

RhoA 在胃癌细胞核中的表达及预后意义

顾勇^{1,2}, 杨艳², 段炜¹, 周金锋², 吴秀华¹, 笄晨星¹

(1.武警陕西总队医院, 陕西 西安 710054;

2.第四军医大学西京消化病医院, 陕西 西安 710032)

摘要: [目的] 探讨 RhoA 蛋白在胃癌细胞核中的表达及预后意义。[方法] 选取有详细临床资料的胃癌组织 179 例及正常胃黏膜组织 80 例, 应用免疫组织化学改良二步法检测 RhoA 蛋白的胞核表达。[结果] RhoA 蛋白在胃癌及正常胃黏膜组织细胞核中的表达阳性率分别为 69.8% (125/179) 和 25.0% (20/80), 差异有显著性 ($P < 0.05$)。RhoA 蛋白胞核表达率与胃癌肿瘤分化、TNM 分期、淋巴结转移有关 ($P < 0.05$)。RhoA 胞核阳性患者的术后生存期短于阴性患者 ($P = 0.022$)。Cox 风险比例模型表明, RhoA 胞核阳性是胃癌术后预后的独立指标 ($OR = 3.09, P = 0.005$)。[结论] RhoA 蛋白在胃癌细胞核中过表达, 是判断胃癌患者术后生存期的独立预后指标。

关键词: RhoA; 胃癌; 预后; 免疫组织化学

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)03-0230-04

Expression and Prognostic Significance of RhoA in Gastric Cancer Cell Nucleus

GU Yong¹, YANG Yan², DUAN Wei¹, et al.

(1. Shanxi Provincial Crops Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Xi'an 710054, China.

2. Xijing Hospital of Digestive Diseases, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of RhoA in gastric cancer cell nucleus and its prognostic significance. [Methods] One hundred and seventy-eight gastric cancer tissues and 80 normal gastric tissues with detailed clinical information were enrolled. The expression of RhoA in cell nucleus was detected by Immunohistochemistry (modified two-step method). [Results] The positive rate of RhoA in gastric cancer and normal mucosa cell nucleus was 69.8% (125/179) and 25.0% (20/80) respectively, with significantly difference ($P < 0.05$). The expression of RhoA in gastric cancer cell nucleus was related to differentiation, TNM stage and lymph node metastasis (all $P < 0.05$). The postoperative survival time in gastric cancer patients with positive RhoA expression was significantly shorter than that in patients with negative RhoA expression ($P = 0.022$). Cox proportional hazards model revealed that RhoA expression was an independent prognostic factor in patients with gastric cancer ($OR = 3.09, P = 0.005$). [Conclusion] RhoA is over expression in gastric cancer cell nucleus, RhoA could serve as an independent prognostic biomarker to evaluate postoperative survival in patients with gastric cancer.

Key words: RhoA; gastric cancer; prognosis; immunohistochemistry

胃癌具有预后差, 死亡率高的特点, 尽管近年来其发病率和死亡率有下降趋势, 但在全世界癌症发病率中仍高居第 4 位, 并且是导致癌症患者死亡的第二大原因^[1]。

Rho 家族蛋白主要包括 Rho、Rac、Cdc42 三个亚家族, 它们是一群具有 GTP 酶活性的小分子 G 蛋白(GTPase), 参与细胞多种生物学过程的调控, 包括

细胞周期进展、凋亡、形态变化、细胞大小、细胞极性、细胞粘附和胞膜转运^[2]。研究表明, Rho 亚家族成员 RhoA 在癌组织中的表达明显高于正常组织^[3]。在胃癌中, RhoA 表达阳性率也明显高于正常组织, 其表达与癌浸润深度相关。但多变量回归分析表明, RhoA 不是一个判断胃癌患者预后的独立因素^[4]。但以上研究未考虑 RhoA 的亚细胞定位对预后的影响。有研究表明, RhoA 不仅表达于胃癌细胞系 SGC-7901 和永生化胃黏膜细胞系 GES 的胞膜和胞浆, 还

收稿日期: 2011-11-07; 修回日期: 2011-12-08

通讯作者: 杨艳, E-mail: yanggy@fmmu.edu.cn

可出现在细胞核中^[5],提示 RhoA 还具有新的生物学功能。进一步研究提出,RhoA 的核转位现象与蛋白修饰无关,并且不依赖于核运输系统^[6]。然而,RhoA 胞核表达的意义仍不清楚。本研究通过免疫组化的方法,对 RhoA 在 179 例胃癌组织和 80 例正常胃黏膜中的胞核表达情况进行研究,结合临床病理资料,分析 RhoA 胞核表达的预后意义。

