

# 不同预后肺腺癌患者酪氨酸激酶信号传导通路异常的初步探讨

林嘉颖<sup>1</sup>, 吴一龙<sup>2\*</sup>, 杨学宁<sup>3</sup>, 陈刚<sup>3</sup>

Preliminary Analysis of Tyrosine Kinase Signaling Pathway in Different Prognosis Patients with Lung Adenocarcinoma

LIN Jiaying<sup>1</sup>, WU Yi-long<sup>2\*</sup>, YANG Xue-ning<sup>3</sup>, CHEN Gang<sup>3</sup>

1. Guangdong Provincial Research Institute of Lung Cancer, Research Center of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Lung cancer; 3. Department of Thoracic Surgery (\* Correspond author)

**Abstract :Objective** To study the abnormality of tyrosine kinase signaling pathway in different prognosis patients with lung adenocarcinoma. **Methods** We chose two patients, one's survival time was more than 60 months, the other's only 9 months. Total RNA was extracted from the two lung adenocarcinoma samples and their matched normal tissues, and then hybridized on the microarray with 13824 genes. At last their expression profiles of tyrosine kinase signaling pathway were analyzed by computer. **Results** The tyrosine kinase signaling pathway between L (the patient with the best prognosis) and S (the worse one) was very different. The most different was that S overexpressed some genes related to proliferation (such as fms, K-ras, myc and so on) while the genes related to immunity and anti-proliferation were in a low lever, for example, INF signaling pathways were inhibited, but which in L were activated. Some genes related to proliferation (PDGF and its receptor, H-ras, MAPK, etc.) were overexpressed in S but low expressed in L. **Conclusion** In the complex system of tyrosine kinase signaling pathway in lung adenocarcinoma, different prognosis samples have different characteristic genes. In our research, the patient with the best prognosis overexpressed some genes related to immunity and anti-proliferation, and the worse one overexpressed some genes related to proliferation while the genes related to immunity and anti-proliferation were in a low lever.

**Key words**: Signaling; Tyrosine kinase; Gene-expression profiles; Microarray; Lung neoplasm

**摘要**:目的 探讨不同预后肺腺癌患者在酪氨酸激酶信号传导通路上的具体差异。方法 选取生存期大于 60 个月和生存期仅 9 个月的两例患者, 抽提其肺腺癌标本及其癌旁组织的总 RNA, 与含 13824 个基因的基因芯片进行杂交, 计算机分析比较两种组织的差异表达基因。结果 两例不同预后的肺腺癌患者在酪氨酸激酶信号传导通路上存在明显差异。预后差的 S 病例高表达许多增殖相关基因, 而与免疫相关的信号传导如干扰素介导的信号传导通路受到抑制; 预后好的 L 病例中干扰素介导的信号传导通路激活, 而某些在预后差的 S 病例中表达的增殖相关基因在预后最好的病例中处于低表达水平。结论 预后好的肺腺癌高表达抗增殖和免疫相关基因; 预后差的肺腺癌高表达与增殖相关基因, 同时抗增殖和免疫防御相关基因处于低表达水平。

**关键词**: 信号传递; 酪氨酸激酶; 基因表达谱; 基因芯片; 肺肿瘤

**中图分类号**: R734.2; Q786 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-8578(2005)06-0339-05

## 0 引言

我们曾分析了肺腺癌酪氨酸激酶信号传导通路 (tyrosine kinase signaling pathway, TKSP) 中的基因

表达谱, 发现肺腺癌 TKSP 异常呈现一种复杂系统的状态, 并与患者的预后密切相关<sup>[1,2]</sup>。为了进一步细化 TKSP 异常的复杂性对具体病例的影响, 本研究选取了两例预后完全不同的肺腺癌, 利用含 13824 个基因的基因芯片, 多方位检测了两者在酪氨酸激酶信号传导通路上的表达谱差异及其影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本和基因芯片

收稿日期: 2005-02-16; 修回日期: 2005-04-07

基金项目: 广州市科技局重点攻关项目资助课题 (2001-Z-044-01); 广东省重点医学科技攻关专项课题 (2003-1); 广东省自然科学基金资助项目 (04003963)。

