

CDC25B在大肠肿瘤中的表达及意义

刘光军, 张 丹, 张 力, 王继红, 姜彦多, 高 红, 刘 丹, 金成兰

刘光军, 张力, 刘丹, 金成兰, 中国人民解放军 202 医院内窥镜中心
辽宁省沈阳市 110003
张丹, 中国人民解放军 202 医院消化科 辽宁省沈阳市 110003
王继红, 姜彦多, 中国人民解放军 202 医院病理科 辽宁省沈阳市 110003
高红, 中国医科大学第二临床学院卫生部小儿先天畸形重点实验室
辽宁省沈阳市 110004
刘光军, 男, 1967-09-05 生, 天津市人, 汉族. 2003 年白求恩医科大学硕士.
主治医师, 主要从事胃肠道疾病的临床及基础研究.
项目负责人: 刘光军, 110003, 辽宁省沈阳市, 中国人民解放军 202 医院内
窥镜中心. lgj10258@163.com
电话: 024-23053833
收稿日期: 2003-12-12 接受日期: 2004-02-01

Expression of CDC25B and its clinical significance in colorectal neoplasms

Guang-Jun Liu, Dan Zhang, Li Zhang, Ji-Hong Wang,
Yan-Duo Jiang, Hong Gao, Dan Liu, Cheng-Lan Jin

Guang-Jun Liu, Li Zhang, Dan Liu, Cheng-Lan Jin, Department of
Endoscopy, 202 Hospital of Chinese PLA, Shenyang 110003, Liaoning
Province, China
Dan Zhang, Department of Gastroenterology, 202 Hospital of Chinese
PLA, Shenyang 110003, Liaoning Province, China
Ji-Hong Wang, Yan-Duo Jiang, Department of Pathology, 202 Hospi-
tal of Chinese PLA, Shenyang 110003, Liaoning Province, China
Gao Hong, Second Clinical College, China Medical University, Shenyang
110004, Liaoning Province, China
Correspondence to: Guang-Jun Liu, Department of Endoscopy, 202
Hospital of Chinese PLA, Shenyang 110003, Liaoning Province, China.
lgj_10258@163.com
Received: 2003-12-12 Accepted: 2004-02-01

Abstract

AIM: To elucidate the role of CDC25B in pathogenesis, evolution and metastasis of colorectal cancer and to investigate the relationship between the expression of CDC25B and the clinical pathological features of colorectal cancer and the prognosis of patients.

METHODS: The expression of CDC25B at the mRNA and protein levels was examined in patients with colorectal cancer ($n=24$ by RT-PCR methods and $n=168$ by S-P methods), colorectal adenoma ($n=62$ by RT-PCR methods and $n=25$ by S-P methods) and normal colorectal mucosa ($n=10$ by RT-PCR methods and $n=20$ by S-P methods) by RT-PCR and immunohistochemical S-P method. The survival of postoperative patients were followed-up.

RESULTS: The CDC25B mRNA expression in colorectal cancer and colorectal adenoma was higher than that of normal colorectal tissues (1.41 ± 0.07 , 1.32 ± 0.17 vs 0.62 ± 0.02 , $P < 0.01$), and the CDC25B mRNA of colorectal cancer was higher than that of colorectal adenoma (1.41 ± 0.07 vs 1.32 ± 0.17 , $P < 0.05$). The expression of CDC25B mRNA in colorectal adenoma with mild, moderate to severe hyperplasia was gradually increasing (1.25 ± 0.21 vs 1.36 ± 0.19

vs 1.40 ± 0.07 , $P < 0.01$). The expression of CDC25B had a positive correlation with distant metastases. The patients whose expression of CDC25B was positive had a markedly low survival rate in 5 years.

CONCLUSION: CDC25B may be involved in the transition from adenoma to cancer. Expression of CDC25B in colorectal cancer may accelerate the transformation of cell cycle, which promotes the metastases to distant organs.

Liu GJ, Zhang D, Zhang L, Wang JH, Jiang YD, Gao H, Liu D, Jin CL. Expression of CDC25B and its clinical significance in colorectal neoplasms. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1057-1060

摘要

目的: 探讨 CDC25B (cell division cycle 25B, 细胞分裂周期蛋白 25B) 在大肠肿瘤中的表达及临床意义.

