

莱菔硫烷联合茶多酚对蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 在肺癌组织中表达的影响研究

曲洪澜

内蒙古林业总医院 血液科, 内蒙古 牙克石 022150

摘要: **目的** 探讨莱菔硫烷联合茶多酚对肺癌组织中蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 的表达的影响。**方法** 选取经病理证实并手术治疗的肺癌患者 56 例, 随机分为治疗组和对照组。采用 ELISA 测定组织中蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 的浓度, 免疫组化法测定组织中蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 的表达并统计微血管密度 (MVD), Western blotting 法检测组织中蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 蛋白表达情况。**结果** 肺癌患者组织中蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 的浓度水平高于治疗组 ($P < 0.05$); 肺癌患者癌变组织中蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 的表达均呈阳性, 且对照组织中 MVD 高于治疗组 ($P < 0.05$), Western blotting 法检测对照组组织中蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 表达高于治疗组 ($P < 0.05$)。**结论** 蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 在肺癌患者组织中均存在表达升高, 与肿瘤生长呈正相关, 莱菔硫烷联合茶多酚用药对两种蛋白起到抑制作用。

关键词: 莱菔硫烷; 茶多酚; 蛋白激酶 A 锚定蛋白 95; 细胞周期蛋白 E2; 肺癌; 抑制作用

中图分类号: R969.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2014)10-1092-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.10.004

Effect of sulforaphane combine with tea polyphenols on expression of protein kinase A anchored protein 95 and cyclin E2 in tissues of lung cancer

QU Hong-lan

Department of Hematology, Inner Mongolia Forestry General Hospital, Yakeshi 022150, China

Abstract: Objective To investigate the effect of sulforaphane combined with tea polyphenols on the expression of protein kinase A anchored protein 95 and cyclin E2 in lung cancer tissue. **Methods** The 56 cases confirmed by pathology and operation therapy for lung cancer patients were randomly divided into treatment group and control group. The levels of protein kinase A anchored protein 95 and cyclin E2 were determined by ELISA method. Protein A kinase anchoring protein 95, the expression of cyclin E2, and statistics of microvessel density (MVD) were determined by immunohistochemical method. The protein kinase A anchored protein 95 and cyclin E2 protein expression in tissues were detected by Western blotting method. **Results** The content of protein in the tissues of patients with lung cancer A kinase anchored protein 95 and cyclin E2 was higher than that of combination group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expression of cancerous tissue of lung cancer patients A kinase anchored protein 95 and cyclin E2 was positive, and the MVD was higher than that in control group ($P < 0.05$). The cell protein kinase A anchored protein 95 and cyclin E2 protein in tissue in the control group were higher than those in treatment group by Western blotting ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of cell protein kinase A anchored protein 95 and cyclin E2 increases in tissues of patients with lung cancer, which is positively correlated with cancer, and sulforaphane combined with tea polyphenols has inhibitory action.

Key words: sulforaphane combine; tea polyphenols; A kinase anchoring protein 95; cyclin E2; lung cancer; tissue; inhibitory action