作者单位: 1. 510080 广州, 广东省肺癌研究所、广东省人民医院医学研究中心, 2. 肿瘤中心肺科, 3. 胸外科 (\* 通讯作者)

肺腺癌标本及其癌旁组织由广东省肺癌研究所提供,组织均为即刻液氮保存。基因芯片由上海生物芯片国家工程研究中心提供。芯片上点有 13824 个人类基因和 EST 片段,以及 768 个对照。

### 1.2 总 RNA 提取

肺腺癌及其癌旁组织的总 RNA 抽提采用 TRIzol 试剂法。分光光度计测浓度和纯度,总 RNA 的质量经 1% 琼脂糖电泳检测及 Agilent 2100 分析仪验证。

### 1.3 荧光探针制备、纯化与杂交

采取反转录 cDNA 第一链标记,以 cy3 标记肺腺癌组织,cy5 标记癌旁组织。取等量的癌组织探针与癌旁组织探针混合后与基因芯片在 42℃ 杂交箱中避光杂交 16~18 小时。

### 1.4 图象扫描及结果分析

经严格洗片后,Agilent 扫描仪扫描芯片。图像分析软件采用 ImaGene 软件,将扫描得到的图像定量转化为数值。数据进一步导入生物信息学分析软件 Genespring,进行标准化并计算 ratio 值(两种荧光 cy3 与 cy5 的比值,即肺腺癌组织与癌旁正常肺组织中基因表达的比值)。ratio 值在 0.5~2.0 范围内的基因不存在显著的表达差异,>2 认为该基因在癌组织中表达上调,<0.5 认为该基因在癌组织中表达下调。最后统计分析在酪氨酸激酶传导通路中各种组分的表达情况。

## 2 结果

### 2.1 两例肺腺癌患者的临床特征

入选病例均为完全性手术切除并经组织病理学确认的男性肺腺癌患者。生存期超过 60 个月的病例为 PT3N0M0, B 期患者(L),术后未作化放疗;生存期仅为 9 个月的病例为 PT3N2M0, A 期患者(S),术后行 MVP 方案辅助化疗。

### 2.2 两例不同预后患者的酪氨酸激酶信号传导通路的差异

预后好的患者 L 和预后差的患者 S 在 TKSP 上的表达差异见图 1、2,相关的基因列表见表 1、2。从图 1 可以看出一种趋势:在细胞增殖方面,预后差的患者 S 更为活跃,但图 2 提示其负调控机制并没有相应的激活,大部分基因仍处于正常或偏下水平,而预后好的患者 L 可见部分负调控基因明显高表达。

## 3 讨论

在既往的研究中,我们对肺腺癌基因表达谱中

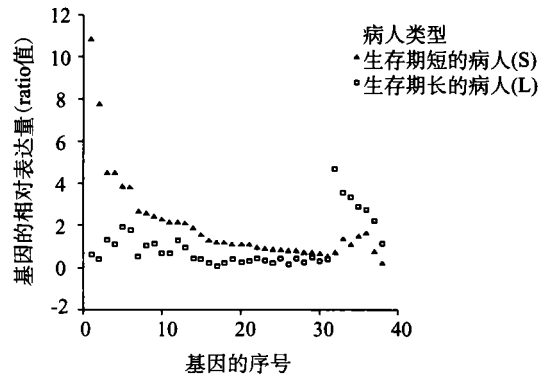


图 1 部分促进细胞增殖相关基因在不同预后病人中的差异表达

(注:纵坐标是基因表达的相对量,即基因在肺癌组织与正常肺组织中表达水平的比值。正常范围为 0.5~2.0。横坐标代表不同的基因,以序号代之,它们详细的名称,以及在不同预后病人中的相对表达量见表 1)

