

细胞周期相关激酶与肿瘤易感相关性研究进展*

孔令斌¹ 王 茜² 综述 杨景玉³ 审阅

(¹ 济宁医学院临床学院, 山东 济宁 272067; ² 山东大学 2012 级硕士研究生, 山东 济南 250100;

³ 山东省消化病防治中心, 山东 济宁 272000)

摘 要 细胞周期相关激酶(cell cycle-related kinase, CCRK)是新近发现的一种细胞周期蛋白依赖性激酶活化激酶(CDK-activating kinase, CAK), 在多种恶性肿瘤细胞中伴有 CCRK 过表达, CCRK 能促进细胞增殖引起恶性肿瘤的发生发展, 而抑制 CCRK 基因能使肿瘤细胞周期停滞、细胞克隆形成率和增殖活性降低。CCRK 参与的信号通路与癌症的成因与演变有关。现就 CCRK 与肿瘤易感相关性研究作一综述。

关键词 CCRK; 恶性肿瘤易感; 相关性

中图分类号: R730.2 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2013)12-383-04

细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)、细胞周期蛋白与肿瘤的发生、发展密切相关; 细胞周期相关激酶(cell cycle-related kinase, CCRK)是 CDK2 的磷酸化激酶, 也称为 CDK20 或 p42, 2000 年首次由 Kaldis 和 Solomon 在宫颈癌细胞中报道^[1], CCRK 通过磷酸化 CDK2 的第 160 个苏氨酸残基而活化 CDK2^[2], 它不仅能激活 CDK2 和促进细胞增殖, 调节细胞周期和转录, 而且能使哺乳动物的 Thr-157 雄性生殖细胞相关激酶(MAK)磷酸化^[3]。研究发现, 细胞周期组件失调如基因 CDK、细胞周期蛋白依赖性激酶活化激酶(CDK-activating kinase, CAK)、Rb 和 p53 发生突变, 引起细胞增殖形成肿瘤^[4-5]。CCRK 在多种恶性肿瘤及细胞系中都有过表达现象, 通过激活 CDK2 和促进细胞增殖, 调节细胞周期和转录影响肿瘤的发生发展^[6]。因此认为, 该基因有可能成为一个比较理想的肿瘤检测标志和肿瘤治疗的新靶点。现就 CCRK 与肿瘤易感相关性研究进展作一综述

1 CCRK 的基因结构及其生物学特点

人类 CCRK 基因在染色体上的位置是 9q22.1, 基因组长度是 8kb, 具有 7 个外显子, 编码一个约 42×10³ 蛋白质。CCRK 是 CDK2 的磷酸化激酶, 为 CAK 组中 CDK1、CDK2 和 CDK7(周期蛋白依赖性激酶)的一种新型同源蛋白激酶, 含有 11 个保守丝氨酸/苏氨酸的蛋白激酶, 与 CSK 也有较

小程度的同源性, 与 CDK7 具有 43% 同源序列。

有研究表明, 当 CDK 活性得不到控制时, 肿瘤相关的细胞周期缺陷就会出现, 进而产生失控的细胞增殖^[7]。其机制可能主要是 CCRK 介入的广泛细胞信号通路和细胞增殖有关^[8-9]。

2 CCRK 的生物学功能

研究指出, CDK 的激活需要 CAK 磷酸化活化阶段 Cyclin-Cdk 复合物的苏氨酸残基, 一些证据表明, CAK 作为一个重要的细胞周期调节器很可能成为一个细胞周期抑制剂的目标^[10]。CAK 除了激活 CDKs, CAK 还调节转录^[11], 尤其在 CDK7 和 CDK9 在调节 RNA 聚合酶 II 介导的转录中扮演着重要角色^[12]。此外, 在 DNA 损伤反应中 CAK 扮演了一个重要角色^[13]。