方法: 应用半定量的 RT-PCR 及免疫组化染色 (S-P 法) 方法检测该基因在大肠癌 (RT-PCR 法, $n=24$; S-P 法, $n=168$), 大肠腺瘤 (RT-PCR 法, $n=62$; S-P 法, $n=25$) 及大肠正常黏膜 (RT-PCR 法, $n=10$; S-P 法, $n=20$) 中的表达.

结果: CDC25B mRNA 在大肠癌及大肠腺瘤中的相对含量明显高于正常大肠黏膜 (1.41 ± 0.07 , 1.32 ± 0.17 vs 0.62 ± 0.02 , $P < 0.01$), 在大肠腺瘤伴轻 - 中 - 重度不典型增生组织中的相对含量逐渐增高 (1.25 ± 0.21 , 1.36 ± 0.19 和 1.40 ± 0.07 , $P < 0.01$); CDC25B 基因翻译蛋白在正常大肠黏膜、腺瘤中未见表达, 在大肠癌中以细胞核表达为主, 其表达与大肠癌有无远处脏器转移相关 ($2/46$ vs $14/106$, $P < 0.05$); 经随访发现 CDC25B 蛋白阳性表达者, 5 a 生存率明显降低 ($25/31$ vs $42/82$, $P < 0.05$).

结论: CDC25B 可能参与了大肠腺瘤到大肠癌的转变过程, 其在大肠癌发展中可能起一定作用, 为大肠癌预后不良的危险因素.

刘光军, 张丹, 张力, 王继红, 姜彦多, 高红, 刘丹, 金成兰. CDC25B 在大肠肿瘤中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1057-1060
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1057.asp>

0 引言

CDC25B 是 CDC25 磷酸酶家族中的一员, 是有丝分裂的激活剂, 加速细胞分裂. CDC25B 蛋白本身具有肿瘤源性. 大肠癌在我国常见^[1-10], 而 CDC25B 过度表达者预后差^[11], 且与有无远处脏器转移及肿瘤大小关系密切, 但未见有关该基因在腺瘤中表达情况的报道. 由于

多数大肠癌均是从大肠腺瘤发展而来,我们应用半定量的 RT-PCR 及免疫组化染色(S-P 法)方法检测该基因在大肠癌,大肠腺瘤及大肠正常黏膜中的表达,同时对术后病例进行随访,比较 CDC25B 阳性及阴性表达者 5 a 生存率的差异.以了解该蛋白在大肠癌发生、发展及转移中的作用,与临床病理特征的联系及与预后的相关性等.

1 材料和方法

1.1 材料 24 份大肠癌和 62 份大肠腺瘤活检组织标本均取自 2002-04/2002-12 我院肠镜室肠镜检查的患者,并均经病理检查证实. 10 份正常黏膜活检标本取自距癌肿 10 cm 以外的部位.将活检标本液氮速冻, -70 °C 冰箱冷冻待测.总 RNA 提取按 Trizol 试剂盒说明进行. CDC25B (416 bp)引物参照 Takemasa et al^[11]资料设计:上游引物为 5'-CACGCCCCGTGCAGAATAAGC-3';下游引物为 5'-ATGACTCTCTTGTCCAGGCTACAGG-3'.同时设内参照 β -actin (592 bp):上游引物为 5'-TGTATGCCTCTGGTCGATCCAC-3';下游引物为 5'-ACAGAGTAC TTGCTGTCAGGAG-3'.均由北京奥科生物有限公司合成.

1.2 方法 逆转录合成 cDNA 第一链各管反应总体积为 10 μ L. RT 反应条件为: 65 °C 预变性 1 min; 30 °C 变性 5 min, 65 °C 退火 30 min (15-30 min 匀速上升), 98 °C 延伸 5 min; 5 °C 延伸 5 min. PCR 扩增 CDC25B 总反应体积为 25 μ L. PCR 条件: 95 °C 预变性 12 min; 95 °C 变性 1 min, 62 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 40 循环; 72 °C 延伸 10 min. β -actin 总反应体积为 25 μ L. PCR 条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 循环; 72 °C 延伸 7 min. 将分别扩增的 CDC25B 和 β -actin PCR 产物一起于 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,测相对含量;同时设标记物为 ϕ x174-Hinc II (Takara 公司).电泳后,经凝胶成像分析系统摄影,用相应软件扫描测定 PCR 产物经溴化乙锭染色后强度(公式: CDC25B 的相对含量 = CDC25B 密度 / β -actin 密度 \times 100 表示).

