DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2016.05.006

·临床医学·

结直肠腺癌 CCRK 基因表达在分化程度评估中的意义*

贺　军[1]　张秋生[1]　孔令斌[2△]　成　双[1]　黄志诚[3△]

([1] 济宁医学院附属医院,济宁 272029;[2] 济宁医学院临床医学院,济宁 272067;
[3] 济宁医学院基础医学院,济宁 272067)

摘　要　目的　检测不同分化程度结直肠腺癌患者 CCRK 基因及其蛋白表达水平,探讨 CCRK 在结直肠腺癌患者分化程度中的作用,为结直肠腺癌分化程度及其预后提供分子生物学依据。**方法**　分别采用 RT-PCR、免疫组织化学方法检测 234 例结直肠腺癌组织中 CCRK mRNA 和 CCRK 蛋白质表达水平。**结果**　在 234 例结直肠腺癌组织中,CCRK 的阳性表达者 140 例,不表达者 94 例。其中 CCRK 阳性表达者在不同分化程度的结直肠腺癌患者中 CCRK 蛋白染色得分值不同($H_C = 123.765$, $P < 0.0001$);而且 CCRKmRNA 相对表达量在结直肠癌低分化组(3.71 ± 0.41)明显高于中分化组(3.09 ± 0.23)和高分化组(2.14 ± 0.21),差别具有统计学意义。**结论**　CCRK 的表达与结直肠腺癌分化程度有关,CCRK 蛋白及其 CCRKmRNA 相对表达量越高,其分化程度越低,恶性程度也越高;检测 CCRK 蛋白表达和 CCRK mRNA 水平有助于结直肠腺癌分化程度和预后的判断。

关键词　细胞周期相关激酶;结直肠腺癌;分化程度

中图分类号:R574　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1000-9760(2016)10-324-04

Significance of CCRK gene expression in differentiation of colorectal adenocarcinoma

HE Jun[1], *ZHANG Qiusheng*[1], *KONG Lingbin*[2△], *CHENG Shuang*[1], *HUANG Zhicheng*[3△]

([1] *The Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining* 272029; [2] *School of Clinical Medicine, Jining Medical University, Jining* 272067; [3] *School of Basic Sciences, Jining Medical University, Jining* 272067, *China*)

Abstract: ***Objective***　To explore the relationship between CCRK gene and protein expression in different differentiation degree types of colorectal adenocarcinoma, which could provide molecular basis for colorectal adenocarcinoma differentiation and prognosis. ***Methods***　The expression of mRNA CCRK and CCRK protein in 234 cases of colorectal adenocarcinoma were detected by RT-PCR and immunohistochemistry respectively. ***Results***　There were 140 cases of CCRK positive expression in 234 cases of colorectal adenocarcinoma. CCRK protein expression levels and differentiation degrees staining score values had certain relevance in colorectal adenocarcinoma tissue, and the difference had significant significance in each group ($H_C = 123.765$, $P < 0.0001$). CCRKmRNA relative expression amount (3.71 ± 0.41) in poorly differentiated colorectal adenocarcinoma was significantly higher than that in moderate differentiation group (3.09 ± 0.23) and high differentiation group (2.14 ± 0.21). The overall difference was statistically significant ($F = 5.689$, $P < 0.05$), and the difference between any two groups were statistically significant. It shows that there are positive correlation between CCRK mRNA relative expression and differentiation degree in colorectal adenocarcinoma. ***Conclusion***　The expression of CCRK was correlated with the differentiate degree in colorectal adenocarcinoma. And the more higher CCRK expression, the more lower the differentiate degree and the higher the degree of malignancy. The detection of CCRK protein expression and mRNA CCRK levels had contributed to the differentiate degree and prognosis of colorectal adenocarcinoma tumors.

