非小细胞肺癌组织中 CDK2 及 β-catenin 的表达

杨海燕 李晓虹 张映红△

（厦门大学附属第一医院肿瘤内科 福建 厦门 361003）

摘要 目的：观察非小细胞肺癌组织中 CDK2 及 β-catenin 的表达，探讨 CDK2 及 β-catenin 与肺癌转移的关系。方法：48 例非小细胞肺癌患者分为转移组和未转移组。手术取肺癌组织，分别采用实时荧光定量 PCR 法和 western blot 法检测脑组织中 CDK2 及 β-catenin 蛋白和 mRNA 的表达。结果：转移组肺癌组织中 CDK2 及 β-catenin 蛋白和 mRNA 的表达明显高于未转移组（P<0.01）。结论：CDK2 及 β-catenin 与肺癌转移有关。

关键词：肺癌；CDK2；β-catenin

中图分类号：R734.2 **文献标识码**：A **文章编号**：1673-6273（2011）20-3897-02

Expression of CDK2 andβ-Catenin in Non Small-Cell Lung Cancer

YANG Hai-yan, LI Xiao-hong, ZHANG Ying-hong△

(Department of medical oncology, The first affiliated hospital of Xiamen University, Fujiang, Xiamen, 361003)

ABSTRACT Objective: To observe the expression of CDK2 and b-catenin in non small-cell lung cancer tissue and to investigate the relationship of CDK2 and b-catenin with metastatic lung cancer. Methods: 48 non small-cell lung cancer patient were divided into metachoresis and non metachoresis groups. Real-time FQ-PCR and western blot were applied respectively to detect the protein and mRNA expression of CDK2 and b-catenin in carcinoma tissue. Results: The protein and mRNA expression of CDK2 and b-catenin was obviously higher in metachoresis group than in non metachoresis group. Conclusion: The expression of CDK2 and b-catenin may be correlated with lung cancer metastasis.

Key words: Carcinomatous metastasis; CDK2; β-catenin

Chinese Library Classification(CLC): R734.2 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2011)20-3897-02

癌症的发生主要是由于细胞周期失去控制造成的。细胞周期与肿瘤发生、发展的关系是当前肿瘤研究的热点之一[1-2]。细胞周期蛋白（cyclin）和周期蛋白依赖性激酶(cyclin2dependent kinase，CDK)是细胞周期调控中的关键大分子[3-4]。细胞周期的精密调控是细胞正常生长的关键性因素，而一系列的细胞周期蛋白依赖性激酶（CDKs）是细胞周期调控的核心装置[5]。β-catenin 是 Wnt 通路（Wnt signaling pathway)的重要成员，与肿瘤的发生、浸润和转移密切相关[6-7]，Wnt 信号通路与肿瘤的关系近年来受到广泛关注。因此研究 CDK2 与 β-catenin 在肺癌中的表达对肺癌的防治有非常重要的意义。

1 材料和方法

1.1 一般资料

病例 48 例均来源于本院肿瘤科，经临床影像学检查（3.0T 核磁共振仪 HDMR（High Definition MR，GE 公司）和病理学确诊为非小细胞肺癌患者。其中，≥ 60 岁 39 例，<60 岁 9 例，男 32 例，女 16 例。未见纵膈和远处转移 20 例，有纵膈或远处转移 28 例。

作者简介：杨海燕，女，硕士，32 岁，主治医师，主要研究方向：炎症免疫与肿瘤浸润转移。E-mail：haiyazi6623@126.com

△通讯作者：张映红，女，53 岁，主任医师，主要研究方向：肺癌综合治疗。E-mail：yhzh63@medmail.com.cn

（收稿日期：2011-04-02 接受日期：2011-04-28）

1.2 试剂与引物设计

RNA 抽提试剂盒，逆转录试剂盒，实时荧光定量 PCR 试剂盒购自 Takara 公司。兔源 CDK2 及 β-catenin 一抗购自 santa cruz 公司，山羊抗兔二抗购自北京中杉公司。采用 "Primer Premier 5.0" 软件设计引物：VEGF 上游：5' CACTTGCTGGGCTTCTTCTC 3'，VEGF 下游：5' CACAGACCGTAACTGCTCCTC 3'，扩增产物长度 186bp；β-catenin 上游：5' AAGGGACAGTATCGTTTGTTTATG 3'，β-catenin 下游：5' GGAAGGACTTAGGTTTGGT GC 3'，扩增产物长度 184bp；GAPDH 上游：5' CATCAAGAAGGTGGTGAAGCA 3'，GAPDH 下游：5' TCAAAGGTGGAGGAGTGGGT 3'，扩增产物长度 117 bp。

