

• 基础实验研究论著 •

非小细胞肺癌组织中 TC-1、CyclinD1、 β -catenin 蛋白表达的变化及意义

罗建奎¹, 邢时云²

(1. 重庆市南川区结核病防治所, 重庆南川 408400; 2. 遵义医学院附属医院胸部肿瘤科, 贵州遵义 463003)

摘要:目的 探讨甲状腺癌相关基因 1(TC-1)、细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)、 β -链蛋白(β -catenin)在非小细胞肺癌组织中的表达情况及其与非小细胞肺癌(NSCLC)病理特征的相关性。分析其与 Wnt/ β -catenin 信号通路的调控的相关性,为研究 TC-1 在 NSCLC 中的作用提供依据。**方法** 用免疫组化方法检测 TC-1、CyclinD1、 β -catenin 蛋白在 48 例 NSCLC 中的表达,并结合肺癌的临床病理特征进行分析。**结果** TC-1、CyclinD1、 β -catenin 在非小细胞肺癌组织中的表达水平明显高于正常肺组织;其中 TC-1 在 NSCLC 组织中的表达与淋巴结转移和 TNM 分期有关; β -catenin 在 NSCLC 组织中的表达与病理类型和组织分化程度有关。**结论** NSCLC 患者中 TC-1、CyclinD1 和 β -catenin 蛋白的表达均为上调趋势,其可能在肺癌的发展中发挥重要作用;TC-1 可能参与 Wnt/ β -catenin 信号通路的调控作用,这些都为 NSCLC 的靶向治疗提供了新的研究思路。

关键词:非小细胞肺癌; 甲状腺癌相关基因 1; 细胞周期蛋白 D1; β -链蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.20.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)20-2723-03

Change of expression of TC-1, CyclinD1 and β -catenin in non-small cell lung cancer and its meaning

Luo Jiankui¹, Xing Shiyun²

(1. Nanchuan District Institute for Tuberculosis Control, Chongqing 408400, China; 2. Department of Thoracic Tumor, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 463003, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression situation of thyroid cancer related gene-1 (TC-1), CyclinD1 and β -catenin in the tissues of non-small cell lung cancer(NSCLC) and their relationship with the clinical pathologic characteristics, to analyze their relationship with the regulation of Wnt/ β -catenin signal pathway to provide the basis for studying the role of TC-1 in NSCLC. **Methods** The expressions of TC-1, CyclinD1 and β -catenin in 48 patients with NSCLC were detected by immunohistochemical SP method and analyzed by combining the clinical pathological features. **Results** The expression levels of TC-1, CyclinD1 and β -catenin in the NSCLC tissue were significantly higher than those in the normal lung tissue; in which, the expression of TC-1 in NSCLC tissue was associated with lymph node metastasis and TNM stages; the expression of β -catenin in NSCLC tissue was related with the pathological types and tissue differentiation degree. **Conclusion** The expressions of TC-1, CyclinD1 and β -catenin show the up-regulating trend in NSCLC and may play an important role in the development of lung cancer; TC-1 may be involved in the regulation of Wnt/ β -catenin signaling pathway, which provide the new research thought of the NSCLC targeted therapy.

Key words: non-small cell lung cancer; thyroid cancer related gene-1; CyclinD1; β -catenin

肿瘤的发病是多基因、多层次、多因素共同参与的结果,其发生、发展涉及多种信号转导机制的复杂过程,信号通路的研究一直以来都是肿瘤治疗的前沿领域,其中 Wnt/ β -catenin 信号通路倍受关注^[1]。甲状腺癌相关基因 1(TC-1)参与基因转录和翻译的调节,在细胞周期的调控中起着关键的作用,与肿瘤细胞的增殖有关。TC-1 能上调许多 Wnt/ β -catenin 中与肿瘤侵袭相关的靶基因^[2]。细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)作为 Wnt/ β -catenin 通路的靶基因之一,是重要的细胞周期调节蛋白,与细胞的增殖相关,其高表达可能导致细胞的恶性转化^[3]。 β -链蛋白(β -catenin)作为 Wnt/ β -catenin 信号传导通路的关键分子,其在肿瘤细胞内的异常蓄积与肿瘤的发展、浸润、转移有关。目前有关 TC-1 参与非小细胞肺癌(NSCLC)发展、浸润、转移等过程中的机制仍然不明确。本实验通过对 NSCLC 及正常肺组织中的 TC-1、CyclinD1 和 β -catenin 的表达情况进行分析研究,来探讨它们的相互关系,为 NSCLC 的靶向治疗提供了新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集遵义医学院附属医院 2010 年 1 月至

