

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.26.032

CCNB2 在结直肠癌中的表达及临床意义 *

辛 莹^{1,2#} 陈 军^{1#} 严钢莉¹ 李彬彬¹ 何 金¹ 余宏宇^{1△}

(1 第二军医大学附属长征医院病理科 上海 200003; 2 济南军区总医院病理科 山东 济南 250031)

摘要 目的:探讨细胞周期蛋白 B2(Cyclin B2, CCNB2)在结直肠癌组织中的表达及其临床意义。**方法:**选择 45 对结直肠癌组织及癌旁正常结直肠组织样本,分别采用实时定量 PCR(qRT-PCR)方法和免疫组织化学技术检测 CCNB2 的 mRNA 和蛋白表达,并进一步分析 CCNB2 的表达与结直肠癌临床病理特征之间的关系。**结果:**结直肠癌组织中 CCNB2 mRNA 的表达显著高于癌旁正常结直肠组织,差异有统计学意义($P<0.001$),且 CCNB2 的 mRNA 表达与结直肠癌的肿瘤大小、浸润深度及 TNM 分期显著相关($P<0.05$),与年龄、性别、肿瘤位置、分化程度、脉管神经浸润、淋巴结转移和远处转移均无关($P>0.05$)。45 例结直肠癌标本中 39 例表达(+~+++),6 例表达(-)。CCNB2 蛋白主要表达于结直肠癌细胞质中,少量见于细胞核。结直肠癌组织中 CCNB2 蛋白的阳性表达率为 86.7%,显著高于癌旁正常结直肠组织,并与患者的性别、年龄、分化程度和肿瘤转移均无显著相关性($P>0.05$),但与肿瘤分期、浸润程度均显著相关($P<0.05$)。**结论:**CCNB2 在结直肠癌中呈异常高表达,且与结直肠癌的发生发展相关,有望作为结直肠癌的诊断和预后预测参考指标。

关键词:结直肠癌;细胞周期蛋白 B2;表达;临床病理特征

中图分类号:R735.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)26-5127-05

Expression and Clinical Significance of Cyclin B2 in Colorectal Cancer*

XIN Xuan^{1,2#}, CHEN Jun^{1#}, YAN Gang-li¹, LI Bin-bin¹, HE Jin¹, YU Hong-yu^{1△}

(1 Department of Pathology, Shanghai Changzheng Hospital, Shanghai, 200003, China;

2 Department of Pathology, Military General Hospital of Jinan Area of Command, Jinan, Shandong, 250031, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression and clinical significance of Cyclin B2 (CCNB2) in colorectal cancer (CRC). **Methods:** The expression of CCNB2 in 45 pairs of CRC tissues and para-adjacent normal tissues were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and immunohistochemistry. The relationship between the expression of CCNB2 and clinicopathologic characteristics was analyzed by SPSS 17.0. **Results:** The expression of CCNB2 mRNA in CRC tissue was significantly higher than that of the para-adjacent non-malignant tissues ($P<0.001$). It was significantly correlated with the tumor size, greater tumor depth, TNM stage and lymph node metastasis of CRC ($P<0.05$), but had no correlation with the age or gender of patients, tumor location, differentiation, venous and nervous invasion, lymph nodes metastasis and distant metastasis ($P>0.05$). The immuno-activity was detected mainly in the cytoplasm of colorectal cancer cells. The positive rate of CCNB2 protein expression in CRC tissues was 86.7%, markedly higher than that of the para-adjacent non-malignant tissues($P<0.001$), and related to the tumor stage and invasion($P<0.05$), but it had no correlation with the age or gender of patients, differentiation, metastasis ($P>0.05$). **Conclusion:** Overexpression of CCNB2 in colorectal cancer could be associated with the occurrence and progress of CRC and expected to be the diagnostic and prognostic indicator of CRC.

