

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.11.004

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.11.004>

## NOK 与 p-GSK3 $\beta$ (Tyr216) 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义

黄翌, 赵晋波, 卢强, 张志培, 赖远阳, 李维妙, 张晨曦, 刘文豪, 李小飞

(空军军医大学第二附属医院胸腔外科, 西安 710038)

**[摘要]** 目的: 检测NOK与p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中的表达、两者之间的相关性以及蛋白表达和患者预后关系, 为研究NOK在肿瘤进展中的作用机制提供依据。方法: 采用免疫组织化学法检测NOK与p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)在104例NSCLC和10例非肿瘤患者肺组织中的表达, 分析组织中表达的差异性和相关性。对患者按蛋白表达情况分组, 进行生存分析。结果: 肿瘤细胞中NOK阳性着色主要位于细胞质中, p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)阳性着色定位于细胞质和细胞核中。NOK蛋白在肿瘤组织中高表达, 相对于癌旁组织、非肿瘤肺组织差异均有统计学意义( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ); p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)在正常肺组织、癌旁组织中的相对高表达, 而且正常组织与肿瘤组织差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。NOK的表达与淋巴结转移、TNM分期密切相关( $P < 0.001$ )。p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)表达与肿瘤组织的病理分类、TNM分期密切相关( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ )。NOK与p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)蛋白在NSCLC组织中呈显著负相关( $P < 0.05$ ,  $r = -0.264$ )。NOK高表达、p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)低表达患者术后生存时间显著低于两蛋白表达情况相反的患者( $P < 0.0001$ )。结论: NOK在高表达和p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)低表达与TNM分期密切相关, 2个蛋白的表达可能与NSCLC发生发展相关; NOK, p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)蛋白在NSCLC组织中呈显著负相关, 且2个蛋白可能共同影响NSCLC患者预后。NOK可能与GSK3 $\beta$ 相关通路的激活有关。

**[关键词]** 非小细胞肺癌; NOK; p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)

## Expression and its clinical significance of NOK and p-GSK3 $\beta$ (Tyr216) in non-small cell lung cancer

HUANG Zhao, ZHAO Jinbo, LU Qiang, ZHANG Zhipei, LAI Yuanyang, LI Weimiao, ZHANG Chenxi, LIU Wenhao, LI Xiaofei

(Department of Thoracic Surgery, Second Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710038, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the expressions of NOK and p-GSK3 $\beta$  (Tyr216) in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods:** The expression rates of NOK and p-GSK3 $\beta$  (Tyr216) proteins in 104 patients with NSCLC and 10 patients without NSCLC was detected by immunohistochemical stain. The clinical correlations between two

收稿日期 (Date of reception): 2019-03-15

通信作者 (Corresponding author): 李小飞, Email: [lxchest@fmmu.edu.cn](mailto:lxchest@fmmu.edu.cn)

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (81572252). This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81572252).

proteins were analyzed by statistics. Survival analysis was performed on grouping patients according to proteins expression. **Results:** The NOK positive expression was mainly located in cytoplasm and p-GSK3 $\beta$  (Tyr216) was mainly located in the cytoplasm and nucleus. NOK protein was highly expressed in tumor tissues, which was significantly different from the expression in corresponding adjacent tissues and non-tumor lung tissues ( $P<0.001$ ,  $P<0.05$ ). The expression of p-GSK3 $\beta$  (Tyr216) was higher relatively in normal lung tissues and adjacent tissues than that in tumor tissues. And the difference between normal tissue and tumor tissue was significant ( $P<0.001$ ). There were significant differences for NOK expression among lymphatic invasion and TNM stages in NSCLC ( $P<0.001$ ). There were significant differences for p-GSK3 $\beta$  (Tyr216) expression among pathology type and TNM stages in NSCLC ( $P<0.001$ ,  $P<0.05$ ). There was significantly negative correlation between positive and intensity of NOK and p-GSK3 $\beta$  (Tyr216) expression in NSCLC tissues ( $r=-0.264$ ,  $P<0.05$ ). The survival time of patients with high expression of NOK and low expression of p-GSK3 $\beta$  (Tyr216) was significantly lower than that of patients with opposite expression of two proteins ( $P<0.0001$ ). **Conclusion:** The NOK proteins are highly expressed and the p-GSK3 $\beta$  (Tyr216) proteins are lowly expressed in the NSCLC, which is correlated with TNM stages. The expressions of NOK and p-GSK3 $\beta$  (Tyr216) proteins may be connected with tumor genesis and progression. NOK and p-GSK3 $\beta$  (Tyr216) proteins have a significantly negative correlation in NSCLC tissues, which may work together to influence the prognosis of NSCLC patients. It reveals that NOK may be involved in the activation of GSK3 $\beta$ -related pathways, which provides a clue for further study on the role and mechanism of NOK in NSCLC.