Keywords: Cell cycle related kinase; Colorectal adenocarcinoma; Differentiate degree

* [基金项目]山东省医药卫生科技发展计划(2013WS0335)
△ [通信作者]孔令斌,klb3904@163.com
黄志诚,hzc3629@163.com

结直肠癌是指大肠黏膜上皮在环境或遗传等多种致癌因素作用下发生的恶性病变,在我国其死亡率占全部恶性肿瘤死亡率的第 4 位,占胃肠道肿瘤的第 2 位。其中绝大部分是腺癌,约占 67.22%[1]。腺癌根据分化程度分为高、中、低分化癌。腺癌的不同分化程度对手术和药物、放射治疗的效果不同。因此,针对不同分化程度的个体开展精准诊断、治疗及预防就显得更加重要。研究发现,细胞周期相关激酶(cell cycle related kinase, CCRK)的高表达与结直肠癌的发生、发展及其 TNM 的分期相关,分期越高,其表达量越高[2]。但就有关 CCRK 表达与结直肠腺癌的分化程度是否相关,目前尚未见诸报道。为此,本文采用分子生物学技术,比较腺癌不同分化程度结直肠腺癌患者组织中 CCRK 的表达水平,探讨 CCRK 表达水平与大肠腺癌分化程度的关系,为不同结直肠腺癌患者的预后及其精准治疗提供指导。

1　材料和方法

1.1　病例选择

选取医院 2012 年 7 月至 2016 年 3 月间确诊的大肠腺癌患者 234 例,其中高分化腺癌 84 例、中分化腺癌 101 例、低分化腺癌 49 例;年龄 35 ~ 67 岁,平均(54.4 ± 10.7)岁;男性 118 例,女性 116 例。每例患者均于行结肠镜检查时钳取 2 块组织或留取 2 块手术组织,其中 1 组织标本用于 RT-PCR的检测,收集后及时置于 RNA 酶抑制剂的无菌冻存管中,4℃过夜后保存于 -80 ℃低温冰箱留待统一检测;另一标本用于免疫组化检测,直接保存于 -80 ℃低温冰箱留待统一检测。均征得患者同意。

1.2　实验方法

1.2.1　CCRK 蛋白表达检测

按照免疫组化操作规程,严格按照 CCRK 检测说明书以 SP 三步法进行操作。结果判定由 2 名有经验的病理医师独立进行评分,最终评分为 2 位医师评分的平均数。评分方法根据染色程度和染色阳性细胞百分比进行,染色方法采用细胞染色与背景着色对比计算阳性细胞染色强度,根据染色程度记分:无染色 0 分,淡黄色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分。染色细胞百分比根据阳性细胞所占总细胞数百分比记分:随机选取 5 个高倍镜视野观察,未发现阳性细胞计 0 分,阳性细胞占总细胞数比≤ 25% 者计 1 分,阳性细胞比占总细胞数比在 25% ~75% 计 2 分,阳性细胞占总细胞数比 >75% 计 3 分;最后将染色程度记分和染色阳性细胞百分比乘积即为染色总得分:记为 0 ~ 2 分(-)、3 ~ 4 分(+)、5 ~ 7 分(++)和 8 ~ 9 分(+++)。

1.2.2　CCRK mRNA 检测

取结直肠腺癌组织标本约 10mg,经常规处理取裂解取得的 RNA 全部置于新的 Ep 管中。然后按照组织总 RNA 提取试剂盒说明书操作。将提取物置于 260nm 紫外波长下测定 RNA 的 OD 值,则 RNA 的浓度(μg/μl)为:$40 \times OD_{260} \times 100$(稀释倍数)/1000,计算总 RNA 含量。确定 RNA 的完整性后按照反转录说明书将 RNA 反转录为 cDNA,然后采用 RT-PCR 方法检测 CCPK mRNA 的表达,按照试剂盒说明书将表达产物进行琼脂糖凝胶电泳,160V、20min 在 UVP 凝胶成像扫描分析系统中观察凝胶结果,以目的基因的灰度值与内参 GAPDH 灰度值的比值代表目的基因的相对表达量。其引物由上海生物工程公司合成并纯化,目的基因 CCRK 扩增产物片段长度 321 bp,上游引物:5'-TGAGCCTTACCTTCTGTGTGC-3';下游引物:5'-GAGACAATGCCACCTTAGCC-3′;内参 GAPDH 扩增产物片段长度 317 bp,上游引物:5′-GACTCAC-CCTGCCCTCAATA-3′;下游引物:5′-CCCTGTAGC-CTGGACCTGAT-3′。