Key words: Colorectal cancer; CCNB2; Expression; Clinicopathological characteristics

Chinese Library Classification: R735.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)26-5127-05

前言

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是消化道系统最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率在我国均列恶性肿瘤前 5 位^[1]。CRC 的发生发展涉及一系列分子遗传学改变及细胞内信号传导通路异常,其癌变机制至今未能充分阐明。积极研究并探索 CRC 发生癌变的原理和机制,寻找一种可用于检测 CRC

发病及预后预测的标志性蛋白对于指导临床治疗 CRC 具有重要的意义。

细胞周期蛋白 B2(Cyclin B2, CCNB2)属于细胞周期蛋白家族(包括细胞周期蛋白 B1 和 B2)^[2],在肺癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤中均呈高表达^[3-5],并与患者临床的病理和预后不良显著相关^[3-4],可能作为特异的诊断标志物应用于肾上腺皮质癌的早期诊断^[6]。既往的研究表明 CCNB2 在结直肠腺癌中呈显著高

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81370553)

作者简介:辛莹(1982-),女,硕士研究生,主要从事消化系统病理学方面的研究;

陈军(1980-),女,住院医师,电话:13917405849, E-mail: feier0251@163.com

为共同第一作者

△通讯作者:余宏宇,电话:021-81886121, E-mail: yuhongyu795@hotmail.com

(收稿日期:2014-03-13 接受日期:2014-04-12)

表达^[7],但其与结直肠癌临床病理参数之间的相关性尚不清楚。本研究拟通过实时定量 PCR(qRT-PCR)和免疫组织化学方法,观察结直肠癌和相应癌旁正常结直肠组织中 Cyclin B2 的 mRNA 和蛋白的表达,并分析其与结直肠癌病理类型、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移等临床病理特征的相关性,以期进一步分析其临床意义。

1 材料与方法

1.1 病例与标本

病例标本由第二军医大学附属长征医院提供。病例收集的时间期限为 2012 年 4 月至 10 月,共 45 例,包括结直肠癌组织及相应癌旁正常结直肠组织(距离肿瘤组织 5 cm 以上)。病例提供者术前均未接受放疗、化疗及免疫治疗,术后标本经常规病理诊断结果均为腺癌。其中,结肠癌 18 例,直肠癌 27 例;男 18 例,女 27 例;年龄 30~86 岁,中位年龄 56 岁;肿瘤直径最小者 1.5 cm,最大者 8 cm,中位直径 4 cm;组织学病理分级:低分化及中~低分化,共 12 例;中分化 25 例;中~高分化 8 例。浸润深度:T1+T2 共 12 例,T3+T4 共 33 例。据 NCCN 2011 版 TNM 分期,I 期 9 例,II 期 17 例,III 期 11 例,IV 期 8 例;淋巴结转移 16 例;远处转移 10 例。患者均已签署知情同意书。所有标本采集后立即放置于无 RNA 酶的 EP 管中,于液氮罐中冷冻储藏。

1.2 试剂

PCR 上下游引物(上海生工生物工程有限公司),TRIZOL 试剂(Invitrogen,Carlsbad, CA, USA),逆转录试剂盒及 PCR 试剂盒(大连 TaKaRa 公司),焦碳酸二乙酯(DEPC,上海生工生物工程有限公司)。CCNB2 鼠抗人单克隆抗体购于 Abcam 公司;DAB(二氨基联苯胺)显色剂,0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液、0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液、PV-9000 通用试剂盒购于福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 RT-PCR 法检测 CCNB2 mRNA 的表达

将组织放入研磨钵,迅速倒入液氮,迅速研磨至粉末状,按说明书要求使用 TRIZOL 提取组织总 RNA,用酶标仪检测其浓度和 OD 值。然后按逆转录试剂盒要求将 RNA 逆转录为 cDNA 后,再进行 PCR 反应。内参 GAPDH 及 CCNB2 引物均由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列:GAPDH 上游:5'-CATGGCCTTCCGTGTTCTTA-3',下游:5'-TGTCATCAT-CTTGGCAGGTTT-3',扩增产物片段长度为 309 bp;CCNB2 上游:5'-CAGGAGACTCTGTACATGTGCG-3'和 5'-TTCTCG GATTGGGAAGTGG-3',扩增产物片段长度为 195 bp。10 μl 反应体系,反应条件:预变性 95℃ 30 s 后,进行 40 个循环反应:95℃ 5 s,60℃ 30 s。检测后获得 CT 值,将获得的数值用 2^{-ΔΔCT} 法进行统计学计算。

1.4 免疫组织化学检测 CCNB2 蛋白的表达

所有标本均经 10% 中性甲醛溶液固定,石蜡包埋,常规切片,每个蜡块取 4 μm 厚切片进行免疫组化染色:3% H₂O₂ 室温孵育 20 min,封闭内源性过氧化物酶,微波抗原修复,山羊血清封闭,加入抗 CCNB2 抗体,4℃ 孵育过夜,再加入生物素标记的羊抗鼠二抗 37℃ 孵育 1h,辣根酶标记链酶卵白素 37℃ 孵育 30 min。DAB 显色,苏木精复染,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树