**Keywords** non-small cell lung cancer; NOK; p-GSK3 $\beta$  (Tyr216)

NOK(novel oncogene with kinase-domain)又称丝氨酸苏氨酸酪氨酸激酶1(Serine threonine tyrosine kinase 1, STYK1), 是受体蛋白酪氨酸激酶(receptor protein tyrosine kinase, RTK/RPTK)的家族成员。NOK在多种癌症中高表达, 包括非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)、结直肠癌等<sup>[1-4]</sup>。但有报道提示NOK激酶活性较低<sup>[5]</sup>, 其可以通过激活磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)通路参与肿瘤发生发展<sup>[3-4]</sup>。这提示NOK是新的候选癌基因, 但其在NSCLC发生发展中的作用及机制尚待进一步研究。

糖原合成酶激酶3(glycogen synthase kinase 3, GSK3)是一种多功能丝氨酸/苏氨酸激酶, 在真核细胞中广泛存在<sup>[6]</sup>, GSK3 $\beta$ 是其一个亚型。GSK3 $\beta$ 存在2个磷酸化位点, 在细胞中持续活化的酪氨酸216(Tyr216)位点磷酸化使其功能激活; 而丝氨酸9(Ser9)位点磷酸化会导致其失活<sup>[7-8]</sup>。GSK3 $\beta$ 是PI3K/Akt通路的作用底物<sup>[9-13]</sup>。但国内外关于NOK和p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)在NSCLC中的表达及相关性意义的研究报道鲜见。本研究探讨NOK和p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)蛋白在NSCLC中的表达及相关性意义。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

以2005年1月至2013年1月空军军医大学唐都医院的NSCLC患者为研究对象, 收集每例患者术后原发病灶手术标本及相应癌旁肺组织标本(实验室存档)共计104例, 其中鳞癌60例, 腺癌44例, 年龄36~78(中位数61)岁。从计算机登记数据库中登记的患者的医疗记录中获得详细信息, 包括患者性别、年龄、吸烟史、临床表现、手术方法、肿瘤病理分型、组织分化程度、淋巴结转移状况和随访信息等, 肿瘤分期标准参照第七版的肺癌TNM分期标准<sup>[14]</sup>, 患者均未接受放化疗和靶向治疗。正常肺组织10例, 为非肿瘤患者手术标本。所有患者的组织标本在手术后均立即用液氮转移, 然后置于-80℃冰箱中保存。研究方案符合人体试验伦理学标准, 患者均签署书面知情同意书, 同意其组织标本和医疗记录用于研究。标本采集经空军军医大学唐都医院伦理委员会批准。NOK多克隆抗体、p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)多克隆抗体购自美国Abcam公司, EnVision<sup>TM</sup>免疫组织化学试剂盒购自丹麦DAKO公司。

## 1.2 免疫组织化学

根据预选病例选择标本, 5  $\mu\text{m}$ 连续切片, 行HE和免疫组织化学染色, 免疫组织化学染色采用两步法。步骤如下: 石蜡切片脱蜡至水, 尿素消化, 抗原修复, 3%过氧化氢封闭, 山羊血清封闭, 一抗孵育4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 37  $^{\circ}\text{C}$ 下复温, 二抗孵育, DAB显色, 苏木精复染细胞核, 脱水封片, 显微镜镜检。阳性、阴性和空白对照组: 将已知为阳性或阴性表达的组织作为阳性或阴性对照组, PBS代替一抗作为空白对照组。

## 1.3 免疫组织化学结果判断

NOK的阳性表达主要定位在细胞质中和细胞膜上, GSK3 $\beta$ 的阳性表达主要定位在细胞质和细胞核中。采用双评分半定量法判读结果。由阴性名研究者盲法读片, 并对细胞的染色强度、染色细胞比例综合评分。在细胞质和/或细胞核中着色判定为阳性。每例均随机在400倍高倍镜下随机挑选5个视野, 计数200个细胞, 统计阳性细胞所占的百分比: <10%为0分, 10%~20%为1分, 20%~50%为2分, >50%为3分; 无反应细胞为0分, 浅黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分; 将染色强度和染色细胞的比例两项积分相乘。积分0~2为阴性表达, 积分3~9为阳性表达。

## 1.4 统计学处理

采用SPSS 24.0统计软件比较组间差异和相关性分析, 采用GraphPad Prism5软件进行生存分析。免疫组织化学检测结果以阳性例数表示, 采用卡方检验和Fisher精确概率法比较NOK和p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)蛋白表达在肿瘤组织与癌旁肺组织、非肿瘤肺组织间的差异及与NSCLC患者临床病理特征之间的关系; 采用卡方检验和Spearman法进行NOK和p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)相关性分析; 采用生存分析和Log-rank检验进行预后分析。P<0.05为差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 免疫组织化学表达定位