肺癌是世界范围内的一种常见的发病率非常高的恶性肿瘤, 而且具有非常高的死亡率^[1]。因为没有明显的病发现象和按期的体检, 大部分患者都是

在晚期时才被确诊, 这就导致会出现转移现象, 错过了临床上手术治疗的最佳时间。在临床上治疗肺癌的手段主要包括化疗、放疗、物理治疗、分子靶

收稿日期: 2014-06-29

作者简介: 曲洪澜 (1972—), 女, 内蒙古牙克石人, 硕士, 副主任医师, 主要研究方向: 急性白血病的诊治、恶性肿瘤的靶向治疗。

Tel: 13947088376 E-mail: quhonglan@163.com

向治疗等手段^[2]。茶多酚是茶叶中的有效成分,对肝癌、艾氏腹水癌等肿瘤都具有抗肿瘤效果^[3-6]。茶多酚对肿瘤的抑制作用体现在每个阶段:诱导细胞凋亡、抑制肿瘤细胞的增殖、阻遏细胞传导通路、阻滞肿瘤细胞的细胞周期、抑制端粒酶活性、抑制血管形成等^[7]。莱菔硫烷是十字花科植物中的成分,可以抑制化学物诱发肿瘤的起始阶段,对肿瘤有抑制作用^[8]。研究表明癌症的病变过程中,蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 起相当重要的作用^[9-11]。因此本实验选用莱菔硫烷联合茶多酚治疗,考察肺癌组织中蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 的表达。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集从 2010 年 11 月至 2013 年 8 月我院肿瘤科收治的经病理证实且经过手术的 56 例肺癌患者作为研究对象,其中有 26 例为管内型肺癌患者,结节型患者为 8 例,管壁浸润型患者为 6 例,块状型患者为 12 例,弥漫浸润型患者为 4 例,疗程为 4 个周期,治疗前患者均签署知情同意书,经医院医学伦理委员会批准。随机分成 2 组,两组患者的年龄、性别等方面经统计学分析无统计学差异。

1.2 实验分组

将选取的治疗组患者给予莱菔硫烷(上海谱振生物科技有限公司)20 mg/支和茶多酚(安徽省歙县茶叶生物碱厂)依据说明书,2 粒/d,2 次/d,在 2 个周期治疗中连续服用联合治疗,对照组不使用药物治疗,给予正常的护理。

1.3 ELISA 法检测组织中蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 浓度

取肺癌组织,匀浆,在低温下以 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液置于-40℃保存待测。选用双抗体 ELISA 法测定蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 水平,试剂盒购于美国 RnD 公司,实验步骤严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.4 免疫组织化学测定微血管密度

取所有患者的肺癌变鲜活组织,浸泡在 4%甲醛中固定,石蜡包埋,石蜡切片机切片,采用链霉菌抗生素蛋白过氧化物酶测定,实验步骤按照试剂盒说明书严格执行,用已知的蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 肺癌组织作为阳性对照,阴性对照组采用的是 PBS 作为一抗进行孵化,鼠抗人以及显色剂等均购自与北京中杉生物科技有限公司。

微血管密度(MVD)的计数根据参考文献报道方法^[12]:首先在低倍镜下对整个切片进行分析,寻找血管最密集处,然后在高倍镜下对染色的血管进行计数。组织中蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 的测定采用灰度值扫描,通过与 β -actin 进行比较得出灰度值比,组织中蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 的表达采用吸光度值计算质量浓度表示。

1.5 Western blotting 法检测蛋白激酶 A 锚定蛋白 95 受体、细胞周期蛋白 E2 受体的表达

取患者术后肺癌组织,液氮研磨使细胞破裂充分,将已经破碎的组织装入混匀器中进行混匀,然后按照 100 μ L/10 ng 加入含 PMSF 的裂解液,载冰块上孵育 30 min,然后低温以 12 000 r/min 离心 5 min,取上清,-80℃冻存备用。组织总蛋白经考马斯亮蓝进行定量。组织样品加入 0.25 倍量 5 $\times$ SDS 上样缓冲液进行混匀,6 min 左右煮沸变性,用 10% SDS-PAGE 115 V 电泳,210 mA 恒流 1 h,40 min 湿转至硝酸纤维膜上。用 5%的脱脂奶粉 TBST 缓冲液室温封闭 3 h,加抗蛋白激酶 A 锚定蛋白 95 受体(AKAP-8)、细胞周期蛋白 E2 受体单抗(鼠抗人,1:500)。用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,结合辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(1:5 000)室温孵育 1 h,TBS 洗膜 3 次,每次 10 min,最后采用发光试剂盒 ECL 反应,X 胶片曝光显影。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件包以及 Image J4.2 对数据、图片进行处理,对计量资料采用 t 检验,以进行计数,计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 组织中蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 浓度水平

蛋白激酶 A 锚定蛋白 95 和细胞周期蛋白 E2 的浓度水平在治疗组和对照组中比较,均具有统计学意义($P<0.05$),提示治疗组对肿瘤具有一定的抑制作用。见表 1。

2.2 组织中蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 表达与血管关系

肺癌患者病变组织中蛋白激酶 A 锚定蛋白 95 表达明显高于治疗组,两者差异具有显著性($P<0.05$);细胞周期蛋白 E2 蛋白在肺癌患者病变组织中表达也明显高于治疗组,差异具有显著性($P<0.05$)。研究中发现无论是治疗组还是对照组中两种

