



食管鳞癌RhoC和OPN蛋白的表达及其对患者预后的影响

食管癌是常见的恶性肿瘤之一，而恶性肿瘤的侵袭转移是导致患者死亡的主要原因。近年来的研究表明，RhoC(Ras homology C)和骨桥蛋白(OPN)在多种恶性肿瘤组织中的表达增高，它们与肿瘤细胞的侵袭转移有密切关系。本研究通过免疫组化方法检测食管鳞癌组织中RhoC和OPN蛋白的表达，探讨它们与食管鳞癌生物学行为之间的关系及其对食管鳞癌患者预后的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

选取我院胸外科1996~2004年手术切除并经病理证实的食管鳞癌80例，术前均未进行放化疗，随访28个月以上。死亡58例，尚生存22例。死亡者生存期1.5~63个月，平均17.2个月。其中，男性65例，女性15例，年龄38~84岁，平均59.25岁。所有标本均用10%甲醛固定，石蜡包埋切片，厚4 μ m。

1.2 方法

羊抗人RhoC多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司。HRP标记的兔抗羊IgG(二抗)购自武汉博士德生物工程有限公司。鼠抗人OPN单克隆抗体、二步法免疫组化检测试剂盒(PV-6002)和浓缩型DAB试剂盒购自北京中衫金桥生物技术有限公司。RhoC一抗工作浓度为1:100稀释，OPN一抗工作浓度为1:50稀释。采用免疫组化二步法：脱蜡，水化组织切片。3% H₂O₂去离子水孵育10 min，阻断内源性过氧化物酶。微波炉抗原热修复15 min，室温下冷却20 min，蒸馏水冲洗2 min \times 3次。滴加一抗，37 $^{\circ}$ C孵育2 h，PBS冲洗2 min \times 3次。滴加二抗，37 $^{\circ}$ C孵育25 min，PBS冲洗2 min \times 3次。DAB显色10 min，蒸馏水冲洗以终止反应。常规苏木素复染，脱水，透明，封片。以PBS代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判断

RhoC和OPN蛋白均表达于细胞质(呈棕黄色)。观察阳性反应采用双盲法，并由两位医师独立观察每张切片后一起做出判断。RhoC蛋白判断标准如下，(1)阴性(-)：胞质基本不着色；(2)阳性(+): 胞质出现黄色沉淀。OPN蛋白判断标准如下，(1)阴性(-)：胞质基本不着色；(2)弱阳性(+): 胞质出现浅黄色沉淀；(3)阳性(++): 胞质出现棕黄色沉淀；(4)强阳性(+++): 胞质出现棕褐色沉淀。

1.4 统计学处理

应作SPSS11.5统计学软件，肿瘤大小的比较采用t检验和方差分析，率的比较采用秩和检验(Kruskal Wallis和Wilcoxon W)，生存分析采用Ka-plan-Meier曲线法和Log Rank检验，RhoC蛋白和OPN蛋白表达的关系分析采用相关性分析。

2 结果

2.1 食管鳞癌组织中RhoC和OPN蛋白表达情况

有53例RhoC蛋白和80例OPN蛋白呈阳性表达(图1、2)，阳性表达率分别为66.25%和100%，其中OPN蛋白表达水平为(+)者43例，(++)者30例，(+++)者7例。

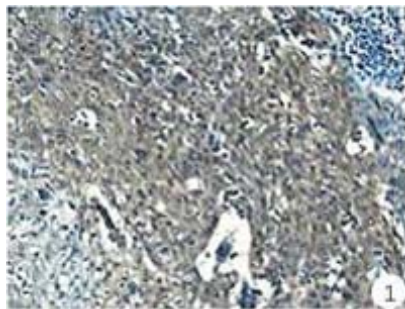


图1 食管鳞癌组织RhoC蛋白免疫组化染色

Fig.1 Expression of RhoC protein detected by immunohistochemical staining in esophageal squamous carcinoma (Original magnification: $\times 200$)

