

# 人脑胶质瘤中 RhoA 的表达及其临床意义

苗旺 刘晓东 范益民 赵和千 王宏勤 郝解贺

**【摘要】** **目的** 研究 RhoA 在人脑胶质瘤组织中的表达情况及其与病理分级的相关性,探讨 RhoA 在胶质瘤的诊断、恶性程度及预后判断中的临床意义。**方法** 采用 SABC 免疫组化法、RT-PCR 法对 53 例不同病理级别的星形细胞瘤及 9 例正常脑组织标本,进行 RhoA 蛋白和 RhoA mRNA 的检测。**结果** (1)免疫组化结果显示 53 例胶质瘤组织中 RhoA 蛋白表达全部呈阳性,对照组正常脑组织存在弱表达或不表达。(2)不同级别星形细胞瘤标本的 RhoA 阳性细胞率、RhoA mRNA 与 GAPDH mRNA 灰度比值均存在差异; I 级和 III、IV 级之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), III、IV 级 RhoA mRNA 表达均高于 I 级; II 级和 III、IV 级之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), III、IV 级 RhoA mRNA 表达均高于 II 级。(3)相关性分析:RhoA 阳性细胞率和 RhoA mRNA 表达量与胶质瘤病理分级均呈正相关性( $r = 0.875, r = 0.817, P < 0.001$ )。**结论** (1)RhoA 在所有已检测的胶质瘤标本中均存在表达,且表达程度与胶质瘤病理分级呈正相关。检测 RhoA 的 mRNA 和(或)蛋白的表达,可以作为胶质瘤诊断、判断预后的一个可靠指标。(2)RhoA 表达水平与肿瘤恶性程度呈正相关,提示我们可以将其作为星形细胞瘤 I ~ IV 级新的有效的诊断标记物,同时作为常规组织病理学的分级标准的补充。这将有助于描述肿瘤的生物行为特征,选择术后进一步的治疗方案。

**【关键词】** 神经胶质瘤; 免疫组织化学; 逆转录聚合酶链反应; RhoA

**Expression of RhoA in human glioma and its clinical significance** MIAO Wang, LIU Xiao-dong, FAN Yi-min, ZHAO He-qian, WANG Hong-qin, HAO Jie-he. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: WANG Hong-qin, Email: whq1968hq@163.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the expression of RhoA in human glioma and the correlation between RhoA's expression and pathological grade, furthermore, whose clinical significance would be discussed for diagnosing the glioma, judging the malignant grades and the patients' prognosis. **Methods** The expression of RhoA protein and RhoA mRNA were detected in 53 cases of human glioma samples and 9 cases of normal brain tissues by SABC immunohistochemical staining and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively. **Results** (1) The immunohistochemistry showed that the ratio of RhoA positive cells was 100% in all detected 53 human glioma samples while there was no expression in 9 normal brain tissue samples. (2) The ratio of RhoA positive cells and the gray degree ratios of the RhoA mRNA belt relative to the GAPDH mRNA belt varied accordingly to different pathologic grades. There were differences between grade I and grade III or grade IV ( $P < 0.05$ ), also existed between grade II and grade III or grade IV ( $P < 0.05$ ). The expressions of RhoA mRNA in grade III or grade IV were significantly more than those of grade I or grade II. (3) Analyses of correlation: The positive correlation existed between the ratio of RhoA positive cells or RhoA mRNA and the pathologic grading of the human glioma ( $r = 0.875, r = 0.817, P < 0.001$ ). **Conclusions** (1) RhoA was present in all 53 cases glioma samples, whose expression was correlate to grade positively. Detecting RhoA in the human glioma can be used for diagnosis, judging the glioma malignancy degree and the patients' prognosis. (2) Our findings suggested that RhoA may serve as novel and efficient diagnostic markers for astrocytic brain tumors of histological grade I to IV and complement for

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.09.010

基金项目: 山西省卫生厅科技攻关项目(20100224)

作者单位: 030001 太原,山西医科大学第一医院神经外科

通讯作者: 王宏勤, Email: whq1968hq@163.com

currently applied histopathological analysis. It will contribute to characterizing tumors biological behavior and choosing therapeutic approach following surgery.

