

P34^{cdc2}、Cyclin B1 在大肠癌中的表达及意义

颜文娟, 邓长生

颜文娟, 邓长生, 武汉大学医学院消化内科 湖北省武汉市 430071
通讯作者: 颜文娟, 430071, 湖北省武汉市, 武汉大学医学院消化内科.
whywj2005@163.com
电话: 027-87330224
收稿日期: 2005-01-06 接受日期: 2005-02-26

摘要

目的: 研究 p34^{cdc2}、细胞周期素 B1(cyclin B1)在大肠癌组织中的表达, 并探讨其与大肠癌发生、发展的关系。

方法: 应用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶法检测 p34^{cdc2}、cyclin B1 在 64 例大肠腺癌组织及 10 例正常对照大肠组织中的表达情况。

结果: 64 例大肠癌组织中 p34^{cdc2}、cyclin B1 表达阳性率分别为 68.75% 和 82.81%, 定位于细胞质中, 呈棕黄色或棕褐色。10 例正常对照大肠组织中 p34^{cdc2}、cyclin B1 部分为弱阳性及中度阳性表达。病例组与对照组比较差异均有显著性 ($P<0.05$)。cyclin B1 与 p34^{cdc2} 的表达呈正相关, 相关系数为 0.586。p34^{cdc2} 和 cyclin B1 在大肠癌组织中的表达在有淋巴结和远隔器官转移组与没有淋巴结和远隔器官转移组间其差异有显著性 ($P<0.05$); 而在根据患者年龄、性别、肿瘤的原发部位、分化程度等进行分组的组间其表达的差异没有显著性。在大肠癌组织中 PCNA 阳性细胞呈弥漫分布, 呈明显异质性, 阳性率为 73.44%。在正常大肠组织中见 PCNA 阴性或少量阳性表达。经统计学分析在大肠癌组织中 PCNA 的表达与 p34^{cdc2} 和 cyclin B1 均没有相关性。

结论: p34^{cdc2}、cyclin B1 在大肠癌中呈过表达, 可作为反映大肠癌淋巴结转移和远隔器官转移的指标之一。

颜文娟, 邓长生. P34^{cdc2}、Cyclin B1 在大肠癌中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2005;13(10):1228-1230
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1228.asp>

0 引言

细胞周期复杂的顺序过程是细胞周期调控因子在细胞周期检测点的控制下, 相互作用忠实而有顺序地启动和完成细胞周期事件的过程。对细胞周期调控机制的研究是研究癌变机制的重要内容之一。绝大多数恶性肿瘤细胞都存在遗传物质和(或)细胞周期检验点的异常, 将肿瘤细胞的遗传不稳定性固定于肿瘤细胞中, 促进肿瘤的发生发展。G₂/M 期是与细胞恶变有关的重要细胞周期时相, 本文对 G₂/M 期调控因子 p34^{cdc2} 及细胞周期素 B1(cyclin B1) 在大肠癌中的表达及意义进行了研究, 以期进一步阐明大肠癌发病机制, 并为其临床治疗另辟新径。

1 材料和方法

1.1 研究对象 收集我院 2000-2002 年间经手术证实的 64 例大肠癌, 其中男性 40 例, 女性 24 例。年龄 24-76 岁, 平均 53.6 ± 10.8 岁。术前均未行放、化疗。Duke's 分期中 A 期 10 例, B 期 26 例, C 期 17 例, D 期 11 例。10 例正常的大肠黏膜组织均来自于肠镜活检标本。

1.2 主要试剂和来源 即用型鼠抗人 p34^{cdc2} 单克隆抗体购自武汉博士德公司; 鼠抗人 cyclin B1、PCNA 单克隆抗体均购自福州迈新公司; S-P 试剂盒购自北京中山公司。

1.3 方法 全部新鲜标本 24 h 内经 10% 甲醛固定, 常规石蜡包埋。大肠癌蜡块行 4 μ m 厚度的连续切片四张, 贴于经多聚赖氨酸处理的玻片上, 70°C 烘烤 2 h, 1 张行 HE 染色复查诊断, 3 张行免疫组化研究。染色方法按链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物 (SP 法) 试剂盒说明书步骤进行, 石蜡切片常规二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化, 30 ml/L H₂O₂ 10 min; 微波预处理 15 min (微波抗原修复液为 pH6.0 柠檬酸缓冲液), PBS 洗 2 min, 3 次; 10% 山羊血清 15 min; 加一抗 4°C 过夜, PBS 洗 2 min, 3 次; 生物素标记二抗 10 min, PBS 洗 2 min, 3 次; 加 SP 15 min, PBS 洗 2 min, 3 次; DAB 显色 2-5 min; 自来水充分冲洗, 苏木精复染、脱水、透明, 中性树胶封固。以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 用已知阳性切片作阳性对照。