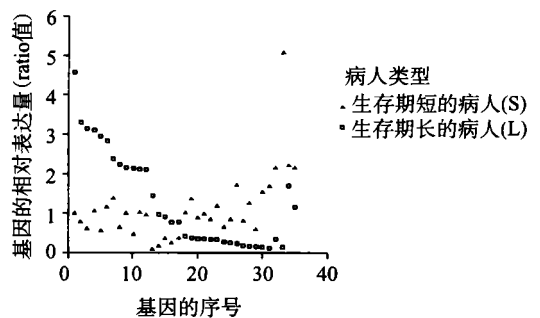


图 2 部分负调控基因在不同预后病人中的差异表达

(注:纵坐标是基因表达的相对量,即基因在肺癌组织与正常肺组织中表达水平的比值。正常范围为 0.5~2.0。横坐标代表不同的基因,以序号代之,它们详细的名称,以及在不同预后病人中的相对表达量见表 1)

酪氨酸激酶信号传导通路的主要组分包括配体、受体、相关酶类、转录因子、正性调控基因及负性调控基因等进行了分析<sup>[1]</sup>,发现这些组分在癌组织中均有不同程度的改变。生长因子与酪氨酸激酶介导的信号传导不同程度地被激活,而抗增殖的信号传导受到不同程度的抑制。我们进一步探讨酪氨酸激酶传导通路的异常与临床预后的关系<sup>[2]</sup>,发现不同预后的病例有不同的特征基因群。预后最好的一组病人高表达抗增殖和免疫相关基因;预后最差的病人在高表达与增殖相关基因的同时,抗增殖和免疫防御相关基因处于低表达水平。

在本研究中,我们重点探讨两例预后明显不同的肺腺癌患者在酪氨酸激酶信号传导通路上的具体差异。

我们对预后好的 L(生存期 > 60 个月)与预后差的 S(生存期为 9 个月)进行了比较,发现他们在酪氨酸激酶传导通路上的差异是多维的。具体表现在各个环节中,差异基因的数目、种类、变化趋势不一,从而分别激活不同的信号传导。

表 1 部分促进细胞增殖相关基因在不同预后病人中的差异表达

序号	基因名	L/ 正常	S/ 正常
在 L 中表达正常而在 S 中高表达的基因			
1	platelet-derived growth factor receptor-like	0.618	10.842
2	fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)	0.414	7.783
3	SKFl like	1.301	4.516
4	Human K-ras oncogene protein mRNA ,complete cds	1.092	4.486
5	phospholipase A2 , group IIA (platelets , synovial fluid)	1.933	3.837
6	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1	1.773	3.805
7	lysophospholipase I	0.522	2.670
8	tyrosine kinase 2	1.042	2.549
9	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3	1.123	2.437
10	fer (fps/fes related) tyrosine kinase (phosphoprotein NCP94)	0.678	2.287
11	PTK2 protein tyrosine kinase 2	0.685	2.152
12	MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor)	1.272	2.147
13	mitogen-activated protein kinase 6	0.930	2.080
在 L 中低表达而在 S 中表达正常的基因			
14	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	0.432	1.878
15	signal transducing adaptor molecule (SH3 domain and ITAM motif) 1	0.395	1.551
16	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 5	0.188	1.275
17	amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	0.064	1.189
18	platelet-derived growth factor receptor , beta polypeptide	0.216	1.163
19	phospholipase C , beta 2	0.380	1.094
20	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6	0.267	1.084
21	protein kinase (cAMP-dependent , catalytic) inhibitor alpha	0.314	1.066
22	insulin receptor substrate 2	0.437	0.952
23	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	0.34	0.902
24	mitogen-activated protein kinase 4	0.231	0.844
25	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	0.436	0.834
26	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	0.154	0.829
27	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	0.422	0.792
28	protein kinase , cAMP-dependent , regulatory , type I , alpha (tissue specific extinguisher 1)	0.253	0.735
29	putative c-Myc-responsive	0.464	0.729
30	v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog	0.288	0.662
31	jun B proto-oncogene	0.391	0.515
在 L 中高表达而在 S 中表达正常的基因			
32	EphB4	4.661	0.729
33	abl-interactor 2 # ABI-2 # , mRNA	3.564	1.375
34	glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase D1	3.354	1.075
35	protein tyrosine kinase 9	2.873	1.484
36	epidermal growth factor receptor pathway substrate 8	2.747	1.651
37	adenylate cyclase 3	2.243	0.770
在 L 中表达正常而在 S 中低表达的基因			
38	v-erbB2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 , neuro/ glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	1.124	0.227