表 1 各组组织中蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=28$)

Table 1 Expression levels of protein kinase A anchored protein 95 and cyclin E2 in tissues in each group

组别	锚定蛋白 95 浓度	细胞周期蛋白 E2 浓度
	水平/(pg·mL ⁻¹)	水平/(pg·mL ⁻¹)
治疗	33.47±5.43*	1.09±0.32*
对照	73.67±6.74	2.94±0.61

与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

蛋白均具有表达,但是对照组中表达量明显高于治疗组。在进行 MVD 计数中,对照组肺癌患者病变组织中以蛋白激酶 A 锚定蛋白 95 标记的 MVD 高于治疗组,对照组肺癌患者在病变组织中以细胞周期蛋白 E2 标记的 MVD 高于治疗组 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组组织中蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 表达与血管的关系的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=28$)

Table 2 Comparison on relationships between expression of protein kinase A anchored protein 95 and cyclin E2 with vascular ($\bar{x} \pm s$, $n=28$)

组别	白激酶 A 锚定蛋白 95		细胞周期蛋白 E2	
	阳性表达率	MVD	阳性表达率	MVD
治疗	24.2%*	4.03±0.75*	22.7%*	3.53±1.12*
对照	67.0%	9.14±1.12	56.5%	9.01±1.13

与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

2.3 Western blotting 检测组织中蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 蛋白表达水平

治疗组蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 蛋白表达较少,而对照组蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 的蛋白表达量明显高于治疗组,相对于给药组差异具有显著性 ($P<0.05$),提示治疗组具有一定的抑制肿瘤的效果。见表 3。

表 3 蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 的蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Expression of protein kinase A anchored protein 95 and cyclin E2 ($\bar{x} \pm s$)

组别	蛋白表达	
	锚定蛋白 95	细胞周期蛋白 E2
治疗	0.123±0.001*	0.192±0.011*
对照	0.387±0.027	0.602±0.103

与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

3 讨论

以蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 为考察指标评价茶多酚联合莱菔硫烷对肺癌患者的治疗作用。将实验分为治疗组和对照组,采用 Western blotting 检测来分析不同组别中蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 的含量。结果显示,治疗组蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 蛋白表达较少,而对照组蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 的蛋白表达量明显高于给药组,相对于给药组差异具有显著性 ($P<0.05$),给药组具有一定的抑制肿瘤的效果。通过应用 ELISA 检测组织中蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 含量,结果显示蛋白激酶 A 锚定蛋白 95 的表达在治疗组和对照组比较,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。细胞周期蛋白 E2 在治疗组和对照组中相较,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。结果显示茶多酚联合莱菔硫烷可以有效的抑制肿瘤的生长,对肺癌具有一定的抑制作用。应用免疫组织化学测定 MVD 对肿瘤组织部位的血管进行计算,治疗组的血管含量低于对照组,说明肿瘤组织生长受到了抑制,有抗肿瘤的效果。以上实验证明茶多酚联合莱菔硫烷对对肿瘤组织的生长具有抑制作用,治疗组的蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 的表达低于对照组,说明蛋白激酶 A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 的表达与肿瘤的生长呈正相关性。

周期蛋白 E2 是细胞核内蛋白,位置在 8 号染色体 q22.1 上。蛋白上具有 1 个 2 801 bp 的 cDNA 片段,它编码 1 个含有 404 个氨基酸残基的开放阅读的框架,大小为 2.8 kb mRNA,相对分子质量是 4.7×10^7 。47% 的同源性是这个编码蛋白和周期蛋白 E1 所具有的,拥有 1 个周期蛋白盒基序^[13]。这个基序是所有的细胞周期蛋白所共拥有的。蛋白激酶 A 锚定蛋白 95 刚开始被认为是一种蛋白激酶 A 锚定蛋白,它能够将蛋白激酶 A 特异地锚定于细胞核内的作用^[14]。最近发现蛋白激酶 A 锚定蛋白 95 不仅仅是一种蛋白,它还参与细胞内许多生命过程,如参与了细胞分裂染色体集缩的建立以及集缩状态的保持^[15]。还参与了 DNA 的复制维持信使 RNA 的稳定以及基因表达,参与细胞凋亡以及参与细胞周期调控^[16-17]。

