

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.17.009

文章编号: 1005-8982(2017)17-0045-05

CCNB2 过表达对非小细胞肺癌 不良预后的预测效果研究*

王杰, 陈大兴, 郭宁, 陶立轩

(湖北省武汉市普仁医院 心胸外科, 湖北 武汉 430081)

摘要:目的 探讨细胞周期蛋白 B2(CCNB2)在非小细胞肺癌(NSCLC)组织中的表达及对预后的影响。**方法** 实时荧光定量聚合酶链反应和免疫组织化学法测定 CCNB2 mRNA 和蛋白在 NSCLC 肿瘤组织及临近非肿瘤组织中的表达水平,分析其与患者临床病理特征的关系。**结果** 肿瘤组织中 CCNB2 mRNA 和蛋白表达量高于非肿瘤组织($P < 0.05$),且其表达水平与肿瘤分化等级、直径、淋巴结转移、远处转移及临床分期呈正相关($P < 0.05$),同时 CCNB2 高表达是患者生存率预后不良的危险因素。**结论** 肿瘤组织中 CCNB2 高表达与 NSCLC 不良预后密切相关。

关键词: 非小细胞肺癌;细胞周期蛋白 B2;生物标志物;预后

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Cyclin B2 overexpression is a poor prognostic biomarker in NSCLC patients*

Jie Wang, Da-xing Chen, Ning Guo, Li-xuan Tao

(Department of Cardiothoracic Surgery, Wuhan Puren Hospital, Wuhan, Hubei 430081, China)

Abstract: Objective To identify the role of cyclin B2 (CCNB2) in patients with NSCLC. **Methods** CCNB2 mRNA and protein expressions were detected in NSCLC and paracancerous tissues. Immunohistochemistry was used to detect the expression of CCNB2 protein in 186 NSCLC patients. The relationships between the expression of CCNB2 and clinicopathological features were analyzed. **Results** In this study, the expressions of CCNB2 mRNA and protein in the tumor tissues were higher than those in the non-tumor tissues ($P < 0.05$). The expression levels of CCNB2 mRNA and protein were positively correlated with tumor differentiation grade, tumor diameter, lymph node metastasis, distant metastasis and clinical stage ($P < 0.05$), while CCNB2 overexpression was a risk factor for low survival rate and poor prognosis of the patients. **Conclusions** The overexpression of CCNB2 in NSCLC is closely related to disease progression and poor prognosis, and CCNB2 could be served as a marker of prognosis in patients with NSCLC.

Keywords: CCNB2; NSCLC; biomarker; prognosis

肺癌是病死率极高的一种恶性肿瘤^[1-2],非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)约占全部肺癌的 80%~85%,发病率高^[3]。临床上大多数 NSCLC 患者确诊时已为晚期,5 年生存率仅为 16%^[4-5],因此成为临床面临的一个难题,也为相关预后研究提出挑

战。细胞周期蛋白 B2(cyclin B2,CCNB2)在不同部位和细胞周期中发挥作用^[6-8]。近年来有研究提示,其在多种人类肿瘤组织和外周血中表达增高^[9-13],且与肿瘤临床分期和转移状态相关^[14]。本研究就 CCNB2 在 NSCLC 组织中的表达及其与预后的关系进行分析。

收稿日期:2016-05-06

* 基金项目:湖北省武汉市科技基金(No:WX12D26)

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2008 年 1 月 -2011 年 12 月湖北省武汉市普仁医院肿瘤科收治的 NSCLC 患者 186 例,均为临床原发灶,入组前未接受任何治疗。收集同期体检健康对照组 31 例。将收集的 NSCLC 样本和邻近非肿瘤组织样本共 217 例石蜡包埋,液氮保存。诊断和分期标准参照美国癌症联合委员会制定的第 7 版肿瘤分类标准^[6];术后随访 5 ~ 60 个月。本研究通过本院伦理委员会审批。

