

# 原发性肝癌组织 cyclinB1表达水平及其临床诊断意义

易火春 黄如欣 张忠英

**【摘要】** 目的 探讨细胞周期蛋白 B1(cyclinB1)在肝癌组织的表达及其临床诊断意义。方法 用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 40例原发性肝细胞癌患者癌组织及其癌旁组织 cyclinB1 mRNA 的表达。结果 90% (36/40)癌组织及 85% (34/40)癌旁组织 cyclinB1 mRNA 呈阳性表达,癌组织 cyclinB1 mRNA 表达量为  $0.531 \pm 0.015$ ,明显高于癌旁组织  $0.263 \pm 0.023$  两者比较有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。cyclinB1 mRNA 表达与肝癌的病理分级、淋巴转移与否有关,而与性别、年龄、肿瘤大小、癌栓形成与否无关。结论 在肝癌发生、发展中, cyclinB1 可能起着重要作用, cyclinB1 表达水平可作为肝癌分级、分化及癌转移的辅助衡量指标之一。

**【关键词】** 肝肿瘤; 细胞周期蛋白 B; 逆转录聚合酶链反应

**Expression level and clinical significance of cyclinB1 in primary hepatocellular carcinoma** YIHuo-chun, HUANG Ru-xin, ZHANG Zhong-ying, Xiamen Center for Clinical Laboratory, Xiamen Zhongshan Hospital, Xiamen University / Fujian Medical University, Xiamen 361004, China  
Corresponding author: ZHANG Zhong-ying, Email: zzy1121@tom.com.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression level and clinical significance of cyclinB1 in primary hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA level of cyclinB1 in liver cancer tissues and adjacent tissues of cancer. **Results** CyclinB1 mRNA was positive expression in 90% (36/40) cancer tissues and 85% (34/40) adjacent tissues of cancer. The expression level of cyclinB1 in cancer tissues ( $0.531 \pm 0.015$ ) was significantly higher than that in adjacent tissues of cancer ( $0.263 \pm 0.023$ ). The level of cyclinB1 was significantly associated with pathological grades and lymph node metastasis but not associated with sex, age, tumor size or tumor thrombus. **Conclusion** CyclinB1 may play an important role in the tumorigenesis of PHC and may be a potential adjuvant parameter in evaluating pathological grades and lymph node metastasis.

**【Key words】** Liver neoplasms; Cyclin B; Reverse transcriptase polymerase chain reaction

肿瘤组织的过度生长有赖于细胞的过度分裂,而细胞分裂是由一组称为细胞周期素(cyclin)的蛋白和一组依赖于 cyclin 的蛋白激酶 CDK 及其抑制物 CDK I 所调控的。其中, cyclinB1 是细胞周期 G<sub>2</sub>/M 检测点关键的调控因子,与 cdc2 形成 cyclinB1/cdc2 复合物,即所谓的有丝分裂促进因子(mitosis promoting factor MPF),在 G<sub>2</sub>/M 转换中发挥关键作用。人类多种肿瘤发现有 cyclinB1 过表达,如食管癌、非小细胞性肺癌等,与肿瘤的分级、分化、浸润转移及预后有关<sup>[1,2]</sup>。但在原发性肝癌的表达情况报道较少。本文采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

法半定量检测 cyclinB1 基因 mRNA 在原发性肝癌的表达并探讨其意义。

## 材料与方法

### 一、材料

1. 组织标本:收集自 2004 年 1 月至 2005 年 10 月在我院肝胆外科接受手术治疗的原发性肝癌患者,均经病理确诊。共 40 例,其中男性 34 例,女性 6 例,年龄 27~68 岁,平均 48 岁。取癌组织和手术切缘组织,离体后的组织立即置于液氮中,储存于 -80℃ 冰箱备用。

2. 主要试剂:TRIzol 试剂系美国 Life technology 公司产品,逆转录系统试剂盒、dNTPs、Taq DNA 聚合酶系美国 Promega 公司产品,异丙醇、氯仿、无水

作者单位:361004 厦门大学医学院第一临床学院 福建医科大学

厦门中山教学医院 厦门市临床检验中心

通讯作者:张忠英,电子信箱:zzy1121@TOM.com.cn

乙醇购自北京化学试剂厂, Tris 碱、硼酸、EDTA (Na) 购自上海生工生物工程技术有限公司, 琼脂糖、DNA Marker 购自广东晶美生物工程有限公司。

3. 主要仪器: 梯度 PCR 扩增仪系德国 MWG Biotech AG 公司产品, 紫外分光光度仪 (DU-650) 系美国 BECKMAN 公司产品, Gel Scan 凝胶成像系统系美国 UVP 公司产品。

4. 引物合成: 引物序列参考文献 [3], 并由上海博亚生物公司合成。cyclinB1 的上游引物序列为: 5'-TGTGGATGCAGAAGATGGAT-3', 下游引物序列为: 5'-AAACATGGCAGTGACACCAA-3', 扩增目的基因片段长度 295 bp。以 GAPDH 为内参照, 其上游引物序列为: 5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3', 下游引物序列为: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3', 扩增目的基因片段长度 307 bp。

