组织(距肿瘤边缘 > 5 cm),在手术切除标本后 30 min 内,立即冻存于液氮中。

### 1.2 主要试剂及方法

应用 RIPA 组织裂解液分别裂解肺癌与正常肺组织,提取组织总蛋白;蛋白定量试剂盒(美国 Bio-Rad 公司产品)测定组织提取液的蛋白浓度。每例标本取蛋白 50 μg 电泳,经 10% 聚丙烯酰胺电泳分离后电转移至 PVDF 膜(美国 Millipore 公司)上,封闭后,加一抗(兔抗人 p38 及 P-p38 多克隆抗体,美国 Santa Cruz 公司,工作浓度 1:1 000)和二抗(辣

根过氧化物酶结合羊抗兔多克隆抗体,英国 Amersham 公司产品,工作浓度 1 1 000)进行杂交。ECL 化学发光试剂盒(英国 Amersham 公司产品)检测杂交信号,发光显影于感光胶片上。

肺癌石蜡包埋标本制成 5 μm 厚的切片,脱蜡水化后,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 灭活内源性酶。然后分别与一抗(兔抗人 p38 及 P-p38 多克隆抗体,工作浓度 1 1 000)、二抗(生物素标记羊抗兔 IgG,1 400 稀释)及辣根过氧化物酶标记的链霉素亲和素复合物(1 400 稀释)孵育。DAB 显色,苏木素复染,封片观察。

HPIAS 2000 型图像分析软件测定条带的 OD 值,以 OD 值代表 p38 及 P-p38 蛋白的相对表达量。计算每一例标本中肿瘤与正常肺组织 OD 值的比值,以此值反映各病例之间 p38 及 P-p38 蛋白表达水平的差异。

1.3 统计学方法

应用 SPSS11.0 统计软件,进行样本 t 检验。

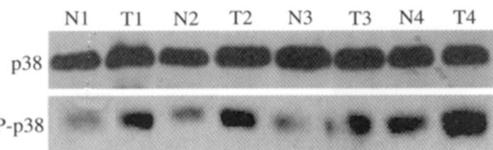
2 结果

27 例(51.9 %)肺癌组织标本中 p38 蛋白的表达水平高于癌旁正常组织,差异无统计学意义。P-p38 蛋白表达水平在 52 例标本中全部高于癌旁正常组织,为癌旁组织的 2.1 倍, P < 0.01 差异有统计学意义,见表 1、图 1。

表 1 p38 和 P-p38 在非小细胞肺癌中的表达情况

Tab 1 The expression of p38 and P-p38 in NSCLC

Table with 4 columns: Item, OD, t, P. Rows include p38 (Lung cancer, Normal control) and P-p38 (Lung cancer, Normal control).



Western blot image T: NSCLC tissues N: Adjacent normal tissues

图 1 人非小细胞肺癌中 p38 及 P-p38 蛋白的表达情况

Fig 1 p38 and P-p38 expression in NSCLC and normal lung tissues by Western blot

P-p38 蛋白表达水平与肺癌的分型、肿瘤直径、淋巴结转移及 TNM 分期均无关,见表 2。

免疫组化结果:p38 蛋白分布在胞浆内,见图 2a;P-p38 蛋白在肺癌和正常肺组织胞浆和胞核内

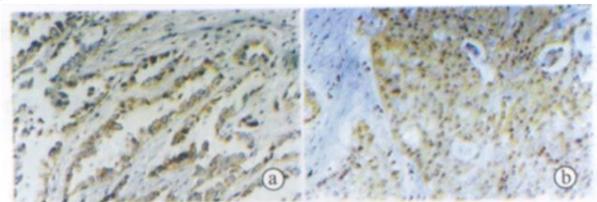
均有表达,见图 2b,肺癌组织染色较深,正常组织染色较浅,癌组织与正常组织染色无明显差异。

表 2 P-p38 的表达与人非小细胞肺癌的临床病理特征的关系(x̄ ± s)

Tab 2 Relationship between P-p38 expression and clinicopathologic characteristics of NSCLC(x̄ ± s)

Table with 5 columns: Item, n, Average multiple, t, P. Rows include Histology (Squamous cell carcinoma, Adenocarcinoma), P-TNM stage (+, +), Tumor size (<5cm, 5cm), Lymph node metastasis (With, Without).

\*: The average value of the ratio of cancer tissues to adjacent normal tissues



a:p38 expressed in the cytosol of the NSCLC, dyeing with yellow; b:P-p38 expressed in both the cytosol and nuclear of the NSCLC, dyeing with yellow(SP method,original magnification ×200)

图 2 p38 和 P-p38 在人非小细胞肺癌组织中的表达情况(SP ×200)

Fig 2 The expression of p38 and P-p38 in NSCLC (SP ×200)

3 讨论

大量研究已证实哺乳动物内至少存在四条 MAPK 通路,MAPK 信号蛋白的表达异常可通过级联反应引发该通路失调,从而介导细胞恶变。p38 是 1993 年 Brestler 等人发现的,通过磷酸化而被激活。

研究表明 p38 信号传导途径在乳腺癌侵袭与转移中起关键作用,其蛋白表达与乳腺癌临床分期有关[1]。大肠癌组织中 p38 蛋白处于过度表达状态,并且与大肠癌的发生、发展和转移密切相关[2]。此外,亦有研究报道 p38 蛋白与肝癌、食管癌、胃癌等相关。

(下转第 410 页)

究,全面揭示该基因在 NSCLC 发病过程中所起的作用。另外 INGI 基因的甲基化、杂合性或纯合性缺失等都有可能使 INGI 基因产物表达下降或缺失,INGI 基因的甲基化、杂合性或纯合性缺失等也需要进一步研究。