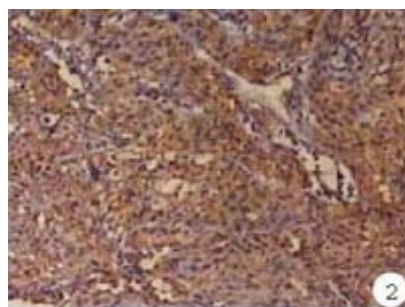


图2 食管鳞癌组织OPN蛋白免疫组化染色

Fig.2 Expression of OPN protein detected by immunohistochemical staining in esophageal squamous carcinoma (Original magnification: $\times 200$)

2.2 食管鳞癌组织中RhoC和OPN蛋白的表达与临床病理指标的关系

RhoC蛋白的表达与淋巴结转移有关($r_s = -2.115$, $P < 0.05$), 而与肿瘤大小、分化程度及TNM分期无关($P > 0.05$); OPN蛋白的表达水平与肿瘤的分化程度($\chi^2 = 10.766$, $P < 0.05$)及淋巴结转移有关($r_s = -2.289$, $P < 0.05$), 而与肿瘤大小、TNM分期无关($P > 0.05$)(表1)。

表1 RhoC和OPN蛋白在食管鳞癌组织中的表达及与临床病理指标的关系

Tab.1 Relation of RhoC and OPN protein expressions with the clinicopathology of the patients

Item	n	RhoC		P	OPN			P
		-	+		+	++	+++	
Tumor size (cm)		5.1 \pm 2.0	5.7 \pm 3.0	$P > 0.05$	5.1 \pm 2.3	5.9 \pm 2.9	6.3 \pm 4.2	$P > 0.05$
Differentiation				$P > 0.05$				
Well	43	17	26		30	12	1	$P < 0.05$
Moderate	24	7	17		8	13	3	
Poor	13	3	10		5	5	3	
TNM stage				$P > 0.05$				
Stage 1	2	2	0		2	0	0	$P > 0.05$
Stage 2	47	17	30		28	17	2	
Stage 3	23	6	17		9	10	4	
Stage 4	8	2	6		4	3	1	
Lymph node metastasis				$P < 0.05$				
No	43	19	24		28	13	2	$P < 0.05$
Yes	37	8	29		15	17	5	

2.3 食管鳞癌组织中RhoC和OPN蛋白的表达与患者术后生存时间的关系

RhoC蛋白阳性表达组患者的术后生存时间较阴性表达组短($P < 0.001$)；OPN蛋白的表达水平越高，患者的术后生存时间越短($P < 0.001$)，即RhoC和OPN蛋白的表达与患者术后生存时间均呈负相关性(图3、4)。

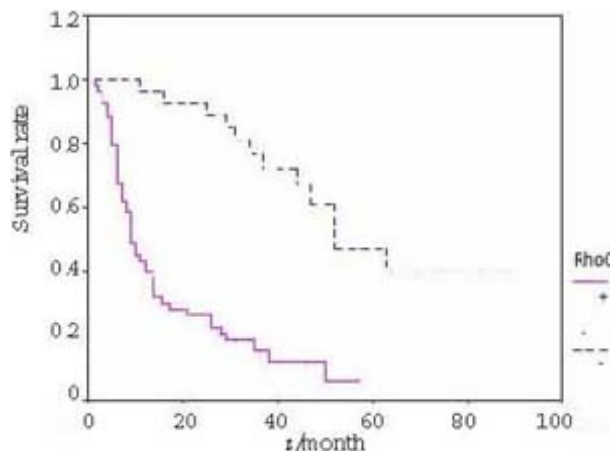


图3 食管鳞癌组织中RhoC蛋白的表达与患者术后生存时间的关系

Fig.3 Relationship between RhoC expression and the patients' survival time after operation