**【Key words】** Glioma; Immunohistochemistry; Reverse transcriptase polymerase chain reaction; RhoA

人脑星形细胞瘤是最常见且恶性度极高的颅内肿瘤。对于该肿瘤治疗方法的优化选择、预后判断以及肿瘤等级确立一直是神经外科领域的研究热点。目前该肿瘤的诊断主要根据组织病理学的分析,而传统病理学由于诊断时存在主观性,不同的观察者所得结论不尽一致。因此寻找对于星形细胞瘤的分级和预后能够提供参考的客观的分子标记物,将对诊断病理学有着重要的作用。

RhoA 是一种小分子 GTP 酶蛋白,参与肿瘤细胞多种功能<sup>[1]</sup>。现已发现 RhoA 在人类多种肿瘤中存在过表达<sup>[2]</sup>。但目前国内外在颅内疾病中研究较多的是其与缺血性脑卒中、蛛网膜下腔出血、神经纤维损伤修复等的关系,其与胶质瘤的相关性研究国内外文献报道较少。本研究采用免疫组化和 RT-PCR 法对 53 例胶质瘤标本行 RhoA 蛋白和 RhoA mRNA 检测,以期探讨 RhoA 在胶质瘤的诊断、恶性程度及预后判断中的作用。

## 资料和方法

1. 一般资料:标本采自山西医科大学第一医院病理科 2009 年 10 月至 2010 年 10 月均以临床、手术及病理确诊为胶质瘤的病例,共 53 例,均为原发,有详细的临床资料和手术记录,术前均未接受放疗和化疗。男女比例为 1.5:1;年龄为 19~73 岁。按 WHO(2000)神经上皮肿瘤分类标准对胶质瘤组织标本进行组织学分级,其中:I 级 11 例,II 级 13 例,III 级 20 例,IV 级 9 例。对照组 9 例标本取自急性颅脑损伤患者行内减压术切除的脑组织。

2. 实验试剂:一抗(兔抗人 IgG 型多克隆 RhoA 抗体)、二抗(过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG)、RT-PCR 试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司,其中一抗工作浓度为 1:100。细胞总 RNA 提取试剂盒、SABC 试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。引物由上海生工生物工程有限公司合成;反转录酶购自 Gibco 公司;DNA marker 购自美国 MBI 公司。

3. SABC 免疫组化法:所有组织标本切片脱蜡至水,过氧化氢室温孵育,正常山羊血清封闭后,滴加一抗工作液 4℃ 过夜,再加入二抗、复合物 SABC,孵育,DAB 显色,苏木素复染,树胶封片,光镜下观察。设磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗为空白对照。免疫组化染色结果判断:胞质内出现棕黄色或棕褐色颗粒为 RhoA 阳性细胞。观察整个切片,在 ×200 倍下,每张切片随机取 10 个视野,以阳性细胞比例的平均值定义为该肿瘤的阳性细胞率。

4. RT-PCR 检测 RhoA mRNA 的表达:(1)引物序列:RhoA 上游 5'-CTGGTGATTGTTGGTGATGG-3',下游 5'-GCGATCATAATCTTCCTGCC-3',扩增长度 183 bp;GAPDH 作为内参:上游 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3',下游 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGGA-3',扩增长度 307 bp。(2)组织总 RNA 的提取:使用 Trizol 试剂提取组织总 RNA,紫外分光光度计检测其浓度、纯度,所得  $A_{260/280}$  均在 1.7~2.0。(3)cDNA 制备及 PCR 扩增:取适量总 RNA 反转录成 cDNA,并以其为模板行扩增反应,RhoA 与 GAPDH 反应同管进行。(4)反应条件:95℃ 预变性 5 min,然后 94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 30 s,共 32 个循环。取扩增产物行凝胶电泳,紫外线照射仪上观察结果,扫描保存。

5. 统计学分析:结果以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 13.0 软件对数据行单因素方差分析,多重比较采用 LSD 法,相关性分析采用 Spearman 秩相关分析, $P < 0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 结 果

1. RhoA 在胶质瘤组织中的表达情况及与胶质瘤临床病理级别的关系:RhoA 阳性表达为位于细胞质的棕黄色或者褐色颗粒,胞核未见染色。RhoA 在 I、II、III、IV 级别中均有表达,且随着级别增高,染色程度加深、面积增加,而在对照组中没有或者弱表达(图 1)。RhoA 在正常脑组织和不同病理级别脑胶质瘤中的免