1.3 仪器

3.0T 核磁共振仪 HDMR（High Definition MR，GE 公司，凝胶成像系统（BIO-RAD 公司），低温离心机（sigma 公司），Light-Cycler Ⅱ型实时荧光定量基因扩增系统（德国 Roche 公司）。

1.4 方法

1.4.1 分组 患者随机分为两组，未转移组和转移者。所有患者均经手术治疗，取肺癌组织 -80℃保存备用。

1.4.2 western blot 法检测癌组织中 CDK2 及 β-catenin 表达 (1) 蛋白抽提：取 50～100mg 组织，加入 100ul 含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液，4℃旋转 15 分钟。12000rpm 离心 10min，吸上清。(2) Western blot：蛋白上样后 80v 电泳 3h，100v 恒压湿转 45min，转膜结束后脱脂奶粉封闭至少 30 分钟，根据抗体的稀

释比将相应的一抗加入牛奶中，用封膜带封好后放入 4℃冰箱过夜。TBST 洗膜，3 遍，每次 10min。然后加入二抗，二抗的稀释比一般为 1:3000，方法和加一抗相同，封好口后放室温 30-40min。TBST 洗膜，3 遍，每次 10min。显影液显影，凝胶成像仪获取图像。

1.4.3 总 RNA 的提取及荧光定量逆转录聚合酶链反应 取 50～80 mg 组织置于研磨器中，加入液氮研磨成匀浆，加入 1ml Trizol，用加样枪吹打混匀，室温静置 10 min，加入 0.2 ml 氯仿，摇匀，室温下静置 15min，4℃ 10000g 离心 15 min，将上层水相转移至新的离心管中，加入等体积的异丙醇，混匀，室温下静置 10min 后，4℃ 10000g 离心 10min，弃上清，75%乙醇清洗 1 次，将 RNA 沉淀晾干，用 20 μl 无 RNA 酶去离子水溶解。逆转录按试剂盒说明书进行。荧光定量聚合酶链反应参见试剂盒说明书：1μl cDNA 样本作为 PCR 扩增模板，阴性对照扩增模板为去离子水 扩增条件为 95℃预变性 3 min；随后 95 ℃30 s，退火温度 30 s，72 ℃ 45s，共 40 个循环。

1.4.4 统计学方法 所有数据以均数± 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，应用 SPSS 12.0 对数据进行统计学处理，统计学方法采用卡方检验，当 $P<0.05$ 时认为有统计学意义。

2 结果

2.1 肺癌组织中 CDK2 及 β-catenin mRNA 的表达

本实验采用 realtime RT-PCR 方法测定了肺癌组织中 CDK2 及 β-catenin mRNA 的含量，结果如表 1、图 1 所示。相对于未转移组，转移组肺癌组织中 CDK2 及 β-catenin mRNA 表达明显增加（$P<0.01$）。

表 1 肺癌组织中 CDK2 及 β-catenin mRNA 的表达 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 1 The expression of CDK2 and β-catenin mRNA in lung carcinoma tissue

Group	CDK2/GAPDH	β-catenin/GAPDH
Non metachoresis group	0.13± 0.019	0.24± 0.031
Metachoresis group	0.28± 0.033**	0.41± 0.067**

** $P<0.01$ vs non metachoresis group

2.1 肺癌组织中 CDK2 及 β-catenin 蛋白的表达

本实验采用 western blot 方法测定了肺癌组织中 CDK2 及 β-catenin 蛋白的含量，结果如表 2 所示。相对于未转移组，转移组肺癌组织中 CDK2 及 β-catenin mRNA 表达明显增加（$P<0.01$）。

表 2 肺癌组织中 CDK2 及 β-catenin 蛋白的表达 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 The expression of CDK2 and β-catenin protein in lung carcinoma tissue

Group	CDK2/GAPDH	β-catenin/GAPDH
Non metachoresis group	0.25± 0.041	0.19± 0.028
Metachoresis group	0.47± 0.089**	0.37± 0.055**