肿瘤细胞中NOK阳性着色主要位于细胞质中, 而在正常肺组织中主要呈阴性染色。肿瘤细胞中p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)阳性着色定位于细胞质和细胞核中(图1)。

## 2.2 NOK, p-GSK3 $\beta$ (Tyr216) 蛋白在不同肺组织的表达率和差异性

在104例患者的肿瘤组织中, NOK, p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)阳性表达分别有63例和28例(60.58% vs 25.96%); 在相应的104例癌旁正常肺组织中, NOK, p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)阳性表达分别有13例和38例(12.50% vs 36.54%); 正常肺组织中, NOK, p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)阳性表达分别有1例和8例(10.00% vs 80.00%)。NOK在肿瘤组织中阳性表达率高于癌旁组织、正常肺组织中的表达, 且差异均有统计学意义(P<0.001; P<0.05)。p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)在正常肺组织、癌旁组织中的阳性表达率高于肿瘤组织中的表达, 且在正常组织与肿瘤组织中的差异有统计学意义(P<0.001, 表1)。

## 2.3 NOK, p-GSK3 $\beta$ (Tyr216) 蛋白与肺癌临床病理因素的关系

NOK的表达与淋巴结转移和TNM分期密切相关(P<0.001)。p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)表达与肿瘤组织的病理分类、TNM分期密切相关(P<0.001, P<0.05)。其余病理因素与NOK, p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)蛋白表达量无明显相关性(表2)。

## 2.4 NOK, p-GSK3 $\beta$ (Tyr216) 蛋白表达之间及与患者预后的关系

按照NOK和NSCLC组织中表达情况分为4组: NOK阳性表达63例, 其中p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)蛋白阳性表达11例(N<sup>+</sup>G<sup>+</sup>组), 阴性表达52例(N<sup>+</sup>G<sup>-</sup>组); NOK阴性表达41例, 其中p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)蛋白阳性表达17例(N<sup>-</sup>G<sup>+</sup>组), 阴性表达24例(N<sup>-</sup>G<sup>-</sup>组)。两种蛋白阳性强度经Spearman相关性检验存在显著负相关(P<0.05, r=-0.264; 表3)。对四组患者的术后生存时间进行生存分析发现: N<sup>+</sup>G<sup>-</sup>组、N<sup>+</sup>G<sup>+</sup>组、N<sup>-</sup>G<sup>-</sup>组和N<sup>-</sup>G<sup>+</sup>组患者的术后中位生存时间分为15个月、41个月、24个月、48个月。根据p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)表达情况来看, N<sup>-</sup>G<sup>-</sup>组患者术后生存时间显著低于N<sup>-</sup>G<sup>+</sup>组患者(P=0.0101), N<sup>+</sup>G<sup>-</sup>组患者术后生存时间显著低于N<sup>+</sup>G<sup>+</sup>组患者(P=0.0061); 根据NOK表达情况来看, N<sup>+</sup>G<sup>-</sup>组患者术后生存时间显著低于N<sup>-</sup>G<sup>-</sup>组患者(P=0.0157), N<sup>+</sup>G<sup>+</sup>组患者术后生存时间低于N<sup>-</sup>G<sup>+</sup>组患者(P=0.2749); 而综合两个蛋白表达情况来看, N<sup>-</sup>G<sup>-</sup>组患者的预后则明显优于N<sup>+</sup>G<sup>-</sup>组患者(P<0.0001, 图2)。



