

RSK4 蛋白在结直肠癌中的表达及临床意义

Expression of RSK4 Protein in colorectal Cancer and Its Clinical Significance

CAI Jun, ZHANG Tao

蔡 君^{1,2}, 张 涛²

(1. 长江大学附属第一人民医院, 湖北 荆州 434000;

2. 华中科技大学附属协和医院, 湖北 武汉 430022)

摘要: [目的] 探索 RSK4 蛋白在结直肠癌表达情况及其与临床病理特征的关系。[方法] 用免疫组化方法检测 RSK4 蛋白在 103 例经手术切除的结直肠癌组织标本和 46 例匹配的癌旁组织和正常结直肠组织表达情况。[结果] RSK4 蛋白在结直肠癌组织中阳性表达率为 15.0%(7/46), 而癌旁组织中 RSK4 蛋白表达为 41.3%(19/46), 正常结直肠组织中的表达为 50.0%(23/46)。结直肠癌中 RSK4 蛋白的表达较癌旁及正常结直肠中表达明显减少($P<0.001$)。RSK4 蛋白在伴淋巴结转移的结直肠癌组织中的阳性表达率为 13.2%, 明显低于无淋巴结转移者(37.0%, $P<0.05$); RSK4 蛋白在中低分化(G_2+G_3)的结直肠癌组织中的阳性表达率为 10.8%, 明显低于高分化(G_1)者(34.2%) ($P=0.005$)。在Ⅲ、Ⅳ期结直肠癌中 RSK4 蛋白的表达明显低于Ⅰ、Ⅱ期病例。[结论] RSK4 蛋白的低表达可能与结直肠癌的发生发展和侵袭转移相关, RSK4 可能是一个潜在的抑癌基因。

关键词: 结直肠肿瘤; 核糖体 S6 蛋白激酶 4; 免疫组织化学

中图分类号: R735.3

文献标识码: B

文章编号: 1671-170X(2015)03-0252-03

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.03.B018

结直肠癌是胃肠道系统中最为常见的恶性肿瘤, 在欧美等西方国家其死亡率位居第 2。在我国, 随着人民生活水平的提高和饮食结构的变化, 结直肠癌的发病率有逐年上升的趋势, 它已成为严重危害广大人民生命健康的恶性肿瘤之一。手术、放疗和化疗三大传统治疗模式很难进一步提高疗效。深入研究结直肠癌的发病机制对探索更为有效的预防、诊断和治疗方法具有重要意义。RSK4 是核糖体 s6 蛋白激酶(ribosomal s6 kinase, RSK)基因家族成员之一, 曾有报道在乳腺癌细胞系和肿瘤组织中 RSK4 基因异常表达^[1], 本研究中, 我们采用免疫组化的方法检测结直肠癌组织中 RSK4 蛋白的表达, 并探讨其与结直肠癌患者临床病理特征的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

103 例标本来自长江大学附属第一人民医院 2006 年 1 月至 2010 年 12 月期间经手术切除的结直肠癌组织和 46 例匹配的癌旁组织和正常结直肠组织。在 103 例结直肠癌患者中, 中位年龄为 57 岁(22~75 岁), 临床分期为Ⅰ期 3 例, Ⅱ期 20 例, Ⅲ期 66 例, Ⅳ期 14 例; 淋巴结转移 86 例, 无淋巴结转

移 27 例。所有患者术前均未行放射治疗或化疗。标本采集后一部分立即置液氮保存, 另一部分经 10% 中性福尔马林溶液固定, 用于病理诊断和免疫组化检查。

1.2 免疫组化 Envision 两步法

石蜡组织块 4 μ m 连续切片, 常规脱蜡至水, PBS 冲洗 3 次, 微波修复后, 在 3% 过氧化氢甲醇中浸泡 20min 以灭活内源性过氧化氢酶。5%(m/v) BSA 封闭 20min, 加入 1:100 稀释的 RSK4 一抗, 4℃ 过夜; 37℃ 复温 1h, PBS 漂洗, 加入 Envision 二抗孵育 40min, PBS 清洗 3 次后 DAB 显色, 苏木精复染, 脱水封片。阴性对照: 用 PBS 替代一抗。结果判定: 阳性结果为棕黄色颗粒, 表达于胞质中; 阴性: 细胞质中未见到棕黄色颗粒。