总之,INGI 作为抑癌基因,除了表达下调,其主要失活方式不是突变,可能有多方面的原因,如甲基化、等位基因缺失或转录水平异常导致 INGI 基因表达的丧失和(或)蛋白功能的异常,导致 INGI 基因产物相应抑癌功能减弱等,从而影响 NSCLC 的发生、发展,这些还有待进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] Garkavtsev I, Kazarov A, Gudkov A, et al. Suppression of the novel growth inhibitor p33/INGI promotes neoplastic transformation[J]. Nat genetics, 1996, 14(4):415-420.
- [2] Garkavtsev I, Riabowol K. Extension of the replicative life span of human diploid fibroblast by inhibition of the p33INGI candidate tumor suppressor[J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(4):2014-2019.
- [3] Helbing CC, Veillette C, Riabowol K, et al. A novel candidate tumor suppressor, INGI, is involved in the regulation of apoptosis[J]. Cancer Res, 1997, 57(7):1255-1258.

- [4] Gunduz M, Ouchida M, Fukushima K, et al. Genomic structure of the human INGI gene and tumor-specific mutations detected in head and neck squamous cell carcinomas[J]. Cancer Res, 2000, 60(12):3143-3146.
- [5] Toyama T, Iwae H, Waston P, et al. Suppression of INGI expression in sporadic breast cancer[J]. Oncogene, 1999, 18(37):5187-5193.
- [6] 戴小波, 黄志勇, 孟凡青. 改良石蜡切片 DNA 提取法在检测人乳头瘤病毒中的应用[J]. 临床与实验病理学杂志, 1998, 14(4):405.
- [7] Haga Y, Hiroshima K, Iyoda A, et al. Frequency of loss of heterozygosity at 3p, 9p, 13q, and 17p is related to proliferative activity in smokers with stage I non-small cell lung cancer[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2005, 53(2):114-117.
- [8] Tallen G, Kaiser I, Krabbe S, et al. No INGI mutations in human brain tumours but reduced expression in high malignancy grades of astrocytoma[J]. Int J Cancer, 2004, 109(3):476-479.
- [9] Aasland R, Gibson TJ, Stewart AF. The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation[J]. Trends Biochem Sci, 1995, 20(2):56-59.
- [10] Wei G, Keiko S, Michael R, et al. Function of INGI family of PHD protein in cancer[J]. Int J Biochem Cell Bio, 2005, 37(12):1054-1065.
- [11] 马华玲, 朱润庆, 曾艳, 等. 非小细胞肺癌中 p33<sup>INGIb</sup> 表达的临床及生物学意义[J]. 中国肿瘤临床, 2006, 33(5):241-244.

[编辑校对:贺文]

(上接第 407 页)

大量研究表明 MAPK 激酶在肿瘤组织中过度表达,但本研究结果中全部癌组织标本高于正常组织的情况未见报道。由此可见, P-p38 的表达水平和肺癌密切相关, p38 通路和肺癌的关系更值得进一步的研究。

根据本研究免疫组化结果,我们猜测 p38 作为一种蛋白激酶广泛存在于细胞胞浆内,在紫外线、高渗、应激及细胞因子等影响下激活 MAPK 通路, p38 活化转化为 P-p38 移位于核内作用于相应的转录因子,启动基因转录,从而参与肺癌的形成和发展。p38 在肺癌中的作用机制尚不清楚, Greenberg 等人<sup>[3]</sup>模仿肿瘤组织的低氧环境,将非小细胞肺癌 A549 细胞放在体外低氧的温箱里培养,却发现 P-p38 并没有随着时间的延长而增加。这表明仅仅低氧环境尚不能激活 p38 蛋白, p38 通路的活化是一个复杂的过程,其具体机制有待进一步研究。

本结果表明 P-p38 蛋白表达水平在鳞癌、腺癌组织中无明显差异,与肺癌淋巴结转移、肿瘤直径大小及 TNM 分期无关。因此,我们认为 p38 通路的过度激活在肺癌的发生过程中起着重要作用,似乎和进一步恶化关系不大。这为肺癌的预防提供了一

个新的方向。p38 抑制剂的开发研究已经表现出广阔的前景。p38 特异性抑制剂可抑制 JAR 细胞的侵袭能力<sup>[4]</sup>。VEGF 通过 p38 通路诱导肝癌细胞转移,而阻断 p38 通路可抑制这种转移<sup>[5]</sup>。

p38 信号蛋白的过度激活与肺癌的发生密切相关。p38 蛋白及其信号通路的进一步研究有望为非小细胞肺癌的发病机制提供新的思路。

#### 参考文献:

- [1] 李柏林, 韩硕, 李凤, 等. p38 信号蛋白在乳腺癌组织中表达的研究[J]. 中国老年学杂志, 2006, 3(26):346-349.
- [2] 孙泽群, 徐少勇, 邓长生, 等. p38 蛋白在大肠癌中的表达及其临床意义[J]. 中国肿瘤临床, 2005, 32(11):635-637.
- [3] Greenberg AK, Basu S, Hu J, et al. Selective p38 activation in human non-small cell lung cancer[J]. Am J Resp Cell Mol Biol, 2002, 26(3):558-564.
- [4] Zhang XQ, Pang ZJ, Chen SL, et al. p38 MAPK inhibitor SB203580 in inhibition of in vitro invasion human choriocarcinoma JAR cells[J]. J Prac Oncol, 2003, 18(2):95-97.
- [5] Mao H, Yuan AL, Zhao MF, et al. The effect of signal passway of mitogen activated protein kinase on hepatocellular carcinoma metastasis induced by VEGF[J]. Chin J Dig, 2002, 20(1):14-16.

[编辑:刘红武;校对:安凤]