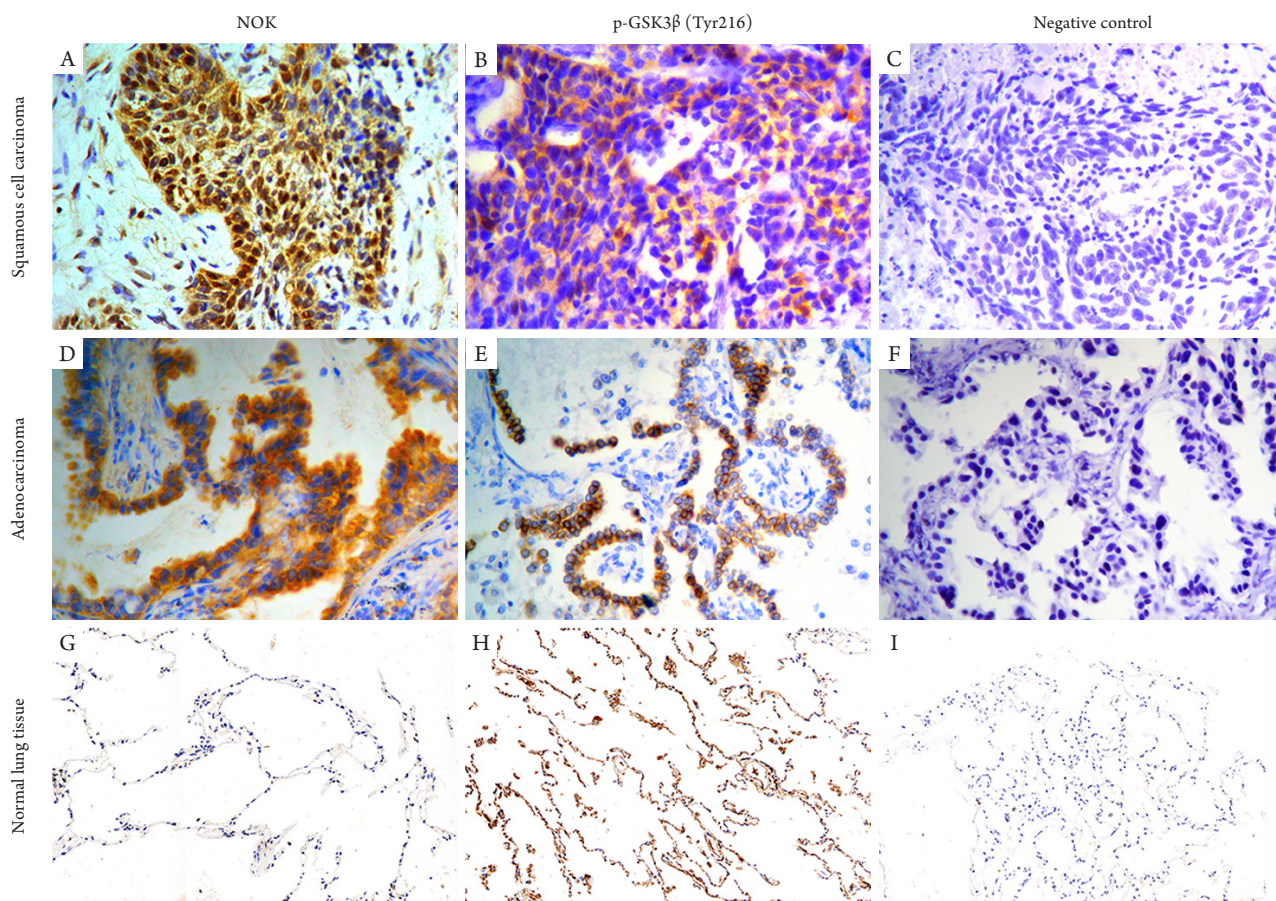


图1 NOK, p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)在不同肺组织中的表达情况(A~F:  $\times 400$ ; G~I:  $\times 200$ )

Figure 1 Expression of NOK and p-GSK3 $\beta$  (Tyr216) in different lung tissues (A~F:  $\times 400$ ; G~I:  $\times 200$ )

(A, D)NOK蛋白在肺鳞癌和腺癌中呈较强阳性表达; (B, E)p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)蛋白在肺鳞癌和腺癌中呈较弱阳性或阴性表达; (C, F, I)空白对照; (G, H)非肿瘤正常肺组织中NOK蛋白呈阴性表达, p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)蛋白呈阳性表达。

(A, D) NOK expression were strongly positive in lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma; (B, E) p-GSK3 $\beta$  (Tyr216) expression were weakly positive or negative in lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma; (C, F, I) blank control; (G, H) negative expression of NOK protein and positive expression of p-GSK3 $\beta$  (Tyr216) in non-tumor normal lung tissue.

表1 NOK, p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)在不同肺组织中的表达差异

Table 1 Expression difference of NOK, p-GSK3  $\beta$  (Tyr216) among different lung tissues

组织类型	n	NOK/%			p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)/%		
		-	+	P	-	+	P
正常肺组织	10	9 (90.00)	1 (10.00)	0.005*	2 (20.00)	8 (80.00)	<0.001*
癌旁组织	104	91 (87.50)	13 (12.50)	<0.001*	66 (63.56)	38 (36.54)	0.180
肿瘤组织	104	41 (39.42)	63 (60.58)		76 (74.04)	28 (25.96)	

表2 NSCLC组织中NOK与p-GSK3β(Tyr216)的表达量与临床病理因素的相关性

Table 2 Correlation between expression of NOK, p-GSK3β(Tyr216) in NSCLC tissues and clinical pathological factors

