

CCNG2 在鼻咽癌中的表达及其临床意义

孙国贵¹, 崔大为², 程云杰³, 胡万宁¹

(1.唐山市人民医院, 河北 唐山 063000; 2.唐山市工人医院, 河北 唐山 063000;

3.河北医科大学第四医院, 河北 石家庄 050017)

摘要: [目的] 探讨细胞周期蛋白 G2(CCNG2) 在鼻咽癌中的表达及其意义。[方法] 采用免疫组织化学方法、Western Blot 检测 87 例鼻咽癌组织和 34 例正常鼻咽组织中 CCNG2 蛋白的表达情况。[结果] 免疫组织化学结果表明, CCNG2 蛋白在鼻咽癌组织及正常鼻咽组织中的表达阳性率分别为 37.9%、91.2%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Western Blot 结果表明, CCNG2 的蛋白在鼻咽癌组织的相对表达量较正常鼻咽组织明显降低, 差异亦具有统计学意义 ($P < 0.05$)。CCNG2 蛋白表达与鼻咽癌 T 分期、临床分期及分化程度有关 ($P < 0.05$)。[结论] 鼻咽癌组织中 CCNG2 蛋白表达明显减低, 且与鼻咽癌 T 分期、临床分期及肿瘤分化有关。

关键词: CCNG2; 鼻咽肿瘤; 预后; 肿瘤转移

中图分类号: R739.62 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)04-0316-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.04.B011

Expression of CCNG2 in Nasopharyngeal Cancer and Its Significance

SUN Guo-gui¹, CUI Da-wei², CHENG Yun-jie³, et al.

(1. Tangshan People's Hospital, Tangshan 063000, China; 2. Tangshan Works Hospital, Tangshan 063000, China; 3. The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of Cyclin G2(CCNG2) in nasopharyngeal carcinoma and its clinical significance. [Methods] Immunohistochemistry and Western Blot assays were used to analyze CCNG2 protein expression in 87 samples of nasopharyngeal cancer tissue and 34 samples of normal nasopharyngeal tissue. [Results] The positive rate of CCNG2 protein expression was significantly lower in nasopharyngeal cancer tissues than that in normal tissues ($P < 0.05$). The relative amount of CCNG2 protein in nasopharyngeal cancer tissues was significantly lower than that in normal tissues ($P < 0.05$). The expression of CCNG2 protein correlated to T stage, clinic stage and histological grade ($P < 0.05$). [Conclusion] CCNG2 expression is low in nasopharyngeal cancer and correlates to T stage, clinic stage and histological grade.

Subject words: CCNG2; nasopharyngeal neoplasms; prognosis; tumor metastasis

鼻咽癌是头颈部比较常见的恶性肿瘤之一, 目前其主要治疗手段为放射治疗, 而生物学治疗手段亟需提高。因此分析鼻咽癌的生物学特性, 探索其治疗的新途径成为临床关注的问题。近年研究发现细胞周期蛋白 G2 (Cyclin G2, CCNG2) 基因在某些肿瘤中表现出的生物学和遗传学特征具有肿瘤抑癌基因的特性, 由此推测 CCNG2 在肿瘤的形成和发展中具有

重要作用^[1]。我们采用免疫组织化学方法、Western Blot 法研究 CCNG2 在鼻咽癌中的表达情况, 以期今后的临床治疗找到新的基因靶点提供参考。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2005 年 1 月至 2008 年 12 月期间首诊的 87 例鼻咽癌患者的肿瘤组织标本, 其中 34 例于肿瘤组织及距肿瘤边缘 2cm 以上(镜下未见癌)的正

通讯作者: 孙国贵, 副主任医师, 博士; 唐山市人民医院放疗科, 河北省唐山市路南区胜利路 65 号 (063000); E-mail: guogui_sun2013@163.com