** $P<0.01$ vs non metachoresis group

3 讨论

CDK2 是细胞周期中重要的调控因子，主要作用于 G1 期和 S 期，是 DNA 复制的重要启动因子，具有启动 DNA 复制和诱发有丝分裂的双重作用[8-9]。CDK2 是酪氨酸蛋白激酶家族的成员之一，其基因定位于染色体 12q13，编码 33kd 的蛋白质，为苏氨酸激酶，是细胞周期素依赖性激酶复合体的一个亚基，在 G1/S 期的转换中起关键作用[10]。而 G1/S 的调控点又是细胞内外信号经过传递、整合汇集到细胞核，对细胞的增殖进行调控的关键点，与肿瘤的发生发展关系密切[11]。体外实验已显示 CDK2 与细胞增殖之间有密切关系，其表达增加导致 DNA 合成增加、进而促进细胞分裂增殖[12]。β-catenin 是 Wnt 信号通路的关键信号元件。在正常细胞中，β-catenin 的表达主要位于细胞膜，胞浆中很少。而一旦在胞浆发生累积，β-catenin 转位入核增多，与转录因子 TCF /LEF 结合并激活转录因子，可促进下游靶基因的转录，对细胞的增殖和分化进行调节[13-14]。当 Wnt 通路不被激活时，大部分的 β- catenin 与细胞膜上的 E-cadherin 及 α -catenin 形成功能复合体，少部分的 β-catenin 在细胞浆内与糖原合成酶激酶 -3β（glycogen synthase kinase, GSK-3β)/ 结肠腺瘤性息肉病基因蛋白（adenomat ous polyposis coli, APC) 形成降解复合物而被磷酸化，最终被降解和泛素化[15]。本研究观察了临床病人肺癌组织中 CDK2 和 β-catenin 的表达情况，结果发现，在有纵膈或远处转移的病人肺癌组织中，二者的表达远高于未转移组病人肺癌组织。本研究结果提示，CDK2 和 β-catenin 不仅与肿瘤的发生发展有密切联系，其可能还与肿瘤的浸润转移具有密切关系，进一步探讨二者与肿瘤的浸润转移关系很有意义。

参考文献 (References)

[1] Wcislo R, Dzwinel W, Yuen DA, et al. A 3-D model of tumor progression based on complex automata driven by particle dynamics [J]. J Mol Model, 2009, 15(12): 1517-39

[2] Wang HC, Yang JH, Hsieh SC et al. Allyl sulfides inhibit cell growth of skin cancer cells through induction of DNA damage mediated G2/M arrest and apoptosis [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(11): 7096-103

[3] Rizzolio F, Tuccinardi T, Caligiuri I, et al. CDK inhibitors: from the bench to clinical trials[J]. Curr Drug Targets[J]. 2010, 11(3): 279-90

[4] Gerard C, Goldbeter A. Temporal self-organization of the cyclin/Cdk network driving the mammalian cell cycle [J]. Proc Natl Acad Sci USA[J]. 2009, 106(51): 21643-8

（下转第 3893 页）

参考文献(References)

[1] 胡亚美,江载芳.诸福棠实用儿科学[M]. 第7版.北京:人民卫生出版社,2002.1204-1205
Hu Yamei,jiang Zaifang. Zhu Futang Practical pediatrics [M]. 7th edition. Beijing: people's medical publishing house. 2002.1204-1205

[2] Chernic V,Boat TF.Kendigs disorders of the respiratory tract in children[M].6th ed.WB Saunders Company,1998:476

[3] 陆权，车大钿. 肺炎支原体性胸腔积液 [J]. 中国实用儿科杂志，2008,23(4):241-244
Lu Quan,Che Dadian. Pulmonary Atelectasis Caused by Mycoplasma Pneumoniae[J]. Chin J Pract Pediatr 2008,23(4):241-244

[4] 陆权,车大钿.肺炎支原体感染诊治中的若干问题[J].国际儿科学杂志,2007,34(4):235-238
Lu Quan,Che Dadian. Some Problems In Treatment of mycoplasma infection, [J].International journal pediatrics,2007,34(4):235-238

[5] Gaillat J,Elahault A,Debarbeyrac B,et al.Community Epaidemiology of Chlamydia and Mycoplasma pneumoniae in LRTI in France over 29 months[J].Eur J Epidemiol,2005,20(7):643-651

[6] Nagalingam NA,Adesyun AA,Swanston WH,et al.Prevalence of Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae in pneumoniae patients in four major hospitals in Trinidad[J].New Microbiol,2004,27(4):345-351

[7] 赵顺英,马云,张桂芳,等. 儿童重症肺炎支原体肺炎11例临床分析[J]. 中国实用儿科杂志,2003,18(7):414-416
Zhao Shunying,Ma Yun,Zhang Guifang,et al. Clinical Analysis of Children's Severe Mycoplasma Pneumonia Pneumonia 11 cases [J]. Chin J Pract Pediatr, 2003,18(7):414-416

[8] Yamazaki T,Narita M,Sasaki N,et al.Comparison of PCR for sputum samples obtained by induced cough and serological tests for diagnosis of Macoplasma pneumoniae infection in children . [J].Clin Vaccine Immunol,2006,13(6):708-710

[9] Beersma MF,Dirven K,van Dam AP,et al.Evaluation 12 commercial tests and the complement fixation test for Mycoplasma pneumoniae-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies,with PCR used as the"gold standard".[J]Clin Mirobiol,2005,43(5):2227-2285