免疫组化阳性细胞率结果显示: I级 $[(0.64 \pm 4.01)\%]$ 和II级 $[(1.36 \pm 7.27)\%]$ 之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), I级和III级 $[(11.97 \pm 2.53)\%]$ 、IV级 $[(18.85 \pm 8.50)\%]$ 之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), II级和III、IV级之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), III级和IV级之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。胶质瘤病理级别越高,阳性细胞率越高,IV级胶质瘤中RhoA阳性细胞率明显高于其他级别。

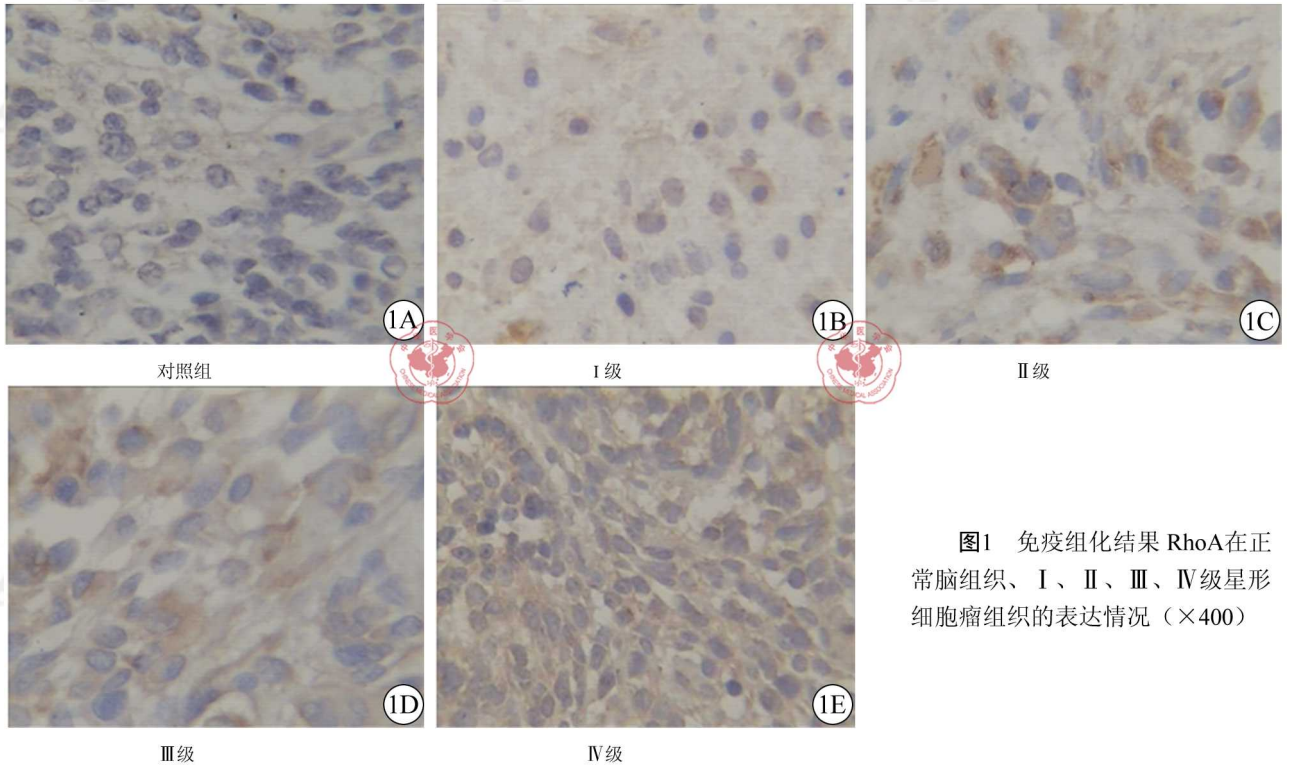


图1 免疫组化结果 RhoA在正常脑组织、I、II、III、IV级星形细胞瘤组织的表达情况( $\times 400$ )

