

MEK/ERK 通路蛋白在肾癌骨转移患者的表达

秦彩朋^{1,2}, 刘春雷³, 赵燕辉³, 殷华奇¹, 杜依青¹, 胡风战¹, 盛正祚¹, 徐 涛^{1△}

(1. 北京大学人民医院泌尿外科, 北京 100044; 2. 北京大学国际医院泌尿外科, 北京 102206; 3. 青岛市中心医院泌尿外科, 山东青岛 266042)

[摘要] **目的:**探讨 MEK/ERK 通路蛋白在肾癌骨转移患者原发灶及转移灶表达的差异及其意义,并探索这种差异的发生机制。**方法:**选择北京大学人民医院 2009 年 1 月至 2010 年 1 月 7 例肾癌骨转移患者的原发灶及转移灶组织标本,应用免疫组织化学法分析 VEGFR-2、MEK、ERK 蛋白在原发灶与转移灶表达的差异,VEGFR-2、MEK、ERK 的 I 抗工作浓度(体积比)分别为 1:200、1:25、1:250,应用 PCR 技术检测 *PDGFRA* 基因 20 号外显子,*K-ras* 基因 2 号外显子,*Braf* 基因 15 号外显子和 *MEK1* 基因 2 号外显子的相关突变。**结果:**免疫组织化学结果判读:细胞阳性率 ≤ 5% 为 1 分,6% ~ 50% 为 2 分,51% ~ 100% 为 3 分;染色强度:不着色为 1 分,淡黄色细颗粒状为 2 分,黄色颗粒状为 3 分,棕黄色粗颗粒状为 4 分,将两个得分相乘得到其表达强度。本组 7 例肾癌骨转移患者 VEGFR-2 在原发灶(2.86 ± 2.27)和骨转移灶(2.67 ± 1.85)表达差异无统计学意义($P=0.901$),而 MEK(1.33 ± 0.51 vs. 6.10 ± 4.10, $P=0.015$)和 ERK(4.43 ± 2.84 vs. 9.10 ± 2.24, $P=0.021$)表达差异有统计学意义;在原发灶及转移灶标本中并未检测到相关的基因突变。**结论:**MEK/ERK 通路蛋白在肾癌骨转移患者原发灶和转移灶表达的差异可能与其转移过程有关,也可能是影响靶向治疗效果的原因之一。

[关键词] 癌,肾细胞;MAP 激酶信号系统;肿瘤转移;骨;突变

[中图分类号] R737.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2016)04-0590-04

doi:10.3969/j.issn.1671-167X.2016.04.004

Expression of MEK/ERK signal pathways in renal cell carcinoma with bone metastasis

QIN Cai-peng^{1,2}, LIU Chun-lei³, ZHAO Yan-hui³, YIN Hua-qi¹, DU Yi-qing¹, HU Feng-zhan¹, SHENG Zheng-zuo¹, XU Tao^{1△}

