

CCNG2 在肾癌组织中的表达及其临床意义

崔大为¹, 程云杰², 孙国贵³

(1. 唐山市工人医院, 河北 唐山 063000; 2. 河北医科大学第四医院, 河北 石家庄 050017;

3. 唐山市人民医院, 河北 唐山 063000)

摘要: [目的] 探讨细胞周期蛋白 G2 (CCNG2) 在肾癌组织中的表达及其临床意义。[方法] 采用免疫组织化学方法、Western Blot 法检测 65 例肾癌组织及距其癌组织边缘 2cm 以上镜下未见癌浸润的正常组织中 CCNG2 蛋白的表达情况。[结果] 免疫组织化学结果表明, CCNG2 蛋白在肾癌组织及正常肾组织中的表达阳性率分别为 32.3%、93.8%, 有统计学差异 ($P < 0.05$)。Western Blot 结果表明, CCNG2 的蛋白在肾癌组织的表达相对量较正常肾组织的表达相对量明显降低, 两者比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。CCNG2 蛋白表达与肾癌患者性别、年龄及肿瘤大小无关 ($P > 0.05$), 但与淋巴结转移、临床分期及分化程度有关 ($P < 0.05$)。[结论] 肾癌组织中 CCNG2 蛋白表达明显减低, 其表达与淋巴结转移、临床分期及肿瘤分化有关。

关键词: CCNG2; 肾肿瘤; 预后; 肿瘤转移

中图分类号: R737.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)06-0492-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.06.B012

Expression of CCNG2 in Kidney Cancer Tissue and Its Significance

CUI Da-wei¹, CHENG Yun-jie², SUN Guo-gui³

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

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of Cyclin G2 (CCNG2) in kidney cancer tissues and its clinical significance. [Methods] Immunohistochemistry and Western Blot were used to detect CCNG2 protein expression in 65 cases of kidney cancer tissues and >2cm cancer adjacent tissues. [Results] Immunohistochemistry: the level of CCNG2 protein expression was found to be significantly lower in kidney cancer tissues than that in cancer adjacent tissues ($P < 0.05$). Western Blot: the relative amount of CCNG2 protein in kidney cancer tissues was significantly lower than that in cancer adjacent tissues ($P < 0.05$). The level of CCNG2 protein expression did not correlate with gender, age and tumor size ($P > 0.05$). The level of CCNG2 protein expression correlated with lymph node metastasis, clinic stage and histological grade ($P < 0.05$). [Conclusion] The expression of CCNG2 decreases in kidney cancer tissues and correlates with lymph node metastasis, clinic stage and histological grade.

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

近年研究发现细胞周期蛋白 G2(CyclinG2, 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 在肾癌中的表达情况, 以期为今后肾癌的临床治疗找到新的基因靶点。

通讯作者: 孙国贵, 主治医师, 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: 2013-11-12; **修回日期:** 2014-01-16

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集唐山市工人医院 2006 年 1 月至 2008 年 12 月期间 65 例新鲜肾癌标本, 分别于肿瘤组织及距肿瘤边缘 2cm 以上(镜下未见癌)的正常肾组织处取材。其中女性 21 例, 男性 44 例; 年龄 27~76 岁, 中位年龄 55 岁。其中 ≤ 65 岁者 40 例, > 65 岁者 25 例; 透明细胞型癌 57 例, 乳头状型型癌 8 例。肿瘤直径 ≤ 7 cm 者 27 例, > 7 cm 者 38 例; 淋巴结转移中 N_0 者

22例,N₂者43例;临床分期Ⅰ+Ⅱ期19例,Ⅲ+Ⅳ期46例;高分化者17例,中低分化者48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 免疫组织化学

将4μm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℃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。细胞阳性百分率分为4个等级:≤5%计0分,5%~25%计1分,25%~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(黄褐色)计2分,强染色(棕黄色)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(+++),1~6分为阳性。以PBS替代一抗作为阴性对照。

1.3 Western Blot 法

提取肾癌组织及正常组织总蛋白。4℃、12 000r/min离心20min,取上清,-20℃备用。BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,按每孔上样量50μg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℃过夜(CCNG2 1:1 000,GAPDH 1:5 000),兔抗人红外荧光标记二抗(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/GAPDH A值。

1.4 统计学处理

本实验结果均应用SPSS16.0统计软件处理数据。免疫组织化学结果构成比之间的比较采用 χ^2 检验,Western Blot结果组间均数的比较采用 t 检验。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