与 S 相比 ,L 虽然部分与细胞增殖的相关基因表达升高,但负调控基因如某些酪氨酸磷酸酶和免疫相关基因也表达升高,如多种酪氨酸磷酸酶高表达,它们能使酪氨酸激酶磷酸化而失活,执行负调节

功能;免疫相关基因如 B 细胞酪氨酸激酶表达升高,刺激 B 细胞生长发育;与干扰素信号传导相关的基因高表达(如干扰素、STAT1、多种干扰素诱导蛋白等),表明干扰素介导的信号传导通路可能被

表 2 部分负调控基因在不同预后病人中的差异表达

序号	基因名	L/ 正常	S/ 正常
在 L 中高表达而在 S 中表达正常的基因			
1	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), beta isoform	4.586	1.003
2	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 3	3.304	0.783
3	B lymphoid tyrosine kinase	3.141	0.624
4	chemokine (C-C motif) ligand 25	3.097	1.074
5	colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage)	2.943	0.547
6	interferon regulatory factor 7	2.827	1.163
7	signal transducer and activator of transcription 1, (STAT 1)	2.376	1.389
8	signal transducer and activator of transcription 2, (STAT 2)	2.222	0.645
9	interferon-related developmental regulator 1	2.145	1.010
10	protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator	2.129	0.468
11	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	2.114	1.035
12	interferon, gamma	2.101	0.972
在 L 中表达正常而在 S 中低表达的基因			
13	guanylate binding protein 2, interferon-inducible	1.439	0.089
14	small inducible cytokine A4	0.975	0.180
15	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kD	0.907	0.378
16	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI6-16)	0.775	0.263
17	leukemia inhibitory factor receptor	0.762	0.366
在 L 中低表达而在 S 中表达正常的基因			
18	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2	0.420	1.028
19	interferon stimulated gene (20kD)	0.372	1.368
20	protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, beta isoform	0.356	0.890
21	signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced	0.350	0.981
22	cytokine inducible SH2-containing protein	0.344	0.841
23	small inducible cytokine A3	0.332	1.179
24	small inducible cytokine A2 (monocyte chemotactic protein 1)	0.271	0.655
25	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	0.254	0.850
26	interleukin 2 receptor, beta	0.241	1.705
27	protein regulator of cytokinesis 1 # PRC1 #, mRNA	0.179	0.807
28	interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)	0.163	1.265
29	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13	0.150	0.603
30	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	0.132	1.526
31	small inducible cytokine A3-like 1	0.122	1.680
在 L 中低表达而在 S 中高表达的基因			
32	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	0.334	2.142
33	cytokine-like protein C17	0.140	5.067
在 L 中表达正常而在 S 中高表达的基因			
34	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), alpha isoform	1.690	2.219
35	Rho GTPase activating protein 1	1.156	2.151

激活。而在 S 中,上述某些组分不同程度的下调。干扰素 主要由活化的 T 细胞和 NK 细胞产生,主要通过 JAK-STAT 途径调节细胞中许多基因的表达来实现其功能,具有抗病毒活性、广泛的免疫调节功能,对绝大多数细胞有抑制增殖和促凋亡作用。干扰素介导的信号传导通路的激活可能增强了 L 自身抗肿瘤的能力。与 S 另一个明显不同的是,在

L 中,某些参与细胞增殖的基因低表达,而这些基因在 S 中不变或不同程度的上调。如血小板衍生的生长因子(PDGF)及其受体,类胰岛素及胰岛素受体, H-ras,某些有丝分裂原激活蛋白激酶,转录因子等。有报道认为,PDGF 表达减少的肿瘤侵袭性较少和预后较好,五年生存率更高<sup>[3]</sup>。L 与 S 的这些差异可能提示,在细胞增殖调控及免疫防御等方面,它们