1.2 核糖核酸提取与实时荧光定量聚合酶链反应

提取组织样本总 RNA,使用 Trizol(大连宝生生物工程公司有限公司),通过逆转录试剂盒(大连宝生生物工程公司有限公司)进行逆转录,每个样本重复 3 个/孔,以 β -actin 基因作为内参,取 5 μ l 血清与 5 μ l 准备液(2.5% Tween 20,50 mmol/L 三羟甲基甲烷和 1 mmol 乙二胺四乙酸二钠混合,加入 10 μ l 逆转录反应体系。逆转录反应体系含 2 μ l 10 \times 逆转录缓冲液、0.8 μ l 25 \times 脱氧核糖核苷三磷酸混合液(100 nmol/L)、2 μ l 10 \times 随机引物、1 μ l Multi Scribe™ Reverse Transcriptase 试剂、1 μ l RNA 抑制剂和 3.2 μ l 焦碳酸二乙酯水。反应条件:25 $^{\circ}$ C 预变性,10 min,37 $^{\circ}$ C 变性 120 min,85 $^{\circ}$ C 退火 5 min。反应液 140 000 r/min 离心 5 min,取上清液,实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction,qRT-PCR)引物序列见表 1。CCNB2 基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行计算。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列
CCNB2	正向:5'-CACAGGATACACAGAGAATG-3'
	反向:5'-CTTGATGGCGATGAATTTAG-3'
β -actin	正向:5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3'
	反向:5'-CCAGAGCGTACAGGGATAG-3'

1.3 免疫组织化学染色

组织样本石蜡包埋后切片,分别用二甲苯和无水乙醇脱石蜡和水,在柠檬酸钠溶液煮沸 10 min 介导抗原复性。3%过氧化氢和 1%牛血清白蛋白封闭内源性过氧化物酶活性和非特异性位点,采用 1:200 稀释的 CCNB2 一抗(英国 Abcam 公司)孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜。磷酸盐缓冲溶液洗涤后加入生物素标记的二抗及亲和素标记的辣根过氧化物酶(horseradish per-

oxidase,HRP)复合物,每步均室温孵育 20 min,加入发光液后显色。染色结果由 2 位病理学家参照相关标准观察判断^[6],总分 0 ~ 7 分,0 ~ 5 分判为低表达,6 和 7 分为高表达。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 t 检验,计数资料以率(%)表示,用 χ^2 检验,Kaplan-Meier 法制作生存曲线,比较用 Log-rank χ^2 检验,影响因素的分析用 Cox 比例风险模型, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 组织样本中 CCNB2 的表达

20 对 NSCLC 及邻近非肿瘤组织 CCNB2 mRNA 表达水平比较,经 t 检验,差异有统计学意义($t = 45.961, P = 0.001$),NSCLC 样本中 CCNB2 mRNA 表达量为邻近非肿瘤组织的 3.02 倍(见图 1)。186 例石蜡包埋 NSCLC 样本中 62.4%(116/186)为 CCNB2 高表达,经 χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2 = 12.089, P = 0.001$),CCNB2 高表达率在 NSCLC 样本中高于正常组(见图 2)。

2.2 不同特征 CCNB2 高表达率的比较

不同特征 CCNB2 高表达率的比较,经 χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2 = 19.541, P = 0.000$),CCNB2 高表达与肿瘤分化等级增加有关,CCNB2 高表达率越低,肿瘤分化等级越高。CCNB2 高表达与肿瘤大小的增加、淋巴结转移,以及远处转移和临床分期密切相关($P < 0.05$),提示肿瘤越大、淋巴结转移越严重,以及出现远处转移和临床症状越严重,则肿瘤分化等级越高。CCNB2 高表达与患者性别、年龄、吸烟史及病理学分化类型无关。见表 2。

2.3 CCNB2 高表达与 NSCLC 患者疾病预后关系

CCNB2 低表达 NSCLC 患者疾病预后较好,经 Log-rank χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2 = 33.251, P = 0.000$),CCNB2 表达与 NSCLC 患者疾病总生存率