另收集我院 1991/1996 年资料完整手术切除的大肠癌标本 168 例,其中男 90 例,女 78 例.年龄 23-83 岁. 113 例随访 18-132 mo. Dukes A 期 46 例, B 期 62 例, C 期 42 例, D 期 18 例.同时选择正常大肠黏膜 20 例,大肠腺瘤 25 例.所有标本经 40 g/L 甲醛固定,石蜡包埋,连续切片,厚度 3-5 μ m,分别行 HE 染色和免疫组化染色.采用 S-P 法,阳性细胞核染成棕黄色.细胞无染色或阳性细胞数小于 5% 记为(-);阳性细胞数 5-25% 记为(+);26-50% 记为(++);阳性细胞数大于 50% 记为(+++).从手术日起,到随访日期或由于复发、转移而死亡的日期为止,有 113 例完整的随访资料.

统计学处理 实验数据采用均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示.计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用 F 分析和 t 检验,以上均在 SPSS 8.0 软件包上进行.计算生存期,

对随访资料的生存期分析,按 Kaplan-Meier 法制作累积生存率曲线并作 Log-rank 检验.

2 结果

2.1 CDC25B mRNA 的表达 经紫外分光光度计测定提取的总 RNA A260/A280 在 1.6-1.9,电泳时可见清晰的 RNA 条带. RT-PCR 产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳后,紫外透射仪下在 416 bp 可见明显的特异产物带,无明显非特异产物带.正常组织未见电泳带;大肠腺瘤中随着组织不典型增生程度的加重,电泳带逐渐增宽、变亮;大肠癌组织的电泳带最亮且宽(图 1). CDC25B 在大肠癌、大肠腺瘤中的表达均明显高于正常组织($P < 0.05$),但二者间差异不显著($P > 0.05$);同时 CDC25B 在大肠腺瘤中的表达与不典型增生程度无关($P > 0.05$,表 1).在大肠癌、大肠腺瘤及正常组织中均有不同程度的 CDC25B mRNA 表达,其中以大肠癌中为最高,腺瘤居中,正常组织最少. CDC25B 在大肠癌中的相对含量高于大肠腺瘤($P < 0.05$);大肠癌和大肠腺瘤中的相对含量均高于正常组织($P < 0.01$). CDC25B 在大肠腺瘤伴有轻、中、重度不典型增生组织中的相对含量逐渐增高($P < 0.01$,表 1).

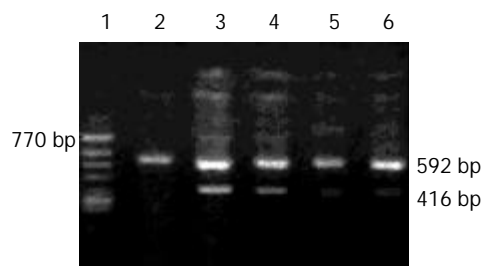


图1 大肠不同组织中 CDC25B mRNA 表达. 1: ϕ x174-Hinc II; 2: 阴性对照; 3: 大肠腺瘤; 4: 大肠腺瘤伴重度不典型增生, 局部癌变; 5: 大肠腺瘤伴中度不典型增生; 6: 大肠腺瘤伴轻度不典型增生.

表1 结肠组织 CDC25B 表达和 CDC25B mRNA 相对含量

结肠组织	n	CDC25B		CDC25B mRNA (mean \pm SD, ng)
		阳性(n)	阳性率(%)	
正常	10	0	0	0.62 \pm 0.02
腺瘤	62	21	33.9 ^a	1.32 \pm 0.17 ^b
轻度不典型增生	26	7	26.9	1.25 \pm 0.21
中度不典型增生	24	8	33.3	1.36 \pm 0.19 ^d
重度不典型增生	12	6	50	1.40 \pm 0.07
大肠癌	24	9	37.5 ^a	1.41 \pm 0.07 ^{bc}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常; ^c $P < 0.05$ vs 腺瘤; ^d $P < 0.01$ vs 轻、重度不典型增生.