(1. Department of Urology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China; 2. Department of Urology, Peking University International Hospital, Beijing 102206, China; 3. Department of Urology, Central Hospital of Qingdao, Qingdao 266042, Shandong, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of MEK/ERK signaling pathways in renal cell carcinoma with bone metastasis, and to analyze the differences of expressions of VEGFR-2, MEK, ERK on the primary and metastasis tissue and its mechanism. **Methods:** The tissue samples were obtained from 7 renal cell carcinoma patients kindly provided by Department of Urology, Peking University People's Hospital from January 1, 2009 to January 1, 2010. The expression of MEK/ERK signaling pathways was detected in the 7 renal cell carcinoma patients' primary and matched metastatic tissues with ICH. The antibody concentrations were 1:200, 1:25, and 1:250, respectively. The mutation of the twentieth exon of the *PDGFRA* gene, the second exon of the *K-ras* gene, the fifteenth exon of the *Braf* gene and the second exon of the *MEK1* gene were detected with PCR. **Results:** The expression intensities of VEGFR-2, MEK, and ERK were measured by H-score [intensity (1, 2, 3, or 4) multiplied by the distribution (%)]. VEGFR-2, MEK, and ERK expressions were divided into 3 groups according to the positive distribution of the tumor cells: 1, 0-5%; 2, 6%-50%; and 3, >50%. To assess intratumor heterogeneity, three distinct microscopic fields (×200) from each specimen were used to evaluate the expressions. Subsequently, the scores were averaged to obtain a single concatenated score for each tissue. VEGFR-2, MEK, and ERK expressions were assessed by 2 independent pathologists who were blinded to the clinicopathological data. The data were expressed as the mean value of the triplicate experiments. The expressions of MEK, and ERK were higher in the metastatic tissues than in the matched RCC tissues (6.10 ± 4.10 vs. 1.33 ± 0.51, $P=0.015$; 9.10 ± 2.24 vs. 4.43 ± 2.84, $P=0.021$) while the expression of VEGFR-2 was not different between the primary and metastatic tissues ($P=0.901$). No mutation was detected on the twentieth exon of the *PDGFRA* gene, the second exon of the *K-ras* gene, the fifteenth exon of the *Braf* gene and the second exon of the *MEK1* gene. **Conclusion:** MEK/ERK signaling pathways may play an important role in the metastasis and the resistance of sunitinib in RCC patients

基金项目:北京市科技计划项目(Z151100003915145)资助 Supported by the Beijing Science and Technology Planning Project (Z151100003915145)

△Corresponding author's e-mail, xutao@medmail.com.cn

网络出版时间:2016-7-4 3:17:49 网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20160704.1317.016.html

with bone metastasis.

KEY WORDS Carcinoma, renal cell; MAP kinase signaling system; Neoplasm metastasis; Bone; Mutation

肾癌(renal cell carcinoma, RCC)占成人恶性肿瘤的2%~3%,高发年龄是60~70岁,男、女发病比例约为2:1,且发病率约以每年2%的速度递增,肾癌患者转移的发生是肿瘤相关死亡的主要原因,约有1/3患者在确诊时已发生转移,此外,还有1/3患者在根治术后发生转移^[1],转移患者的平均生存期为7~11个月,5年死亡率大于90%^[2],加之肾癌对放疗和化疗不敏感,使得转移性肾癌患者的治疗显得尤为棘手和迫切,也正因为如此,靶向治疗成为转移性肾癌重要的治疗手段。目前肾癌的靶向治疗主要集中于多激酶抑制剂和mTOR抑制剂,距索拉菲尼、舒尼替尼以及替西罗莫司被批准应用于转移性肾癌的治疗已将近10年,虽然此后同类药物如帕唑帕尼、阿西替尼和依维莫司被研发并批准应用于转移性肾癌的治疗,但疗效并无明显提升,因此,至今舒尼替尼仍是治疗转移性肾癌的一线药物。多激酶抑制剂不仅至少抑制一种VEGFR(vascular endothelial growth factor receptor)受体,同时抑制数十种其他位点,近期研究结果显示,抑制VEGFR以外的位点并不能提高转移性肾癌的治疗效果。目前,mTOR通路新抑制剂的尝试尚未取得突破,一个小样本Ⅱ期临床试验结果显示,一种非选择性PI3K和TORC1/2双重抑制剂apitolisib(GDC0980)针对抗VEGF治疗耐药的患者治疗效果同依维莫司相比,患者的无进展生存期反而缩短。GOLDⅢ期临床试验显示VEGFR和FGFR(fibroblast growth factor receptor)抑制剂多韦替尼在治疗一、二线靶向治疗失败的患者中效果并不优于索拉菲尼,此临床试验并没有获得其预期的治疗效果。一个尚无依据的假设提出多韦替尼的治疗效果可能仅来自对VEGFR的抑制,对FGFR的抑制并不能提高疗效,另外一种提高转移性肾癌疗效的思路,即靶向药物联合应用并未见取得成功的报道,药物的联合应用使得不良反应增加且并未取得更多的临床获益。一项包含168例转移性肾癌患者的研究报道,靶向治疗罕能使原发灶体积缩小,进一步提示转移灶同原发灶药物靶点可能存在差异^[3]。Karashima等^[4]的研究表明血管生成相关基因在转移灶中表达增高,而且体外细胞试验进一步证实转移癌细胞针对靶向治疗的耐药性增加,这种转移灶同原发灶对药物反应的差异性提示二者之间不同的生物学行为,遗憾的是目前肾