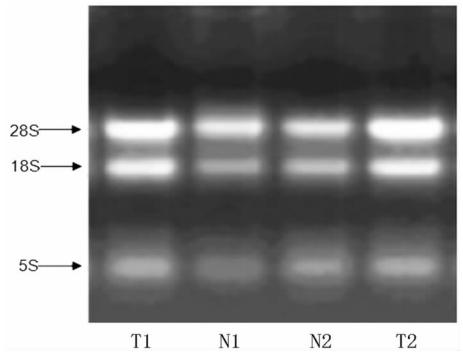
1.3　统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件对数据进行分析。不同分化程度结直肠腺癌 CCRK 蛋白阳性表达染色分值比较采用校正的秩和检验(H_C);CCRK 表达阳性者不同分化程度结直肠癌组织 CCRK mRNA 相对表达量间的比较采用 F 检验和组间两两比较的 q 检验,检验水准 α 均取 0.05。

2　结果

2.1　结直肠癌组织中总 RNA 完整性检测

所提取的组织总 RNA 在 UVP 凝胶成像扫描分析系统中观察,结果显示 28S 和 18S 条带清晰,无弥散拖尾的现象,28S 条带的亮度约为 18S 条带的 2 倍(见图 1)。表示提取的组织总 RNA 无降解,可用于下一步研究。



注:T1-T2 为 1-2 号癌组织;N1-N2 为 1-2 号癌旁组织

图 1　总 RNA 完整性检测结果

2.2　PCR 扩增产物

将提取的 RNA 反转录为 cDNA 后测序,结果见峰图 2,CCRK 扩增产物与目的基因序列一致率为 97%;GAPDH 扩增产物与目的基因序列一致率为 99%。

AAAAACCTCAGGTGGTCTGCTTAGTCTGTCTT
TCTCCTTTCTCAAGGGAAATGGCTAAGGTGGCATT
GTCTCATGGCTCTCGTTTTTGGGGTCATGGGGAGG
GTAGCACCAGCATAGCCACTTTTGCCCTGAGGGA
CTCCTGTGTGCTTCACATCACTGAGCACTCATTTAG
AAGTGAGGGAGACAGAAGTCTAGGCCCAGGGATG
GCTCCAGTTGGGGATCCAGCAGGAGACCCTCTGC
ACATGAGGCTGGTTTACCAACATCTACTCCCTCAG
GATGAGCGTGAGCCAGAAGCAGCTGTGTATTTAA
GGAAACAAGCGTTCCTGGAATTAATTTATAAATTT
AATAAATCCCAATATAATCCCAAAAAAAAAAAAA
AAAAAA

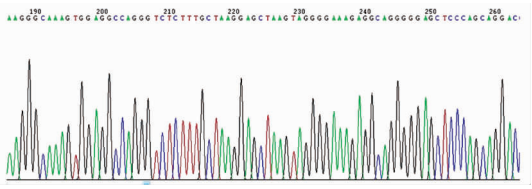


图 2　CCRK 扩增产物

CCTGGCTCGCCTGCACGTCCCAGGGCGGGGA
GGGACTTCCGCCCTCACGTCCCGCTCTTCGCCCCA
GGCTGGATGGAATGAAAGGCACACTGTCTCTCTCC
CTAGGCAGCACAGCCCACAGGTTTCCAGGAGTGC
CTTTGTGGGAGGCCTCTGGGCCCCCACCAGCCATC
CTGTCCTCCGCCTGGGGCCCCAGCCCGGAGAGAG
CCGCTGGTGCACACAGGGCCGGGATTGTCTGCCCT
AATTATCAGGTCCAGGCTACAGGG