对各组胶质瘤临床病理级别与RhoA阳性细胞率应用Spearman秩相关分析得出: $r = 0.875, P < 0.001$ ,证实RhoA阳性细胞率与胶质瘤临床病理分级呈正相关。

2. RhoA mRNA在各级别胶质瘤组织中的表达情况及与临床病理级别的关系:扩增后,RT-PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,电泳条带结果如图2所示。计算胶质瘤组织标本RhoA mRNA与GAPDH mRNA灰度值的比值,结果显示: I级 $(0.32 \pm 0.12)$ 和III级 $(0.68 \pm 0.15)$ 、IV级 $(0.97 \pm 0.28)$ 之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), III、IV级RhoA mRNA表达高于I级; II级 $(0.41 \pm 0.14)$ 和III、IV级之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), III、IV级RhoA mRNA表达高于II级。其余各组RhoA mRNA表达差异无统计学意义。

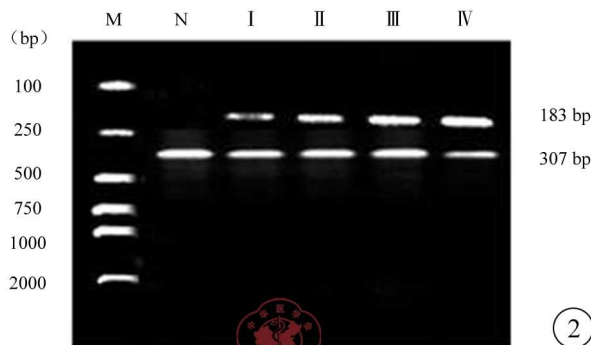


图2 RT-PCR检测结果 RhoA mRNA在正常脑组织、I、II、III、IV级星形细胞瘤的表达情况: RhoA产物为183 bp, GAPDH产物为307 bp; M: marker; N: 对照组正常脑组织; I、II、III、IV: I~IV级星形细胞瘤

对胶质瘤患者的临床病理分级与 RhoA mRNA 表达量应用 Spearman 秩相关分析得出:  $r = 0.817, P < 0.001$ 。证实 RhoA mRNA 表达量与胶质瘤病理分级成正相关。

## 讨 论

人脑胶质瘤是颅内最常见且恶性度非常高的恶性肿瘤,致死、残率极高。由于肿瘤的过度增殖、侵袭性、浸润性的生长方式,导致肿瘤不能全切且易复发。不同级别的星形细胞瘤患者中位生存期相差很大,治疗方法也不相同。而治疗方法的选择取决于诊断的精确性。目前星形细胞瘤的诊断主要决定于传统组织病理学的分析。因此,寻找对于星形细胞瘤的分级和预后能够提供参考的客观的分子标记物,明确其与星形细胞瘤的相关程度,将有助于更好地描述肿瘤的生物特征,提高诊断的质量,指导治疗方案的制定。

胶质瘤的发生发展、增殖分化、侵袭转移等各种生物学行为均以胶质瘤细胞骨架的活动变化为基础。RhoA 是 Rho 蛋白家族的一个成员。而 Rho 是一组主要与细胞骨架调节相关的 GTP 酶<sup>[3]</sup>;与 Ras 相似,Rho 蛋白在活化的结合态 GTP 与失活态 GDP 之间转化。RhoA 蛋白在调节细胞骨架、细胞分裂、细胞增殖、细胞凋亡、细胞转录、细胞转化及恶性肿瘤细胞的浸润转移等多个方面发挥着重要作用<sup>[4]</sup>。研究发现,RhoA 在头颈癌<sup>[5]</sup>、胃癌<sup>[6]</sup>、肝癌<sup>[7]</sup>、乳腺癌、肺癌<sup>[2]</sup>、结肠癌<sup>[8]</sup>、膀胱癌、卵巢癌<sup>[9]</sup>及睾丸癌<sup>[10]</sup>等多种恶性肿瘤中表达异常增高。