## 二、方法

1. 组织总 RNA 的提取: 参照 TRIzol 试剂盒说明书进行操作。最后, RNA 沉淀用 50 μl DEPC 水溶解。琼脂糖凝胶电泳显示 5 s、18 s 和 28 s 的 3 条清晰条带, 再经紫外分光光度仪测定 260 nm 和 280 nm 的吸光度 (A) 值, 取  $A_{260}/A_{280}$  比值为 1.8~2.0 者用于 RT 反应, 并根据  $A_{260}$  计算出 RNA 的浓度。

2. cDNA 第一链的合成: 参照 Promega 公司的逆转录系统试剂盒说明书进行操作。(1) 在冰浴的 0.5 ml EP 管内, 加入总 RNA 2 μg 70℃ 水浴箱 10 min 后, 立即冰浴 1 min 离心, 置冰上;(2) 每管加入 10 × reaction buffer 2 μl 25 mmol/L 的 MgCl<sub>2</sub> 4 μl 10 mmol/L 的 dNTP 2 μl RNA 酶抑制剂 0.5 μl 20 U/μl 的 AMV 逆转录酶 0.75 μl 0.5 μg/μl 的 Oligo (dT)<sub>15</sub> 引物 1 μl 并用 Nuclease-free 水补足 20 μl (3) 42℃ 水浴箱反应 1 h (4) 95℃ 加热 5 min 使逆转录酶失活, 立即冰浴 5 min 储存 cDNA 第一链于 4℃ 冰箱或立即 PCR。

3. PCR 扩增: 反应体系为 20 μl 包括: cDNA 第一链 1.5 μl 10 × buffer 2 μl 25 mmol/L 的 MgCl<sub>2</sub> 1.5 μl 上游引物 1 μl 下游引物 1 μl dNTPs 0.36 μl Taq 酶 0.1 μl 去离子水 9.75 μl 反应条件相同: 94℃, 2 min 30 cycles 94℃, 30 s 58℃, 30 s 72℃, 30 s 72℃, 5 min 4℃, 10 min。

4. PCR 产物的电泳鉴定及半定量分析: 取 10 μl PCR 扩增产物与 1 μl 上样缓冲液混匀, 2% 琼脂糖凝胶电泳。紫外透射反射仪下观察结果, 并在

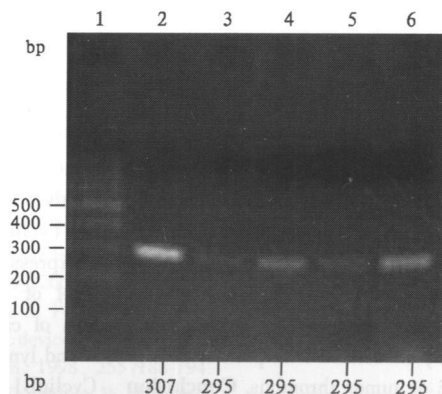
Gel Scan 凝胶图像成像仪上扫描, 以 cyclinB1 积分吸光度值与相应的内参照 GAPDH 积分吸光度值之比作为 cyclinB1 基因 mRNA 表达水平的定量指标。

## 三、统计学处理

cyclinB1 表达值以均数 ± 标准差表示, 用 SPSS10.0 统计软件包分析, 采用 *t* 检验或多组方差分析,  $P < 0.05$  表明差异有统计学意义。

## 结 果

1. PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果: cyclinB1 及内参 GAPDH 的 RT-PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳后, 其条带与标准 Marker 相比较, 均只有一条带, 且其大小与预先设计引物大小一致, 表明所设计引物有较好的特异性和可靠性。40 例癌组织和相应癌旁组织均有内参照 GAPDH 的有效扩增, 表明 RNA 提取及 RT-PCR 实验的可靠性 (图 1)。



1: DNA Marker 2: GAPDH; 3, 5: 癌旁组织; 4, 6: 肝癌组织

图 1 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

2. 肝癌及其癌旁组织 cyclinB1 mRNA 表达: 40 例癌组织及其癌旁组织 cyclinB1 mRNA 表达阳性率分别为 90% (36/40) 和 85% (34/40), 两者比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。但其表达水平比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 癌组织表达水平为  $0.531 \pm 0.015$ , 明显高于癌旁组织中的  $0.263 \pm 0.023$ , 见表 1。

表 1 肝癌组织及其癌旁组织 cyclinB1 mRNA 表达

标本来源	例数	cyclinB1 mRNA
癌旁组织	40	$0.263 \pm 0.023$
癌组织	40	$0.531 \pm 0.015$

注: 两组相比,  $P < 0.05$

3. 肝癌 cyclinB1 mRNA 表达与临床病理特征

的关系:不同病理分级、淋巴结转移与否的 cyclinB1 mRNA 表达量比较,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ );而年龄、性别、肿瘤大小、癌栓形成与否的 cyclinB1 mRNA 表达量比较,差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见表 2。