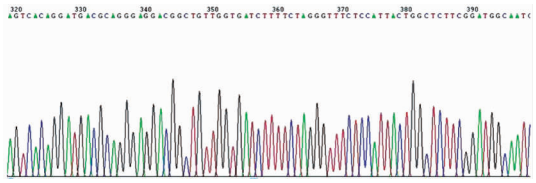


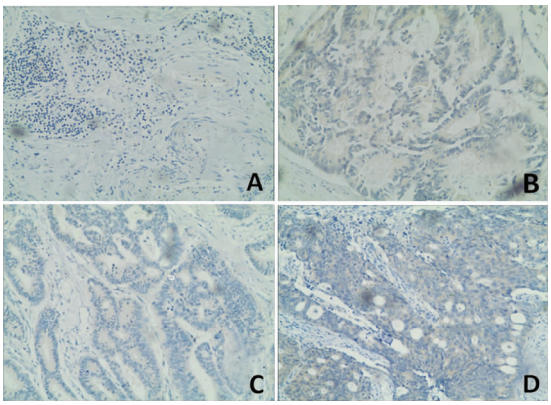
图 3　GAPDH 扩增产物

2.3　不同分化程度结直肠腺癌组织中 CCRK 阳性表达染色分值比较

在 234 例结直肠腺癌组织中,140 例有 CCRK 的阳性表达,其中阳性表达者 CCRK 蛋白在不同分化程度腺癌组织中的染色分值不同(H_C = 123.765, P < 0.001)。见表 1、图 4。

表 1　CCRK 蛋白在不同分化程度结直肠腺癌组织中染色分值比较

分组	+ + +	+ +	+	−	合计
低分化组	27	5	5	12	49
中分化组	18	29	19	35	101
高分化组	2	22	13	47	84
合 计	47	56	37	94	234



注:A 正常组织 CCRK 表达(10, −);
B 高分化直肠腺癌组织 CCRK 表达(10, +);
C 中分化直肠腺癌组织 CCRK 表达(10, + +);
D 低分化直肠腺癌组织 CCRK 表达(10, + + +)

图 4　免疫组化法检测不同分化程度结直肠腺癌组织中 CCRK 蛋白的表达情况

2.4　CCRK mRNA 的相对表达量

对 140 例 CCRK 阳性表达的不同分化程度结直肠腺癌组织中 CCRK mRNA 的水平比较发现,低分化结直肠腺癌组 CCRKmRNA 相对表达量为(3.71 ± 0.41)明显高于中分化组结直肠腺癌表达量(3.09 ± 0.23)和高分化组腺癌的相对表达量(2.14 ± 0.21),3 组间差别具有统计学意义(F 值

=5.689, $P<0.05$), 组间两两比较见表 2, 提示随着结直肠癌分化程度的增高, CCRKmRNA 相对表达量逐渐降低。见表 2。

表 2　CCRK mRNA 在不同分化程度结直肠腺癌中的相对表达量比较

分 组	CCRK 的相对表达量
低分化组	3.71 ±0.41
中分化组	3.09 ±0.23 *
高分化组	2.14 ±0.21 *△
F 值	5.896
P	<0.05