2.2 CDC25B 蛋白的表达 在 20 例正常大肠黏膜及 25 例大肠腺瘤组织中均未见 CDC25B 基因表达. 大肠癌组织中 CDC25B 基因表达以细胞核表达为主(图 2), 阳性率 71.4%(120/168), 其中(+)5.9%、(++)23.8%、(+++)41.7%. 癌旁正常组织中无表达. 大肠癌 CDC25B 基因表达与大

肠癌有无远处脏器转移、血清癌胚抗原(CEA)水平相关($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 而与临床病理分期、组织分级、淋巴结转移、肿瘤大小、性别、年龄均无关(表 2). 本组大肠癌随访 113 例(67.3%). 5 a 内死于本病者 46 例, 占 40.7%. Kaplan-Meier 生存率曲线分析, CDC25B 阴性和阳性表达者, 5 a 生存率分别为 80.6%(25/31)和 51.2%(42/82). 经 Log rank 检验, 阳性组 5 a 生存率显著低于阴性组($P < 0.05$, 图 3). 提示 CDC25B 阳性者恶性程度高, 预后差.

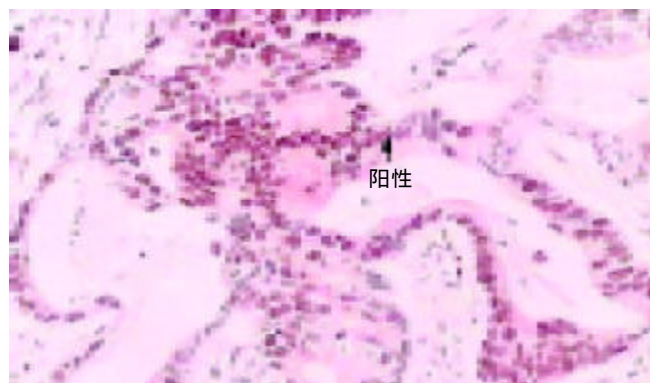


图 2 大肠癌组织中细胞核 CDC25B 表达阳性 S-P $\times 200$.

表 2 CDC25B 表达与大肠癌临床病理(n)

临床病理	阴性	阳性	合计
正常大肠黏膜	20	0	20 ^a
大肠腺瘤	25	0	25 ^a
大肠癌	48	120	168
Dukes A 期	8	38	46
Dukes B 期	14	48	62
Dukes C 期	18	24	42
Dukes D 期	8	10	18
高分化	22	54	76
中分化	20	58	78
低分化	6	8	14
淋巴结转移 无	26	84	110
有	22	36	58
远处转移 无	46	106	152
有	2	14	16 ^a
血清 CEA $\leq 15 \mu\text{g/L}$	38	84	122
$> 15 \mu\text{g/L}$	10	36	46 ^b
肿瘤直径 $\leq 5 \text{ cm}$	14	50	64
$> 5 \text{ cm}$	34	70	104
男	22	68	90
女	26	52	78
年龄 ≤ 60 岁	30	66	96
> 60 岁	18	54	72

^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$.

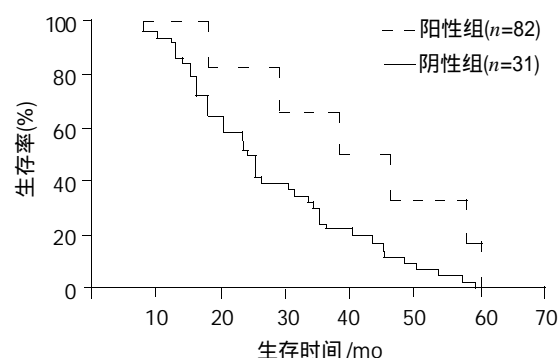


图 3 CDC25B 表达阴性和阳性者 Kaplan-Meier 生存率曲线.