2012 年 12 月胸外科手术切除的肺癌组织标本,对术前未进行过放、化疗,资料完整的 48 例 NSCLC 患者进行研究。男性 33 例,女性 15 例,年龄 33~70 岁,平均 55 岁。按 WHO 组织学分类、分期,其中鳞癌 20 例,腺癌 28 例;有淋巴结转移者 23 例,无淋巴结转移者 25 例;肿瘤小于(3×3×3)cm 者 17 例,不小于(3×3×3)cm 者 31 例;Ⅰ~Ⅱ期者 30 例,Ⅲ~Ⅳ期者 18 例。另取 8 例正常肺组织作为对照。

1.2 仪器与试剂 鼠抗人 TC-1、CyclinD1 和 β -catenin 单克隆抗体由北京中山生物技术公司提供;免疫组化 SP 试剂盒和 DAB 显色试剂盒由北京博奥森生物技术公司提供。

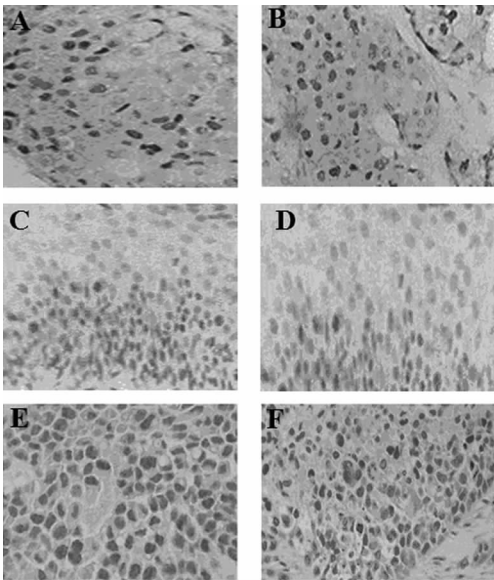
1.3 方法 标本放于 10% 多聚甲醛固定 24 h,常规脱水、透明、浸蜡、包埋。石蜡组织切片,厚 5 μ m,常规脱蜡,水化。枸橼酸修复液高温修复,滴加 3% H₂O₂,室温静置 10 min。滴加鼠抗人 TC-1、CyclinD1 和 β -catenin 单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗 3 次,每次 5 min。辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG,室温静置 30 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min。DAB(过氧化物酶底物)显色 5~10 min,苏木精复染,水洗,吹干,封片,显微镜下观察结果。每张切片于高倍镜下随机取 5 个不同视野。

肿瘤细胞的胞浆或胞核内出现棕黄色颗粒为阳性细胞。按阳性细胞数和染色强度计分,分值为 0~3 分。不显色或细胞数小于 5% 为阴性(-),轻度显色或细胞数 5%~25% 为弱阳性(+),中度显色或细胞数为 26%~50% 为中度阳性(++),重度显色或细胞数大于等于 50% 为强阳性。

1.4 统计学处理 用 SPSS18.0 系统软件进行数据处理,组间差异采用 χ^2 检验和 Fisher 精确概率法检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TC-1,CyclinD1 和 β -catenin 在 NSCLC 组织中的表达 TC-1 蛋白阳性表达主要位于胞浆和部分细胞核中,见图 1。TC-1 在 NSCLC 和肺正常组织中的表达阳性率分别为 68.6%、13.3%,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。CyclinD1 蛋白阳性表达主要位于细胞质中,少数位于细胞核中,见图 1。CyclinD1 在 NSCLC 和肺正常组织中的表达阳性率分别为 64.6%、6.7%,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。 β -catenin 蛋白阳性表达主要位于胞膜和胞质中,见图 1。 β -catenin 在 NSCLC 和肺正常组织中的表达阳性率分别为 72.9%、0.0%,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。