癌的靶向治疗尚未充分考虑以上因素,这可能是影响肾癌靶向治疗效果的一个因素。

本研究旨在探究在转移性肾癌中原发灶和转移灶之间药物的靶点蛋白表达是否存在差异,并初步寻找造成这种差异的可能原因,为提高转移性肾癌的治疗效果做初步探索。

1 资料与方法

1.1 病例资料

2009年1月至2010年1月共7例肾癌骨转移患者原发灶及转移灶标本纳入本实验,由北京大学人民医院病理科提供,本研究开始前获得北京大学人民医院伦理委员会的审查批准,标本的使用获得患者的知情同意,患者的临床病理特征见表1。

1.2 试剂

多克隆抗体VEGFR、MEK、ERK购于美国Cell signaling公司,即用型二抗试剂盒及酶底物显色剂DAB等试剂购于中杉金桥生物有限公司。VEGFR-2、MEK、ERK的工作浓度(体积比)分别为1:200、1:25、1:250,用PBS缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.3 免疫组织化学分析及结果判定

免疫组织化学ABC法参照试剂盒说明书进行,组织芯片脱蜡、水化后,置入3%(质量分数)H₂O₂中室温10min,消除内源性过氧化物酶,0.01mol/L柠檬酸盐缓冲液中用微波法进行抗原修复。5%(体积分数)正常山羊血清室温封闭30min,滴加一抗,湿盒中4℃孵育过夜,室温30min滴加即用型二抗。DAB显色3min,苏木精复染,封片。用DM2500图像分析系统(Leica公司,德国)镜下观察,细胞质或细胞核中出现棕黄色为阳性细胞。由2名经验丰富的病理科医师采用双盲法判断结果。结果均采用双评分半定量法进行评分:细胞阳性率<5%为1分,5%~50%为2分,51%~100%为3分;染色强度:不着色为1分,淡黄色细颗粒状为2分,黄色颗粒状为3分,棕黄色粗颗粒状为4分,将两个得分相乘得到其表达强度。

1.4 PCR检测突变

用巢式PCR分别扩增PDGFRA基因20号外显子、K-ras基因2号外显子、Braf基因15号外显子和MEK1基因2号外显子,引物由北京三博远志公司

合成。首轮 PCR 总反应体系为 25 μ L, 包括模板 DNA 2 μ L, 2 \times PCR mix buffer 12.5 μ L, 终浓度为 5 μ mol/L 的上、下游引物各 2 μ L, ddH₂O 补足至 25 μ L。循环参数: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 51 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取 PCR 产物 2 μ L 进行第 2 轮 PCR 扩增, 步骤同上。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳初步鉴定, 用

ABI 3730XL 测序仪测序分析, 由北京三博远志公司完成, 经 BLAST 软件比较测序结果和基因库中序列的差异。

1.5 统计学分析

应用 SPSS20.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均数 \pm 标准差表示, 两组间均值的差异应用配对 *t* 检验, *P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