3 讨论

CDC25B 是 CDC25 磷酸酶家族中的一员, 是有丝分裂的激活剂, 在 $G_2 \rightarrow M$ 期通过对 cdc2(即 CDK_1 , 是原型的 CDK , 与 CyclinB 调节亚单位一起调节底物磷酸化, 引起细胞有丝分裂, 调节细胞 $G_2 \rightarrow M$ 期转化)激酶的 Tyr-15 和 Thr-14 去磷酸化而激活 cdc2, 促进细胞进入有丝分裂期^[11]. 我们应用 RT-PCR 方法检测正常大肠黏膜组织中 CDC25B 呈低水平表达(相对含量 0.62 ± 0.02), 免疫组化染色发现少数正常大肠黏膜组织中细胞核染色阳性, 但阳性细胞数小于 5%, 故列为阴性. RT-PCR 检测大肠腺瘤中 CDC25B 呈过度表达(相对含量 1.32 ± 0.17 , 高于正常组织 2 倍以上). 而免疫组化染色大肠腺瘤组织中未见表达, 我们在观察中也发现部分腺瘤中可见细胞核染色, 但阳性细胞数小于 5%, 故列为阴性. 考虑免疫组化为假阴性结果, 其原因可能是因标本固定时间较长, 造成抗原漏出而致假阴性. Takemasa et al^[11]报道, CDC25B 在大肠癌检出率为 60%, 而 Hernandez et al^[12]报道大肠癌检出率为 56%. 我们实验中, RT-PCR 检测大肠癌组织中呈过度表达(相对含量 1.41 ± 0.07 , 高于正常组织 2 倍以上), 检出率为 37.5%; 免疫组化染色大肠癌组织中 CDC25B 基因表达阳性占 71.4% (120/168), 但强阳性仅占 41.7%, 均明显低于 Takemasa et al 及 Hernandez et al 的报告的过度表达率, 其原因也可能与种族有关.

从本实验结果看, 所测组织中均有 CDC25BmRNA 的表达. 腺癌和腺瘤中 CDC25BmRNA 的相对含量与正常组织相比差异有非常显著的意义, 癌和腺瘤中呈高水平表达; 并且癌和腺瘤二者中的表达差异亦有显著性意义; 同时发现, 从大肠腺瘤伴轻、中、重度不典型增生到腺癌 CDC25BmRNA 的相对含量呈逐渐增高趋势. 此结果表明, CDC25 基因表达所导致的细胞增生在大肠癌的恶性转化过程中起重要作用. CDC25B 是人体组织中存在的一种正常而微量的物质, 起着促进细胞从 $G_2 \rightarrow M$ 期, 促进细胞有丝分裂的作用. 在发生肿瘤改变时, 由于致癌因素的作用使腺瘤中的 CDC25B 基因活性增强, 导致合成过量的 CDC25B, 促进肿瘤生长和恶性转化. 推测 CDC25B 基因的过度表达可能发生在恶性肿瘤的早期阶段, 进而引起 CDC25B 基因表达异常紊

乱,发生肿瘤改变,CDC25B的表达有可能作为转录紊乱的一个早期生物学指标,对于恶性肿瘤的诊断甚至是早期诊断评估有十分重要的作用。

我们发现,CDC25B基因表达与癌有无远处脏器转移($P < 0.05$),血清CEA水平($P < 0.005$)相关。而与临床病理分期、组织分级、淋巴结转移、肿瘤大小、性别、年龄均无关($P > 0.05$)。提示CDC25B基因表达者很可能存在远处脏器转移。血清CEA水平监测对了解大肠癌有无复发、有无远处脏器转移、判断预后、评价疗效具有较高临床应用价值。本组资料显示CDC25B基因表达与血清CEA水平相关,提示同时监测血清CEA水平及CDC25B基因表达情况可判断预后,指导治疗。CDC25B作为细胞周期正调节因子,可促进肿瘤细胞的分裂增生,进而促进肿瘤的发生与发展,同时在一定条件下CDC25B还具有肿瘤源性,二者共同影响了患者的预后。本结果显示,CDC25B不仅与大肠癌远处脏器转移相关,而且对大肠癌预后也有一定的影响,我们通过生存曲线分析,发现CDC25B阳性表达者,其5a生存率显著低于阴性组。提示CDC25B蛋白过度表达患者预后较差,检测CDC25B表达情况可预测预后,指导治疗。由于CDC25B磷酸酶为细胞周期调控因子,如果能研究某种物质可抑制该蛋白活性,则可抑制细胞分裂,控制肿瘤的发生、发展。近年来Lazo et al^[13-14]和Sodeoka et al^[15]分别合成了某些化合物能够选择性抑制CDC25B磷酸酶,进而阻止了肿瘤细胞G₂→M期的转化,抑制了人和鼠肿瘤细胞的生长,可能是防治结肠癌的可行途径之一。

