

结直肠癌组织中 Vav1、Rac1、CyclinD1、p21 表达的意义

张明明¹, 檀碧波², 卢亚敏¹, 隋爱霞¹, 高伟¹

(1. 河北省人民医院, 河北 石家庄 050051;

2. 河北医科大学第四医院, 河北 石家庄 050011)

摘要: [目的] 通过检测 Vav1、Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1(Rac1)、细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)、p21 蛋白在结直肠癌组织中的表达情况, 分析 Vav1 蛋白与 Rac1、CyclinD1、p21 的关系及意义。[方法] 180 例结直肠癌肿瘤组织和 162 例癌旁组织的石蜡组织标本进行免疫组化染色, 检测肿瘤组织和癌旁组织中 Vav1、Rac1、CyclinD1、p21 蛋白表达。[结果] 结直肠癌肿瘤组织中 Vav1、Rac1、CyclinD1 蛋白表达高于癌旁组织, p21 蛋白在癌组织表达低于癌旁组织($P<0.05$)。Vav1 蛋白表达与肿瘤的浸润深度、分化情况及淋巴结转移有关; Rac1 与肿瘤的分化情况、淋巴结转移有关; CyclinD1 表达与肿瘤的浸润深度、淋巴结转移有关 (均 $P<0.05$)。Spearman 相关分析显示, 肿瘤组织中 Vav1 蛋白表达与 Rac1、CyclinD1 蛋白呈正相关, 与 p21 负相关($P<0.05$)。[结论] Vav1 在结直肠癌组织中的表达与肿瘤增殖的指标有关, 可能通过调节 Rac1、CyclinD1、p21 促进肿瘤的生长。

关键词: 结直肠肿瘤; Vav1 蛋白; Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1; 细胞周期蛋白 D1; p21

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)09-0708-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.09.B004

Expressions of Vav1, Rac1, CyclinD1, p21 in Colorectal Cancer and Their Significance

ZHANG Ming-ming¹, TAN Bi-bo², LU Ya-min¹, et al.

(1. HeBei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China; 2. The Fourth Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: [Objective] To investigate the relationship and significance among expressions of Vav1, Rac1, CyclinD1, p21 in colorectal cancer. [Methods] The expressions of Vav1, Rac1, CyclinD1 and p21 were detected with immunohistochemistry in 180 specimens of colorectal cancer tissues and 162 specimens of adjacent cancer tissues. [Results] Expressions of Vav1, Rac1, CyclinD1 proteins in colorectal cancer tissues were higher than those in adjacent cancer tissues, whereas expression of p21 protein was lower in cancer tissues than that in adjacent cancer tissues (all $P<0.05$). Expression of Vav1 protein was related to depth of invasion, differentiation, lymphatic metastasis; expression of Rac1 protein was related to differentiation, lymphatic metastasis; expression of CyclinD1 protein was related to depth of invasion, lymphatic metastasis (all $P<0.05$). Spearman correlation analysis showed that positive correlation was found between Vav1 and Rac1, Vav1 and CyclinD1; negative correlation was found between Vav1 and p21 (all $P<0.05$). [Conclusion] Vav1 may promote growth of tumor cells by regulating Rac1, CyclinD1, p21 proteins in colorectal cancer.

Subject words: colorectal neoplasms; Vav1 protein; Ras related C3 botulinum toxin substrate 1; CyclinD1; p21

结直肠癌无论是在我国还是在其他国家, 其发

病率和死亡率都居于恶性肿瘤前列^[1,2]。近年来, 结直肠癌发病率处于不断上升的阶段, 患者就诊时多处于晚期, 手术难以根治甚至失去手术机会。结直肠癌肿瘤生长迅速是导致患者死亡的主要原因, 因此

通讯作者: 张明明, 副主任检验师, 硕士生导师, 博士; 河北省人民医院检验科副主任, 河北省石家庄市和平西路 348 号 (050051); E-mail: zhangmm197612@126.com