表 1 患者的一般特征
Table 1 Characters of the patients

Gender	Age/years	Pathological findings	Side	Metastatic sites	Fuhrman grade	Stage
Female	56	ccRCC	Left	Left side of pelvis	I - II	T1bN0M1
Female	43	ccRCC	Left	Left side of pelvis	III	T1bN0M1
Female	59	ccRCC	Right	Right heel bone	III	T2aN0M1
Male	72	ccRCC	Left	Left side of pelvis	IV	T1aN0M1
Male	41	ccRCC	Left	the 4th lumberbody	I - II	T2aN0M1
Male	68	ccRCC	Right	Right side of pelvis	II - III	T1bN0M1
Male	57	ccRCC	Right	Left side of pelvis	II	T1bN0M1

2 结果

2.1 MEK、ERK 蛋白在骨转移灶较肾癌原发灶表达上调

VEGFR-2 主要表达于细胞膜, 而 MEK、ERK 主

要表达于细胞质, 表现为出现淡黄色、黄色或棕黄色反应物。7 例肾癌骨转移患者标本转移灶相比于原发灶, VEGFR-2 的表达差异无统计学意义 (*P* = 0.901), 而 MEK (*P* = 0.015) 和 ERK (*P* = 0.021) 表达存在差异 (图 1)。

