

食管鳞癌 RhoC 和 OPN 蛋白的表达及其对患者预后的影响

张惠忠, 刘金耿, 魏益平, 吴澄, 曹永科, 王梅 (中山大学附属第二医院心胸外科, 广东 广州 510120)

摘要:目的 研究食管鳞癌组织中 RhoC 和 OPN 蛋白的表达及其与食管鳞癌生物学行为之间的关系。方法 采用免疫组织化学方法(二步法)检测 80 例食管鳞癌组织中 RhoC 和 OPN 蛋白的表达情况, 探讨它们与食管鳞癌肿瘤大小、组织分化程度、TNM 分期、淋巴结转移和预后的关系。结果 (1)RhoC 蛋白在食管鳞癌组织中的阳性表达率为 66.25%, 其表达与淋巴结转移有关($r_s = -2.115, P < 0.05$), 而与肿瘤大小、组织分化程度和 TNM 分期无关($P > 0.05$); RhoC 蛋白阳性表达组患者的术后生存时间较阴性表达组短, ($P < 0.001$); (2)OPN 蛋白在食管鳞癌组织中的阳性表达率为 100%, OPN 蛋白的表达水平与组织分化程度($\chi^2 = 10.766, P < 0.05$)及淋巴结转移有关($r_s = -2.289, P < 0.05$), 而与肿瘤大小和 TNM 分期无关($P > 0.05$); OPN 蛋白的表达水平越高, 患者术后生存时间越短($P < 0.05$); (3)RhoC 蛋白和 OPN 蛋白在食管鳞癌组织中的表达之间存在正相关性($r_s = 0.408, P < 0.001$)。结论 食管鳞癌组织 RhoC 和 OPN 蛋白的表达与淋巴结转移情况及患者的预后密切相关, RhoC 蛋白和 OPN 蛋白可作为食管鳞癌预后评价的参考指标。

关键词:食管肿瘤; RhoC 蛋白; OPN 蛋白; 免疫组织化学; 淋巴结转移; 预后

中图分类号: R735.1 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)11-1612-04

Expressions of RhoC and osteopontin in esophageal squamous carcinoma and association with the patients' prognosis

ZHANG Hui-zhong, LIU Jin-geng, WU Yi-ping, WU Cheng, CAO Yong-ke, WANG Mei

Department of Cardiothoracic Surgery, Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China

Abstract: Objective To investigate the expressions of RhoC and osteopontin (OPN) protein in esophageal squamous carcinoma (ESC) and their association with the biological behavior of ESC. **Methods** The expressions of RhoC and OPN protein were detected in 80 ESC cases by immunohistochemistry. **Results** The positive expression rate of RhoC was 66.25% in these ESC cases. The rate was significantly higher in cases with lymph node metastasis than in those without ($r_s = -2.115, P < 0.05$), but RhoC expression was not associated with the tumor diameter, differentiation or TNM grade ($P > 0.05$). The RhoC-positive patients had significantly shorter survival time than the negative patients ($P < 0.001$). All the 80 ESC patients were positive for OPN expression, and OPN expression levels were correlated with the differentiation ($\chi^2 = 10.766, P < 0.05$) and lymph node metastasis of the tumor ($r_s = -2.289, P < 0.05$), but not with the tumor diameter or TNM grade ($P > 0.05$). Higher expression level of OPN was closely related to shorter survival time of the patients ($P < 0.05$). A positive correlation was found between RhoC protein and OPN expressions ($r_s = 0.408, P < 0.001$) in these cases. **Conclusion** The expressions of RhoC and OPN protein are closely related to lymph node metastasis of ESC and the patients survival time, and therefore may serve the purpose of prognostic evaluation of ESC.

Key words: esophageal neoplasm; RhoC; osteopontin; immunohistochemistry; lymph node metastasis; prognosis

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 μm 。

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

收稿日期: 2006-04-28

基金项目: 广东省重点科技攻关项目(2003B30104)

Supported by Key Science Research Project of Guangdong Province (2003B30104)

作者简介: 张惠忠(1963-), 男, 医学硕士, 副教授, 副主任医师, E-mail: zhhzhgd@163.com

通讯作者: 王梅, 电话: 020-81332295

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% H_2O_2 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℃孵育 2 h,PBS 冲洗 2 min \times 3 次。滴加二抗,37℃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 Kaplan-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。

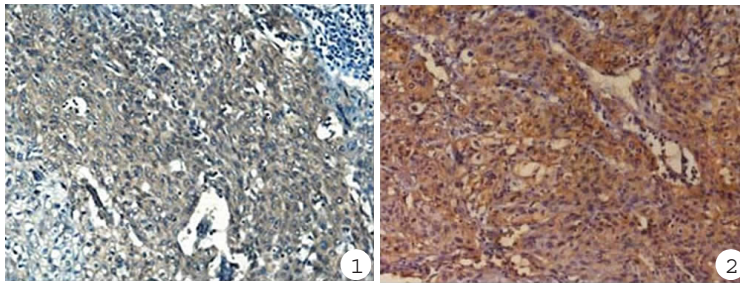


图 1 食管鳞癌组织 RhoC 蛋白免疫组化染色

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)。

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)。

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

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±2.0	5.7±3.0	P>0.05	5.1±2.3	5.9±2.9	6.3±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	

