

肺癌和乳腺癌组织中 RhoE 的表达及其临床意义

· 临床研究 ·

朱亚杰 许峰 周继陶 刘素蕊 黄娟 罗德云 邱萌 金伯泉 毕锋

【摘要】 背景与目的 Rho 家族蛋白与肿瘤细胞的生长、分化、转移有着密切的关系。本研究通过观察 RhoE 在肺癌、乳腺癌以及相应癌旁组织中的表达情况及其与临床病理分级的关系,为探索 RhoE 的生物学功能和临床意义提供依据。方法 运用免疫组化 SABC 法检测 62 例肺癌和 34 例乳腺癌及相应癌旁组织中 RhoE 的表达水平。结果 RhoE 在乳腺和肺正常组织中普遍表达,但在肿瘤组织表达低下或缺失,而且这种差异在乳腺组织中要高于肺组织。RhoE 在乳腺癌组织中的染色平均值为 3.65 ± 0.62 ,在相应癌旁组织中为 10.53 ± 0.44 ,明显高于肿瘤组织($t=12.402, P<0.001$);在肺癌组织中的染色平均值为 2.19 ± 0.19 ,在癌旁组织中为 4.11 ± 0.24 ,高于相应肿瘤组织 ($t=7.123, P<0.005$),并且随着肿瘤分化程度的降低染色强度有下降的趋势 ($\chi^2=26.536, P<0.005$)。结论 RhoE 在肿瘤组织中表达下降,结合前期实验结果及国外新近的研究成果,可以认为 RhoE 在肺癌和乳腺癌的发生发展中具有明显的负调控作用,因此对 RhoE 进行进一步研究将为肿瘤的分子靶向治疗提供新的靶点。

【关键词】 RhoE 乳腺癌 肺癌 抑癌基因

【中图分类号】 R734.2 DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2008.01.019

Expression of RhoE in lung and breast cancer and its clinical significance ZHU Yajie, XU Feng, ZHOU Jitao, LIU Surui, HUANG Juan, LUO Deyun, QIU Meng, JIN Boquan, BI Feng. Department of Abdominal Cancer, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China

Corresponding author: BI Feng, E-mail: bifeng@medmail.com.cn

【Abstract】 Background and Objective Rho family is closely related with the growth, differentiation and metastasis of tumor cells. The objective of this work is to investigate the expression of RhoE in lung and breast carcinoma and their corresponding adjacent tissues, as well as its relationship between the expression and clinical pathological grades. The results of this study provide evidences for exploring the biological functions and clinical significance of RhoE. Methods The expression of RhoE was detected by immunohistochemistry in 62 lung carcinoma samples and 34 breast carcinoma samples, and their corresponding adjacent tissues were taken as control. Results RhoE was generally expressed in normal tissues, but the expression level of RhoE in cancerous tissues was decreased or absent. The stained value of breast carcinoma was 3.65 ± 0.62 , but the adjacent cancerous tissues was 10.53 ± 0.44 , significantly higher than that of the adjacent cancerous tissues ($t=12.402, P<0.001$). While the stained value of lung carcinoma was 2.19 ± 0.19 , lower than that of the adjacent cancerous tissues ($4.11 \pm 0.24, t=7.123, P<0.005$). Moreover, there is a declining tendency of the stained value as the poor differentiation of the carcinoma ($\chi^2=26.536, P<0.005$). Conclusion The expression of RhoE in cancerous tissues was remarkably decreased. Considering the recent research achievement and our early experimental results about RhoE, we inferred that RhoE may play a negative role in the development and progression of lung and breast carcinoma. So further research on RhoE would provide a new target for the molecular targeting therapy of cancer.

【Key words】 Human RND-3 protein Breast neoplasms Lung neoplasms Tumor suppressor gene

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (to BI Feng) (No. 30470789, 30672378).