收稿日期: 2013-09-10; **修回日期:** 2013-10-18

常鼻咽组织取材。所有鼻咽癌组织经病理学证实均为鳞状细胞癌。其中男性 60 例, 女性 27 例, 年龄 31~67 岁, 中位年龄 52 岁。肿瘤浸润范围中 $T_{1,2}$ 32 例, $T_{3,4}$ 55 例; 淋巴结转移中 N_0 者 23 例, N_+ 者 64 例; 临床分期 I + II 期 27 例, III + IV 期 60 例; 高分化者 15 例, 中低分化者 72 例。所有患者术前均未经放、化疗, 标本均为术后立即取材, 于液氮中保存, 供免疫组织化学及 Western Blot 检测。

1.2 主要试剂

CCNG2 鼠抗人单克隆抗体 (Amcam Inc.), 免疫组织化学试剂盒 (北京中杉金桥生物技术公司)。

1.3 免疫组织化学

将 $4\mu\text{m}$ 石蜡切片脱蜡至水, 3%过氧化氢 10min 阻断内源性过氧化物酶, 胰酶修复 20min, 10%山羊血清室温封闭 20min, CCNG2 抗体 (1:100) 湿盒中 4°C 冰箱过夜, 滴加二抗、三抗室温湿盒内孵育各 20min, DAB 显色, 苏木精复染, 常规脱水, 封片。结果判定: 由两名病理科医生在未知患者临床资料的情况下采用双盲法进行计数。细胞计数在显微镜下, 每张切片上随机选择 5 个视野, 每个标本计数 3 张切片。CCNG2 表达以细胞阳性百分率及细胞染色强度得分之和进行判定^[2]。细胞阳性百分率分为 4 个等级: $\leq 5\%$ 计 0 分, $5\% \sim 25\%$ 计 1 分, $25\% \sim 50\%$ 计 2 分, $> 50\%$ 计 3 分; 细胞染色强度分数标准: 无染色记 0 分, 弱染色 (浅黄色) 计 1 分, 中等染色 (棕黄色) 计 2 分, 强染色 (黄褐色) 计 3 分。两项标准相加: 0 分为阴性 (-), 1~2 分为弱阳性 (+), 3~4 分为中等阳性 (++) , 5~6 分为强阳性 (+++) , +~+++ 为阳性。以 PBS

替代一抗作为阴性对照。

1.4 Western Blot 检测

提取鼻咽癌组织总蛋白。 4°C 12 000r/min 离心 20min, 取上清, -20°C 备用。BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度, 按每孔上样量 $50\mu\text{g}$ 进行 SDS-PAGE 电泳, 稳压冰浴电转至硝酸纤维素膜上, 5%脱脂牛奶封闭 2h, 一抗孵育 4°C 过夜 (CCNG2 1:1 000, β -actin 1:5 000), 羊抗鼠红外荧光标记二抗 (1:20 000), Odyssey 双色红外荧光扫描系统进行检测, 计算蛋白相对值=蛋白 A 值/ β -actin A 值。

1.5 统计学处理

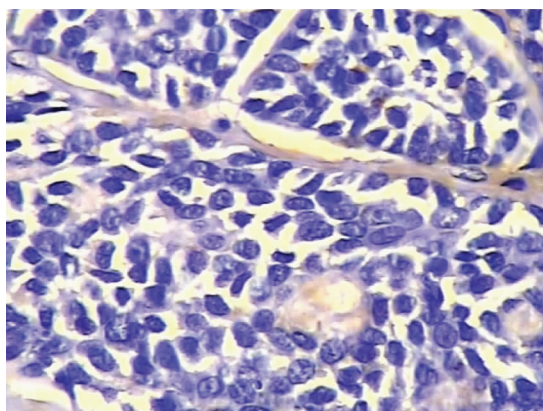
本实验结果均应用 SPSS16.0 统计软件处理数据。分类资料分析采用 χ^2 检验。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

