

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 法检测肺癌组织中 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 and β -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, Fujian, 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。

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' CACAGAC-CGTAAGTCTCCTC 3',扩增产物长度 186bp β -catenin 上游 5' AAGGGACAGTATCGTTTGTATG 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 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°C 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 $^{\circ}\text{C}$ 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

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 yzh63@medmail.com.cn

(收稿日期 2011-04-02 接受日期 2011-04-28)

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)/ 结直肠瘤性息肉病基因蛋白 (adenomatous 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, Dzwiniel 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] Chermic V,Boat TF.Kendigs disorders of the respiratory tract in children[M].6th ed.WB Saunders Company,1998:476
- [3] 陆权,车大钊.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 车大钊.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 Epaideiology 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 II 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 Microbiol,2005,43(5):2227-2285
- [10] Korppi M,Heiskanen-Kosma T,Kleemola M.Incidence of community-acquired 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