Rho 家族蛋白是重要的信号分子,通过对细胞骨架的重组,控制着细胞迁移、浸润和转移;通过对细胞生长周期的调控与细胞的生长、分化相联系^[1]。Rho 家族

本研究受国家自然科学基金(NO.30470789, 30672378)资助

作者单位:610041 四川大学华西医院腹部肿瘤科/信号转导及分子靶向治疗研究室(朱亚杰、许峰、周继陶、刘素蕊、黄娟、罗德云、邱萌、毕锋); 710032 西安,第四军医大学免疫学教研室(金伯泉)(通讯作者:毕锋, E-mail: bifeng@medmail.com.cn)

成员一般都有与 GTP 结合的活性状态和与 GDP 结合的非活性状态。最具有代表性的 Rho 家族成员是 Rho (A,B,C), Rac(1,2,3)和 Cdc42^[2]。RhoE 是 Rnd 家族的一员, Rnd 亚家族与 Rho 家族蛋白不同之处在于它们可以结合但不能水解 GTP^[3-5]。此外, RhoE C 端是 farnesyl group 修饰的^[5],而其他绝大多数 Rho 家族蛋白是 geranylgeranyl group 修饰的,这种结构上的特异性决定

了 RhoE 功能上的独特性。目前研究显示 RhoE 很可能是一种新的抑癌基因, 而且在前期实验研究中也发现: RhoE 在正常组织中的表达明显高于在肿瘤组织中的表达, 因此对这一现象及其临床意义做了进一步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料 预实验收集 2006 年 2 月-2006 年 12 月华西医院手术切除并经病理学检查证实的肺癌、乳腺癌标本各 20 例, 肺癌为男 10 例, 女 10 例, 年龄 30 岁-75 岁, 分级不限; 乳腺癌 20 例, 年龄 33 岁-78 岁, 分级不限。每例标本均须癌组织和相应的癌旁组织(距离肿瘤组织 1.5cm 以上)做对照。另选前列腺正常组织(包括前列腺增生)10 例作阳性对照。正式实验采用组织芯片, 购于陕西超英生物科技有限公司, 肺癌 62 例, 乳腺癌 34 例, 每例均包括肿瘤组织和同一病人的癌旁组织。临床资料: 肺癌, 62 例, 男 50 例, 女 12 例; 年龄 39-77 岁, 平均年龄 55 岁; 按 WHO 肿瘤分类标准, I 级(高分化)3 例, II 级(中分化)15 例, III 级(低分化)36 例, IV 级(未分化)8 例。乳腺癌, 34 例, 年龄 21-78 岁, 平均年龄 46 岁。

1.2 切片制备 ① 标本 合理取材后用 4% 多聚甲醛固定, 梯度酒精脱水, 二甲苯浸泡后石蜡包埋; ② 切片 用含强酸和高锰酸钾的洗液浸泡 24 小时, 冲洗, 凉干, 再用 APES 处理; ③ 制片 制 4μm 的组织切片贴于载玻片上, 60℃ 烘箱过夜, 常温保存备用。各取 5 例做 HE 染色, 供形态学观察。

1.3 免疫组化检测

1.3.1 试剂与方法 采用免疫组织化学 SP 法。一抗 RhoE 鼠抗人多克隆抗体由第四军医大学免疫学教研室金伯泉教授制备并惠赠, SP 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司, DAB 购自美国 Pierce 公司。一抗工作液浓度 1:80。常规切片和组织芯片采用相同的免疫组化方法。石蜡切片常规脱蜡水化, 用 PH6.0 的柠檬酸缓冲液进行微波抗原修复, 之后严格按照试剂盒说明书进行。滴加一抗 4℃ 过夜, 次日滴加二抗和酶标抗体, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水, 透明中型树胶封片, 显微镜下观察。用已知的正常前列腺组织切片作为阳性对照, PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3.2 免疫组化结果判定 RhoE 阳性细胞表现为胞浆呈现棕黄色。结果判定: 随机选取 5 个高倍镜 (400) 视野, 根据每个视野中阳性细胞数占总上皮细胞数的百分比和染色深浅进行评分。阳性细胞数: <1% 为阴性(0 分), 2%-25%(1 分), 26%-50%(2 分), 51%-75%(3 分), >75%(4 分); 染色深浅: 无染色记 0 分, 弱染色记 1 分, 中等强度染的记 2

分, 强染色记 3 分。二者相乘得总分, 根据总分结果将所有病例分为阴性 (-) 0-1 分; 轻度阳性 (+) 2-4 分, 中度阳性(++) 5-8 分, 强阳性(+++) 9-12 分。