胶封片(每一步骤间均用 PBS 缓冲液冲洗 3 次,每次 5 min)。CCNB2 阳性表达为胞浆内的棕黄色颗粒,显微镜下观察并拍照。由两位病理医师评估 CCNB2 蛋白免疫组织化学染色的强度。针对结直肠癌癌细胞、正常组织细胞细胞质中的阳性颗粒进行评估。具体分为:阴性(-):没有阳性颗粒表达;弱阳性(+):阳性颗粒 < 30%;阳性(++):阳性颗粒(30%~60%);强阳性(+++):阳性颗粒 > 60%。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行分析,所有计量资料数据均以均数±标准差表示,组间比较采用 t 检验,计数资料及相关性分析采用 χ² 检验,以 P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌及癌旁正常结直肠组织中 CCNB2 mRNA 表达的比较

RT-PCR 结果显示结直肠癌组织中 CCNB2 mRNA 的相对表达量(36.43±8.90)显著高于癌旁正常结直肠组织(11.34±3.12),差异有统计学意义(P<0.001),见图 1。

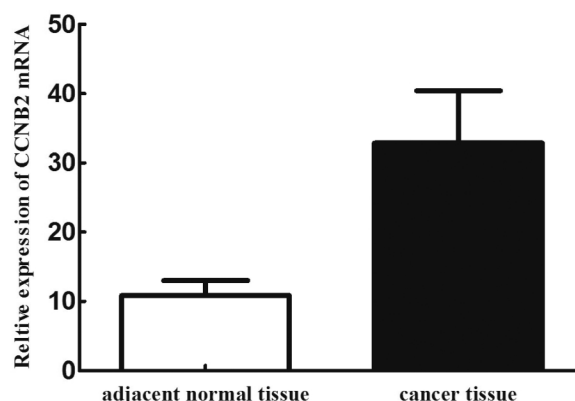


图 1 结直肠癌及癌旁正常结直肠组织中 CCNB2 mRNA 表达的比较
Fig. 1 Comparison of the CCNB2 gene mRNA levels between colorectal cancer tissues and adjacent normal colorectal tissues

2.2 结直肠癌及癌旁正常结直肠组织中 CCNB2 蛋白表达的比较

CCNB2 蛋白阳性表达颗粒主要定位于肿瘤细胞细胞质,见图 2 B、C、D、E、F、G;间质不表达,仅 7 例标本 CCNB2 蛋白阳性表达颗粒定位于肿瘤细胞的细胞核,见图 2G。45 例结直肠癌标本中 39 例表达 CCNB2 蛋白(+~+++),见图 2 B、C、D、E、F、G,所有癌旁正常结直肠组织均不表达 CCNB2 蛋白,见图 2A、E,结直肠癌及癌旁正常结直肠组织中 CCNB2 蛋白表达的阳性率比较差异具有统计学意义(P<0.01)。

2.3 CCNB2 的表达与结直肠癌临床病理因素的相关性

2.3.1 CCNB2 mRNA 的表达与结直肠癌临床病理因素的相关性 12 例低分化及中~低分化结直肠癌(18.19±5.28)组织与 33 例中分化及中~高分化结直肠癌(29.28±10.87)组织 CCNB2 mRNA 的表达比较差异无统计学意义(P>0.05)(表 1)。

24 例肿瘤直径 ≥ 4 cm 结直肠癌组织 CCNB2 mRNA 相对表达量(40.92±14.52)较 21 例肿瘤直径 < 4 cm 结直肠癌组织(9.65±2.35)显著升高,差异有统计学意义(P=0.029)(表 1)。