病理因素	n	NOK				p-GSK3 β (Tyr216)			
		-	+	阳性率/%	P	-	+	阳性率/%	P
性别					0.174				1.000
男	21	11	10	47.62		15	6	28.57	
女	83	30	53	63.86		61	22	26.51	
年龄/岁					0.908				0.659
≤60	50	20	30	60.00		38	12	24.00	
>60	54	21	33	61.11		38	16	29.63	
病理类型					0.689				<0.001
鳞癌	61	23	38	62.30		52	9	14.75	
腺癌	43	18	25	58.14		24	19	44.19	
分化程度					0.402				0.052
低	14	4	10	71.43		7	7	50.00	
高/中	90	37	53	58.89		69	21	23.33	
肿瘤大小/cm					0.678				1.000
>3	98	38	60	61.22		62	26	26.53	
≤3	6	3	3	50.00		4	2	33.33	
淋巴结转移					<0.001				1.000
无	57	32	25	43.86		42	15	26.32	
有	47	9	38	80.85		34	13	27.66	
远处转移					0.154				0.632
无	99	41	58	58.59		63	26	26.26	
有	5	0	5	100.00		3	2	40.00	
TNM分期									
I	10	9	1	10.00		4	6	60.00	
II	30	10	20	66.67	0.003	22	8	26.67	0.123
III	64	22	42	65.63	<0.001	50	14	21.88	0.020
临床分期					0.398				0.855
I/II	53	23	30	56.60		38	25	47.17	
III/IV	51	18	33	64.71		38	23	45.10	

表3 NSCLC组织中 NOK 的表达与p-GSK3β(Tyr216)表达的相关性

Table 3 Correlation between expression of NOK and p-GSK3β (Tyr216) in NSCLC tissues

p-GSK3β(Tyr216)	NOK		r	P
	+	-		
+	11	17	-0.264	0.012
-	52	24		

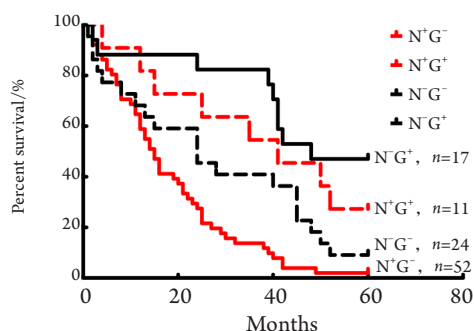


图2 NOK, p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)表达对NSCLC患者预后的影响  
Figure 2 Effect of NOK and p-GSK3 $\beta$  (Tyr216) expression on survival of NSCLC cases

N<sup>+</sup>/ -: NOK阳性表达/阴性表达; G<sup>+</sup>/ -: p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)阳性表达/阴性表达。

N<sup>+</sup>/ -: positive/negative expression of NOK; G<sup>+</sup>/ -: positive/negative expression of p-GSK3 $\beta$  (Tyr216).

### 3 讨论

NOK作为受体蛋白酪氨酸激酶家族(RTPK)成员,可能与肿瘤中的多条信号通路激活相关。NOK有2 749个碱基对,包含1个能够编码422个氨基酸的开放阅读框,其蛋白结构包含胞外区域、跨膜螺旋和胞内蛋白结构域<sup>[15]</sup>。自NOK被发现以来,大量研究<sup>[1,2,16-17]</sup>显示其蛋白或mRNA在NSCLC、结直肠癌和肾细胞癌等肿瘤临床样本中存在高表达。NOK可通过激活下游信号通路参与肿瘤细胞的凋亡、自噬、转移等过程<sup>[3-4,18-20]</sup>。但是有报道<sup>[21]</sup>指出NOK的激酶活性很弱,需要通过下游蛋白的介导才能激活细胞内的信号通路参与肿瘤的发生发展。此外,在肝细胞癌和胆囊癌中,NOK可以通过激活PI3K/Akt通路促进肿瘤细胞的增殖和转移<sup>[3-4]</sup>。提示NOK可能通过激活PI3K/Akt通路调控下游蛋白的表达进而影响肿瘤的发生发展。

本研究采用免疫组织化学方法检测NOK蛋白在104例NSCLC患者和10例非肿瘤患者肺组织中的表达,结果显示:NOK在肿瘤组织中阳性表达率为60.58%,在癌旁肺组织和非肿瘤患者肺组织阳性表达率分别为12.50%,10.00%。肿瘤组织中的NOK表达显著高于相应癌旁组织和非肿瘤正常肺组织中的表达( $P<0.001$ ,  $P=0.005$ )。提示NOK具有致癌性,与本课题组之前的报道<sup>[1]</sup>一致。NOK的阳性表达与淋巴结转移、TNM分期密切相关。在存在淋巴结转移的病例中,NOK阳性率(80.85%)显著高于无转移组(43.86%,  $P<0.001$ ); NOK阳性

率在TNM分期I, II和III期患者中分别为10.00%, 66.67%, 65.63%,在II, III期患者中的阳性率显著高于I期患者阳性率( $P<0.001$ ;  $P=0.003$ ),但是II, III期患者阳性率接近,差异无统计学意义,进一步增加样本量或许可以分析其表达差异。上述结果提示NOK高表达可能与NSCLC的发生、发展(或与转移相关)有关。这与NOK在近期其他肿瘤细胞中的相关研究<sup>[2-4]</sup>一致,但NOK参与肿瘤进展的作用机制仍不清楚。