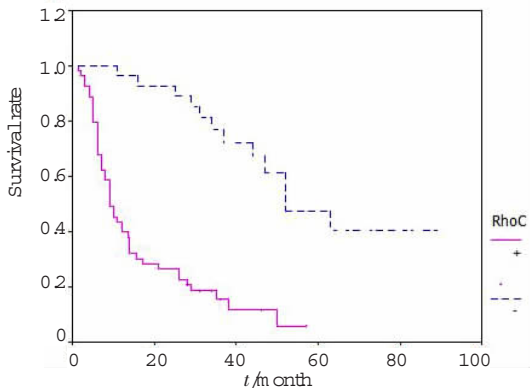


图 3 食管鳞癌组织中 RhoC 蛋白的表达与患者术后生存时间的关系

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

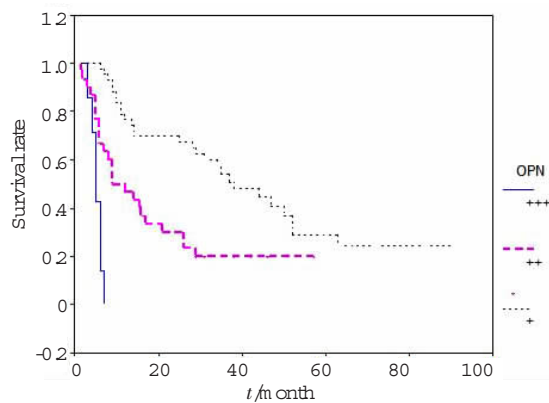


图 4 食管鳞癌组织中 OPN 蛋白的表达与患者术后生存时间的关系

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

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。Shimada 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。

(上接 1611 页)

蛋白的大量获得为研究该片段的功能和在抗感染免疫中的作用提供了重要的材料,并成为制备抗体的良好免疫原。此外,我们所制备的多克隆抗体可与天然表达 TLR2 细胞及转染 TLR2 的哺乳动物细胞结合。近来,有学者发现人肥大细胞上的 TLR2 活化后能促使细胞产生大量白三烯^[8],并导致肥大细胞脱颗粒和 IL-4、IL-5 的产生^[9],这些都提示 TLR2 在肥大细胞参与过敏性哮喘中发挥作用。这也提示抗 TLR-2 抗体有可能干预上述过程,可望为深入揭示过敏反应机制并探索新的控制方式另辟蹊径。在前期工作中,我们已制备了与 TSP-3 抗体所针对表位不同的 TSP-1 抗体,并用此抗体进行了有关过敏反应的研究,在后续工作中我们将探索针对不同位点抗 TLR-2 抗体对过敏反应的作用。

参考文献:

- [1] 富宁. Toll样受体与病原相关分子模式[J]. 上海免疫学杂志, 2001, 21 (4): 195-8.
- [2] Egil L, Timothy JS, Aatoshi Y, et al. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products[J]. J

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 carcinoma 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]. Oncogene, 2006, 25 (16): 2285-96.
- [5] Wang ZN, Xu HM, Jiang L, et al. Positive association of RhoC gene overexpression with tumor invasion and lymphatic metastasis in gastric carcinoma[J]. Chin Med J (Engl), 2005, 118 (6): 502-4.
- [6] Faried A, Faried LS, Kinura H, et al. RhoA and RhoC proteins promote both cell proliferation and cell invasion of human esophageal 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.

Biol Chem, 1999, 274 (47): 33419-23.

- [3] Matsuguchi T, Takagi K, Muskhacharen T, et al. Gene expressions of lipopolysaccharide receptors, toll-like receptors 2 and 4, are differentially regulated in mouse T lymphocytes[J]. Blood, 2000, 95 (4): 1378-85.
- [4] Sabroe I, Parker LC, Wilson AG, et al. Toll-like receptors: their role in allergy and non-allergic inflammatory disease[J]. Clin Exp Allergy, 2002, 32: 984-9.
- [5] Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses[J]. Nat Immunol, 2004, 10 (5): 987-95.
- [6] Jessica KB, Gregory ED, Cynthia AL, et al. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors[J]. Trends Immunol, 2003, 24 (10): 528-33.
- [7] Guangxun M, Aina G, Mario V, et al. Cellular recognition of tri/di-palmitoylated peptides is independent from a domain encompassing the N-terminal seven leucine-rich repeat (LRR)/LRR-like motifs of TLR2[J]. J Biol Chem, 2003, 278 (41): 39822-9.
- [8] McCurdy JD, O'Leary TJ, Maher LH, et al. Cutting edge: distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells[J]. J Immunol, 2003, 170: 1625-9.
- [9] Volanek S, Hiroko U, Akihiro N, et al. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity[J]. J Clin Invest, 2002, 109 (10): 1351-9.