表 2 肝癌组织 cyclinB1 mRNA 表达与临床病理特征的关系

临床病理参数	例数	cyclinB <sub>1</sub> mRNA 表达	P 值
年龄 (岁)			
< 50	17	0.372 ± 0.035	> 0.05
≥ 50	23	0.393 ± 0.023	
性别			
男	34	0.363 ± 0.026	> 0.05
女	6	0.312 ± 0.017	
肿瘤大小 (cm)			
≤ 5	21	0.297 ± 0.026	> 0.05
> 5	19	0.321 ± 0.031	
淋巴结转移			
无	23	0.376 ± 0.015	< 0.05
有	17	0.431 ± 0.032	
癌栓形成			
无	31	0.395 ± 0.018	> 0.05
有	9	0.326 ± 0.027	
病理分级			
+	14	0.296 ± 0.016	< 0.05
+	26	0.387 ± 0.024	

## 讨 论

肿瘤生物学认为肿瘤是一类细胞生长周期紊乱性疾病,表现为细胞增生旺盛而凋亡发生障碍,细胞周期的异常在肿瘤的发生、发展中有着重要作用<sup>[4]</sup>。目前对细胞周期调控的研究是肿瘤研究的热点之一。在细胞周期中,有两个重要周期时相检测点: G<sub>1</sub>/S 和 G<sub>2</sub> M。细胞周期检测点就像“关卡”一样使细胞周期的分子事件按序进行<sup>[5]</sup>。有人认为,肿瘤发生的根本原因在于基因组的不稳定性,而 G<sub>1</sub>/S 和 G<sub>2</sub> M 两个关键的“关卡”失控就有可能使本来应停止增殖或生理性凋亡的 DNA 受到损伤或 DNA 复制发生错误的细胞不停地进入细胞周期,因而造成恶性增生。G<sub>2</sub> M 期转换的关键调控分子是 cyclinB1/cdc2 复合物, cyclinB1 在 S 期开始合成并在 G<sub>2</sub> 期定位于细胞浆中,与 p34cdc2 结合形成有丝分裂促进因子 MPF,促进细胞从 G<sub>2</sub> 期进入 M 期,从而完成有丝分裂。cyclinB1 在 M 期移行于细胞核中,在有丝分裂后期通过泛素依赖途径迅速降解<sup>[6]</sup>。

Ito 等用免疫组化法检测 101 例原发性肝癌的 cdc2, cyclinA, cyclinB1 的表达,发现它们在肝癌组织

明显过表达,且 cdc2, cyclinB1 与肝癌的分级、分化、侵袭性及肝内转移直接相关,提示 cdc2, cyclinB1 在细胞周期 G<sub>2</sub> M 转换及肝癌细胞增生中发挥重要的作用,并可能用来预测肝癌的复发<sup>[7]</sup>。本研究发现 cyclinB1 在肝癌组织及其癌旁组织的表达阳性率很高,分别达到 90% 和 85%,而且,癌组织的表达强度明显高于癌旁组织,提示 cyclinB1 可能与肝癌的发病、发展有关。研究显示<sup>[8]</sup>,高表达的 cyclinB1 与其结合因子 cdc2 形成过多的有丝分裂促进因子 MPF,并在活性和功能异常的 CAK、cdc25 的作用下,形成不成熟的 cyclinB1/cdc2/cdc25 自动连锁式反馈环,触发并通过恶性细胞有缺陷的 G<sub>2</sub> M 期检测点,从而引发核内重要蛋白结构的改变并进入 M 期,而且 cdc2 激酶触发的泛素依赖性 cyclinB1 降解和自身失活也发生异常,从而促进恶性细胞的发展。

很多肿瘤组织 cyclinB1 表达阳性率明显高于正常组织,与肿瘤的发生、发展及预后相关<sup>[1,2]</sup>。在食道癌, cyclinB1 的表达随着不典型增生的分级升高而增高,是食道癌预后不良的指标。本研究比较不同临床病理特征与肝癌 cyclinB1 表达量的关系,发现病理分级越高、有淋巴转移者其 cyclinB1 表达量也越高,提示 cyclinB1 可作为评价肝癌分级、分化及癌转移与否的辅助指标之一。

## 参 考 文 献

- 1 Takeno S, Noguchi T, K kuch i R, et al. Prognostic value of cyclinB1 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 2874-2881.
- 2 Soria JC, Jang SJ, Khuri FR, et al. Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication. *Cancer Res* 2000; 60: 4000-4004.
- 3 Masab T, Naohko S, Toshinori O, et al. Identification of the p33 (NG1)-regulated genes that include cyclin B1 and protooncogene DEK by using cDNA microarray in a mouse mammary epithelial cell line NM1MG. *Cancer Res* 2002; 62: 2203-2209.
- 4 Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; 266: 1821-1828.
- 5 Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989; 246: 629-634.
- 6 Muschel RJ, Zhang HB, McKenna WG. Differential effect of ionizing radiation on the expression of cyclin A and cyclin B in HeLa cells. *Cancer Res* 1993; 53: 1128-1135.
- 7 Ito Y, Takeda T, Sakon M, et al. Expression and prognostic role of cyclin-dependent kinase 1 (cdc2) in hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2000; 59: 68-74.
- 8 Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 1994; 79: 573-582.

(收稿日期: 2005-05-23)

(本文编辑: 唐栋)