GSK3 $\beta$ 是一种在细胞中广泛存在的糖原合成酶激酶,其功能多样,在糖尿病、双向情感障碍、阿尔兹海默病及肿瘤发生发展过程中均发挥作用<sup>[22-26]</sup>。GSK3 $\beta$ 是多种信号转导通路的重要组成部分和交叉点,能够调节细胞命运,如蛋白质合成、糖原代谢、细胞迁移、增殖和存活<sup>[10-12,24-35]</sup>。GSK3 $\beta$ 的激酶活性由其磷酸化状态决定,正常状态下Tyr216位点持续磷酸化保持活性,而Ser9位点磷酸化时其功能失活。这是GSK3 $\beta$ 功能多样化的重要基础<sup>[7]</sup>。GSK3 $\beta$ 在肿瘤中的作用存在争议,一方面,一些研究<sup>[31-32,36-37]</sup>发现GSK3 $\beta$ 在许多临床肿瘤样本中存在过表达,而且抑制GSK3 $\beta$ 的表达会抑制肿瘤进展;另一方面, $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)是GSK3 $\beta$ 经典的磷酸化底物,这就使GSK-3 $\beta$ 在Wnt信号通路中充当了“肿瘤抑制因子”的功能<sup>[10,12,28,38-40]</sup>。GSK3 $\beta$ 是PI3K/Akt信号通路的作用底物。近年来,Akt/GSK3 $\beta$ /Snail/E-cadherin这条信号通路在不同肿瘤中被广泛报道,其通路的激活依靠配体与RPTK的结合<sup>[9-13,25]</sup>。NOK作为RPTK家族的成员,是否参与Akt/GSK3 $\beta$ /Snail/E-cadherin通路的激活、与其中关键蛋白GSK3 $\beta$ 的表达的关系,GSK3 $\beta$ 蛋白在NSCLC组织中的表达及与临床病理因素的关系尚待进一步阐明。

本研究通过免疫组织化学实验,检测p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)蛋白在同上述的NSCLC和非肿瘤患者肺组织中的表达情况,并分析其与NOK表达的相关性,结果显示:肿瘤组织、癌旁组织、正常肺组织中p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)表达阳性率分别为25.96%,36.54%和80.00%;肿瘤组织中p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)表达阳性率高于癌旁组织,癌旁组织中高于正常肺组织。正常肺组织中阳性率与肿瘤组织差异有统计学意义( $P<0.001$ ),与癌旁组织差异无统计学意义( $P=0.180$ )。腺癌患者中p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)表达阳性率(44.19%)高于鳞癌患者中p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)表达阳性率(14.75%),且差异有统计学意义( $P<0.001$ )。这可能与腺癌组织更具分泌、释放活性有关。按TNM分期来看,



分期与p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)表达阳性率呈反比(I期:60.00%; II期:26.67%; III期:21.88%),且I期与III期患者中差异有统计学意义( $P=0.020$ )。这些结果提示p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)可能在NSCLC中起肿瘤抑制因子的作用,其表达量与肿瘤的恶性进展呈负相关。实验中使用的抗体为GSK3 $\beta$ ((phospho Tyr216),代表了细胞中常态下处于功能激活状态的内源性GSK3 $\beta$ 蛋白的总量。一项关于NSCLC中总GSK3 $\beta$ 蛋白表达的研究<sup>[36]</sup>显示:GSK3 $\beta$ 表达与患者预后呈负相关。这些结果提示在NSCLC中GSK3 $\beta$ 蛋白可能大量以Ser9位点磷酸化形式存在,介导肿瘤的恶性进展。

此外,Spearman相关性检验显示:肿瘤组织中NOK与p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)表达量呈显著负相关( $r=-0.264$ ,  $P=0.012$ )。生存分析结果进一步提示NOK高表达与p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)低表达共同存在可能与患者的不良预后相关。而在乳腺癌细胞中,NOK可与Akt,GSK3 $\beta$ 结合,促进Akt的磷酸化进而激活其活性,通过活化的Akt介导参与促进GSK3 $\beta$ 在Ser9位点的磷酸化,导致GSK3 $\beta$ 功能的失活<sup>[21]</sup>。而GSK3 $\beta$ 功能的失活,会导致转录因子Snail降解减少,进而下调E-cadherin表达,促进肿瘤的EMT进程<sup>[41]</sup>。提示在NSCLC中,NOK可能与GSK3 $\beta$ 存在相互作用,促进肿瘤的恶性进展。且NOK作为受体酪氨酸激酶家族(RPTK)的成员,其对酪氨酸位点的直接作用不强,其更可能先通过激活Akt,进而参与Akt/GSK3 $\beta$ /Snail/E-cadherin信号通路,促进GSK3 $\beta$ 在Ser9位点的磷酸化,间接降低p-GSK3 $\beta$ (Tyr216)的表达,介导肿瘤的EMT进程。因此推测NOK可以通过调控Akt/GSK3 $\beta$ 介导NSCLC的EMT进程,但有关证据如NOK与p-Akt和p-GSK3 $\beta$ (Ser9)表达相关性、NOK与EMT的作用及相关机制需要进一步体外实验以证实。