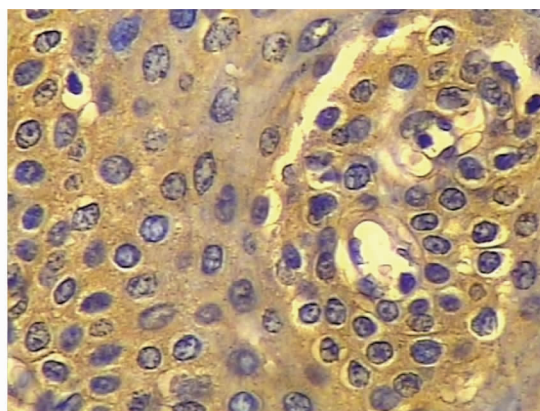
2.1 CCNG2 在鼻咽癌组织中的表达

免疫组织化学结果显示, CCNG2 阳性表达表现主要为染成浅黄色、棕黄色或黄褐色。CCNG2 在鼻咽癌组织、正常鼻咽组织的阳性表达率分别为 37.9% (33/87) 及 91.2% (31/34), 两组比较差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (Table 1, Figure 1)。

Western Blot 结果显示, CCNG2 蛋白在鼻咽癌组织的表达量为 0.339 ± 0.027 , 明显低于正常鼻咽组织 (0.862 ± 0.091), 两组比较差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (Figure 2)。



A: nasopharyngeal cancer tissue



B: normal nasopharyngeal tissue

Figure 1 Expression of CCNG2 in nasopharyngeal cancer tissue and normal nasopharyngeal tissue (x400)

Table 1 Expression of CCNG2 in nasopharyngeal cancer tissue and normal nasopharyngeal tissue

Groups	N	Expression of CCNG2 Protein				χ^2	P
		-	+	++	+++		
Normal tissue	34	3	7	11	13	32.099	0.000
Cancer tissue	87	54	14	11	8		

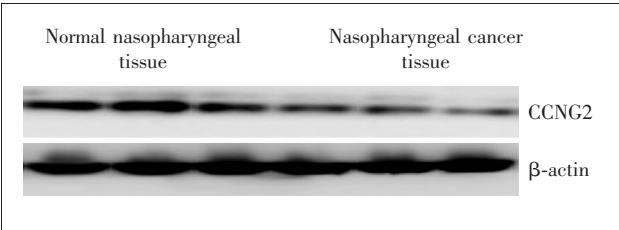


Figure 2 Expression of CCNG2 in nasopharyngeal cancer tissue and normal tissue by Western Blot assay

2.2 CCNG2 与鼻咽癌患者临床病理参数的关系

临床因素分析表明,CCNG2 蛋白表达在鼻咽癌不同浸润范围、临床分期及分化程度间表达差异具有统计学意义($P<0.05$),而与性别、年龄和淋巴结转移无关($P>0.05$)(Table 2)。

Table 2 Relationship between CCNG2 expression and clinic characteristics in nasopharyngeal cancer tissues

Factors	N	Expression of CCNG2 Protein			χ^2	P
		-	+	++		
Gender						
Male	60	43	23		0.040	0.841
Female	27	17	10			
Age (years)						
≤60	68	42	26		0.012	0.921
>60	19	12	7			
Tumor invasion						
T _{1,2}	32	15	17		4.963	0.026
T _{3,4}	55	39	16			
Lymph node metastasis						
N ₀	23	9	14		6.988	0.088
N ₊	64	45	19			
Clinic stage						
I ~ II	27	12	15		5.165	0.023
III ~ IV	60	42	18			
Histological grade						
I	15	5	10		6.357	0.012
II ~ III	72	49	23			

3 讨 论

CCNG2 与细胞周期蛋白 G1 同属于细胞周期蛋白 G 家族。该蛋白于 1996 年首次发现,其编码基因定

位于人染色体 4q21.1,虽然在 cDNA 碱基序列和蛋白氨基酸残基结构上与细胞周期蛋白 A 相似,但在生物学功能上明显不同于传统的细胞周期蛋白^[3]。CCNG2 负性调控细胞周期进程,CCNG2 基因表达受 DNA 损伤及其他生长抑制性信号均上调,与蛋白质磷酸脂酶 PP2A 形成复合体,抑制细胞周期依赖型激酶 CDK2,并与中心体结合,阻滞细胞周期进程,调节细胞增殖^[4]。目前研究发现,CCNG2 在口腔鳞癌^[4]、喉鳞状细胞癌^[5]、膀胱移行细胞癌^[6]及胃腺癌^[7]等肿瘤组织表达水平与相应正常组织相比较明显下调,提示 CCNG2 基因可能是一个重要的抑癌基因并且参与肿瘤的发生、发展。但是目前在鼻咽癌中 CCNG2 的研究仍然鲜有报道。研究 CCNG2 在鼻咽癌中的表达情况,并深入探讨 CCNG2 参与鼻咽癌发生发展、增殖恶变的分子生物学机制,有助于进一步全面明确鼻咽癌的恶性生物学行为及机理,并且有望为鼻咽癌的临床治疗和预后判断提供新的分子指标。