1.3 判定标准

在 200 倍高倍镜下观察细胞的染色情况。按阳性细胞所占的比例分为 4 个等级: 0 (0~10%), 1 (10%~25%), 2 (25%~50%) 和 3 (50%~100%)。为了更加客观反映真实情况, 阳性细胞表达的浓度也分为 4 个等级: 0 (阴性表达), 1 (胞浆呈现淡黄色), 2 (胞浆呈现棕黄色表达), 3 (呈现棕色表达)。计算两者乘积, 0 分为阴性表达(-), 1~2 分为弱阳性表达(+), 3~4 分为中度阳性表达(++), >4 分为强阳性表达。两者乘积 3 分以上为阳性结果。所有结果由病理科两位有经验的副主任医师共同商量决定。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 16.0 统计软件包进行统计分析。计数资料采用 χ^2 检验和 Fisher 确切概率法。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 种结直肠组织中 RSK4 蛋白表达状况

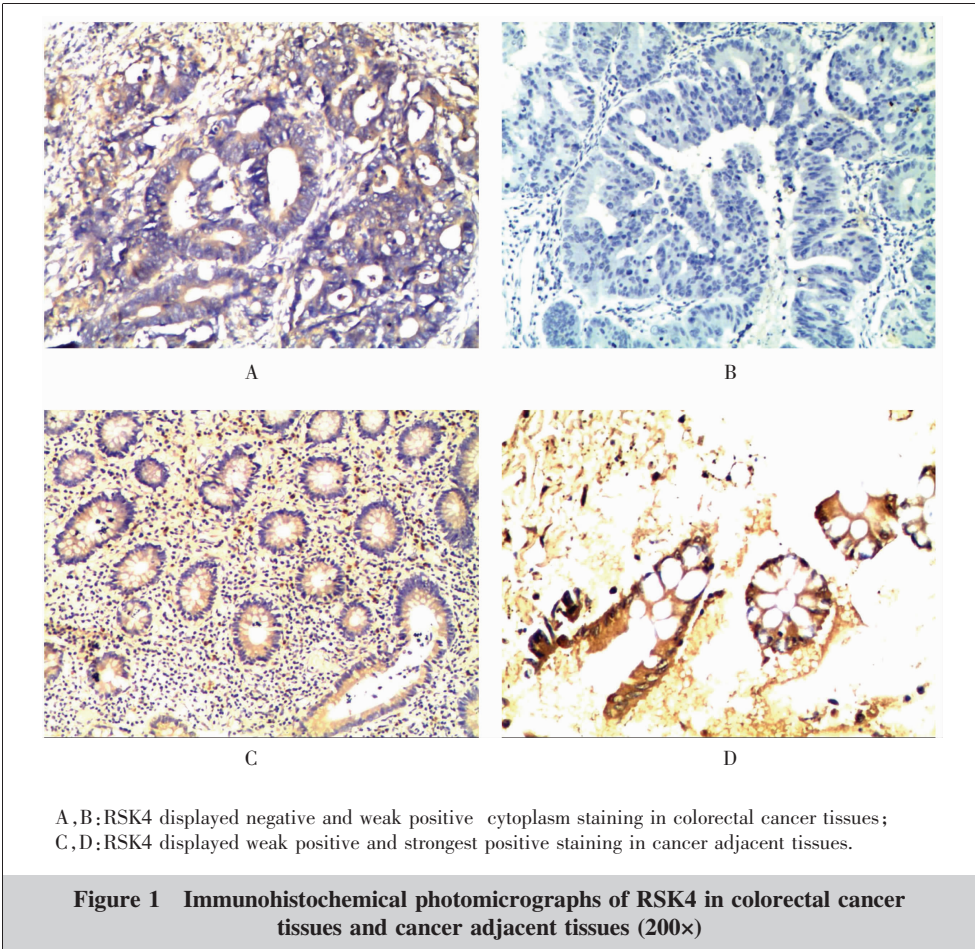
RSK4 主要在胞质中表达, 在结直肠癌组织中, RSK4 蛋白在肿瘤细胞中表达(Figure 1), 阳性及强阳性率为 15.0%(7/46), 而癌旁组织中 RSK4 蛋白表达为 41.3%(19/46), 正常结直肠中的表达为 50.0%(23/46)。结直肠癌中 RSK4 蛋白的表达较癌旁及正常结直肠中表达明显减少($P=0.001$)(Table 1)。