## 志谢

感谢所有参与本研究的人员。感谢参与课题构思与设计的黄翌、赵晋波、张志培、卢强、赖远阳、李小飞;提供课题资金资助和管理的李小飞、赵晋波、张志培、卢强;提供研究材料或标本的张志培、赖远阳、李维妙、张晨曦;收集和整理数据的黄翌、赖远阳、李维妙、张晨曦、刘文豪;进行数据分析的黄翌、赖远阳、刘文豪、赵晋波、张志培、李小飞;另外感谢唐都医院胸腔外科实验室全体工作人员提供技术指导。

## 参考文献

1. Chen P, Li WM, Lu Q, et al. Clinicopathologic features and prognostic implications of NOK/STYK1 protein expression in non-small cell lung cancer[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 402.
2. Orang AV, Safaralizadeh R, Hosseinpour Feizi MA, et al. Diagnostic relevance of overexpressed serine threonine tyrosine kinase/novel oncogene with kinase domain (STYK1/ NOK) mRNA in colorectal cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15: 6685-6689.
3. Wang Z, Qu L, Deng B, et al. STYK1 promotes epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis in human hepatocellular carcinoma through MEK/ERK and PI3K/AKT signaling[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33205.
4. Hu YP, Wu ZB, Jiang L, et al. STYK1 promotes cancer cell proliferation and malignant transformation by activating PI3K-AKT pathway in gallbladder carcinoma[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 97: 16-27.
5. Chen Y, Li YH, Chen XP, et al. Point mutation at single tyrosine residue of novel oncogene NOK abrogates tumorigenesis in nude mice[J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 10838-10846.
6. Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase[J]. *J Cell Sci*, 2003, 116: 1175-1186.
7. ter Haar E, Coll JT, Austen DA, et al. Structure of GSK3beta reveals a primed phosphorylation mechanism[J]. *Nat Struct Biol*, 2001, 8: 593-596.
8. Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling[J]. *Prog Neurobiol*, 2001, 65: 391-426.
9. Dou Y, Lei JQ, Guo SL, et al. The CNPY2 enhances epithelial-mesenchymal transition via activating the AKT/GSK3 $\beta$  pathway in non-small cell lung cancer[J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(8): 959-964.
10. Moon JY, Manh Hung LV, Unno T, et al. Nobiletin enhances chemosensitivity to adriamycin through modulation of the Akt/GSK3 $\beta$ /Catenin/MYC/MRP1 signaling pathway in A549 human non-small-cell lung cancer cells[J]. *Nutrients*, 2018, 10(12): E1829.
11. Wang Y, Zhao M, Liu J, et al. miRNA-125b regulates apoptosis of human non-small cell lung cancer via the PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3): 1715-1723.
12. Liu L, Zhou XM, Yang FF, et al. TRIM22 confers poor prognosis and promotes epithelial-mesenchymal transition through regulation of AKT/GSK3beta/beta-catenin signaling in non-small cell lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 62069-62080.
13. Zhou SL, Zhou ZJ, Hu ZQ, et al. CXCR2/CXCL5 axis contributes to epithelial-mesenchymal transition of HCC cells through activating PI3K/Akt/GSK-3beta/Snail signaling[J]. *Cancer Lett*, 2015, 358: 124-135.
14. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of