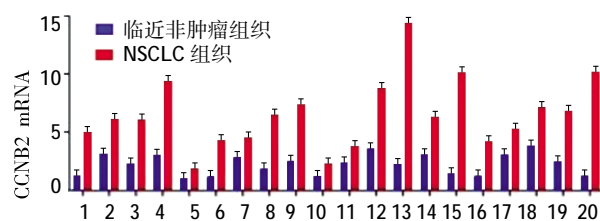
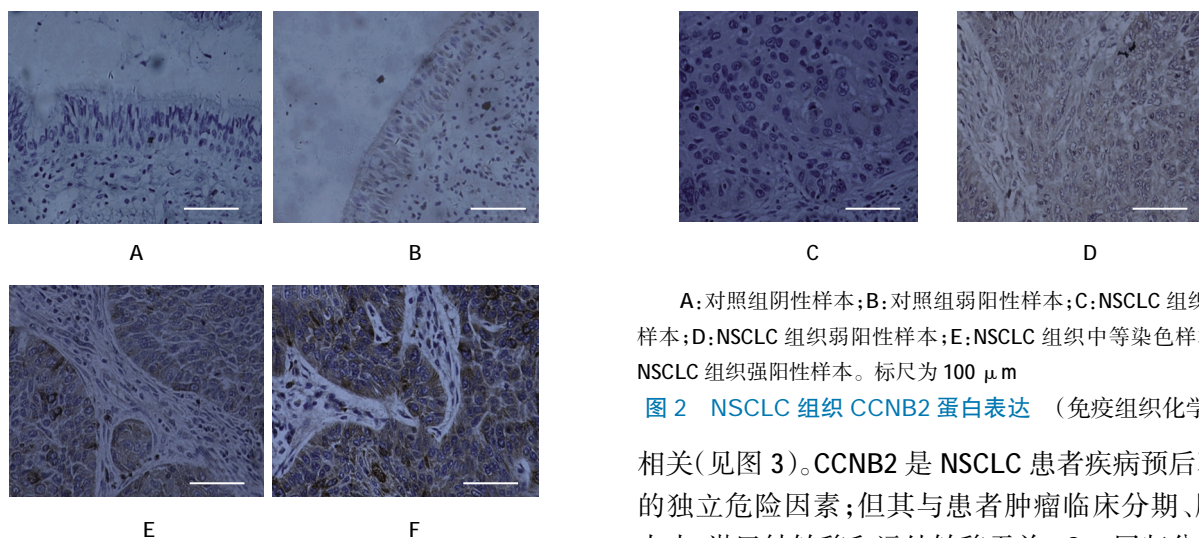


图 1 20 对 NSCLC 和邻近非肿瘤组织 CCNB2 mRNA 表达的比较



A:对照组阴性样本;B:对照组弱阳性样本;C: NSCLC 组织阴性样本;D: NSCLC 组织弱阳性样本;E: NSCLC 组织中中等染色样本;F: NSCLC 组织强阳性样本。标尺为 100 μm

图 2 NSCLC 组织 CCNB2 蛋白表达 (免疫组织化学法)

相关(见图 3)。CCNB2 是 NSCLC 患者疾病预后不良的独立危险因素;但其与患者肿瘤临床分期、肿瘤大小、淋巴结转移和远处转移无关。Cox 回归分析提

表 2 不同特征 CCNB2 高表达率的比较

临床病理特征	例数	CCNB2 高表达 例(%)	χ^2 值	P 值
性别				
女性	76	45(59.2)	0.545	0.460
男性	110	71(64.5)		
年龄				
<50 岁	77	52(67.5)	1.992	0.158
≥50 岁	109	64(58.7)		
吸烟史				
无	106	67(63.2)	0.074	0.785
有	80	49(61.3)		
病理学分类				
鳞状细胞癌	85	52(61.2)	0.094	0.759
腺癌	101	64(63.4)		
分化等级				
高分化	38	12(31.6)		
临床病理特征				
中等分化	59	40(67.8)	19.541	0.000
低分化	89	64(71.9)		
临床分期				
I、II	69	31(44.9)	14.212	0.000
III、IV	117	85(72.6)		
肿瘤直径				
T ₁ 、T ₂	115	63(54.8)	7.381	0.007
T ₃ 、T ₄	71	53(74.6)		
淋巴结转移				
N ₀ 、N ₁	86	37(43.0)	25.498	0.000
N ₂ 、N ₃	100	79(79.0)		
远处转移				
M ₀	171	101(59.1)	9.846	0.002
M ₁	15	15(100.0)		

表 3 NSCLC 患者总生存率的单一和多重变量分析

临床病理特征	单一变量分析				多重变量分析			
	P 值	HR	95%CI		P 值	HR	95%CI	
			下限	上限			下限	上限
性别	0.052	1.482	0.997	2.203	0.899	0.973	0.642	1.477
年龄	0.954	0.989	0.680	1.438	0.559	1.129	0.751	1.699
吸烟史	0.589	0.900	0.615	1.317	0.860	0.963	0.631	1.470
病理学分类	0.987	1.003	0.690	1.458	0.398	0.839	0.559	1.260
分化等级	0.281	1.138	0.900	1.440	0.366	0.885	0.680	1.153
临床分期	0.000	4.214	2.680	6.624	0.098	1.830	0.894	3.744
肿瘤大小	0.000	2.429	1.664	3.545	0.003	1.867	1.229	2.837
淋巴结转移	0.000	4.465	2.925	6.816	0.025	2.158	1.101	4.230
远处转移	0.000	7.964	4.204	15.085	0.003	2.952	1.449	6.013
CCNB2	0.000	3.140	2.037	4.841	0.001	2.272	1.398	3.691