A:腺癌 TC-1 蛋白;B:鳞癌 TC-1 蛋白;C:腺癌 CyclinD1 蛋白;D:鳞癌 CyclinD1 蛋白;E:腺癌 β -catenin 蛋白;F:鳞癌 β -catenin 蛋白

图 1 肺癌组织中 TC-1、CyclinD1 和 β -catenin 蛋白的表达(SP 法,×400)

表 1 NSCLC 和正常肺组织中 TC-1、CyclinD1、 β -catenin 表达

指标	NSCLC			正常肺组织			P 值
	阳性 (n)	阴性 (n)	阳性率 (%)	阳性 (n)	阴性 (n)	阳性率 (%)	
TC-1	33	15	68.6	2	13	13.3	0.0
CyclinD1	31	17	64.6	1	14	6.7	0.0
β -catenin	35	13	72.9	0	15	0.0	0.0

2.2 TC-1,CyclinD1 和 β -catenin 蛋白的表达与 NSCLC 各临床病理因素的关系 TC-1 在 NSCLC 组织中的表达与淋巴结转移和 TNM 分期差异有统计学意义($P<0.05$),与性别、肿瘤

大小、组织分化程度及病理类型差异无统计学意义($P>0.05$)。CyclinD1 在 NSCLC 组织中的表达与性别、肿瘤大小、组织分化程度及病理类型淋巴结转移及 TNM 分期差异无统计学意义($P>0.05$)。 β -catenin 在 NSCLC 组织中的表达与病理类型和组织分化程度差异有统计学意义($P<0.05$),与性别、肿瘤大小、淋巴结转移及 TNM 分期差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 肺癌组织临床病例特征与 TC-1、CyclinD1 和 β -catenin 表达的关系分化程度

组别	n	TC-1		CyclinD1		β-catenin	
		阳性 [n(%)]	P 值	阳性 [n(%)]	P 值	阳性 [n(%)]	P 值
性别							
男	33	24(72.7)	0.5	20(60.6)	0.52	26(78.8)	0.3
女	15	9(60.0)		11(73.3)		9(60)	
病理类型							
腺癌	28	21(75.0)	0.4	20(71.4)	0.36	26(92.9)	0.0
鳞癌	20	12(60.0)		11(55.0)		9(45.0)	
TNM 分期							
I ~ II 期	30	16(53.3)	0.0	22(73.3)	0.13	23(76.7)	0.5
III ~ IV 期	18	17(94.4)		9(50.0)		12(66.7)	
淋巴结转移							
有	23	21(91.3)	0.0	16(69.6)	0.56	18(78.3)	0.5
无	25	12(48.0)		15(60.0)		17(68.0)	
分化程度							
高	4	1(25.0)		2(50.0)		1(25.0)	
中	26	18(69.2)		17(65.4)		17(65.4)	
低	18	14(77.8)		12(66.7)		17(94.4)	
肿瘤大小							
小于(3×3×3)cm ³	17	11(64.7)	0.8	8(47.1)	0.11	11(64.7)	0.5
大于或等于 (3×3×3)cm ³	31	22(71.0)		23(74.2)		24(77.4)	

3 讨 论

Wnt 信号通路主要参与细胞的生长发育、分化、增殖及迁移的过程,研究表明 Wnt 信号通路的异常激活会使细胞发生恶性的转化导致肿瘤的发生^[4]。Wnt 主要信号通路途径有 3 种,其中 Wnt/ β -catenin 信号通路是其经典途径,其主要通过 β -catenin 在胞质中聚集并向细胞核内转移,与 T 细胞因子/淋巴增强因子相结合,来启动靶基因的表达,其中包括 CyclinD1、基质金属蛋白酶、原癌基因等^[5]。研究证实 NSCLC 中 Wnt 信号通路常处于异常激活状态,Akiri 等^[6]研究发现,50% 的人类 NSCLC 细胞株中有 Wnt 通路的失调。