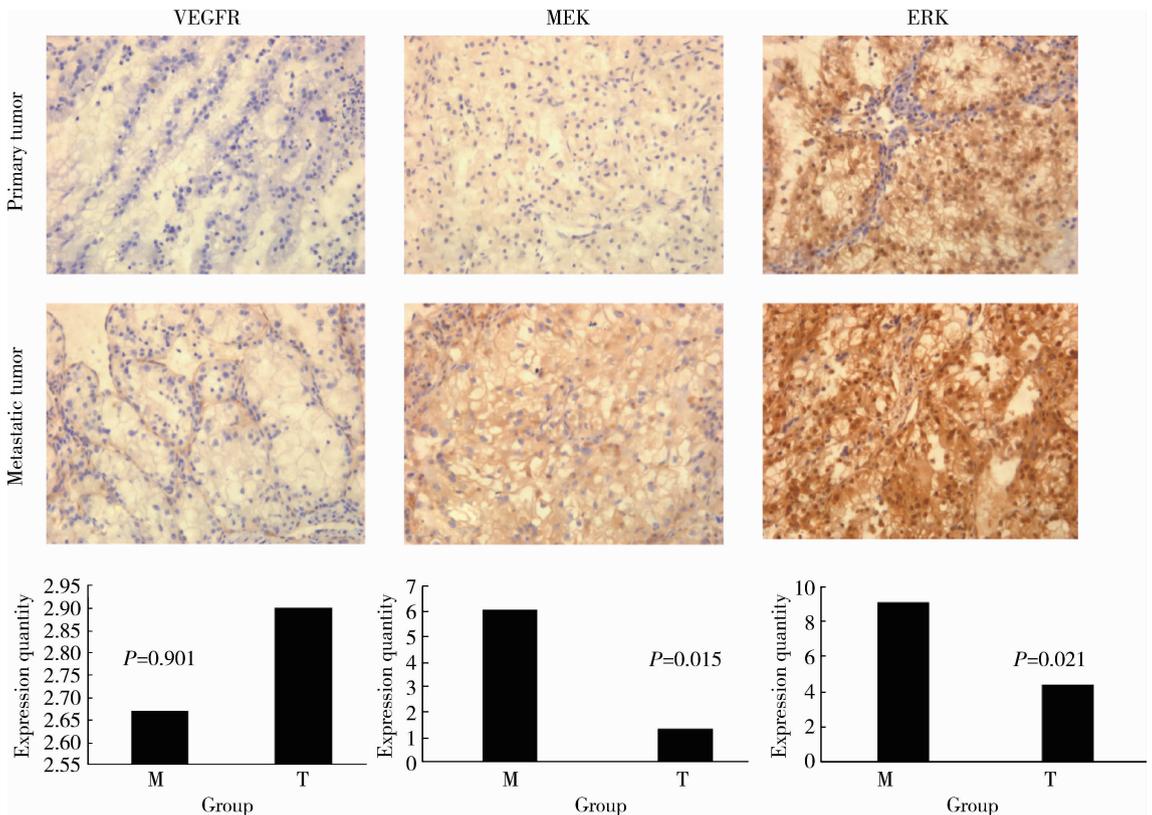


图 1 免疫组织化学染色分析 VEGFR-2、MEK、ERK 在肾癌原发灶(T)及对应转移灶组织(M)中的表达

Figure 1 Immunohistochemistry of VEGFR-2, MEK, ERK in primary tumor (T) and the matched metastatic tissue (M)

2.2 PCR 检测 *PDGFRA*、*K-ras*、*B-raf* 和 *MEK* 基因突变

7 例肾癌骨转移患者的原发灶及转移灶组织中均未检测到阳性突变。

3 讨论

研究表明特定基因表达的改变可使肾癌侵袭性及转移倾向增加,且国内有学者筛选出一株特异发生骨转移的细胞系 ACHN-Bo,提示肾癌骨转移患者原发灶同转移灶之间可能存在不同的基因表达^[5]。Thompson 等^[6]的研究证实肾癌患者转移灶 B7-H1 高于原发灶,且高表达 B7-H1 的患者预后变差,分别为 44.4% 和 54.3%。突变型 *p53* 基因的表达在转移灶比原发灶表达更高,分别为 51.8% 和 22.8%,*p53* 过表达是影响无转移生存期的独立风险因素。一项包含 135 例肾癌原发灶组织和 41 例不配对转移灶组织的研究表明^[7],*mTOR*-*HIF* 通路成员中 *p-AKT*、*p-S6*、*4EBP1* 和 *c-myc* 蛋白在转移灶中表达升高。

此外,在一项包含 168 例转移性肾癌患者的研究发现,靶向治疗罕能使原发灶体积缩小,进一步提示转移灶同原发灶药物靶点可能存在差异^[3]。Karashima 等^[4]的研究表明血管生成相关基因在转移灶中表达增高,且体外细胞试验进一步证实转移癌细胞针对靶向治疗的耐药性增加,这种转移灶同原发灶对药物反应的差异性提示二者之间不同的生物学行为,遗憾的是目前肾癌的靶向治疗尚未见充分考虑以上因素,这可能是影响肾癌靶向治疗效果的一个因素。

恶性肿瘤的个体化治疗已成为肿瘤治疗中一个新的方向,泛亚太临床研究结果表明,在肺癌患者中,吉非替尼(*gefitinib*)对 *EGFR* 突变患者的受益率达 71.2%,效果明显优于化疗,而对无突变患者受益率仅为 1.1%。美国国家癌症综合治疗联盟《非小细胞肺癌临床实践指南》明确指出:当 *K-ras* 基因发生突变时,不建议使用 *EGFR*-TKIs 靶向治疗药物。《结直肠癌临床实践指南》明确指出:(1)所有转移性结直肠癌患者都应检测 *K-ras* 基因状态;(2)只有 *K-ras* 野生型患者才建议接受 *EGFR* 抑制剂治疗。如果 *K-ras* 无突变,应考虑检测 *Braf* 基因状态,*Braf* 基因突变率为 15%。针对 *Braf* 基因突变所研发的新型靶向药物 *vemurafenib* 对于 *Braf* 基因突变阳性患者疗效显著。在血液系统,95% 以上的慢性粒细胞白血病患者携带有染色体重排而导致的 *BCR-ABL* 融合基因。慢性粒细胞白血病患者主要接受酪氨酸激酶抑制剂甲磺酸伊马替尼的治疗,并且疗效显著,然而慢性粒细胞白血病患者接受酪氨酸激酶抑制剂治疗时也会导致耐药性的产生,主要是由 *BCR-ABL* 基因 T315I 的突变所引起,因此,*BCR-ABL* 基因突变检测结果是指导慢性粒细胞白