注: * 与低分化组相比, $P<0.05$; △ 与中分化组相比, $P<0.05$

3　讨论

结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一, 最新报道, 50% ~70% 的结直肠癌是通过“腺瘤 - 癌顺序”演变而来, 此过程大概需要 10 ~15 年[3], 其发生是正常肠上皮 - 增生改变, 微小腺瘤 - 早期腺瘤 - 中期腺瘤 - 后期腺瘤 - 癌 - 癌转移的演变过程, 在这一过程的不同阶段伴随着癌基因和抑癌基因的变化, 基因的突变则是环境因素与遗传因素综合作用的结果。结直肠癌中绝大部分是腺癌, 按癌细胞分化程度又分为高度分化腺癌、中分化腺癌和低分化腺癌 3 种, 分化程度越低恶性程度越最高。CCRK 是新近发现的一种具有 CAK 活性的激酶, 它具有正向调控细胞周期的作用。Liu 等[4]首次指出 CCRK 具有调节细胞生长的作用, 是细胞生长必不可少的一种基因, 细胞一旦缺乏 CCRK 基因将无法生长, 并且细胞 CCRK 蛋白表达水平与细胞的生长速度成正相关性; CCRK 过度表达引起恶性肿瘤的发生发展, 并且影响着患者的预后。本文采用分子生物学技术, 比较了不同分化程度结直肠腺癌组织中 CCRK 的表达。结果发现, CCRK 蛋白在不同分化程度中结直肠腺癌组织中的染色得分值随着分化程度的降低而升高, 各组差别有显著学意义 ($P<0.001$); CCRK mRNA 在低分化结直肠腺癌组 CCRKmRNA 相对表达量高于中分化组和高分化组, 随着结直肠癌分化程度的增高, CCRKmRNA 相对表达量逐渐降低, 差别具有统计学意义 ($P<0.05$), 这与 Feng 的研究结果 CCRK 高表达与癌细胞的侵袭转移及癌症患者的生存率密切相关有一定的相似性[5]; 也与我们先前的研究结果, CCRK 的高表达与结直肠癌的发生、发展及其 TNM 的分期相关的结论基本一致[2]。其机制可能与 CCRK 基因表达增加, 加快了 cycE-Cdk2 复合物的磷酸化, 通过调节 Cdk2、cyclinE 和 Rb 参与结直肠癌 G1/S 期转换和癌变有关[6], 提示 CCRK 的表达与结直肠腺分化程度有关, CCRK 表达水平可以作为判断结直肠腺癌分化程度的重要参考指标; 如果能采用一定的分子生物学技术抑制 CCRK 在结直肠腺癌中的表达, 将有可能达到阻值癌细胞增殖的目的, 为结直肠腺癌的基因精准治疗提供指导。

有关 CCRK 表达在结直肠腺癌分化程度中的作用还不十分明确, 考虑到结直肠癌的发生因素复杂, 还受其他多种因素的影响, 如能结合其他基因等因素, 将 CCRK 的表达水平与其他基因等因素综合分析形成一个诊断结直肠癌分化程度的半定量指标, 必将为下一步结直肠腺癌的分化程度及预后评估、靶向治疗等提供一个新的思路和方向。

参考文献:

[1] 盛伟琪. 个体化治疗对结直肠癌病理诊断和分期的新要求[J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(4): 315-320.

[2] 王茜, 杨景玉, 曲锦, 等. 细胞周期相关激酶在大肠癌组织中的表达及其意义[J]. 中国病原生物学杂志, 2015(3): 228-231.

[3] Hollestein LM, van Herk-Sukel MP, Ruiter R, et al. Incident cancer risk after the start of aspirin use: results from a Dutch population-based cohort study of low dose aspirin users[J]. Int J Cancer, 2014, 135(1): 157-165. DOI: 10.1002/ijc.28634.

[4] Liu Y, Wu C, Galaktionov K. p42, a novel cyclin-dependent kinase-activating kinase in mammalian cells [J]. J Biol Chem, 2004, 279(6): 4507-4514. DOI: 10.1074/jbc.M309995200.

[5] Feng H, Cheng AS, Tsang DP, et al. Cell cycle-related kinase is a direct androgen receptor-regulated gene that drives β-catenin/T cell factor-dependent hepatocarcinogenesis[J]. J Clin Invest, 2011, 121(8): 3159-3175. DOI: 10.1172/JCI45967.

[6] Dong X, Huang Y, Kong L, et al. C35 is overexpressed in colorectal cancer and is associated tumor invasion and metastasis[J]. Biosci Trends, 2015, 9(2): 117-121. DOI: 10.5582/bst.2015.01057.

(收稿日期　2016-05-09)