1 材料与方 法

1.1 标本来源

收集第四军医大学西京消化病医院 2006 年 3 月至 2010 年 5 月经病理证实、临床资料完整的初治胃癌患者的组织石蜡标本 179 例及 80 例正常胃黏膜组织。179 例胃癌患者临床资料见表 1。

1.2 试剂和方法

采用免疫组织化学改良二步法检测 RhoA 的表达。具体方法如下:切片常规二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水。3%双氧水灭活内源性过氧化物酶 12min。PBS 洗涤 3min×3 次。0.4g 柠檬酸/3g 柠檬酸钠混合溶液(1L,pH 6.0)进行高压抗原修复。PBS 洗涤 3min×3 次。滴加 RhoA(1:50,SC-179,Santa 公司)一抗稀释液 4℃过夜。用 PBS 液代替一抗作为阴性对照。PBS 洗涤 5min×3 次。滴加辣根过氧化物酶标记二抗(Santa Cruz),室温孵育 30min。PBS 洗涤 5min×3 次。DAB 显色约 2min。苏木素复染 3min。梯度酒精,二甲苯浸泡。中性树脂封片。待干燥后显微镜下观察染色。

1.3 结果判定标准

只计数关注细胞核 RhoA 的表达,而不计数胞浆和胞膜是否表达。每张切片选 5 个视野(×200 倍),每个视野计数 150 个细胞,观察癌细胞及正常

胃黏膜上皮细胞的染色情况。评分方法:①依据细胞染色强弱(记为 I):无着色为 0 分,浅黄或浅褐色为 1 分,棕黄或褐色为 2 分,深褐色为 3 分。②依据阳性细胞百分比(记为 P):>25%为 1 分,25%~50%为 2 分,50%~75%为 3 分,<75%为 4 分。I 与 P 乘积为最终评分:0 分为-,1~4 分为+,5~8 分为++,9~12 分为+++。-为阴性表达,+~+++为阳性表达。

1.4 随访与统计学处理

179 例胃癌患者进行术后随访,采用电话询问和调查问卷的形式,每隔 3 个月调查一次患者的生存状况。患者均接受根治性胃切除术,术后坚持化疗(氟尿嘧啶为主),术前未接受化疗,术后未给予放射治疗。患者从术后一直随访到死亡到 2011 年 5 月 24 日(9~55 个月,平均 31 个月)。

数据分析采用 SPSS17.0 统计软件,RhoA 表达与临床病理特征间的关系用 χ^2 检验。单因素生存分析用 Log-rank 检验,以 Cox 回归进行多因素分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RhoA 细胞核表达及与胃癌临床病理特征的关系

RhoA 蛋白在胃癌组织和正常胃黏膜中的表达情况见图 1。RhoA 蛋白在胃癌及正常胃黏膜组织细胞核中表达率分别为 69.8%(125/179) 和 25.0%(20/80),差异有显著性($P<0.05$)。胃癌组织中胞核 RhoA 蛋白的阳性率与性别、年龄无关($P>0.05$),而与组织分化、TNM 分期、淋巴结转移有关($P<0.05$)。见表 1。

2.2 RhoA 表达与胃癌患者术后生存时间的关系

至随访结束,有 7 例患者失访,2 例患者死因与胃癌无关,这 9 例被定义为删失(占 5.03%)。患者术后中位生存期为 32.0 ± 1.8 个月,RhoA 胞核阳性表