[10] Korppi M,Heiskanen-Kosma T,Kleemola M.Incidence of communityacquired pneumoniae in children caused by Mycoplasma Pneumonia:serological results of a prospective,population-based study in primary health care[J].Respirology,2004,9(1):109-114

[11] 袁壮,陆权. 董宗祈,等. 肺炎支原体肺炎的诊治[J]. 中国实用儿科杂志,2008,23(8):561-572
Yuan Zhuang,Lu Quan,Dong Zongqi,et al. Treatment and diagnosis of Mycoplasma Pneumonia Pneumonia [J]. Chin J Pract Pediatr,, 2008,23(8):561-572

[12] John SD,Ramanathan J,Swischuk LE.Spectrum of clinical and radiographic findings in pediatric Mycoplasma Pneumonia [J]. Radiographics,2001,21(1):121-131

[13] Wang RS,Wang SY,Hsieh KS,et al.Necrotizing pneumonitis caused by Mycoplasma pneumoniae in pediatric patients: report of fivecases and review of literature[J].Pediatr Infect Dis J,2004,23(6):564-567

[14] Bronte DL,Baquero-Artigao F,Garcia-Miguel MJ,et al.Parapneumonic pleural effusion:an 11-year review [J].Ann Pediatr(Bare),2006,64(1):40-45

[15] 齐建光,张韶杰,陈永红,等.儿童重症支原体肺炎的临床特征和治疗探讨[J].中国当代儿科杂志,2008,10(6):719-722
Qi Jianguang,Zhang Shaojie,Chen Yonghong,et al. Explore the Clinical Characteristics and Treatment for Children's Intensive Mycoplasma Pneumonia [J]. Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2008,10(6):719-722

[16] Morozumi M,Iwata S,Hasegawa K,et al. Increased macrolide resistance of Mycoplasma Pneumonia in Pediatric patients with community-acquired Pneumonia [J].Antimicrob Agents Chemother,2008,52(1):348-350

(上接第3898页)

[5] Wesierska Gadek J, Borza A, Komina O et al. Impact of roscovitine, a selective CDK inhibitor, on cancer cells: bi-functionality increases its therapeutic potential[J]. Acta Biochim Pol, 2009, 56(3): 495-501

[6] Sidhu SS, Nawroth R, Retz M [J]. EMMPRIN regulates the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway, a potential role in accelerating lung tumorigenesis. Oncogene[J]. 2010, 29(29): 4145-56

[7] Zhang LY, Jiang LN, Li FF [J]. Reduced beta-catenin expression is associated with good prognosis in Astrocytoma [J]. Pathol Oncol Res [J], 2010, 16(2): 253-7

[8] Jung KH, Kim JK, Noh JH, et al. Targeted disruption of Nemo-like kinase inhibits tumor cell growth by simultaneous suppression of cyclin D1 and CDK2 in human hepatocellular carcinoma [J]. J Cell Biochem, 2010, 110(3): 687-96

[9] Xu L, Wang C, Wen Z, et al. Selective up-regulation of CDK2 is critical for TLR9 signaling stimulated proliferation of human lung cancer cell[J]. Immunol Lett[J], 2010, 127(2): 93-9

[10] Koledova Z, Kafkova LR, Calabkova L, et al. Cdk2 inhibition prolongs G1 phase progression in mouse embryonic stem cells [J]. Stem Cells Dev, 2010, 19(2): 181-94

[11] Pan MH, Lin CL, Tsai JH, et al. 3,5,3',4',5'-pentamethoxystilbene (MR-5), a synthetically methoxylated analogue of resveratrol, inhibits growth and induces G1 cell cycle arrest of human breast carcinoma MCF-7 cells[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(1): 226-34

[12] Chung JH, Bunz F. Cdk2 is required for p53-independent G2/M checkpoint control[J]. PLoS Genet, 2010, 6(2): e1000863

[13] Li A, Zhou T, Guo L, et al. Collagen type I regulates beta-catenin tyrosine phosphorylation and nuclear translocation to promote migration and proliferation of gastric carcinoma cells [J]. Oncol Rep, 2010, 23(5): 1247-55

[14] Kaur M, Velmurugan B, Tyagi A et al. Silibinin suppresses growth of human colorectal carcinoma SW480 cells in culture and xenograft through down-regulation of beta-catenin-dependent signaling [J]. Neoplasia, 2010, 12(5): 415-24

[15] Han JI, Kim DY, Na KJ, et al. Dysregulation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in canine cutaneous melanotic tumor [J]. Vet Pathol, 2010, 47(2): 285-91