示,CCNB2 蛋白高表达是 NSCLC 患者疾病预后不良的危险因素(HR=2.272, $P=0.001$)。见表 3 和图 3。

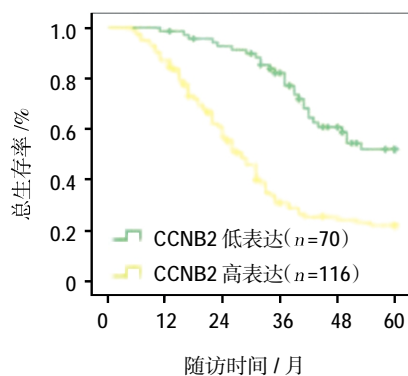


图 3 CCNB2 不同表达患者生存率曲线

3 讨论

细胞周期蛋白 B2 是 B 类细胞周期蛋白家族的成员,在分裂间期 CCNB1 会持续在细胞核和细胞质间穿梭,在分裂间期末 CCNB1 快速进入细胞核并与有丝分裂体结合^[16-17]。与之相反,在分裂间期和有丝分裂期 CCNB2 会穿出细胞核,逐渐靠近高尔基体^[18]。尽管两者在细胞内定位不同,但是 CCNB1 和 CCNB2 共同完成促发细胞进入 G₂/M 期中的重要功能^[19]。此外,CCNB1 和 CCNB2 在氨基末端结构上有一定差异,其同源率为 57%^[20]。目前已经比较明确 CCNB1 在 NSCLC 中的作用,但关于 CCNB2 还在摸索中, YOSHIDA 等^[21]研究表明,CCNB2 与肿瘤细胞分化、血管侵入、Ki-67 增长指数及增殖细胞核抗原标记指数密切相关。研究提示,CCNB1 过表达是 NSCLC 患者不良预后的独立危险因素^[22-23]。然而 CCNB2 在 NSCLC 中的表达情况及作用研究尚不多。

基因芯片研究提示,胃癌患者的胃黏膜组织中 CCNB2 存在过表达状态^[13]。此外,CCNB2 是 HPV16 阳性宫颈癌患者表达上调的 6 种基因之一^[24]。本研究结果提示,与非肿瘤肺脏组织相比,NSCLC 样本中 CCNB2 mRNA 和蛋白高表达。进一步研究 CCNB2 在 NSCLC 组织中表达的临床意义,本研究发现 CCNB2 表达与 NSCLC 患者肿瘤分化程度、淋巴结转移、远处转移及临床分期呈正相关。本研究结果证实,CCNB2 过表达可以通过促进肿瘤细胞生长和加速肿瘤细胞转移,导致 NSCLC 肿瘤发展。与 TAKASHIMA 等^[25]报道的结果近似。

国内外不少研究均提示,在多种人类肿瘤组织中检测到 CCNB2 过表达,且与疾病预后不良密切相

关。SHUBBAR 等^[10]研究发现,CCNB2 过表达与乳腺癌患者 DSS 预后有关,是其独立预后标志物。此外, TAKASHIMA 等^[25]也报道,肺腺癌患者肿瘤组织中 CCNB2 mRNA 过表达,且其表达与疾病总生存率密切相关。为进一步探讨 CCNB2 表达在 NSCLC 中的预后价值,本研究探讨 CCNB2 表达与患者总生存率的关系,结果证实两者呈负相关,多重变量分析提示,CCNB2 过表达是 NSCLC 患者疾病预后不良的独立标志物。总之,NSCLC 组织中 CCNB2 蛋白表达升高,且与肿瘤的临床分期和预后不良密切相关。

参 考 文 献:

- [1] KANEMATSU T, HANIBUCHI M, TOMIMOTO H, et al. Epidemiological and clinical features of lung cancer patients from 1999 to 2009 in Tokushima Prefecture of Japan [J]. Journal of Medical Investigation Jmi, 2010, 57(3/4): 326-333.
- [2] AKGÜN K M, CROTHERS K, PISANI M. Epidemiology and management of common pulmonary diseases in older persons [J]. Journals of Gerontology, 2012, 67(3): 276-291.
- [3] KAMANGAR F, DORES G M, ANDERSON W F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world [J]. Journal of the American Society of Clinical Oncology, 2006, 24(14): 2137-2150.
- [4] SORIA J C, MASSARD C, LE C T. Should progression-free survival be the primary measure of efficacy for advanced NSCLC therapy [J]. Annals of Oncology, 2010, 21(12): 2324-2332.
- [5] CHU Z, YANG Z, SHAO H, et al. Small peripheral lung adenocarcinoma: CT and histopathologic characteristics and prognostic implications [J]. Cancer Imaging, 2011, 11(1): 237-246.
- [6] VERMEULEN K, van BOCKSTAELE D R, BERNEMAN Z N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer [J]. Cell Proliferation, 2003, 36(3): 131-149.
- [7] PETRI E T, ERRICO A, ESCOBEDO L, et al. The crystal structure of human cyclin B [J]. Cell Cycle, 2007, 6(11): 1342-1349.
- [8] WU T, ZHANG X, HUANG X, et al. Regulation of cyclin B2 expression and cell cycle G₂/M transition by menin [J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(24): 18291-18300.
- [9] FERNANDEZ-RANVIER G G, WENG J, YE H R F, et al. Identification of biomarkers of adrenocortical carcinoma using genomewide gene expression profiling [J]. Archives of Surgery, 2008, 143(9): 841-846.
- [10] SHUBBAR E, KOVÁCS A, HAJIZADEH S, et al. Elevated cyclin B2 expression in invasive breast carcinoma is associated with unfavorable clinical outcome [J]. BMC Cancer, 2013, 13(1): 1-10.
- [11] PARK S H, YU G R, KIM W H, et al. NF- κ B-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.
- [12] DE-MARTINO I, VISIONE R, WIERINCKX A, et al. HMGA proteins up-regulate CCNB2 gene in mouse and human pituitary adenomas[J]. Cancer Research, 2009, 69(5): 1844-1850.
- [13] WANG D G, CHEN G, WEN X Y, et al. Identification of biomarkers for diagnosis of gastric cancer by bioinformatics[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp, 2015, 16(4): 1361-1365.
- [14] MO ML, CHEN Z, LI J, et al. Use of serum circulating CCNB2 in cancer surveillance [J]. International Journal of Biological Markers, 2010, 25(4): 236-242.
- [15] 方子文. 电视胸腔镜下解剖性肺段切除联合系统性淋巴结清扫在 I B 期老年高危非小细胞肺癌患者切除术后生存及预后因素的研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2016.
- [16] HAGTING A, JACKMAN M, SIMPSON K, et al. Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal[J]. Current Biology, 1999, 9(13): 680-689.
- [17] CLUTE P, PINES J. Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase[J]. Nature Cell Biology, 1999, 1(2): 82-87.
- [18] 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]. Embo Journal, 1995, 14(8): 1646-1654.
- [19] LIU J H, WEI S, BURNETTE P K, et al. Functional association of TGF-beta receptor II with cyclin B[J]. Oncogene, 1999, 18(1): 269-275.
- [20] BRANDEIS M, HUNT T. The proteolysis of mitotic cyclins in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase[J]. Embo Journal, 1996, 15(19): 5280-5289.
- [21] YOSHIDA T, TANAKA S, MOGI A, et al. The clinical significance of cyclin B1 and wee 1 expression in non-small-cell lung cancer[J]. Annals of Oncology, 2004, 15(2): 252-256.
- [22] SORIA J C, JANG S J, KHURI F R, et al. Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication[J]. Cancer Research, 2000, 60(15): 4000-4004.
- [23] COOPER W A, KOHONENCORISH M R, MCCAUGHAN B, et al. Expression and prognostic significance of cyclin B1 and cyclin A in non-small cell lung cancer[J]. Histopathology, 2009, 55(1): 28-36.
- [24] ESPINOSA A M, ALFARO A, ROMAN-BASAURE E, et al. Mitosis is a source of potential markers for screening and survival and therapeutic targets in cervical cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(2): 142.
- [25] 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]. Tumor Biology, 2014, 35(5): 4257-4265.

(童颖丹 编辑)