血病患者用药的一个重要指标。*Braf* 基因在原发性黑色素瘤中突变率为 80%,在转移性黑色素瘤中突变率为 68%,在良性痣中的突变率高达 82%。针对 *Braf* 基因突变所研发的新型靶向药物 *vemurafenib* 对于 *Braf* 基因突变阳性患者疗效显著,而 *Braf* 基因 V600E 突变是舒尼替尼治疗甲状腺癌耐药的主要机制之一^[8],*BRAF* 位于 *sunitinib* 作用位点的下游,发生 V600E 突变后使得下游的 *MEK/ERK* 通路激活过表达,产生耐药。

要提高肾癌患者的预后,获得更高的生存率和改善生活质量,需要明确转移性肾癌患者原发灶与转移灶靶点表达的差异以及肾癌患者是否存在靶点相关突变,以便对肾癌患者实施个体化靶向治疗,但目前国内外尚未见针对转移性肾癌的个体化靶向治疗的研究报道,本研究对肾癌患者的 *sunitinib* 主要作用通路 *MEK/ERK* 通路靶点表达差异进行研究,发现肾癌骨转移患者转移灶 *MEK*、*ERK* 出现高表达,而 *VEGFR* 未见高表达,提示肾癌骨转移患者转移灶 *MEK/ERK* 通路过度激活,为进一步明确此类激活是否由 *VEGFR* 下游 *MEK/ERK* 相关基因突变导致,本课题组对已知的 *PDGFRA* D842V 突变,*K-ras* 的 12 和 13 密码子上的 G12S、G12C、G12R、G12D、G12A、G12V、G13D 突变,*B-raf* V600E 突变,*MEK* 基因突变进行检测,并未发现突变。

本研究病例数有限,但均为配对标本,因此可排除基因表达的本底差异,虽然发现肾癌骨转移患者转移灶存在 *MEK/ERK* 通路过度激活,但尚待扩大样本进行进一步研究以发现其机制。

参考文献

- [1] Laird A, O' Mahony FC, Nanda J, et al. Differential expression of prognostic proteomic markers in primary tumour, venous tumour thrombus and metastatic renal cell cancer tissue and correlation with patient outcome[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60483.
- [2] Abou Youssef T, Fahmy MA, Koumakpayi IH, et al. The mammalian target of rapamycin pathway is widely activated without PTEN deletion in renal cell carcinoma metastases[J]. *Cancer*, 2011, 117(2): 290-300.
- [3] Abel EJ, Culp SH, Tannir NM, et al. Primary tumor response to targeted agents in patients with metastatic renal cell carcinoma[J]. *Eur Urol*, 2011, 59(1): 10-15.
- [4] Karashima T, Fukuhara H, Tamura K, et al. Expression of angiogenesis-related gene profiles and development of resistance to tyrosine-kinase inhibitor in advanced renal cell carcinoma: characterization of sorafenib-resistant cells derived from a cutaneous metastasis[J]. *Int J Urol*, 2013, 20(9): 923-930.
- [5] Wang J, Chen A, Yang C, et al. A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the ACHN parental human renal cell carcinoma *in vivo* and *in vitro*[J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(4): 1104-1110.
- [6] Thompson RH, Gillett MD, Chevillat JC, et al. Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma[J]. *Cancer*, 2005, 104(10): 2084-2091.
- [7] Schultz L, Chau A, Albadine R, et al. Immunorepression status and prognostic value of *mTOR* and hypoxia-induced pathway members in primary and metastatic clear cell renal cell carcinomas[J]. *Am J Surg Pathol*, 2011, 35(10): 1549-1556.
- [8] Piscazzi A, Costantino E, Maddalena F, et al. Activation of the *RAS/RAF/ERK* signaling pathway contributes to resistance to *sunitinib* in thyroid carcinoma cell lines[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(6): E898-906.