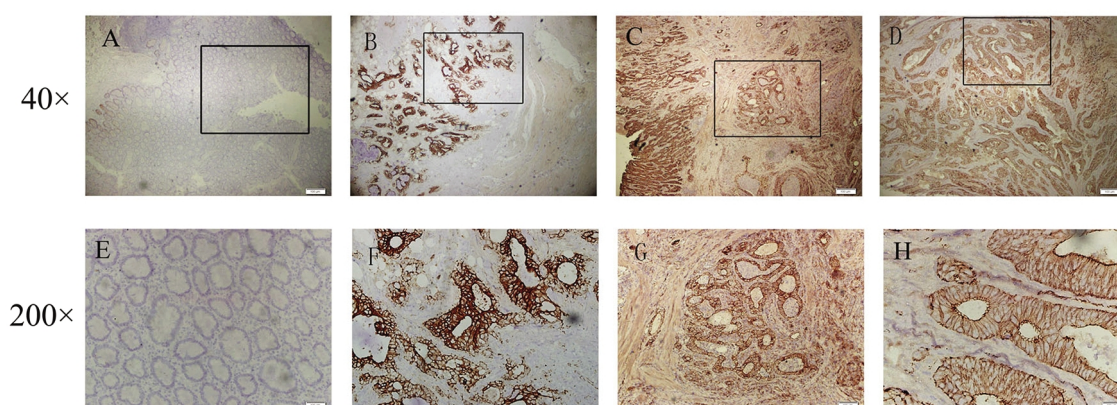


图2 结直肠癌及癌旁正常结直肠组织中 CCNB2 蛋白表达的比较

Fig. 2 Comparison of the CCNB2 protein expressions between colorectal cancer tissues and adjacent normal colorectal tissues

*注:A-H:CCNB2 的表达:A,E:0;B,F:++;C,G:++;D,H:+++。

*Note: A-H; the expression of CCNB2: A, E: 0; B, F: ++; C, G: ++; D, H: +++.

表1 CCNB2 mRNA 的表达与结直肠癌患者临床病理因素的关系

Table 1 Relationship between CCNB2 mRNA expression and clinicopathologic parameters of colorectal cancer patients

Variable	Number of case	CCNB2 mRNA expression				x ²	P value
		Low	%	High	%		
Age(years)	45	57.0± 1.94		57.0± 17.16			1.000
Gender						4.281	0.257
male	18	12	35.3	6	54.4		
female	27	22	64.7	5	45.5		
Tumor size						6.223	0.029*
<4cm	21	19	55.9	2	18.2		
≥ 4cm	24	15	44.1	9	81.8		
Location						1.220	0.428
Colon	18	12	35.3	6	54.4		
Rectum	27	22	64.7	5	45.5		
Histologic grade						0.241	0.958
Well and moderately	33	25	73.5	8	72.7		
Poorly and others	12	9	26.5	3	27.3		
Depth of invasion						5.697	0.021*
T1,T2	12	12	35.3	0	0		
T3,T4	33	22	64.7	11	100		
Venous invasion						0.362	0.287
Absent	31	12	35.3	9	81.8		
Present	14	22	64.7	2	18.2		
Nervous invasion						0.031	0.978
Absent	41	31	91.2	10	90.9		
Present	4	3	8.8	1	9.1		
Lymphatic metastasis						0.224	0.287
Absent	31	22	64.7	9	81.8		
Present	14	12	35.3	2	18.2		
Distant metastasis						0.101	0.194
Absent	37	28	82.4	7	63.6		
Present	8	6	17.6	4	36.4		
TNM stage						12.275	0.003*
I	9	9	26.5	0	0		
II	17	8	23.5	9	81.8		
III	11	11	32.4	0	0		
IV	8	6	17.6	2	18.2		

*Note: P<0.05

33 例浸润至肠壁全层、浆膜层或肠壁全层至肠壁外纤维脂肪组织(T3+T4)结直肠癌组织中 CCNB2 mRNA 的相对表达量(33.38± 10.80)显著高于 12 例浸润至肌层(T1+T2)的结直肠癌(6.94± 1.50)组织,差异有统计学意义(P=0.021)(表 1)。

发生淋巴结、盆腔、肝脏等远处转移的结直肠癌组织 CCNB2 mRNA 的表达与未发生远处转移的结直肠癌组织比较,差异无统计学意义(28.57± 10.73 vs. 23.53± 12.59,P>0.05)(表 1)。

TNM 分期为 I 期的结直肠癌组织与 II、III 期及 IV 期的结直肠癌组织中 CCNB2 mRNA 的相对表达量比较差异有统计

学意义(41.43± 10.69 vs. 10.84± 2.78、P=0.003),其余各期两两比较差异无统计学意义((p>0.5),(表 1)。

2.3.2 CCNB2 蛋白表达与结直肠癌临床病理因素的相关性 结直肠癌组织中 CCNB2 蛋白的表达与患者的性别、年龄、分化程度和肿瘤转移均无显著相关性(P>0.05),但与肿瘤分期呈显著正相关性,肿瘤分期越晚,CCNB2 蛋白的阳性表达越高。此外,CCNB2 蛋白的表达与肿瘤浸润程度也显著相关,即结直肠癌肿瘤浸润程度越深,其 CCNB2 蛋白的阳性表达率越高,见表 2。