- malignant tumours[J]. *J Thorac Oncol*, 2007, 2(8): 706-714.
15. Ye X, Ji C, Huang Q, et al. Isolation and characterization of a human putative receptor protein kinase cDNA STYK1[J]. *Mol Biol Rep*, 2003, 30: 91-96.
  16. Cao Q, Chen M, Li Z, et al. High novel oncogene with kinase-domain (NOK) gene expression is associated with the progression of renal cell carcinoma[J]. *Clin Lab*, 2016, 62: 179-186.
  17. Amachika T, Kobayashi D, Moriai R, et al. Diagnostic relevance of overexpressed mRNA of novel oncogene with kinase-domain (NOK) in lung cancers[J]. *Lung Cancer*, 2007, 56(3): 337-340.
  18. Shi WY, Yang X, Huang B, et al. NOK mediates glycolysis and nuclear PDC associated histone acetylation[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2017, 22: 1792-1804.
  19. Zhou J, Wang F, Liu B, et al. Knockdown of serine threonine tyrosine kinase 1 (STYK1) inhibits the migration and tumorigenesis in glioma cells[J]. *Oncol Res*, 2017, 25(6): 931-937.
  20. Liu Y, Li T, Hu D, et al. NOK/STYK1 promotes the genesis and remodeling of blood and lymphatic vessels during tumor progression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478: 254-259.
  21. Li J, Wu F, Sheng F, et al. NOK/STYK1 interacts with GSK-3beta and mediates Ser9 phosphorylation through activated Akt[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586: 3787-3792.
  22. Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 148: 114-131.
  23. Golpich M, Amini E, Hemmati F, et al. Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3beta) signaling: implications for Parkinson's disease[J]. *Pharmacol Res*, 2015, 97: 16-26.
  24. Chen X, Wang R, Liu X, et al. A chemical-genetic approach reveals the distinct roles of GSK3alpha and GSK3beta in regulating embryonic stem cell fate[J]. *Dev Cell*, 2017, 43: 563-576.e4.
  25. Majewska E, Szeliga M. AKT/GSK3β signaling in glioblastoma[J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(3): 918-924.
  26. Patel P, Woodgett JR. Glycogen synthase kinase 3: a kinase for all pathways?[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2017, 123: 277-302.
  27. Yang K, Chen Z, Gao J, et al. The Key Roles of GSK-3beta in regulating mitochondrial activity[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44: 1445-1459.
  28. Geng F, Jiang Z, Song X, et al. Mdig suppresses epithelial-mesenchymal transition and inhibits the invasion and metastasis of non-small cell lung cancer via regulating GSK-3β/β-catenin signaling[J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(6): 1898-1908.
  29. Li T, Jian X, He H, et al. MiR-452 promotes an aggressive colorectal cancer phenotype by regulating a Wnt/β-catenin positive feedback loop[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 238.
  30. Banerjee R, Rudloff Z, Naylor C, et al. The presenilin loop region is essential for glycogen synthase kinase 3 β (GSK3β) mediated functions on motor proteins during axonal transport[J]. *Hum Mol Genet*, 2018, 27(17): 2986-3001.
  31. Edderkaoui M, Chheda C, Soufi B, et al. An inhibitor of GSK3B and HDACs kills pancreatic cancer cells and slows pancreatic tumor growth and metastasis in mice[J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(6): 1985-1998.e5.
  32. Gao S, Li S, Duan X, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3β) suppresses the progression of esophageal squamous cell carcinoma by modifying STAT3 activity[J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(10): 2301-2316.
  33. Xue M, Ji X, Xue C, et al. Caspase-dependent and caspase-independent induction of apoptosis in breast cancer by fucoidan via the PI3K/AKT/GSK3β pathway in vivo and in vitro[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 94: 898-908.
  34. Varano G, Raffel S, Sormani M, et al. The B-cell receptor controls fitness of MYC-driven lymphoma cells via GSK3β inhibition[J]. *Nature*, 2017, 546: 302-306.
  35. Agostinelli C, Carloni S, Limarzi F, et al. The emerging role of GSK-3β in the pathobiology of classical Hodgkin lymphoma[J]. *Histopathology*, 2017, 71: 72-80.
  36. Zeng J, Liu D, Qiu Z, et al. GSK3β overexpression indicates poor prognosis and its inhibition reduces cell proliferation and survival of non-small cell lung cancer cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91231.
  37. McCubrey JA, Steelman LS, Bertrand FE, et al. GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer[J]. *Oncotarget*, 2014, 5: 2881-2911.
  38. Tejada-Munoz N, Robles-Flores M. Glycogen synthase kinase 3 in Wnt signaling pathway and cancer[J]. *IUBMB Life*, 2015, 67: 914-922.
  39. Jacobs KM, Bhawe SR, Ferraro DJ, et al. GSK-3beta: a bifunctional role in cell death pathways[J]. *Int J Cell Biol*, 2012, 2012: 930710.
  40. Gao C, Chen G, Kuan SF, et al. FAK/PYK2 promotes the Wnt/β-catenin pathway and intestinal tumorigenesis by phosphorylating GSK3β[J]. *Elife*, 2015, 4.
  41. Zhou BP, Deng J, Xia W, et al. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(10): 931-940.

本文引用: 黄翌, 赵晋波, 卢强, 张志培, 赖远阳, 李维妙, 张晨曦, 刘文豪, 李小飞. NOK与p-GSK3β(Tyr216)在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(11): 2363-2370. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.11.004

**Cite this article as:** HUANG Zhao, ZHAO Jinbo, LU Qiang, ZHANG Zhipei, LAI Yuanyang, LI Weimiao, ZHANG Chenxi, LIU Wenhao, LI Xiaofei. Expression and its clinical significance of NOK and p-GSK3β (Tyr216) in non-small cell lung cancer[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(11): 2363-2370. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.11.004