1.4 结果判断

1.4.1 p34^{cdc2}和cyclinB1 光镜下每张切片随机选取高倍视野记数 500 个细胞。按阳性细胞百分数记分, 阳性细胞数 = 5% 为 0 分, 阳性细胞数 = 6-25% 为 1 分, 阳性细胞数 = 26-50% 为 2 分, 阳性细胞数 = 50-75% 为 3 分, 阳性细胞数 > 75% 为 4 分; 按染色强度记分, 无着色记 0 分, 淡棕黄色记 1 分, 棕褐色记 2 分。两项合并, 得 0-2 分为阴性 (-), 3-4 分为弱阳性 (+), 5-6 分为阳性 (++), 7-8 分为强阳性 (+++)。

1.4.2 PCNA 高倍镜下记数 1 000 个细胞中核染色呈棕黄色的阳性细胞百分数, 阳性细胞数 = 10% 为阴性, >10% 为阳性。

统计学处理 用 SPSS 统计软件进行 χ^2 检验和 Spearman 等级相关分析法进行统计学分析, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 p34^{cdc2}和cyclinB1以及PCNA在大肠癌组织和正常肠组织中的染色定位. p34^{cdc2} 和 cyclin B1 在大肠癌组织癌细胞中和正常肠组织中定位于细胞质中, 呈棕黄色或

棕褐色, 细胞核无着色. PCNA 在正常大肠组织中未见表达, 而在大肠癌组织中 PCNA 阳性物质主要集中于细胞核, 阳性细胞呈散在、灶状或弥漫分布, 且有明显异质性, 阳性率为 73.44%.

2.2 p34^{cdc2}和cyclinB1在大肠癌组织和正常肠组织中的表达结果(表1) p34^{cdc2}和cyclinB1在大肠癌组织中表达阳性率分别是 68.75% 和 82.81%, 正常肠组织中的表达阳性率分别是 10% 和 30%, 差异有显著性 ($P<0.05$), 即 p34^{cdc2} 和 cyclinB1 在大肠癌组织中呈过表达. 大肠癌组织中 cyclin B1 和 p34^{cdc2} 的表达呈正相关 ($P<0.05$), 相关系数为 0.586.

表1 p34^{cdc2} 和 cyclin B1 的表达

	p34 ^{cdc2} 表达情况				cyclin B1 表达情况			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
正常组织	9	1	0	0	7	1	2	0
大肠癌组织	20	14	17	13	11	19	18	16

2.3 p34^{cdc2}和cyclinB1在大肠癌组织中的表达与临床病理特征的关系(表2) 经统计学分析, p34^{cdc2} 和 cyclinB1 在大肠癌组织中的表达在有淋巴结和远隔器官转移组与没有淋巴结和远隔器官转移组间其差异有显著性 ($P<0.05$); 而在根据患者年龄、性别、肿瘤的原发部位、分化程度等进行分组的组间其表达的差异没有显著性.

2.4 p34^{cdc2}和cyclinB1在大肠癌组织中的表达与PCNA的关系 在 47 例 PCNA 表达阳性者中, p34^{cdc2} 表达阳性为

35 例, 在 17 例 PCNA 表达阴性者中, p34^{cdc2} 表达阴性为 8 例, 组间差异没有显著性 ($P>0.05$), 提示在大肠癌组织中 p34^{cdc2} 的表达与 PCNA 的表达没有相关性; 在 47 例 PCNA 表达阳性者中, cyclinB1 表达阳性为 39 例, 在 17 例 PCNA 表达阴性者中, cyclinB1 表达阴性为 3 例, 组间差异没有显著性 ($P>0.05$), 提示在大肠癌组织中 cyclinB1 的表达与 PCNA 的表达没有相关性.