表 2 CCNB2 的蛋白表达与结直肠癌患者临床病理因素的关系

Table 2 Relationship between CCNB2 protein expression and clinicopathologic parameters of colorectal cancer patients

Items	n	-	+~+++	χ^2	P
Gender				2.051	0.152
Male	18	4	14		
Female	27	2	25		
Age(years)				0.067	0.796
<60	32	4	28		
>60	13	2	11		
Differentiation				1.240	0.538
Poor	8	2	6		
Moderate	25	3	22		
Well	12	1	11		
Stage				9.426	0.009
I	9	4	5		
II	17	1	16		
III/ IV	19	1	18		
Metastasis				0.006	0.939
Yes	8	1	7		
No	37	5	32		
Invasion				14.679	0.001
Mucosa and submucosa	4	3	1		
Muscularis	8	1	7		
Out of the adventia	33	2	31		

*Note: P<0.05.

3 讨论

结直肠癌是临床常见恶性肿瘤之一,其发生发展是由多种致病因子多种调控机制共同协作产生的结果。在我国,由于结直肠癌一直属于高发疾病且预后较差,故一直是研究者们关注的热点。为了探寻一种高效的分子标记物用于指导结直肠癌的临床诊断以及判断预后,本课题组开展了此项研究。

在真核生物中,CCNB2 作为 B 型细胞周期蛋白家族的一员,在有丝分裂过程中的 G2 期显著增加并达到峰值^[8]。在结直肠癌中,NF-Y 亚基可与 CNNB2 启动子上的 DNA 片断结进而调控 CCNB2 启动子的活性。NF-Y 亚基所致的 CCNB2 和其他细胞周期相关基因的上调可加速细胞周期进程从而导致肿瘤

细胞增殖^[7]。也有研究表明 CCNB2 可通过与 CDC2 激酶结合影响 G2/M 期进程,若抑制 CCNB2 表达可诱发细胞周期停滞^[9,10]。Seon-Hwa Park^[7]等通过免疫组化研究发现,在分化良好的结肠腺癌细胞中 CCNB2 主要定位于上皮细胞的细胞质中,而在相邻的固有层、粘膜肌层、粘膜下血管或纤维结缔组织几乎检测不到,表明 CCNB2 与结直肠癌的发生有一定的关系。本研究共收集手术切除的新鲜结直肠癌组织 45 例,并取其癌旁正常组织作为对照,结果显示 CCNB2 蛋白阳性表达颗粒大都定位于结直肠癌的细胞质,仅少数标本定位于肿瘤细胞的细胞核内,结直肠癌中 CCNB2 的 mRNA 及蛋白表达均显著高于癌旁正常结直肠组织,与国外研究结果相似,这也表明 CCNB2 的表达上调在结直肠癌的发生过程中可能发挥了重要的作用。

进一步分析 CCNB2 的表达与结直肠癌临床病理特征的关系,发现其与结直肠癌肿瘤的大小、浸润深度呈正相关。此外,TNM 分期中 I 期 CCNB2 mRNA 的表达水平分别与 II 期和 III/IV 期相比,统计结果存在显著差异性,且 CCNB2 蛋白水平表明其结直肠癌的肿瘤分期及浸润程度也存在差异性,说明 CCNB2 可能作为癌基因参与肿瘤的发生发展过程,也可作为衡量结直肠癌恶性表型的一个重要指标,提示其可用作结直肠癌预后不良的分子标志物在临床治疗中发挥重要作用。我们的研究表明 CCNB2 的 mRNA 和蛋白表达水平与年龄、性别、肿瘤分化程度、转移与非转移转移结直肠癌间等指标无相关性。虽然 CCNB2 在结直肠癌的发生发展过程中起重要作用,但 CCNB2 基因究竟是通过调控编码蛋白的异常,还是与多种肿瘤相关基因的协同作用促使结直肠癌发生恶性转化,其作用机制有待于更深一步研究。