CDK2 可分别与 CyclinE、CyclinA 和 CyclinD 结合, 分别在 G1/S 期、S 期和 G2 期发挥作用; CDK2 是启动 DNA 复制的关键激酶, 也是 G2 期运行的必要条件, 这取决于与 CDK2 结合的 Cyclin 的种类。研究表明, 细胞由 G1 期进入 S 期需要 CyclinE 及 CDK2 形成的复合物的共同参与, 而此复合物可使 pRb 和他的家族成员过度磷酸化, 当细胞进入 S 期后, Cyclin E 降解, CDK2 转而与 Cyclin A 结合, 推进细胞由 S 期越过限制点进入 G2 期。对于所有的激活, CDK 必须绑定到细胞周期蛋白的亚基上, 然后由 CAK 中的活化片段或 t 环使之磷酸化激活^[14], 如果细胞缺乏 CAKs 就不能增长, 若降低 CAKs 的水平就表现出生长抑制^[15]。此外发现, 特定的 CAKs 抑制剂能促进肿瘤细胞

* [基金项目] 山东省医药卫生科技发展计划(项目编号: 2013WSB33012)

死亡^[16]。

尽管整个细胞周期的进程是由调节蛋白控制的,但是整体扩散却是由信号通路调制。在几乎所有的肿瘤类型中都是中断生长的信号转导,例如 Wnt 通路,它通过调节细胞周期机制来控制细胞增殖和肿瘤发生^[17]。在几个人类恶性肿瘤如肝细胞癌(HCC)、胃肠道癌症和乳腺癌中就出现了异常活化的 Wnt 通路^[18]。吴伟佳等^[19]研究发现,CCRK 基因及蛋白质在肝癌组织中的表达明显高于癌旁肝组织,提示 CCRK 在肝癌发生发展中起着重要作用,并且分析发现在肝癌中只有临床分期影响 CCRK 基因及蛋白质的过表达率,Wnt/ β -连环蛋白(catenin)通路在人类 HCC 中往往是激活的^[20]。 β -catenin 是钙粘素蛋白复合物的一个亚基,已经被证实在 Wnt 信号通路中是最重要的组件^[21]。此外,还存在这样一条信号转导通路,即雄激素受体(androgen receptor, AR),它能诱导 CCRK 的表达, β -连环蛋白作为 CCRK 的下游基因再由 CCRK 激活, β -连环蛋白又可以诱导 AR 表达和激活 AR,如此形成一个恶性循环诱导 HCC 的发生^[12]。研究已证实,男性患者发病率明显高于女性是 HCC 一个显著的流行病学特点,男女患者之比为(2~4);1,造成这种性别差别的原因之一就是雄激素和 AR。另有研究发现,CCRK 是 AR 的直接靶基因,AR 可以促进 CCRK 的表达。AR 在癌症细胞的 G1/S 阶段、配体激活转录因子和细胞周期通路中是一个重要的调节器。在结肠癌研究中发现,CCRK 通过激活 CyclinE-CDK2 复合物,再进一步使 Rb 磷酸化,随即释放出转录因子 E2F, E2F 再进一步促进 G1/S 期转换和 S 期所需要的许多基因的转录,最终使细胞顺利通过 G1/S 限制点。

3 CCRK 与恶性肿瘤易感

吴国清等^[10]研究 CCRK mRNA 在人体组织的分布时发现,无论是成熟 mRNA 还是前体 mRNA 在大脑和肾脏中表达较多,而在肝脏、心脏和胎盘中表达较少。该研究采用激光共聚焦显微镜探讨 CCRK 在卵巢癌细胞中的亚细胞定位,主要定位于细胞质和核膜周围,细胞核内分布较少。Liu Y 等^[22]的研究却发现,CCRK 主要定位在细胞核和核周组织,在细胞质中表达较少。研究报道,CCRK 不仅在正常组织中有所表达,而且也广泛表达于各种癌症细胞系如胶质母细胞瘤(U87、