3 讨论

肿瘤的发生, 实质上是一种细胞周期调控上的失控、异常产生了多种生长因子, 信号传导途径失常, 致使细胞呈失控样增长, 这个过程产生的生长因子、激素、各种蛋白及遗传物质 DNA 代谢, 均通过细胞周期来实现和调控. 以分子生物学为基础的细胞周期调控机制主要是: 细胞周期蛋白、周期蛋白依赖性激酶、周期蛋白依赖性激酶抑制物. 以周期蛋白依赖性激酶为中心的系统中的任何一个环节出现问题, 均会引起细胞周期出现异常, 最终导致肿瘤发生. 由 p34^{cdc2} 和 cyclin B1 参与的细胞周期和基因转录的合理调控是保持细胞进行正常增殖和分化的必要条件, 这一调节过程的异常势必将导致细胞周期紊乱, 且与恶性肿瘤的发生、发展有着密切联系^[1]. 一些学者在乳腺癌、胃癌、非小细胞肺癌的研究中发现, 普遍存在 G₂/M 期调控因子 cyclin B1 和 p34^{cdc2} 表达的异常.

我们应用免疫组化的方法检测 p34^{cdc2} 和 cyclin B1 在人大肠癌及正常肠黏膜中的表达, 发现在大肠癌中 p34^{cdc2} 的阳性率为 68.75%, cyclin B1 的阳性率为

表2 大肠癌组织中 p34^{cdc2} 和 cyclin B1 的表达与临床病理特征的关系

n	p34 ^{cdc2}				cyclin B1			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
年龄								
≤60	39	14	8	8	9	6	10	11
>60	25	6	6	9	4	5	9	7
性别								
男	40	12	9	11	8	5	11	12
女	24	8	5	6	5	6	8	6
原发部位								
直肠	41	13	8	11	9	7	11	12
结肠	23	7	6	6	4	4	8	6
分化								
高	14	6	4	2	2	4	4	3
中	37	10	6	12	9	5	10	12
低	13	4	4	3	2	2	5	3
淋巴结和远处转移 ^a								
有	28	5	12	10	1	2	11	13
无	36	15	2	7	12	9	8	5

^a $P<0.05$.

82.81%，同时 p34^{cdc2} 和 cyclin B1 在大肠癌组织中的表达均明显高于正常大肠黏膜组织，且过表达的 cyclinB1 与 p34^{cdc2} 呈正相关 ($P < 0.05$)，相关系数为 0.586，这一结果与国外文献^[2]报道基本相似。多数学者支持 p34^{cdc2} 的总体分布在间期表达于细胞质中，在分裂前期迁入细胞核中。在正常细胞周期的 G₂/M 阶段，p34^{cdc2} 和 cyclin B1 分别是经典的 CDK (细胞周期素依赖性激酶) 和 cyclin。G₂/M 期过渡的关键调节者是 p34^{cdc2}。过表达的 p34^{cdc2} 需要与周期蛋白连接和正确的磷酸化而显示活性。大肠癌恶性细胞进入 S 和 G₂ 期时，cyclin B1 被合成并累积达到最大浓度。p34^{cdc2} 和 cyclinB1 形成 MPF，在 MPF 中 p34^{cdc2} 起催化作用，cyclin B1 起调节作用。在 cyclin B1 诱导下，p34^{cdc2} 的激活酶-CAK (主要由 CDK7 和 Cyclin H 组成) 将其磷酸化，p34^{cdc2} 又经历了有丝氨酸/苏氨酸活性的 Wee1/Mik1 的失活的磷酸化。在 G₂/M 期过渡时，磷酸化酶 CDC25C 去除使 p34^{cdc2} 失活的磷酸化，形成有蛋白激酶活性的 p34^{cdc2}。激活的 p34^{cdc2}/cyclin B1 能磷酸化 CDC25C 来促进 p34^{cdc2}/cyclin B1 的磷酸化，进而形成了 cyclinB1/p34^{cdc2}/CDC25c 自动连锁反馈环，导致 MPF 在激酶活性上突然呈爆发式增加，继而导致癌细胞过度增殖。但在本次实验中经统计学相关分析发现 PCNA 的表达与 p34^{cdc2} 以及 cyclin B1 没有平行的相关关系，这可能是由于此次实验例数较少，同时也可能是由于 p34^{cdc2} 不仅导致肿瘤细胞的过度增殖，也可能通过 PCNA 参与肿瘤细胞的凋亡。Deng *et al* 就发现缺乏 ATM 基因的肿瘤细胞系经射线照射后，ATM 基因阻断了 CDC25 蛋白的反应性减少，持续活化的 p34^{cdc2} 和 CDK2 顺次激发了细胞凋亡^[3]。Ouonnor *et al* 也发现 p34^{cdc2} 通过与抑制凋亡基因 Survivin 相互作用参与细胞凋亡^[4]。