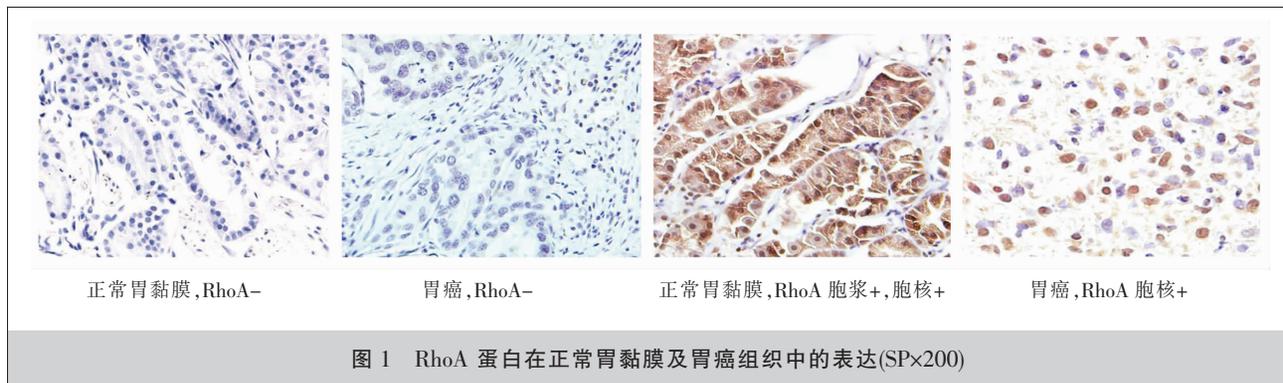


表 1 RhoA 胞核表达和胃癌临床病理学指标之间的关系

临床特征	例数	RhoA 胞核表达		χ^2	P 值
		阴性	阳性		
性别				0.02	0.899
男性	137	41	96		
女性	42	13	29		
年龄(岁)				0.34	0.560
≥ 60	77	25	52		
< 60	102	29	73		
分化				5.43	0.020
高,中分化	76	30	46		
低分化	103	24	79		
TNM 分期				6.31	0.012
I, II	68	28	40		
III, IV	111	26	85		
淋巴结转移				23.56	< 0.001
无	71	36	35		
有	108	18	90		

达患者的中位生存期为 28.0 ± 2.0 个月, RhoA 胞核阴性表达患者中位生存期为 35.0 ± 2.9 个月, 有显著性差异 ($P=0.022$), 图 2。不同 TNM 分期、淋巴结转移和组织分化患者生存期也有显著性差异 ($P=0.045, P=0.002, P<0.001$)。单因素分析中, 将 RhoA 胞核表达阴性患者的死亡风险比设定为 1, RhoA 阳性患者的死亡风险比为 4.04 (95%CI: 2.23~6.65, $P=0.001$)。Cox 比例风险模型多因素分析显示 RhoA 胞核阳性、TNM 分期以及淋巴结转移是胃癌患者预后的独立因素 (OR 分别为 3.09、2.35、2.40, P 均 < 0.05), 见表 2。

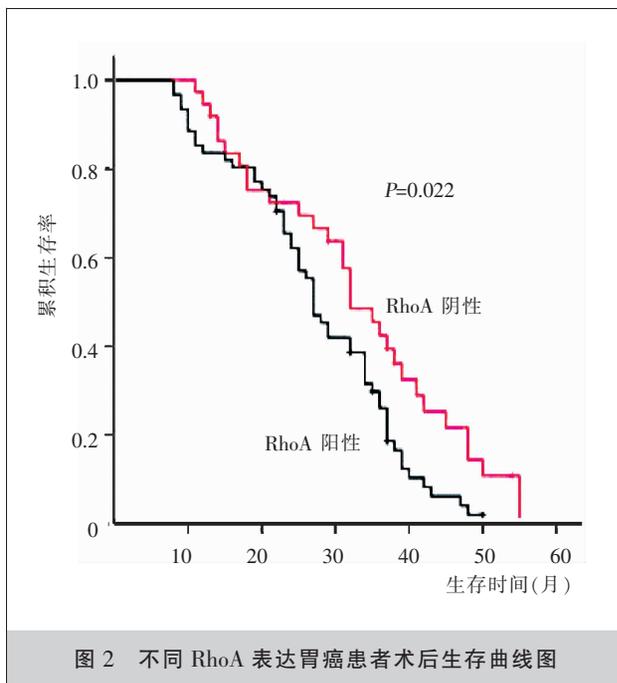


表 2 影响胃癌患者预后的单因素、多因素分析

指标	单因素分析		多因素分析	
	OR(95%CI)	P 值	OR(95%CI)	P 值
性别	1.02(0.45~1.34)	0.872	1.08(0.55~1.43)	0.769
年龄	1.12(0.65~1.37)	0.212	1.14(0.46~1.56)	0.371
分化	1.09(0.86~1.15)	0.086	1.03(0.61~1.45)	0.160
TNM 分期	2.65(1.12~4.43)	0.007	2.35(1.23~4.33)	0.003
淋巴结转移	2.54(1.45~4.47)	0.004	2.40(1.40~4.13)	0.002
RhoA 表达	4.04(2.23~6.65)	0.001	3.09(1.40~6.80)	0.005

3 讨论

胃癌有早期症状不明显、复发率高、淋巴结转移早等特点, 胃癌的病死率一直居高不下。然而, 目前虽然有许多分子被证实参与了胃癌的多种恶性表型, 但其在判断预后方面的价值一直存在着争议。因此, 寻找新的与胃癌发生发展以及患者生存时间有关的生物学指标有重要的临床意义。