通讯作者: 张涛, 教授, 博士生导师, 博士; 华中科技大学附属协和医院肿瘤中心, 湖北省武汉市解放大道 1277 号(430022); E-mail: 529369023@qq.com

收稿日期: 2014-07-07; **修回日期:** 2014-07-15

Table 1 Expression of RSK4 in colorectal cancer tissues, cancer adjacent tissues and normal tissues

Tissue types	N	Positive number	Positive rate(%)	χ^2	P
Colorectal cancer tissues	46	7	15.0	13.16	0.001
Cancer adjacent tissues	46	19	41.3		
Normal colorectal tissues	46	23	50.0		



2.2 RSK4 蛋白表达下降和结直肠癌临床病理特征的关系

RSK4 蛋白在不同年龄人群中表达无统计学意义,且与肿瘤的大小及侵袭深度(T分期)无关,RSK4 蛋白在伴淋巴结转移的结直肠癌组织中的阳性表达率为 13.2%,明显低于无淋巴结转移者的 37.0%($P<0.05$);RSK4 蛋白在中低分化(G_2+G_3)的结直肠癌组织中的阳性表达率为 10.8%,高分化者(G_1)中为(34.2.0%),差异有统计学意义($P=0.005$)。在Ⅲ、Ⅳ期结直肠癌中 RSK4 蛋白的表达明显低于Ⅰ、Ⅱ期病例(Table 2)。

3 讨论

核糖体 S6 蛋白激酶(ribosomal S6 kinase,RSK)是 1985 年 Erikson 和 Maller^[2]在非洲爪蟾卵中发现一种 90kD 的细胞间丝/苏氨酸蛋白激酶,它可以使 40S 核糖体亚单位 S6 蛋白发生磷酸化,从而促进某些 mRNA 的翻译^[3],这种蛋白被称为

p90RSK 或 RSK,它通过自身的丝/苏氨酸磷酸化而产生激酶活性^[4]。哺乳动物有 4 个 *p90RSK* 基因,命名为 *RSK1~4* (RPS6KA1,A3,A2,and A6)。RSK1~4 有 73%~80%的氨基酸一致性,基本结构相同,都有两个功能蛋白激酶结构域 NTKD(N 端结构域)和 CTKD(C 端结构域) 和一个连接区(linker region),序列不同点在末端和连接区,这可能决定了各亚型的不同功能^[5]。*RSK4* 是 X 染色体连锁基因,X 染色体连锁基因对癌症有重要影响。X 染色体连锁的癌基因和抑癌基因是在个体基因水平调控的,这些基因的过表达可能与 X 染色体的拷贝数相关^[6]。*RSK4* 在脑、心脏、肾脏还有骨骼肌等组织中高表达^[7],在肺脏、胰腺、肝脏和脂肪组织没有检测到它的存在。刘剑仑等^[8]采用 RT-PCR 和免疫组化方法对 56 例乳腺癌组织及癌旁正常乳腺组织、20 例乳腺良性病变组织中 RSK4 mRNA 和蛋白的表达进行了检测。RSK4 蛋白在乳腺癌组织、癌旁正常乳腺组织和乳腺良性病

变组织中的阳性表达率分别为 39.3%、71.4%和 75.0%,RSK4 蛋白在乳腺癌组织中的阳性表达率明显低于癌旁正常乳腺组织和乳腺良性病变组织($P<0.05$)。付国庆等^[9]报道胰腺癌组织中 RSK4 表达阳性率为 37.5% (12/32),而癌旁正常胰腺组织 RSK4 表达阳性率为 0(0/14),两者差异有显著性($P=0.009$)。在我们的研究中,RSK4 蛋白在结直肠癌肿瘤细胞中阳性率 15.0%(7/46),而癌旁组织中 RSK4 蛋白表达为 41.3% (19/46),正常结直肠中的表达为 50.0% (23/46)。结直肠癌中 RSK4 蛋白的表达较癌旁及正常结直肠中表达明显减少($P<0.001$)。这些结果跟国外的有些报道^[10]类似。这些结果提示 RSK4 在结直肠癌中可能是一个潜在的抑癌基因。为了评价 RSK4 蛋白和结直肠癌的进展的关系,我们进一步分析了 RSK4 蛋白的表达和临床病理特征的关系,RSK4 蛋白在伴淋巴结转移的

Table 2 Correlation between RSK4 expression and clinicopathologic characteristics