本研究首次用免疫组织化学及 Western Blot 技术对鼻咽癌组织及正常鼻咽组织进行定量检测,结果显示 CCNG2 蛋白在鼻咽癌组织中的表达水平均显著低于正常鼻咽组织,取得了一致结果。这一研究与 CCNG2 在胃癌^[8]、膀胱癌^[6]、口腔鳞癌^[4]等组织中的表达水平明显低于其正常组织的结果一致。本组结果的单因素分析也显示,CCNG2 蛋白的表达水平与鼻咽癌 T 分期、临床分期及肿瘤分化有关。国内作者研究发现,CCNG2 在无淋巴结转移或高分化的喉癌组织中表达较高,而在有淋巴结转移或病理低分化的喉癌中表达下降^[9]。此结果提示 CCNG2 表达水平可能与鼻咽癌的发生发展有关,可能起潜在的抑癌作用,但表达降低机制的研究尚不十分明确。

本研究结果提示,鼻咽癌组织中 CCNG2 蛋白的表达明显降低,且与鼻咽癌 T 分期、临床分期及肿瘤分化有关。然而,细胞癌变为一个纷繁复杂的综合过程,CCNG2 涉及癌变的信号转导机制尚需进一步明确。

参考文献:

[1] Ahmed S,Al-Saigh S,Matthews J. FOXA1 is essential for aryl hydrocarbon receptor-dependent regulation of cyclin G2 [J]. Mol Cancer Res,2012,10(5):636-648.
[2] Kim Y,Shintani S,Kohno Y,et al. Cyclin G2 dysregula-

- tion in human oral cancer[J]. Cancer Res, 2004, 64(24): 8980-8986.
- [3] Bates S, Rowan S, Vousden KH. Characterization of human cyclin G1 and G2: DNA damage inducible genes [J]. Oncogene, 1996, 13(5): 1103-1109.
- [4] Horne MC, Goolsby GL, Donaldson KL, et al. Cyclin G1 and cyclin G2 comprise a new family of cyclins with contrasting cycle-regulated expression[J]. J Biol Chem, 1996, 271(11): 6050-6061.
- [5] Cui XF, Liu AJ, Xu ZM. Expression of Cyclin G2 and its clinical significance in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. J Clin Oncol, 2009, 23(6): 277-279.
- [6] Shan G, Shan SG, Zhang XB. Expression and clinical significance of cyclin G1 and cyclin G2 in transitional cell carcinoma of bladder[J]. Chin J Histochemistry and Cytochemistry, 2009, 18(3): 268-272.
- [7] Choi MG, Noh JH, An JY, et al. Expression levels of cyclin G2, but not cyclin E, correlate with gastric progression [J]. J Surg Res, 2009, 157(2): 168-174.
- [8] Shi W, Yu KR, Wu GY, et al. Expression of CCNG2 in gastric carcinoma and its relationship with prognosis [J]. Chin J Cell Biol, 2011, 33(9): 994-997.
- [9] Song YL, Hu GH. Cyclin G2: correlation with head and neck neoplasms[J]. Int J Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 2006, 30(1): 8-11.