收稿日期: 2016-03-30; **修回日期:** 2016-05-31

找到与结直肠癌生长和增殖密切相关的基因有较大意义。目前关于结直肠癌新基因的发现以及基因作用机制等方面虽然有了很大的进步,但仍然未取得突破。研究表明 Vav1 与恶性肿瘤关系密切,在许多恶性肿瘤中表达增高^[3,4],具有促进肿瘤生长、侵袭及远处转移的作用,但 Vav1 蛋白在结直肠癌中的表达情况及意义的相关报道还不多见。为了解结直肠癌患者 Vav1 蛋白表达及意义,本研究检测了 Vav1 蛋白在结直肠癌组织及癌旁组织中的表达,比较了两者之间的差别,并分析了结直肠癌组织 Vav1 蛋白表达与肿瘤增殖及预后的关系。为初步探讨 Vav1 蛋白的作用机制,本研究同时检测了 Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1 (Ras related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac1)、细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1)、p21 蛋白等与肿瘤增殖关系密切的蛋白表达。Rac1 受 Vav1 调控,与肿瘤细胞的增殖有关^[5];CyclinD1、p21 蛋白对细胞周期具有直接调节作用,因而对肿瘤的增殖有重要影响^[6,7]。本文分析了 Vav1 蛋白与 Rac1、CyclinD1、p21 蛋白之间的关系及意义,对结直肠癌组织中 Vav1 蛋白表达的意义进行了初步分析。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2012 年 8 月至 2014 年 12 月在河北省人民医院住院行原发肿瘤切除手术并有术后病理证实的结直肠癌患者石蜡标本 180 例,其中 162 例有癌旁组织标本(所取标本距肿瘤边缘大于 3cm,术后病理无癌细胞)。所有入选患者均有完整的临床病理资料,术前均未接受过其他治疗。其中男性 106 例,女性 74 例,年龄 34~71 岁,平均年龄(53.1±7.7)岁。记录患者的临床病理特征 (Table 1),分析 Vav1、Rac1、CyclinD1、p21 蛋白与这些特征的关系。

1.2 免疫组化染色检测 Vav1、Rac1、CyclinD1、p21 蛋白表达

Vav1、Rac1、CyclinD1、p21 一抗均为美国 Sigma 公司产品,免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物公司。取石蜡标本连续切片,厚度为 4μm。组织切片制备完成后进行抗原修复,严格按免疫组化试剂盒说明操作,逐步进行显色、复染及封片。切片染色完成

后进行结果判断。染色结果由两位病理专业人员进行阅片。在 400×视野下每张切片随机取 5 个视野,每个视野随机计数 100 个肿瘤细胞,进行二次计分法计算目的蛋白表达情况。Vav1、Rac1、CyclinD1、p21 蛋白均以在细胞浆或细胞膜出现黄或棕黄色颗粒为染色阳性。细胞表达阳性的计分标准:阳性细胞<10%计为 0,10%~25%计为 1,26%~50%计为 2,51%~75%计为 3,>75%计为 4。染色强度的计分标准:无色计为 0,浅黄色计为 1,黄色计为 2,黄褐色计为 3。二者相乘结果≤2 计为(-),2~4 计为(+),4~8 计为(++),>8 计为(+++)。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 18.0 统计分析软件对研究结果数据进行分析,采用 χ^2 检验、Spearman 相关分析对实验数据进行处理,综合分析 Vav1 蛋白在胃癌增殖中的意义。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌肿瘤组织与癌旁组织 Vav1 蛋白与 Rac1、CyclinD1、p21 蛋白表达比较

结直肠癌组织中 Vav1、Rac1、CyclinD1、p21 蛋白均在细胞浆表达,镜下可见癌细胞的胞浆中散在黄色或棕黄色染色的颗粒(Figure 1)。分析结果发现,癌组织中 Vav1、Rac1、CyclinD1 的表达均明显高于癌旁组织(均 $P<0.01$),p21 蛋白的表达在癌组织低于癌旁组织($P<0.01$)(Table 2)。

2.2 结直肠癌肿瘤组织 Vav1、Rac1、CyclinD1、p21 蛋白与患者临床病理特征的关系

应用 χ^2 检验分别分析结直肠癌肿瘤组织 Vav1、Rac1、CyclinD1、p21 蛋白与患者临床病理特征的关系,结果发现 Vav1 表达与肿瘤的浸润深度、分化情况及淋巴结转移有关;Rac1 与肿瘤的分化情况、淋巴结转移有关;CyclinD1 表达与肿瘤的浸润深度、淋巴结转移有关(均 $P<0.05$)。p21 蛋白与患者的临床病理特征无明显关系($P>0.05$)(Table 1)。