1.3.3 统计学分析 采用 SPSS11.0 统计软件包进行分析。染色均值的比较采用配对 t 检验, 肿瘤分级与染色强度的相关性采用 χ^2 检验中的行和列表关联性分析, 率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 RhoE 在肺癌中的表达 62 例肺癌组织中, RhoE 在正常组织中阳性表达 58 例, 阳性率为 93.5%, 而在相应的 62 例肿瘤组织组织中 RhoE 表达阳性仅 44 例, 阳性率 71.0%, 两者比较差异有统计学意义($\chi^2=10.831, P<0.005$) (表 1); RhoE 在肺癌组织中的染色平均值为 2.19 ± 0.19 , 在相应癌旁组织中为 4.11 ± 0.24 高于相应肿瘤组织 ($t=7.123, P<0.005$) (表 2); 并且 RhoE 阳性表达的染色强度与肿瘤的分化程度具有相关性($\chi^2=26.536, P<0.005$) (表 3)。

表 1 RhoE 在肺癌和癌旁组织中的表达(n,%)

Tab 1 Expression levels of RhoE in lung carcinoma and the adjacent cancerous tissues

Item	Negative(n,%)	Positive(n,%)	Total
Adjacent tissues	4(6.5%)	58(93.5%)	62
Cancer tissues	18(29.0%)	44(71.0%)	62
Total	22	102	124

$\chi^2=10.831, P<0.005$

表 2 RhoE 在肺癌和癌旁组织中的染色均值(Mean±SD)

Tab 2 Mean value of RhoE in lung carcinoma and the adjacent cancerous tissues(Mean±SD)

Item	Samples	Mean±SD
Adjacent tissues	62	4.11± 0.24
Cancer tissues	62	2.19±0.19

$t=7.123, P<0.005$

表 3 RhoE 表达与肺癌组织分级的相关关系

Tab 3 Relationship between expression levels of RhoE and differentiation of lung carcinoma

Grade	Staining intensity			Total
	-	+	++	
Normal	4	37	21	62
Grade I	1	2	0	3
Grade II	5	10	0	15
Grade III	10	25	1	36
Grade IV	2	5	1	8
Total	22	79	23	124

$\chi^2=26.536, P<0.005$

2.2 RhoE 在乳腺癌中的表达 34 例乳腺癌组织标本中, RhoE 在正常组织中阳性率达 100%, 而在相应的 34 例肿瘤组织中 RhoE 表达阳性仅 20 例, 阳性率 58.8%, 两者比较差异有统计学意义($\chi^2=17.630, P<0.005$) (表 4); RhoE 在 34 例乳腺癌组织中的染色平均值为 3.65 ± 0.62 , 在相应癌旁组织中为 10.53 ± 0.44 , 明显高于相应肿瘤组织($t=12.402, P<0.001$) (表 5)。

表 4 RhoE 在乳腺癌和癌旁组织中的表达

Tab 4 Expression levels of RhoE in breast carcinoma and the adjacent cancerous tissues

Item	Negative(n,%)	Positive(n,%)	Total
Adjacent tissues	0(0.0%)	34(100.0%)	34
Cancer tissues	14(41.2%)	20(58.8%)	34
Total	14	54	68

$\chi^2=17.630, P<0.005$

表 5 RhoE 在乳腺癌和癌旁组织中的染色均值(Mean±SD)

Tab 5 Mean value of RhoE in breast carcinoma and the adjacent cancerous tissues(Mean±SD)

Item	Samples	Mean±SD
Adjacent tissues	34	10.53 ± 0.44
Cancer tissues	34	3.65 ± 0.62

$t=12.402, P<0.001$

2.3 免疫组化图片 RhoE 主要定位于胞浆, 图中可见棕黄色颗粒弥漫分布, 并且可见正常组织中 RhoE 的表达明显高于相应癌旁组织。肺癌(图 1, 2), 乳腺癌(图 3, 4)。

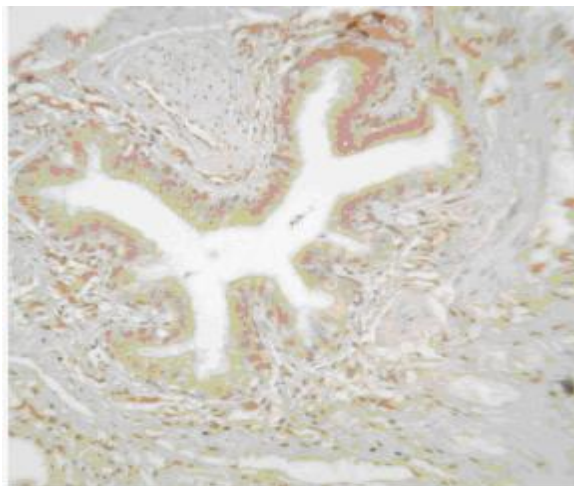


图 1 肺正常组织, RhoE 表达较高, 可见腺体胞浆中棕黄色颗粒弥漫分布 (SP 法, 原始放大倍数×400)