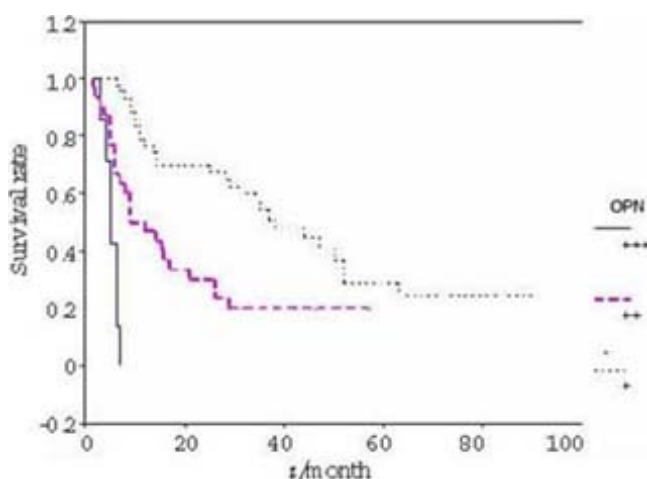


图4 食管鳞癌组织中OPN蛋白的表达与患者术后生存时间的关系

Fig.4 Relationship between OPN protein expression and the patients' survival time after operation

2.4 食管鳞癌组织中RhoC蛋白和OPN蛋白表达之间的关系

随着OPN蛋白表达水平的升高，RhoC蛋白阳性表达率也逐渐升高。关联性检验表明，两种蛋白表达之间存在正相关性($r_s = 0.408$, $P < 0.001$)。

3 讨论

3.1 RhoC蛋白对食管鳞癌患者临床预后的影响

RhoC是Ras基因超家族的一个成员，是细胞信号转导通路的重要分子。Madaule等[1]于1985年鉴定了Ras基因的一个新家族，即Rho基因。Rho参与肿瘤发生发展的许多环节，如调控细胞骨架和细胞周期、调节细胞黏附和细胞运动、影响细胞转化、参与调节肿瘤侵袭转移和肿瘤细胞生成等。RhoC通过调节肌动蛋白细胞骨

架来增强细胞迁移的能力, 在肿瘤的侵袭转移中发挥了更为突出的作用。Clark[2]等应用基因芯片技术研究发现, 当RhoC基因过表达时, 可增强黑色素瘤细胞的转移能力, 首次提出了RhoC基因可能是肿瘤浸润转移的分子开关的观点。研究表明RhoC在多种肿瘤组织中均有表达。Kleer[3]等研究发现在乳腺癌组织中, RhoC蛋白的高表达与淋巴结转移及较低的生存期有关。Yao[4]等在体外实验研究中发现, RhoC对于人前列腺癌PC-3细胞系的侵袭转移是必需的。Wang[5]等在胃癌组织中的研究发现RhoC基因的过表达与肿瘤的浸润及淋巴转移有关。本研究结果显示, RhoC蛋白的表达与淋巴结转移有密切关系, 阴性表达组患者的术后生存期明显比阳性表达组长, 提示RhoC蛋白在食管鳞癌的侵袭发展和淋巴转移中发挥了重要作用, RhoC蛋白的表达可以作为预示食管鳞癌患者临床预后的一项独立指标。Faried[6]等通过研究发现RhoA和RhoC蛋白均可增强人食管鳞癌细胞的增殖和浸润能力; 二者之中, RhoC促进细胞浸润转移的能力更强。与本研究结果一致。有关RhoC的研究已取得重大进展, 深入研究其在恶性肿瘤侵袭转移中的机制具有重大意义。RhoC有可能成为判断恶性肿瘤侵袭转移能力的独特指标, 为临床上判断恶性肿瘤患者预后提供有力帮助, 同时也为恶性肿瘤的治疗带来新的希望。