浸润、转移是恶性肿瘤演进的重要特征，也是大肠癌患者不良预后的主要原因，但迄今尚无理想的方法进行早期诊断。本实验通过对过表达的 p34^{cdc2} 和 cyclin B1 与大肠癌临床病理特征的研究，发现 p34^{cdc2} 和 cyclinB1 在大肠癌组织中的表达在有淋巴结和远隔器官转移组与没有淋巴结和远隔器官转移组间其差异有显著性 ($P < 0.05$)；而在根据患者年龄、性别、肿瘤的原发部位、分化程度等进行分组的组间其表达的差异没有显著性，提示过表达的 p34^{cdc2} 和 cyclin B1 可以作为提示淋巴结转移和远隔器官转移的参考指标。Nozoe *et al* 认为 p34^{cdc2} 是大肠癌淋巴结转移的独立相关因子^[5]。刘标 *et al* 的研究表明鼻咽癌颈部淋巴结转移存在 p34^{cdc2} 和 cyclin B1 的过表

达^[6]。也有学者发现 cyclin B1 的过表达提示了食管鳞状细胞癌较差的预后。另一方面 Yasuda *et al* 发现 cyclin B1 的表达与胃癌临床分期和广泛淋巴结浸润呈负相关^[7]，Kourea *et al* 也未发现 p34^{cdc2} 的表达与乳腺癌淋巴结转移有相关关系^[8]。可见 p34^{cdc2} 和 cyclin B1 的表达与恶性肿瘤包括大肠癌的临床病理特征的关系尚不明确，如本实验未得出 p34^{cdc2} 与恶性肿瘤分化有关的结论，因而 p34^{cdc2} 和 cyclin B1 如何应用于指导临床诊断还有待进一步研究。

细胞的增殖、凋亡、分化、衰老均是细胞周期依赖性的，因此，选择能同时破坏细胞并引起凋亡的药物以调节细胞周期为其策略将是今后抗癌治疗的新途径^[9]。G₂/M 期阻滞是细胞在染色体分离前对损伤的 DNA 进行必要的修复时期，可减少染色体畸变，避免有丝分裂的失败，并有可能增加细胞对 DNA 损伤剂的耐受。因此，设计针对细胞 G₂/M 期检测点的药物，可能为改善癌肿治疗的策略提供新思路。

4 参考文献

- Solorzano L, Rieber MS, Rieber M. Lower cyclin H and cyclin-dependent kinase-activating kinase activity in cell cycle arrest induced by lack of adhesion to substratum. *Cancer Res* 2000; 60:7114-7118
- Seong J, Chung EJ, Kim H, Kim GE, Kim NK, Sohn SK, Min JS, Suh CO. Assessment of biomarkers in paired primary and recurrent colorectal adenocarcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;45:1167-1173
- Deng J, Zhou J, Meng F, Li D, Sun H. Failure to inactivate CDK activity is responsible for the enhanced apoptotic response in U937 cells mediated by silencing ATM gene. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2002;22:193-196
- O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Zhang H, Villa A, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13103-13107
- Nozoe T, Honda M, Inutsuka S, Korenaga D. P34cdc2 expression is an independent indicator for lymph node metastasis in colorectal carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:498-502
- 刘标, 陈小毅, 苟新敏. 鼻咽良恶性病变中 EBV-LMP1, Cyclin B1, p34cdc2 和 Survivin 的表达及意义. *广东医学院学报* 2004;22:10-12
- Yasuda M, Takesue F, Inutsuka S, Honda M, Nozoe T, Korenaga D. Overexpression of cyclin B1 in gastric cancer and its clinicopathological significance: an immunohistological study. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:412-416
- Kourea HP, Koutras AK, Scopa CD, Marangos MN, Tzoracoeletherakis E, Koukouras D, Kalofonos HP. Expression of the cell cycle regulatory protein p34cdc2, p21waf1, and p53 in node negative invasive ductal breast carcinoma. *Mol Pathol* 2003;56:328-335
- Blagoslunny MV, Pardee AB. Exploiting cancer cell cycling for selective protection of normal cells. *Cancer Res* 2001;61:4301-4305