Fig1 Expression of RhoE in lung adjacent cancerous tissues is higher than the carcinoma. The positive staining of RhoE lies in the cytoplasm and takes on brown particle (SP method, original magnification ×400)

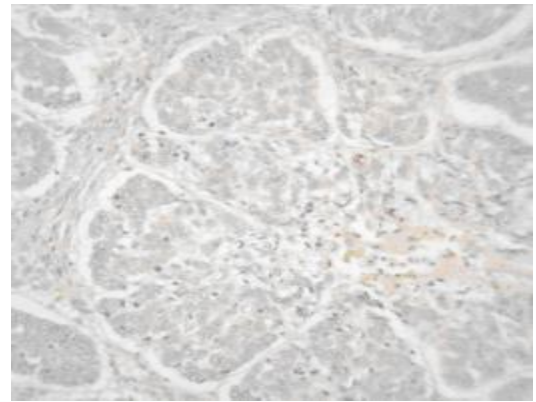


图 2 低分化鳞癌, RhoE 在肺癌组织中表达下降 (SP 法, 原始放大倍数 ×400)

Fig2 Expression of RhoE in lung cancerous tissues is decreased (SP method, original magnification ×400)

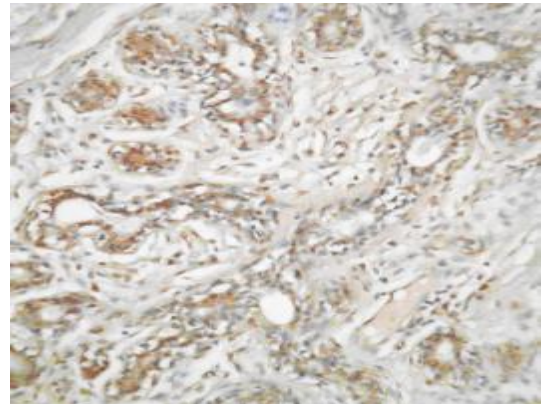


图 3 乳腺正常组织, RhoE 明显表达, 可见腺体胞浆中棕黄色颗粒弥漫分布 (SP 法, 原始放大倍数 ×400)

Fig3 Expression of RhoE in breast adjacent cancerous tissues is much higher than the carcinoma. The positive staining of RhoE lies in the cytoplasm and takes on brown particle (SP method, original magnification ×400)

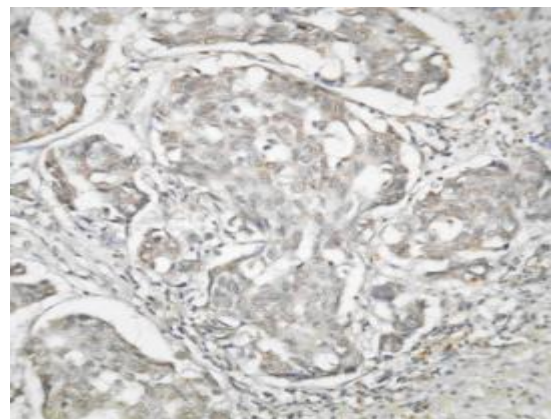


图 4 非特殊性浸润性导管癌, RhoE 在乳腺癌组织中表达明显下降 (SP 法, 原始放大倍数 ×400)

Fig4 Expression of RhoE in breast cancerous tissues is significantly decreased (SP method, original magnification ×400)