3.2 OPN蛋白对食管鳞癌患者临床预后的影响

OPN是一种具有多种功能的分泌型钙结合磷酸化糖蛋白, 1979年由Senger作为一种与恶性转化有关的磷酸化蛋白从骨基质中提取出来。OPN蛋白通过与其整合素受体和CD44受体结合, 而在肿瘤细胞的黏附、迁移、浸润, 血管新生以及肿瘤的微环境中起重要作用[7]。OPN蛋白作为一种细胞因子, 通过抑制细胞凋亡, 帮助肿瘤细胞逃避免疫系统的识别和破坏, 而促进肿瘤细胞的浸润和转移。近年研究发现在人类多种肿瘤组织以及肿瘤患者的血清中出现OPN蛋白过量表达或者其基因异常扩增的现象, 如乳腺癌、胃癌、非小细胞肺癌、大肠癌等[5]。Casson等[8]用Northern blot 和免疫组化方法对食管癌原位标本(腺癌19例、鳞癌6例)进行分析研究, 发现100%鳞癌和58%腺癌组织中OPN mRNA呈阳性表达。Shi-mada等[9]用酶联免疫测定法对103例食管鳞癌病人进行了术前血浆OPN蛋白水平的测定, 发现血浆OPN蛋白的水平与淋巴结转移有关, 但与肿瘤组织学类型和浸润深度无关, 高OPN蛋白水平组患者的总生存率比低OPN蛋白水平组差, 提示血浆OPN蛋白水平的测定有助于预测食管鳞癌的进展情况。本研究结果显示, OPN蛋白的表达与食管鳞癌的分化程度和淋巴结转移有密切关系, OPN蛋白的表达水平与食管鳞癌患者的临床预后呈负相关, 提示OPN蛋白在食管鳞癌的浸润转移中可能发挥重要作用, OPN蛋白的表达水平可作为预示食管鳞癌患者临床预后的一项指标。OPN蛋白及其受体可以被其抗体或合成的多肽所抑制[10]。OPN蛋白的受体CD44已经被用作多种肿瘤治疗的靶点, 包括细胞毒性试验和免疫治疗。因此, 深入研究OPN蛋白与食管鳞癌的关系将会为食管癌的治疗开拓新的途径。

3.3 RhoC蛋白和OPN蛋白在食管鳞癌组织中表达的相互关系

目前国内外尚无关于RhoC蛋白和OPN蛋白表达关系的研究。本研究发现, 食管鳞癌组织中RhoC蛋白和OPN蛋白的表达呈正相关, 提示两种蛋白在食管鳞癌淋巴结转移的过程中可能起到协同作用, 它们相互间的作用机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1]Madaule P, Axel R. A novel ras-related gene family[J]. Cell, 1985, 41(1): 31-40.
- [2]Clark EA, Golub TR, Lander ES, et al. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC[J]. Nature, 2000, 406(6795): 532-5.
- [3]Kleer CG, Griffith KA, Sabel MS, et al. RhoC-GTPase is a novel tissue biomarker associated with biologically aggressive carcinomas of the breast[J]. Breast Cancer Res Treat, 2005, 93(2): 101-10.
- [4]Yao H, Dashner EJ, van Golen CM, et al. RhoC GTPase is required for PC-3 prostate cancer cell invasion but not motility[J]. Onco-gene, 2006, 25(16): 2285-96.
- [5]Wang ZN, Xu HM, Jiang L, et al. Positive association of RhoC gene overexpression with tumour invasion and lymphatic metastasis in gastric carcinoma[J]. Chin Med J (Engl), 2005, 118(6): 502-4.

[6]Faried A, Faried LS, Kimura H, et al. RhoA and RhoC proteins promote both cell proliferation and cell invasion of human oesophageal squamous cell carcinoma cell lines in vitro and in vivo[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(10): 1455-65.

[7]Coppola D, Szabo M, Boulware D, et al. Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(1 Pt 1): 184-90.

[8]Casson AG, Wilson SM, McCart JA, et al. Ras mutation and expression of the ras-regulated genes osteopontin and cathepsin L in human esophageal cancer[J]. Int J Cancer, 1997, 72(5): 739-45.

[9]Shimada Y, Watanabe G, Kawamura J, et al. Clinical significance of osteopontin in esophageal squamous cell carcinoma: comparison with common tumor markers[J]. Oncology, 2005, 68(2-3): 285-92.

[10]Weber GF. The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy [J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1552(2): 61-85.

[回结果列表](#)