2.3 Vav1 表达与 Rac1、CyclinD1、p21 蛋白的关系

Spearman 相关分析结果显示,结直肠癌组织中 Vav1 蛋白与 Rac1、CyclinD1 的表达存在正相关关系($r=0.3367, P<0.001$; $r=0.2564, P<0.001$),Vav1 与 p21 表达存在负相关关系($r=-0.2016, P=0.006$);

Rac1、CyclinD1 与 p21 表达存在负相关关系 ($r=-0.3612, P<0.001; r=-0.2663, P<0.001$)。

3 讨论

结直肠癌是消化道常见的恶性肿瘤之一 [8,9],其发病与生活方式、饮食习惯、抽烟酗酒、遗传等多种因素关系密切。结直肠癌症状不典型,早期不易发现,发现时许多患者已处于晚期,失去了最佳的救治时间,生存质量下降,容易复发,预后差。近年来,结直肠癌发生率在国内外都有不同程度的增加,术后生存率虽有一定提高,但远未达到令人满意的水平。因此,尽快找到与结直肠癌增殖密切相关的蛋白质作为判断病情、选择治疗方案的依据已成为当务之急。Vav1 蛋白是近期受到国内外关注的蛋白之一,研究显示,Vav1 蛋白在多种恶性肿瘤中表达增高,促进肿瘤生长、向周围侵袭及远处转移 [10,11],其表达与肿瘤的恶性程度呈正相关。

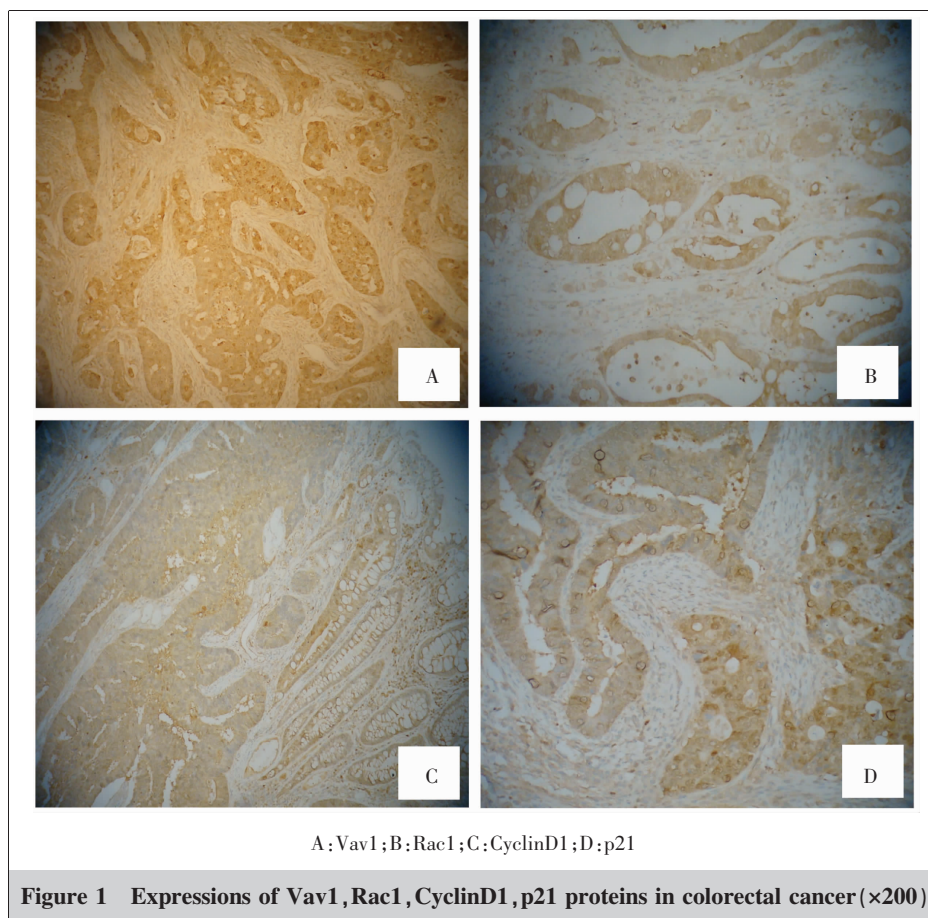
我们的研究发现,结直肠癌组织中 Vav1 蛋白的表达阳性率明显高于癌旁组织,这说明 Vav1 蛋白的表达与肿瘤的发生、发展密切相关。结果还发现 Vav1 表达与肿瘤的浸润深度、分化情况及淋巴结转