浙江省放射肿瘤学重点实验室 2014 春季研讨会暨胸部肿瘤放射治疗新进展 国家级继续教育学习班/影像引导下的放射治疗在胸腹部肿瘤应用进展 国家级继续教育学习班在杭成功举行

2014 年 3 月 14~15 日,由浙江省肿瘤医院和浙江省放射肿瘤学重点实验室主办,肿瘤学杂志社协办的浙江省放射肿瘤学重点实验室 2014 春季研讨会暨胸部肿瘤放射治疗新进展国家级继续教育学习班/影像引导下的放射治疗在胸腹部肿瘤应用进展国家级继续教育学习班在美丽的西湖畔成功举行。

浙江省放射肿瘤学重点实验室于 2013 年 7 月经浙江省科技厅批准正式获准立项建设,是省内在肿瘤放射治疗领域最高等级的研究中心。该实验室依托于浙江省肿瘤医院,以浙江省肿瘤医院副院长陈明教授和放疗科主任朱远教授为学术带头人,聘请了中国工程院院士于金明教授和浙江省肿瘤医院院长毛伟敏教授担任学术委员会主任。自 2014 年起,浙江省放射肿瘤学重点实验室将于每年的春季和秋季定期举办研讨会,为促进和提高肿瘤放射治疗新进展和新技术的应用水平,提供一个开放式的交流平台。本期为重点实验室首次举办的学术研讨会,大会特别邀请了于金明院士以及来自北京、上海、广州、天津、武汉、贵州等一批我国著名肺癌放疗专家授课交流,同时安排相应的肺癌放射治疗靶区勾画和计划设计的示教及实际操作训练。内容主要包含临床各期肺癌放射治疗的原则、常见放射治疗模式的靶区定义和勾画,以及常用肺癌放射治疗计划的设计等。报名参会的学员 350 余人,来自全国各地,除江浙沪地区外,还汇集了江西、河南、海南、内蒙古、山西、宁夏等 15 个省(自治区)的放疗同行。

开幕式由重点实验室主任陈明教授主持,院长毛伟敏教授致大会欢迎辞,对研讨会的举行表示祝贺,对各位同道表示热烈的欢迎。于金明院士代表重点实验室学术委员会在致辞中向会议承办方表示了感谢,他肯定了本次会议所营造出来的浓厚学术、文化氛围,鼓励从事肿瘤放疗领域的专家学者借此平台互相交流合作,推动肿瘤放疗学科的进步和发展,也预祝了本次会议取得圆满成功。

在专题报告阶段,于金明院士带来了“分子影像学在肺癌放射治疗中的应用”的精彩专题报告,武汉大学中南医院的谢丛华教授就“肿瘤放射治疗和免疫”诠释了全新概念,北京大学肿瘤医院的朱广迎教授、天津医科大学肿瘤医院的赵路军教授(代表医科院肿瘤医院王绿化教授)、复旦大学附属肿瘤医院的傅小龙教授、杭州市肿瘤医院的吴式琇教授、贵州省肿瘤医院的卢冰教授,以及浙江省肿瘤医院的陈明教授,带来了一场胸部肿瘤放射治疗的听觉盛宴。

在临床实践阶段中,浙江省肿瘤医院许亚萍教授及中山大学肿瘤医院的包勇副教授,针对靶区勾画及计划设计上,讲解了相关标准,浙江省肿瘤医院放疗科医师及物理师也协同配合现场的示教。与会者普遍反映,通过这样的现场实践和操作受益匪浅,在肺癌的治疗方法及靶区勾画方面有了进一步的认识,也对浙江省肿瘤医院在这一领域所取得的成绩表达了充分的肯定和赞赏,当即有几位放疗科主任表示要派人前来进修学习。

会议同期还举行了浙江省放射肿瘤学重点实验室学术委员会全体成员会议,与会专家纷纷进言,共同谋划了浙江省放射肿瘤学重点实验室的建设和发展蓝图。整个研讨会气氛热烈、交流开放、互动性强,会议组织合理有序,充分起到了知识更新、分享经验的作用。会议的成功举办,推动了浙江省放射肿瘤学重点实验室的建设,提高了放射治疗新进展和新技术的应用水平,通过搭建高水平的交流平台,促进了肿瘤放疗领域同行间的交流,也提高了浙江省肿瘤医院、浙江省放射肿瘤学重点实验室的国内知名度和影响力。