U118、U138、U373 和 SW1088)、宫颈腺癌(HeLa)、结直肠癌(HCT116)、骨肉瘤(U2OS)、乳腺癌(MCF-7)、卵巢癌(UACC-1598、UACC-326、OVCAR-3、HO-8910 和 TOV-21G)、肺成纤维细胞(WI-38)、成肌细胞(C2C12)和淋巴细胞(GM08336)^[13-14],并且在肿瘤组织中表达水平明显升高,其升高的程度与患者的不良预后有关。朱龙贤等^[23]的研究还进一步发现,CyclinD1 参与了大肠癌的发生并与肿瘤的分化程度和 Duke's 分期有关,高表达的 CyclinD1 被发现与肿瘤不断生长、进展和/或不良预后密切相关。其机制可能与 CCRK 直接磷酸化 Rb,促进 CyclinE 的表达,进而促进细胞周期有关。还有研究发现,神经胶质瘤的细胞增殖和致瘤性与 CCRK 的高表达有关,CCRK 在神经胶质瘤诊断中有可能成为一个候选癌基因。

Feng H 等^[8]研究发现肝癌晚期患者 CCRK 也有显著高表达,而且临床分期影响 CCRK 基因及蛋白质的表达率,CCRK 过度表达的水平与肝癌患者的总体低生存率有关。此外,在卵巢癌中的研究发现,与正常卵巢组织相比,在卵巢癌组织中检测到 CCRK 有 53% 的过表达,从卵巢良性囊腺瘤(15%)、卵巢交界性肿瘤(26%)到卵巢癌组织(53%) CCRK 表达上调比例逐渐升高。CCRK 表达上调与卵巢癌患者临床病理特征密切相关。在卵巢癌组织学分型中,未分化型上调比例最高(72%);在组织学分级中, G3 级上调比例最高(67%),临床分期越晚 CCRK 上调比例越高;在卵巢癌总生存期和肝细胞癌中 CCRK 的高表达水平是一个强大而独立的预测因子^[12]。由此推测,CCRK 表达有可能成为预测肿瘤发生的一个重要基因。

4 CCRK 基因沉默对癌细胞的抑制作用

Liu Y^[22]首次表明 CCRK 有 CAK 调节细胞生长的作用,CCRK 对细胞生长是必不可少的,细胞缺乏 CCRK 将无法生长和形成克隆,与对照组细胞相比,降低细胞中 CCRK 的水平会显著降低细胞增长率。在宫颈腺癌 HeLa 细胞中,通过 RNAi 沉默 CCRK 基因能抑制细胞增殖,引起细胞周期 G1 期阻滞,减少 pCDK2 水平和抑制 CDK2 激酶活性。在人类胶质母细胞瘤中同样观察到类似的结果^[3],由小干扰 RNA 沉默 CCRK 抑制胶质母细胞瘤细胞生长,诱导细胞周期 G1 阻滞和降低 pCDK2 水平;此外 CCRK 表达水平还与恶性胶质

瘤的致瘤性有关。在对恶性神经胶质瘤的研究中也发现,CCRK 在 73.7% 的恶性神经胶质瘤标本和 83.3% 的恶性神经胶质瘤细胞株中表达增高。应用 CCRK 小干扰 RNA 可以抑制 CCRK 高表达细胞株(U-373MG、U-87MG)恶性神经胶质瘤细胞和 CCRK 低表达细胞株(U-138 MG)的活性,且有时间和剂量依赖性^[3]。