3 讨论

肿瘤发生与发展是一个多因素作用、多基因参与和经过多个阶段才最终形成的极其复杂的生物学现象。在大多数人类肿瘤细胞的发生发展过程中癌基因的表达往往是上调的,而抑癌基因表达下调甚至缺失,通过对癌基因、抑癌基因产物功能的分析,发现这类分子大多位于正常细胞信号转导通路的不同部位,例如生长因子、生长因子受体、G 蛋白、胞质内激酶和核内转录因子等,因此这就为肿瘤的治疗提供了潜在的靶点。Ras 超家族包括有 Ras 家族、Rho 家族、Rab 家族、Ran 家族以及 Arf/Sar 家族,其中 Rho 家族是 Ras 超家族中与肿瘤关系最密切的家族,主要与细胞的生长、分化、迁移、转移有关。这些重要的生物学功能注定了它们与肿瘤的发生和发展有着不可分割的关系。^[6,7]Rho 家族从氨基酸序列,基因结构基序,以及生物学功能上可分为以下几个亚家族:RhoA 亚家族(RhoA, RhoB 和 RhoC)、Rac1 亚家族(Rac1, Rac2, Rac3 和 RhoG)、Cdc42 亚家族(Cdc42, 脑特异性 C-末端剪接变体 G25K, TC10, TCL, Chp/Wrch-2, Wrch-1)、Rnd 亚家族(Rnd1, Rnd2, RhoE/Rnd3)、RhoBTB 亚家族等。RhoE 是 Rho 家族比较独特的一个分子,它在 1996 年被 Rosemary Foster 首次鉴定并命名。RhoE 是法尼基(farnesyl)修饰的,表达很广泛,但它在不同的细胞中表达水平有很大的差别^[45]。对于其功能目前研究表明 RhoE 通过与 ROCK1 结合阻止 RhoA 下游分子的磷酸化而达到拮抗 RhoA 的作用;通过与 ROCK1 单独作用可以阻止 cyclinD1 而抑制细胞的增值^[8],但同时也有报道显示 RhoE 具有不依赖 ROCK1 而调节细胞周期的作用,并且发现 RhoE 并不能阻止生长因子引发的早期信号传导过程,例如 PKB(蛋白激酶 B)/Akt, RhoA 和 Rac1 的活化^[9]。然而 RhoE 可以通过抑制 ERK 的活化下调 cyclinD1 的表达,从而导致 Rb 的磷酸化水平下降进而引起细胞凋亡,由于 cyclinD1 对于细胞周期的增殖起着至关重要的作用,因此这也充分显示了 RhoE 的功能^[10]。传统的 Rho 家族蛋白像分子开关一样在 Rho-GTP(活性形式)和 Rho-GDP(非活性形式)两种状态转换进而发挥生物学功能,并且在肿瘤细胞中过度表达或过度活化^[11],例如 RhoA, Rac1, Cdc42 等。但是 RhoE 所属的 Rnd 亚家族具有与 Rho 家族蛋白不同的生物学特性,它缺乏内源性 GTP 酶活性,因此在细胞总是保持活性状态^[12],这也说明 RhoE 的活性主要取决于它的表达水平^[4]。在此,使用免疫组化的方法检测

了肿瘤和癌旁组织中 RhoE 的表达水平,以此推测 RhoE 在肿瘤发生发展中潜在的作用。实验结果显示 RhoE 在癌旁组织的表达明显高于肿瘤组织,并且染色强度与肿瘤的分化程度具有相关性 ($\chi^2=26.536$, $P<0.005$)。这与之前预测 RhoE 可能是一种重要的抑癌基因的推断相符合。如前所述,Rho 家族分子 RhoA 是一个重要的癌基因,而 RhoE 对其具有拮抗作用。并且,有研究表明 RhoA 在正常肺组织中表达很弱甚至没有表达,而在肿瘤组织中的表达明显增强^[13]。这也从另一方面肯定了我们的假设,RhoE 很可能作为一种抑癌基因在肿瘤的发生发展中具有重要作用,从而也为肿瘤的治疗开辟新的思路。

此实验是首次应用组织芯片技术对 RhoE 的表达进行临床病理研究,为进一步研究 RhoE 对肿瘤负性调控作用的分子机制奠定了病理学基础。RhoE 在肿瘤组织中表达的降低进一步证实了肿瘤发生发展的复杂性,因此深入研究 RhoE 在肿瘤中的具体作用及其信号转导机制,将为今后了解肿瘤发生发展的分子机制提供重要的帮助,也将为肿瘤的治疗提供新的理论依据和选择方向。