Characteristics	RSK4		P
	Negative	Positive	
Age(years old)			
≤60	38	10	0.734
>60	45	10	
T stage			
T ₁	4	2	0.123
T ₂	10	6	
T ₃	37	8	
T ₄	32	4	
N stage			
N ₀	17	10	0.017
N ₁	27	6	
N ₂	39	4	
M stage			
M ₀	71	18	0.874
M ₁	12	2	
Differentiation grade			
G ₁	25	13	0.005
G ₂	20	5	
G ₃	38	2	
Clinical stage			
I	1	2	0.007
II	12	8	
III	58	8	
IV	12	2	

结直肠癌组织中的阳性表达率为 13.2%，明显低于无淋巴结转移者 37.0%($P<0.05$)；RSK4 蛋白在中低分化(G_2+G_3)的结直肠癌组织中的阳性表达率为 10.8%，明显低于高分化(G_1)者(34.2.0%)($P=0.005$)。在Ⅲ、Ⅳ期结直肠癌中 RSK4 蛋白的表达明显低于Ⅰ、Ⅱ期病例。这点与 López-Vicent 等^[11]报道相似。因此我们认为，结直肠癌的发生发展和侵袭转移可能与 RSK4 的缺失及异常表达相关，RSK4 表达缺失或异常表达的结直肠癌的增殖能力可能更强，恶性程度可能更高，更容易发生转移。RSK4 可能是结直肠癌的一个抑癌基因，与结直肠癌的分期、分级及有无淋巴结转移有明显的相关性。

参考文献：

- [1] Yang HW, Liu JL, Liao ZD, et al. Effects of breast cancer cells stably overexpressing RSK4 on growth of transplanted human breast cancer in severe combined immunodeficiency mice [J]. Chinese Medical Journal, 2012, 92(26): 1845–1848. [杨华伟, 刘剑仑, 廖德仲, 等. RSK4 过表达真核表达载体对人乳腺癌移植瘤体内侵袭和转移的影响[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(26): 1845–1848.]
- [2] Erikson E, Maller JL. A protein kinase from *Xenopus* eggs specific for ribosomal protein S6 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82(3): 742–746.
- [3] Alcorta DA, Crews CM, Sweet LJ, et al. Sequence and expression of chicken and mouse rsk; homologs of *Xenopus laevis* ribosomal S 6 kinase[J]. Mol Cell Biol, 1989, 9 (9): 3850–3859
- [4] Dümmler Bettina A, Camilla H, Joachim S, et al. Functional characterization of human RSK 4, a new 90-kDa ribosomal S 6 kinase, reveals constitutive activation in most cell types[J]. J Biol Chem, 2005, 280(14): 13304–13314.
- [5] Anjum R, Blenis J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(10): 747–758.
- [6] Thakur A, Rahman KW, Wu J, et al. Aberrant expression of X-linked genes RbAp 46, Rsk 4, and Cldn 2 in breast cancer[J]. Mol Cancer Res, 2007, 5 (2): 171–181.
- [7] Carriere A, Ray H, Blenis J, et al. The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade [J]. Front Biosci, 2008, 13: 4258–4275.
- [8] Liu JL, Yang HW, Chen ZX, et al. Abnormal expression of RSK4 and its clinical significance in breast cancer[J]. Chinese Journal of Oncology, 2011, 33 (6): 452–455. [刘剑仑, 杨华伟, 陈祖舜等. 核糖体 S6 蛋白激酶 4 在乳腺癌中的异常表达及临床意义 [J]. 中华肿瘤杂志, 2011, 33(6): 452–455.]
- [9] Fu GQ, Fan LN, Zhu J, et al. Expression of Rsk-4 and its clinicopathologic correlation in pancreatic tumors [J]. 2010, 26(6): 658–661. [付国庆, 范林妮, 朱瑾, 等. Rsk-4 蛋白在胰腺肿瘤中的表达及其与临床病理的关系[J]. 临床与实验病理学杂志, 2010, 26(6): 658–661]
- [10] Thakur A, Sun Y, Bollig A, et al. Anti-invasive and anti-metastatic activities of ribosomal protein S 6 kinase 4 in breast cancer cells [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14 (14): 4427–4436.
- [11] López-Vicent L, Pons B, Coch L, et al. RSK4 inhibition results in bypass of stress-induced and oncogene-induced senescence[J]. Carcinogenesis, 2011, 32(4): 470–476.