Fritz 等^[7]发现 RhoA 蛋白的表达水平在乳腺癌、肺癌和结肠癌中均出现显著上调。Abraham 等^[8]发现 RhoA 蛋白水平的升高可以作为判断头颈癌发生的指标。刘娜等^[9]的研究则显示, 胃癌中 RhoA 的表达水平显著高于相应正常胃黏膜组织。近年来发现 RhoA 还可定位于胃癌细胞系的细胞核中^[5]。以往的研究较少探讨 RhoA 在癌细胞核中的表达情况及其意义。本研究发现 RhoA 蛋白在胃癌组织细胞核中的阳性率显著高于正常胃黏膜, 临床分期以 III、IV 期较高, 且 RhoA 胞核表达阴性者的生存期明显优于胞核表达阳性者, 表明 RhoA 的胞核表达模式可能参与了肿瘤细胞的恶性进展。

RhoA 蛋白可通过调节细胞骨架蛋白和细胞运动、加速细胞增殖、影响细胞转录等^[10,11]作用调控肿瘤细胞多种恶性生物学行为。另外, RhoA 参与多种肿瘤的侵袭和转移的发生, 例如: VEGF-C 可通过上调和激活 RhoA/ROCK2/moesin 通路促进宫颈癌的转移^[12], MTORC1/2 可通过 RhoA 和 RAC1 通路调节结肠癌细胞的迁移和转移^[13]。BART 可通过抑制 RhoA 的激活而抑制胰腺癌细胞的侵袭^[14]。本研究中我们发现 RhoA 的胞核表达与淋巴结转移相关, 提示 RhoA 的胞核表达促进了胃癌细胞的侵袭和转移。另外, 我们还注意到, RhoA 的表达阳性率与胃癌的分化程度有关, 以低分化组阳性率最高, 明显高于高、中分化组。这提示 RhoA 还是一种分化相关蛋

白。另有研究表明,RhoA 活性增强可促进胃癌细胞的增殖,而降低对化疗药物的敏感性^[15],提示 RhoA 可能还参与胃癌多药耐药的发生。

综上,RhoA 蛋白参与了胃癌的多种恶性表型的发生和发展,是胃癌多种恶性表型的相关蛋白。RhoA 胞核表达对判断胃癌患者术后预后有一定参考价值。

参考文献:

- [1] Parkin DM.International variation [J]. *Oncogene*, 2004, 23(38):6329-6340.
- [2] Etienne-Manneville S,Hall A. Rho GTPases in cell biology [J].*Nature*,2002,420(6916): 629-635.
- [3] Gómez del Pulgar T,Benitah SA,Valeron PF,et al. Rho GTPase expression in tumorigenesis:evidence for a significant link[J]. *Bioessays*, 2005, 27(6):602-613.
- [4] Su XJ,Tang ZF,Li Q,et al. Expression and significance of RhoA and NF- κ B in human gastric carcinoma [J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2011, 33(4):276-279.
- [5] Li Y,Chen Y,Tao Y,et al. RhoA protein is generally distributed in the nuclei of cancer cells[J].*Oncol Rep*, 2010, 24(4):1005-1009.
- [6] Li Y,Chen Y,Xu J. Factors influencing RhoA protein distribution in the nucleus [J]. *Mol Med Report*, 2011, 4(6): 1115-1119.
- [7] Fritz G,Just I,Kaina B.Rho GTPases are over-expressed in human tumors[J].*Int J Cancer*, 1999, 81(5):682-687.
- [8] Abraham MT,Kuriakose MA ,Sacks PG ,et al. Motility-related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer[J].*Laryngoscope*, 2001, 111(7):1285-1289.
- [9] Liu Na, Bi Feng, Pan Yanglin, et al. The expression and possible function of RhoA in human gastric cancer cell lines[J]. *Chin J Oncol*, 2004, 26(1): 26-28.
- [10] Chappell J,Golovchenko I,Wall K,et al.Potentiation of RhoA-mediated lysophosphatidic acid activity by hyperinsulinemia [J].*J Biol Chem*,2000,75(41):31792-31797.
- [11] Fritz G,Brachetti C,Bahlmann F,et al.Rho GTPases in human breast tumours:expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters [J].*Br J Cancer*, 2002,87(6):635-644.
- [12] He M,Cheng Y,Li W,et al. Vascular endothelial growth factor C promotes cervical cancer metastasis via up-regulation and activation of RhoA/ROCK-2/moesin cascade[J]. *BMC Cancer*, 2010,10:170.
- [13] Gulhati P, Bowen KA,Liu J,et al. mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(9):3246-3256.
- [14] Taniuchi K,Iwasaki S,Saibara. BART inhibits pancreatic cancer cell invasion by inhibiting ARL2-mediated RhoA inactivation [J]. *Int J Oncol*, 2011, 39(5):1243-1252.
- [15] Zhang GY, Bi F, Liu N, et al. The relationship between RhoA subfamily molecules and malignant phenotype of gastric cancer cells [J].*Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2006, 33(18): 1021-1024.