4 参考文献

1 来茂德. 中国结直肠癌发生发展相关基因. 世界华人消化杂志

- 2001;9:1227-1232
- 2 金顺钱,詹启敏. 肿瘤分子生物学是基础医学研究的前沿. 世界华人消化杂志 2002;10:678-680
- 3 谢正勇,卿三华. 结直肠癌发病率及解剖部位变化趋势. 世界华人消化杂志 2003;11:1050-1053
- 4 卿三华. 结、直肠癌临床病理分期系统及其临床意义. 世界华人消化杂志 2003;11:1760-1763
- 5 刘建平,朱兆华. 大肠肿瘤COX-2的表达与临床病理特征的关系. 世界华人消化杂志 2003;11:306-309
- 6 盛剑秋,晨智敏. 大肠癌相关基因对大肠癌的筛选. 世界华人消化杂志 2001;9:783-785
- 7 肖军,邓长生,朱尤庆. 大肠腺癌组织Survivin蛋白的表达意义. 世界华人消化杂志 2003;11:540-543
- 8 李世荣. 大肠癌早期诊断的策略. 世界华人消化杂志 2001;9:780-782
- 9 周海波,张居民,颜云. 结直肠癌组织中DPC₄基因分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1140-1142
- 10 吴佩,方胜,芮景,夏祥厚. 大肠癌组织胃泌素生长抑素表达的意义. 世界华人消化杂志 2002;10:1404-1407
- 11 Takemasa I, Yamamoto H, Sekimoto M, Ohue M, Noura S, Miyake Y, Matsumoto T, Aihara T, Tomita N, Tamaki Y, Sakita I, Kikkawa N, Matsuura N, Shiozaki H, Monden M. Overexpression of CDC25B phosphatase as a novel marker of poor prognosis of human colorectal carcinoma. *Cancer Res* 2000;60:3043-3050
- 12 Hernandez S, Bessa X, Bea S, Hernandez L, Nadal A, Mallofre C, Muntane J, Castells A, Fernandez PL, Cardesa A, Campo E. Differential expression of cdc25 cell-cycle-activating phosphatases in human colorectal carcinoma. *Lab Invest* 2001;81:465-473
- 13 Lazo JS, Nemoto K, Pestell KE, Cooley K, Southwick EC, Mitchell DA, Furey W, Gussio R, Zaharevitz DW, Joo B, Wipf P. Identification of a potent and selective pharmacophore for Cdc25 dual specificity phosphatase inhibitors. *Mol Pharmacol* 2002;61:720-728
- 14 Lazo JS, Aslan DC, Southwick EC, Cooley KA, Ducruet AP, Joo B, Vogt A, Wipf P. Discovery and biological evaluation of a new family of potent inhibitors of the dual specificity protein phosphatase Cdc25. *J Med Chem* 2001;44:4042-4049
- 15 Sodeoka M, Sampe R, Kojima S, Baba Y, Usui T, Ueda K, Osada H. Synthesis of a tetronic acid library focused on inhibitors of tyrosine and dual-specificity protein phosphatases and its evaluation regarding VHR and cdc25B inhibition. *J Med Chem* 2001;44:3216-3222

科技论文写作高级研修班即将开办

由国家自然科学基金委员会科学基金杂志部主办,中国科学院上海生命科学信息中心协办的“第二期科技论文写作高级研修班”定于2004-07-12/17在北京和上海举行。

本次研修班的主讲人有来自英国牛津、剑桥等著名学府的华人学者、Nature 期刊的高级编辑、国家自然科学基金委员会的管理专家等,涉及的主题有科技论文写作的理论与实践、投稿注意事项、科技编辑技巧,以及如何撰写科学基金项目申请书等。

有关科技论文写作高级研修班招生的详细内容敬请查询相关网站: www.nsfc.gov.cn; 或 www.pub.nsfc.gov.cn

咨询电话: 010-62326893

(武长白、莫京)