综上所述,本研究发现结直肠癌中 CCNB2 的 mRNA 和蛋白呈高表达,其与结直肠癌肿瘤大小、浸润深度具有相关性,为结直肠癌的诊断治疗和追踪复查提供特异性更高的分子标志物奠定了基础。CCNB2 可能成为反映结直肠癌生物学行为的重要指标。本课题组在未来的工作中,针对 CCNB2 的功能和机制展开大量的研究,并且检测其在结直肠癌中的相关信号通路并加以调控,为临床治疗提供有力的理论依据。

参考文献(References)

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2011, 61(2): 69-90
- [2] Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer[J]. Cell proliferation, 2003, 36(3): 131-149
- [3] Hofmann H S, Hansen G, Burdach S, et al. Discrimination of human lung neoplasm from normal lung by two target genes [J]. American journal of respiratory and critical care medicine, 2004, 170 (5): 516-519
- [4] Albulescu R. Elevated cyclin B2 expression in invasive breast carcinoma is associated with unfavorable clinical outcome[J]. Biomarkers in medicine, 2013, 7(2): 203-203
- [5] Stav D, Bar I, Sandbank J. Usefulness of CDK5RAP3, CCNB2, and RAGE genes for the diagnosis of lung adenocarcinoma [J]. The International journal of biological markers, 2007, 222: 108-113
- [6] Fernandez-Ranvier G G, Weng J, Yeh R F, et al. Identification of biomarkers of adrenocortical carcinoma using genomewide gene expression profiling [J]. Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960), 2008, 143(9): 841-846
- [7] Park S H, Yu GR, Kim W H, et al. NF-Y-dependent cyclin B2 expression in colorectal adenocarcinoma[J]. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2007, 13(3): 858-867
- [8] Jackman M, Firth M, Pines J. Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus[J]. The EMBO journal, 1995, 14(8): 1646-1654
- [9] Wu T, Zhang X, Huang X, et al. Regulation of cyclin B2 expression and cell cycle G2/m transition by menin[J]. The Journal of biological chemistry, 2010, 285(24): 18291-18300
- [10] Petri ET, Errico A, Escobedo L, et al. The crystal structure of human cyclin B[J]. Cell cycle (Georgetown, Tex), 2007, 6(11): 1342-1349
- [11] Takashima S, Saito H, Takahashi N, et al. Strong expression of cyclin B2 mRNA correlates with a poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer[J]. Tumour Biol, 2014, 35(5): 4257-4265
- [12] Yang J, Zhang W. New molecular insights into osteosarcoma targeted therapy[J]. Curr Opin Oncol, 2013, 25(4): 398-406
- [13] Fu L J, Wang B. Investigation of the hub genes and related mechanism in ovarian cancer via bioinformatics analysis[J]. J Ovarian Res, 2013, 6(1): 92
- [14] Mo M L, Chen Z, Li J, et al. Use of serum circulating CCNB2 in cancer surveillance[J]. Int J Biol Markers, 2010, 25(4): 236-242
- [15] De Martino I, Visone R, Wierinckx A, et al. HMGA proteins up-regulate CCNB2 gene in mouse and human pituitary adenomas[J]. Cancer Res, 2009, 69(5): 1844-1850
- [16] Esteban-Jurado C, Garre P, Vila M, et al. New genes emerging for colorectal cancer predisposition [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20 (8): 1961-1971
- [17] Koehler BC, Jäger D, Schulze-Bergkamen H, et al. Targeting cell death signaling in colorectal cancer: Current strategies and future perspectives[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(8): 1923-1934
- [18] Coppède F, Lopomo A, Spisni R, et al. Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(4): 943-956
- [19] Chesnel F, Bazile F, Pascal A, et al. Cyclin B2/cyclin-dependent kinase1 dissociation precedes CDK1 Thr-161 dephosphorylation upon M-phase promoting factor inactivation in *Xenopus laevis* cell-free extract[J]. Int J Dev Biol, 2007, 51(4): 297-305
- [20] Bellanger S, de Gramont A, Sobczak-Thépot J. Cyclin B2 suppresses mitotic failure and DNA re-replication in human somatic cells knocked down for both cyclins B1 and B2 [J]. Oncogene, 2007, 26(51): 7175-7184
- [21] Sarafan-Vasseur N, Lamy A, Bourguignon J, et al. Overexpression of B-type cyclins alters chromosomal segregation [J]. Oncogene, 2002, 21(13): 2051-2057