茶多酚和莱菔硫烷都是治疗肿瘤的临床药物,实验中没有考察两种药物单独使用对肿瘤的抑制作用,二者结合可以对肿瘤起到抑制作用,蛋白激酶

A 锚定蛋白 95、细胞周期蛋白 E2 是人体细胞的重要组成部分蛋白,二者的表达增多与肿瘤的生长有明显的相关作用。本实验考察茶多酚和莱菔硫烷联合用药对肿瘤组织中两种蛋白表达的影响。结果证明,联合用药抗肿瘤可以对肿瘤组织起到抑制作用,两种蛋白的表达明显下降。说明两种蛋白的表达与肿瘤的生长呈正相关性。而联合用药对两种蛋白可以起到抑制作用。

参考文献

- [1] Langer C J, Natale R B. The emerging role of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors [J]. *Semin Oncol*, 2009, 32(10): 23-29.
- [2] 李龙芸. 探讨肺癌的早诊及个体化治疗 [J]. 中华肿瘤学杂志, 2011, 9(1): 5-6.
- [3] Faulkner K, Mithen R, Williamson G. Selective increase of the potential anticarcinogen 4-methylsulphinylbutyl glucosinolate in broccoli [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 19(4): 605-609.
- [4] 阎玉森, 王球达, 邹玉珍, 等. 绿茶对荷瘤小鼠细胞免疫功能的影响及其抑瘤作用 [J]. 中华预防医学杂志, 2013, 26(1): 5-7.
- [5] 付 婷, 韩国柱. 茶多酚的药动学研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 2102-2106.
- [6] 张晓梦, 倪 艳, 李先荣. 茶多酚的药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(2): 157-160.
- [7] Kadish A S, Doyle A T, Steinhauer E H, *et al.* Natural cytotoxicity and interferon production in human cancer: Deficient in natural killer activity and normal interferon production in patients with advanced disease [J]. *J Immunol*, 2010, 127(2): 1817-1822.
- [8] 廖系哈, 金翠兰. 茶多酚及其抗癌机理的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2010, 17(9): 1783-1785.
- [9] Ishii H, Mimori K, Yoshikawa Y, *et al.* Differential roles of E-type cyclins during transformation of murine E2F-1 deficient cells [J]. *DNA Cell Biol*, 2011, 24(3): 173-179.
- [10] Yamada S, Sumrejkanchanakij P, Amagasa T, *et al.* Loss of cyclin E requirement in cell growth of an oral squamous cell carcinoma cell line implies deregulation of its downstream pathway [J]. *Int J Cancer*, 2009, 111(1): 17-22.
- [11] Kim K I, Cho H J, Hahn J Y, *et al.* Beta-catenin overexpression augments angiogenesis and skeletal muscle regeneration through dual mechanism of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell proliferation and progenitor cell mobilization [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 26(1): 91-98.
- [12] 刘东华. 非小细胞肺癌 VEGF-C 的表达及 LYVE-1 标记的微血管密度与淋巴结转移的关系 [J]. 中国生化药物杂志, 2012, 32: 3927-3928.
- [13] Zariwala M, Liu J, Xiong Y. Cyclin E2, a novel human G1 cyclin and activating partner of CDK2 and CDK3, is induced by viral oncoproteins [J]. *Oncogene*, 2011, 17(21): 2787-2798.
- [14] Coghlan V M, Langeberg L K, Fernandez A, *et al.* Cloning and characterization of AKAP 95, a nuclear protein that associates with the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase [J]. *J Biol Chem*, 2012, 26(9): 7658-7660.
- [15] Eide T, Carlson C, Taskén K A, *et al.* Distinct but overlapping domains of AKAP95 are implicated in chromosome condensation and condensin targeting [J]. *J Biochem*, 2012, 3(5): 426-432.
- [16] Tatjana A, Chantal D, Jacques E, *et al.* A novel partner for D-type cyclins: protein kinase A-anchoring protein AKAP95 [J]. *J Biochem*, 2013, 37(8): 673-679.
- [17] Langeberg L K, Scott J D. A-kinase-anchoring proteins [J]. *J Cell Sci*, 2012, 118: 3217-3220.