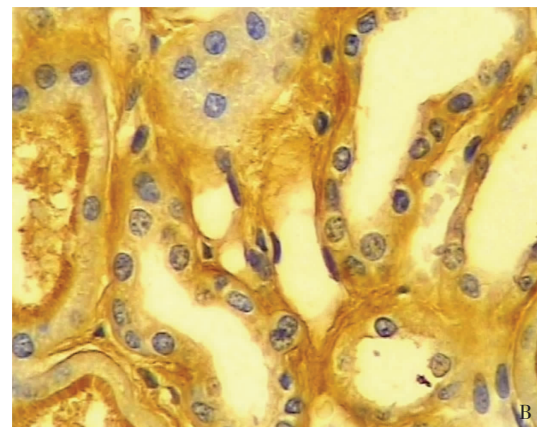
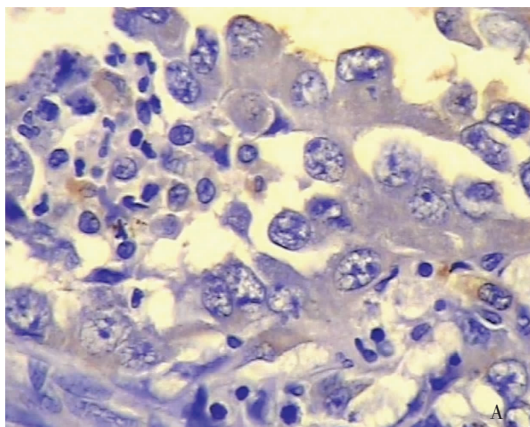
2 结 果

2.1 CCNG2在肾癌组织中的表达

免疫组织化学结果显示,CCNG2阳性表达主要表现为染成浅黄色、黄褐色或棕黄色。CCNG2在肾癌组织、正常肾组织的阳性表达率分别为32.3%(21/65)及93.8%(63/65),两组之间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蛋白在肾癌组织的表达量为 0.383 ± 0.045 ,明显低于正常肾组织(0.768 ± 0.065),两组之间比较差异具有统计学意义($P<0.05$)(Figure 2)。

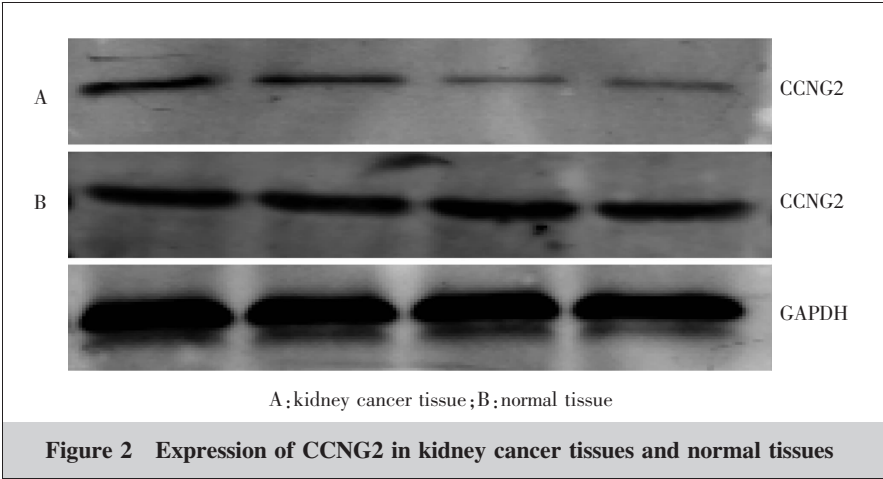
Table 1 Expression of CCNG2 in kidney cancer tissues and normal tissues

Groups	N	Expression of CCNG2 Protein				χ^2	P
		-	+	++	+++		
Cancer tissues	65	44	4	10	7	56.189	0.000
Normal tissues	65	2	11	27	25		



A:kidney cancer tissue;B:normal tissue

Figure 1 Expression of CCNG2 in kidney cancer tissues and normal tissues($\times 400$)



2.2 CCNG2 与临床病理参数的关系

临床因素分析表明,CCNG2 蛋白表达在肾癌患者性别、年龄、肿瘤大小及肿瘤病理类型无关 ($P>0.05$), 而与淋巴结转移、临床分期及分化程度有关 ($P<0.05$)(Table 2)。