明显不同。L 细胞恶性程度较低,众多抑制因素使之不易侵袭转移。

在 S 中,一方面,许多与细胞增殖的信号高表达,除上述的基因外,S 还高表达某些癌基因,这些癌基因产物参与信号传导的不同环节。如 *fms*, 产物为酪氨酸激酶,是血管内皮生长因子的受体,参与肿瘤血管的形成; *K-ras* 基因产物激活酪氨酸激酶通路中的关键酶类 MAPK,从而使信号不断下传;某些癌基因产物本身就是转录因子(如 *myc*),直接参与基因的转录;另一方面与负调控相关的基因低表达(如某些细胞因子、酪氨酸蛋白磷酸酶等),这些基因的低表达,使得负调控功能减弱,某些信号传导通路处于持续活化状态。

在 S 中,血管内皮生长因子 VEGF 并没有出现明显上调,但由癌基因 *fms* 编码的受体 Flt 却明显高表达,尽管目前机制不明,但高表达的受体即使在低浓度的 VEGF 的刺激下,也能激活相应的信号传导,促进肿瘤血管形成。

*ras* 蛋白在转导增殖信息上起重要作用。它在癌细胞中主要以点突变和基因扩增的方式存在,其中突变热点第 12、13、61 编码子正是 Ras 蛋白与 GTP 酶激活蛋白(GAP)的作用位点,突变后将使 *ras* 蛋白处于持续激活状态,从而刺激细胞不断增殖<sup>[4]</sup>。以往研究在肺腺癌中 *K-ras* 第 12 点突变发生率较高,可达 30%~50%<sup>[5]</sup>。在本研究中,过表达的 *K-ras* 是否存在点突变仍有待进一步研究。因为点突变在芯片杂交上并不能很好的区分开来。但无论如何,*K-ras* 的过表达或点突变均直接影响正常的细胞信号传导<sup>[6]</sup>。

综上所述,S 在酪氨酸激酶传导通路的多个环

节上都与 L 明显不同,而这些差异可能赋予了 S 增殖失控,更易于侵袭转移的特性。

本研究探讨两例预后不同的肺腺癌患者在酪氨酸激酶信号传导通路上的具体差异。通过把海量的基因信息与详细的临床资料相结合,我们发现预后好的病人高表达抗增殖和免疫相关基因;预后差的病人在高表达与增殖相关基因的同时,抗增殖和免疫防御相关基因处于低表达水平。这两例预后不同的肺腺癌患者在酪氨酸激酶传导通路上的具体差异不仅很好的解释他们不同的生物学行为,而且促进了我们对肿瘤分子机制的认识。深入研究这些具体差异对肺癌的诊断与治疗均有十分重要的意义。

#### 参考文献:

- [1] 吴一龙,林嘉颖,杨学宁,等.肺腺癌酪氨酸激酶信号传导通路中基因异常表达的复杂性[J].肿瘤防治研究,2004,31(2):65-69.
- [2] 吴一龙,林嘉颖,杨学宁,等.肺腺癌患者酪氨酸激酶信号传导通路的异常和临床预后[J].中华医学杂志,2004,84(12):992-996.
- [3] Bonnefoi H, Smith IE. How should cancer presenting as malignant pleural effusions be managed? [J]. Br J Cancer, 1996, 74(5):832-835.
- [4] Wu CH, Chen YF, Wang JY, et al. Mutant *K-ras* oncogene regulates steroidogenesis of normal human adrenocortical cells by the RAF-MEK-MAPK pathway[J]. Br J Cancer, 2002, 87(9): 1000-1005.
- [5] Garrett C & Sell S. Cellular Cancer Markers[M]. New Jersey: Humana Press, 1995. 17-110, 209-229, 375-391.
- [6] Ammouni W, Ramakrishna G, Sithanandam G, et al. Increased *K-ras* protein and activity in mouse and human lung epithelial cells at confluence[J]. Cell Growth Differ, 2002, 13(9): 441-448.

[编辑:张麟;校对:刘红武]