参 考 文 献

- Burrige K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell*, 2004, 116(2):167-179.
- Sahai E, Marshall CJ. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002, 2 (2):133-142.
- Foster R, Hu K.Q, Lu.Y, et al. Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Mol Cell Biol*, 1996,16: 2689 - 2699.
- Nobes CD, Lauritzen I, Mattei MG, et al. A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol*, 1998,141: 187 - 197.
- Guasch RM, Scambler P, Jones GE, et al. RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Mol Cell Biol*, 1998, 18 : 4761 - 4771.
- Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 2002, 420(6916) : 629-635.
- Boettner B, Van Aelst L. The role of Rho GTPases in disease development. *Gene*, 2002, 286(2) : 155-174.
- Riento K, Totty N, Villalonga P, et al. RhoE function is regulated by ROCK I-mediated phosphorylation. *EMBO J*, 2005, 24 :1170 - 1180.
- Villalonga P, Guasch RM, Riento K, et al. RhoE inhibits cell cycle progression and Ras-induced transformation. *Mol Cell Biol*, 2004, 24 (6) :7829 - 7840.
- Poch E, Minambres R, Mocholi E, et al. RhoE interferes with Rb inactivation and regulates the proliferation and survival of the U87 human glioblastoma cell line. *Exp Cell Res*, 2007, 313(4) : 719-731.
- Fritz G, Just I, Kaina B. Rho GTPases are over-expressed in human

- tumors. Int J Cancer, 1999, 81(5): 682-687.
- 12 Foster R, Hu KQ, Lu Y, et al. Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. Mol Cell Bio I, 1996, 16 (6): 2689-2699
- 13 Liu Y, Xu HT, Liu N, et al. Correlation of expression of p120ctn, RhoA and Cdc42 and their significance in non-small cell lung cancer. Chin J Lung Cancer, 2005, 8(4): 304-308.[刘洋,徐洪涛,刘楠,等.非小细胞肺癌组织中 p120ctn 与 RhoA 和 Cdc42 表达的相关性及意义.中国肺癌杂志,2005,8(4):304-308.]
- (收稿:2007-08-31 修回:2007-11-05)
- (本文编辑 李博)

• 会议消息 •

第 44 届美国临床肿瘤学会年会 (ASCO 2008)

相关科室: 肿瘤科
所属类型: 国际会议
联系人: 北京和平国旅
邮 件: service@medig.com.cn

会议日期: 2008-5-30 至 2008-6-3
举办地点: 美国 芝加哥
电 话: 010-65888128-1015
网 址: <http://www.asco.org/>

美国临床肿瘤学会 American Society of Clinical Oncology(ASCO)是全球领先的肿瘤专业学术组织,宗旨是预防癌症及改善癌症服务。学会规模日益壮大,有来自 100 多个国家约 21500 多名会员,会员包括肿瘤学领域及其专科之临床肿瘤科医师、参与认可的肿瘤学训练计划的医师和医疗专家、肿瘤科护士以及肿瘤科开业医师。学会会员专攻肿瘤学领域,包括医学、血液学、放射线治疗、外科与小儿科。一年一度的 ASCO 年会汇聚了全球临床肿瘤学研究的精英,被公认为全球最重要的肿瘤学术会议。

第 99 届美国癌症研究协会年会 (AACR2008)

相关科室: 肿瘤科
所属类型: 国际会议
联系人: 北京和平国旅

会议日期: 2008-4-12 至 2008-4-16
举办地点: 美国 圣地亚哥
电 话: 010-65888128-1015

本次年会将有来自个国家的多名与会者将在此聚集就份摘要进行讨论,并听取多个有关癌症基础研究、临床研究和可转化性研究方面的新发现或重大发现的报告。各种科学讲座、专题研究会、交流会和教育会议将贯穿整个会议过程。

第 64 届美国过敏、哮喘和免疫协会年会 (AAAAI 2008)

相关科室: 呼吸/胸病 风湿/免疫
所属类型: 国际会议
联系人: 北京和平国旅
邮 件: service@medig.com.cn

会议日期: 2008-3-14 至 2008-3-18
举办地点: 美国 费城
电 话: 010-65888128-1015
网 址: <http://www.aaaai.org/members/meetings/>

美国过敏、哮喘和免疫协会(AAAAI)之年会向来以学术水平高、内容丰富、覆盖面广以及参加人数多而吸引着世界各地的变态反应和免疫学者、内科和耳鼻咽喉专科医生、家庭医生、博士后在研人员、在读博士和硕士研究生以及相关管理行政人员参加。