本研究从基因和蛋白水平上利用 RT-PCR 和免疫组化方法分别检测 RhoA 的表达水平,发现 RhoA mRNA 和 RhoA 蛋白在病理高级别组高表达,低级别组低表达,这与 Yan 等<sup>[11]</sup>研究 28 例人脑星形细胞瘤中 RhoA 蛋白的表达情况所得结果相一致。此外,本研究也证实 RhoA mRNA 表达量和 RhoA 阳性细胞率均与胶质瘤病理分级成正相关( $r = 0.817, r = 0.875, P < 0.001$ )。这说明 RhoA 的表达量越多提示胶质瘤的恶性程度越高。而恶性程度高的患者预后较差且术后易复发,说明检测 RhoA 的表达可以作为肿瘤预后判断的可靠指标。因此,检测 RhoA 的表达情况可以为胶质瘤的诊断、病理级别及其预后情况的判断提供客观依据。

但也存在与此相反的研究结果,Forget 等<sup>[12]</sup>用 Western blot 技术分析了 24 例人脑星形胶质细胞瘤中 RhoA 和 RhoB 的表达,发现 RhoA 和 RhoB 的蛋白表达水平与肿瘤的病理分级呈负相关。这一结果可能与其选择样本量较少有关。此外,RhoA 的异常表达对恶性肿瘤的侵袭和转移也具有非常重要的意义。王德盛等<sup>[13]</sup>将 RhoA 基因转染 QZG 肝细胞系后发现其体外侵袭能力显著增强。

综上所述,RhoA 在不同恶性程度的胶质瘤标本中均存在表达,且表达程度与胶质瘤病理分级呈正相关,提示 RhoA 可能成为一种新的有效的肿瘤标志物。将其表达程度的检测与常规组织病理学结合,将有助于判断肿瘤的恶性程度、描述其生物学特征、估计患者预后情况以及选择正确的治疗方式。因此,通过基因沉默或者靶向药物抑制其作用,将可能成为一种切实可行的抗癌策略。

## 参 考 文 献

- [1] Ellenbroek SI, Collard JG. Rho GTPases; functions and association with cancer. Clin Exp Metastasis, 2007, 24: 657-672.
- [2] Fritz G, Just I, Kaina B. Rho GTPases are over-expressed in human tumors. Int J Cancer, 1999, 81: 682-687.
- [3] Aspenstrom P. The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton. Exp Cell Res, 1999, 246: 20-25.
- [4] Fukata M, Nakagawa M, Kaibuchi K. Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. Curr Opin Cell Biol, 2003, 15: 590-597.
- [5] Abraham MT, Kuriakose MA, Sacks PG, et al. Motility-related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer. Laryngoscope, 2001, 111: 1285-1289.
- [6] 刘娜, 毕锋, 潘阳林, 等. RhoA 在胃癌细胞中的表达及其作用. 中华肿瘤杂志, 2004, 1: 28-31.
- [7] 薛妍, 毕锋, 刘文超, 等. 缺氧状况下 Rho GTPases 的表达和活性变化及其与肿瘤血管生成关系的研究. 中华肿瘤杂志, 2004, 26: 517-520.
- [8] 潘阳林, 毕锋, 刘娜, 等. Rac 亚家族在胃肠道肿瘤细胞系中的表达及活性. 中华肿瘤杂志, 2003, 25: 441-444.
- [9] Horiuchi A, Imai T, Wang C, et al. Up-regulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma. Lab Invest, 2003, 83: 861-870.

- [10] Kamai T, Arai K, Tsujii T, et al. Overexpression of RhoA mRNA is associated with advanced stage in testicular germ cell tumour. *BJU Int*, 2001, 87:227-231.
- [11] Yan B, Chour HH, Peh BK, et al. RhoA protein expression correlates positively with degree of malignancy in astrocytomas. *Neurosci Lett*, 2006, 407:124-126.
- [12] Forget MA, Desrosiers RR, Del M, et al. The expression of rho proteins decreases with human brain tumor progression: potential tumor markers. *Clin Exp Metastasis*, 2002, 19:9-15.
- [13] 王德盛, 李郁, 杨薛康, 等. RhoA 基因转染对 QZG 肝细胞生物学行为的影响及其机制的研究[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2009, 3:1628-1635.

(收稿日期:2011-03-17)

(本文编辑:戚红丹)

苗旺, 刘晓东, 范益民, 等. 人脑胶质瘤中 RhoA 的表达及其临床意义[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2011, 5(9):2549-2553.