Yang Y 在对结直肠癌的致癌机制研究中发现,在 LoVo 和 DLD1 这 2 个人类大肠癌细胞株中由 siCCRK (small interfering RNA)^[12] 或 shCCRK(short hairpin RNAs)沉默 CCRK,能大大降低细胞生长,使细胞周期阻滞在 G0-G1 期;当 CCRK 被沉默时,CycE-CDK2 复合物的磷酸化相应减少。siCCRK 能阻止 CDK2 的磷酸化和降低 pRb 的磷酸化,阻止 CDK2 的磷酸化使细胞产生 G1/S 期周期阻滞;pRb 是一个肿瘤抑制蛋白,在几个主要的癌症中能引起功能失调,在对裸鼠肿瘤模型的治疗实验研究中发现,进一步证实了 CCRK 过表达能促进肿瘤形成, β -catenin 在裸鼠 CCRK 诱导致瘤性中是一个重要的中间物,抑制 CCRK 能显著抑制肿瘤的生长。在卵巢癌细胞 H0-8910 和 OVCAR-3 中用 RNA 干扰的方法下调 CCRK 可以抑制细胞体外增殖及细胞周期 G1 期阻滞,但并不引起细胞凋亡;过表达 CCRK 不仅可以促进卵巢癌细胞 TOV-21G 的体外增殖和细胞由 G1 期进入 S 期,而且还可以显著促进 TOV-21G 移植瘤在裸鼠体内的生长;用 RNA 干扰的方法下调卵巢癌细胞 H0-8910 中 CCRK 可以在 mRNA 和蛋白水平显著降低细胞周期蛋白 D1 的表达水平;过表达 CCRK 可以使卵巢癌细胞 TOV21G 中细胞周期蛋白 D1 轻度升高。因此,可以通过检测 CCRK 的表达水平,为肿瘤分期治疗提供指导。还有研究指出,持续、稳定的结直肠癌细胞 shCCRK(short hairpin RNAs)克隆表达会减少细胞增殖率^[2],其原因可能与 CCRK 能够调节 AR 和 β -catenin 活动有关。因此,作为干扰所有恶性细胞周期的一个标志物,CCRK 有可能成为癌症的一个重要细胞周期调节器。

5 结语

总之,CCRK 为一种新近发现的细胞周期蛋白依赖性激酶活化激酶,与多种恶性肿瘤的发生、发展有一定的相关性。采用 siRNA 技术沉默 CCRK 的表达有可能控制一些肿瘤的发生。提示 CCRK

有可能成为一种新的肿瘤标志物和癌症治疗的新靶点,探讨 siRNA 沉默 CCRK 的机制应成为下一步研究的方向。

参考文献:

- [1] Kaldis P, Solomon MJ. Analysis of CAK activities from human cells[J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267 (13): 4213-4221.
- [2] Caligiuri M, Becker F, Murthi K, et al. A proteome-wide CDK/CRK-specific kinase inhibitor promotes tumor cell death in the absence of cell cycle progression[J]. *Chem Biol*, 2005, 12(10): 1103-1115.
- [3] Fu Z, Larson KA, Chitta RK, et al. Identification of yin-yang regulators and a phosphorylation consensus for male germ cell-associated kinase (MAK)-related kinase[J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 2622: 8639-8654.
- [4] Zwang Y, Oren M, Yarden Y. Consistency test of the cell cycle: roles for p53 and EGR1[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(5): 1051-1054.
- [5] Cicenas J, Valius M. The CDK inhibitors in cancer research and therapy[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(10): 1409-1418.
- [6] Qiu H, Dai H, Jain K, et al. Characterization of a novel cardiac isoform of the cell cycle related kinase that is regulated during heart failure[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(32): 22157-22165.
- [7] Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(3): 153-166.
- [8] Feng H, Cheng AS, Tsang DP, et al. Cell cycle related kinase is a direct androgen receptor regulated gene that drives beta-catenin/T cell factor dependent hepatocarcinogenesis [J]. *Clin Invest*, 2011, 121(8): 3159-3175.
- [9] Wu GQ, Xie D, Yang GF, et al. Cell cycle related kinase supports ovarian carcinoma cell proliferation via regulation of cyclin D1 and is a predictor of outcome in patients with ovarian carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(11): 2631-2642.
- [10] 吴国清, 郑爱红, 邓海霞, 等. 细胞周期相关激酶在卵巢癌细胞中的亚细胞定位及其表达的意义[J]. *实用肿瘤杂志*, 2010, 25(5): 527-530.
- [11] Qiu H, Dai H, Jain K, et al. Characterization of a novel cardiac isoform of the cell cycle-related kinase that is regulated during heart failure[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(32): 22157-22165.
- [12] Yang Y, Hu Y, Gu HY, et al. Oroxylin A induces G2/M phase cell-cycle arrest via inhibiting Cdk7 mediated expression of Cdc2/p34 in human gastric carcinoma BGC-823 cells [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2008, 60(11): 1459-1463.
- [13] Krystof V, Uldrijan S. Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer drugs[J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11(3): 291-302.
- [14] W? sierska-G? dek J, Maurer M. Promotion of apoptosis in cancer cells by selective purine-derived pharmacological CDK