TC-1 首先在甲状腺肿瘤中被发现,进一步研究表明其与胃癌、子宫内膜腺癌等有着密切的关系^[7]。Wang 等^[8]研究发现 CT-1 可调节细胞周期从 G1 期向 S 期转化,并且发现过表达的 CT-1 可上调 CyclinD1 的表达水平。Jung 等^[9]研究发现,

β -catenin 介导的转录能被 Chibby 负向调节, TC-1 能够与 Chibby 相拮抗,使得 Chibby 对 β -连环蛋白拮抗能力减弱,进而上调该通路的下游有关的靶基因 (MMP-7、MMP-14、VEGF、CyclinD1 等)表达,促进癌细胞的增殖及转移。

β -catenin 是一种细胞骨架蛋白,也是 Wnt 信号通路的关键信号元件。正常情况下, β -catenin 大部分与突出细胞膜上的钙黏蛋白结合,维持着同种细胞的黏附作用,其中小部分会与 Axin、APC 和 GSK-3 β 组成一个多蛋白的复合体,其能够降解 β -catenin。正常情况下 β -catenin 主要位于细胞膜中,胞浆内游离的 β -catenin 极少,当细胞质中游离的 β -catenin 积聚并进入细胞核启动下游靶基因 cyclinD1 的转录,导致细胞的过度增殖,从而参与肿瘤的形成^[10]。CyclinD1 是 G1 期细胞周期素,是细胞从 G1 期进入 S 期促进细胞分裂增殖的重要调控因子。CyclinD1 被认为是一种原癌基因,其持续性高表达,将导致 G1 期缩短,提前进入 S 期,使细胞增殖失控,最终形成肿瘤^[11]。

本实验研究结果显示: TC-1、CyclinD1 和 β -catenin 在 NSCLC 组织中的表达水平明显高于正常肺组织,说明 TC-1、CyclinD1 和 β -catenin 可能在 NSCLC 的发病机制中发挥重要作用,TC-1 可能激活 Wnt/ β -catenin 通路并且能够诱导其相关靶基因 CyclinD1 的高表达,为 NSCLC 的靶向治疗提供了新的研究思路。

参考文献

[1] 徐新娟,丁文柏. Wnt 信号转导通路与肺癌的研究近况[J]. 医学综述,2008,14(2):217-220.
[2] Gordon MD,Nusse R. Wnt signaling:multiple pathways,multiple receptors,and multiple transcription factors[J]. J Biol Chem, 2006,281(32):22429-22433.
[3] Ye L,Ryo R,Huang HK,et al. Loss of pin1 function in the mouse

resembles the cyclin d-null phenotypes[J]. ProNatl Acad Sci USA,2002,99(3):1335-1340.
[4] Polakis P. Wnt signaling and cancer[J]. Genes Dev,2000,14(1): 1837-1851.
[5] 海红艳,胡雪君,侯科佐,等. 非小细胞肺癌组织 EGFR 和 VEGF 及 Cbl 表达的临床意义[J]. 中华肿瘤防治杂志,2010,17(3):209-212.
[6] Akiri G,Cherian MM,Vijayakumar S,et al. Wnt pathway aberrations including autocrine Wnt activation occur at high frequency in human non-small-cell lung carcinoma [J]. Oncogene, 2009, 28 (21):2163-2172.
[7] De Melo MP,Parise JO,Peroira HC,et al. C8orf4/TC-1(thyroid cancer-1)gene expression in thyroid cancer and goiter[J]. ORL J Otorhinolaryngol Relat,2007,69(2):127-130.
[8] Wang YD,Bian GH,Lv XY,et al. TC1 (C8orf4) is involved in ERK1/2 pathway-regulated G(1)-to S-phase transition[J]. BMB Rep,2008,41(10):733-738.
[9] Jung Y,Bang S,Choi K,et al. TC1 (C8orf4) enhances the Wnt/beta-catenin pathway by relieving antagonistic activity of Chibby [J]. Cancer Res,2006,66(2):723-728.
[10] Deiros Bronte L,Baquero-Artigao F,García-Miguel MJ,et al. Parapneumonic pleural effusion: an 11-year review[J]. Anales de pediatria (Barcelona,Spain;2003),2006,64(1):40-45.
[11] Lange C,Huttner WB,Calegari F. Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1,delays neurogenesis,and promotes the generation and expansion of basal progenitors[J]. Cell Stem Cell,2009,5(3):320-331.