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^[2]。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^[3]。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。但是目前在肾癌中 CCNG2 的研究仍然鲜有报道。研究 CCNG2 在肾癌中的表达情况,并深入探讨 CCNG2 参与肾癌发生发展、增殖恶变的分子生物学机制,有助于进一步全面明确肾癌的恶性生物学行为及机理,并且有望为肾癌的临床治疗和预后判断提供新的分子指标。

Table 2 Relation between CCNG2 expression and clinical characteristics in kidney cancer tissues

Groups	N	IHC				Western Blot		
		-	+~++++	χ^2	P	$\bar{x}\pm s$	t	P
Gender								
Male	44	32	12	1.579	0.209	0.385±0.041	0.047	0.965
Female	21	12	9			0.370±0.039		
Age (years)								
≤65	40	25	11	0.583	0.445	0.378±0.039	0.203	0.849
>65	25	15	10			0.379±0.048		
Tumor length (cm)								
≤7	27	18	9	0.022	0.882	0.389±0.057	0.376	0.762
>7	38	26	12			0.373±0.047		
Pathological types								
Clear cell type	57	37	20	1.637	0.201	0.392±0.040	0.185	0.862
Papillary cell type	8	7	1			0.399±0.056		
Lymph node metastasis								
N ₀	22	11	11	4.760	0.029	0.411±0.046	5.827	0.004
N ₊	43	33	10			0.225±0.031		
Clinic stage								
I ~ II	19	9	10	5.071	0.024	0.409±0.036	6.365	0.003
III ~ IV	46	35	11			0.225±0.035		
Histological grade								
I	17	7	10	7.401	0.007	0.379±0.035	6.974	0.002
II ~ III	48	37	11			0.205±0.026		

本研究首次用免疫组织化学及 Western Blot 技术对肾癌组织及正常肾组织进行定量检测,结果显示 CCNG2 蛋白在肾癌组织中的表达水平均显著低于正常肾组织,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 蛋白的表达水平与肾癌有无淋巴结转移、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其表达较高,而在有淋巴结转移或病理低分化的喉癌中表达下降^[9]。结果提示 CCNG2 表达水平可能与肾癌的发生发展有关,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。目前研究认为 CCNG2 可以取代其他 Cyclin/CDK 复合物中的周期蛋白,直接阻断 CDK,其他蛋白与 CCNG2 的 C 末端结合抑制 CDK 的活性^[3]。Bennin 等研究中发现 CCNG2 抑制细胞周期的功能与蛋白质磷酸酯酶(PP2A)有关;认为 CCNG2 本身并不能抑制细胞增殖,只有当 CCNG2 与 PP2A 的 B' 亚基形成 CCNG2-PP2A 复合物后才能发挥抑制细胞周期进程的作用^[10-12]。

本研究结果提示,肾癌组织中 CCNG2 蛋白的表达明显降低,且与肾癌淋巴结转移、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] Bates S, Rowan S, Vousden KH. Characterization of human cyclin G1 and G2: DNA damage inducible genes[J]. *Oncogene*, 1996, 13(5): 1103-1109.
- [3] 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.
- [4] Kim Y, Shintani S, Kohno Y, et al. Cyclin G2 dysregulation in human oral cancer [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(24): 8980-8986.
- [5] Cui XF, Liu AJ, Xu ZM. Expression of Cyclin G2 and its clinical significance in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *J Clin Otorhinolaryngol*, 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]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2011, 33(9): 994-997. [石伟, 余侃儒, 吴国英, 等. CCNG2 在胃癌中的表达及其临床意义[J]. *中国细胞生物学报*, 2011, 33(9): 994-997.]
- [9] Song YL, Hu GH. Cyclin G2: Correlation with head and neck neoplasms [J]. *Int J Otolaryngol Head Neck Sur*, 2006, 30(1): 8-11.
- [10] Sun GG, Zhang J, Hu WN. CCNG2 expression is downregulated in colorectal carcinoma and its clinical significance [J]. *Tumour Biol*, 2013. [Epub ahead of print]
- [11] Bennin DA, Don AS, Brake T, et al. Cyclin G2 associates with protein phosphatase 2A catalytic and regulatory B' subunits in active complexes and induces nuclear aberrations and a G1/S phase cell cycle arrest [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(30): 27449-27467.
- [12] Sun GG, Hu WN, Cui DW, et al. Decreased expression of CCNG2 is significantly linked to the malignant transformation of gastric carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2013. [Epub ahead of print]