(收稿日期:2014-04-08)

(上接第 2722 页)

构和功能时需要移去这些蛋白标签,常用的肠激酶、凝血酶及凝血因子 Xa 不但存在非特异性切割,而且价格昂贵。因此本研究选中人鼻病毒 3C 蛋白酶作为新一代的工具酶。人鼻病毒 3C 蛋白酶不仅具有较高的酶切特异性而且在低温下仍保持较高的酶活性。

本研究在大肠杆菌原核系统中成功表达和制备了有良好活性且纯度高的人鼻病毒 3C 蛋白酶。本研究还发现人鼻病毒 3C 蛋白酶在低温下的酶切效果优于常温,且蛋白酶 N 端及 C 端结构域是保持蛋白酶活性所必须,结果未示出。人鼻病毒 3C 蛋白酶与麦芽糖结合蛋白融合表达,增加了人鼻病毒 3C 蛋白酶的表达量及溶解度,免除了包涵体变性及复性步骤,简化了蛋白酶制备流程,并且保持了蛋白酶的活性。人鼻病毒 3C 蛋白酶的酶切特异性较好,本研究构建的麦芽糖结合蛋白-人鼻病毒 3C 蛋白酶融合蛋白含有人鼻病毒 3C 蛋白酶的酶切位点,可被人鼻病毒 3C 蛋白酶特异性识别,并将其自身从麦芽糖结合蛋白上剪切。人鼻病毒 3C 蛋白酶在低温(4℃)下保持了较高的酶活性,在移除蛋白标签的同时避免了靶蛋白的非特异性降解,是理想的标签移除工具酶。本研究初步建立了人鼻病毒 3C 蛋白酶基因工程的制备工艺,开发了一种新型的工具酶,大大节省了实验经费开销。本研究还构建了人鼻病毒 3C 蛋白酶 pRSF 克隆和表达载体,只需将靶蛋白的遗传微粒克隆

入表达载体,就可高效表达靶蛋白与麦芽糖结合蛋白的融合蛋白,经人鼻病毒 3C 蛋白酶移除麦芽糖结合蛋白标签,就可得到较纯的靶蛋白,为基因工程表达和基因工程药物开发的研究奠定了基础。

参考文献

[1] Fox JD,Routzahn KM,Bucher MH,et al. Maltodextrin-binding proteins from diverse bacteria and archaea are potent solubility enhancers[J]. FEBS Lett,2003,537(1/3):53-57.
[2] He M,Jin L,Austen B. Specificity of factor Xa in the cleavage of fusion proteins[J]. J Protein Chem,1993,12(1):1-5.
[3] Kapust RB,Tozsér J,Copeland TD,et al. The P1' specificity of tobacco etch virus protease[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002,294(5):949-955.
[4] Orr DC,Long AC,Kay J,et al. Hydrolysis of a series of synthetic peptide substrates by the human rhinovirus 14 3C proteinase, cloned and expressed in Escherichia coli[J]. J Gen Virol,1989,70 (Pt 11):2931-2942.
[5] Wang QM,Johnson RB. Activation of human rhinovirus-14 3C protease[J]. Virology,2001,280(1):80-86.

(收稿日期:2014-03-15)