Table 1 Relationship between Vav1, Rac1, CyclinD1, p21 proteins of colorectal cancer and clinical pathological data

Clinical pathological parameters	N	Vav1				Rac1				CyclinD1				p21			
		Negative	Positive	χ^2	P	Negative	Positive	χ^2	P	Negative	Positive	χ^2	P	Negative	Positive	χ^2	P
Gender																	
Male	106	30	76			26	80	0.206	0.650	29	77	3.076	0.080	79	27	0.399	0.528
Female	74	24	50	0.354	0.552	16	58			12	62			52	22		
Age(years old)																	
≥60	56	20	36			12	44	0.165	0.685	14	42	0.228	0.633	36	20	2.959	0.085
<60	124	34	90	1.264	0.261	30	94			27	97			95	29		
Tumor diameter(cm)																	
≥5	109	34	75			24	85	0.267	0.605	22	87	1.057	0.304	78	31	0.207	0.649
<5	71	20	51	0.187	0.665	18	53			19	52			53	18		
Depth of invasion																	
In serosa	44	20	24			15	29	3.767	0.052	20	24	17.025	<0.001	31	13	0.159	0.690
Out of serosa	136	34	102	6.623	0.010	27	109			21	115			100	36		
TNM stage																	
I~II	58	19	39			18	40	2.837	0.092	17	41	2.076	0.150	47	11	2.945	0.086
III~IV	122	35	87	0.310	0.578	24	98			24	98			84	38		
Differentiation																	
Well	122	43	79			34	88	4.354	0.037	29	93	0.212	0.645	91	31	0.628	0.428
Poor	58	11	47	5.513	0.019	8	50			12	46			40	18		
Lymphatic metastasis																	
Positive	134	28	106			22	112	14.018	<0.001	20	114	18.381	<0.001	95	39	0.938	0.333
Negative	46	26	20	20.697	<0.001	20	26			21	25			36	10		
Distant metastasis																	
Positive	28	6	22			5	23	0.556	0.456	7	21	0.093	0.760	21	7	0.083	0.774
Negative	152	48	104	1.160	0.282	37	115			34	118			110	42		

Table 2 Expressions of Vav1, Rac1, CyclinD1, p21 proteins in colorectal cancer and adjacent cancer tissues

Tissues	N	Vav1		Rac1		CyclinD1		p21	
		Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive
Colorectal cancer	180	54	126	42	138	41	139	131	49
Adjacent cancer tissues	162	127	35	123	39	125	37	76	86
χ^2		80.15		90.45		100.95		23.87	
P		<0.0001		<0.0001		<0.0001		<0.0001	



与三磷酸鸟嘌呤核苷 (guanosine triphosphate, GTP) 的结合可导致该基因的激活。Rac1 与 GTP 结合激活后,对调节肿瘤微血管新生、促进增殖、诱发凋亡抵抗都有作用,同时还能通过作用于 Link 激酶破坏肿瘤细胞周围肌动蛋白细胞骨架结构,促进肿瘤组织向周围侵袭。有研究已证实,在乳腺癌、肺癌、胰腺癌中发现 Rac1 高表达^[12~14]。Cyclin D1 是重要的细胞周期调节蛋白,该基因对细胞增殖有重要作用。Cyclin D1 基因位于 11q13 上,全长约 15kb。该基因的主要功能是调节细胞周期,推动细胞由 G₁ 期进入 S 期。在肿瘤组织中,Cyclin D1 促进肿瘤细胞快速由 G₁ 期到达 S 期,加

速了肿瘤细胞的增殖^[15,16]。p21 蛋白由 ras 基因编码,也是最早发现的人类癌基因之一,其分子量是 21 000。p21 蛋白具有 GTP 酶活性,通过结合 GTP 来激活靶分子磷酸酶 C 将刺激信号传递到细胞内,而当它水解 GTP,则作用消失。当肿瘤发生后,肿瘤组织通过某种作用机制作用于 p21 蛋白,使之失去了水解 GTP 的功能,p21 蛋白将刺激信号持续地向细胞内传递,导致细胞癌变,肿瘤细胞快速增殖^[17,18]。Rac1、CyclinD1 促进肿瘤细胞的增殖,肿瘤组织向四周浸润和转移,p21 则抑制信号冲动的传导,它们作用相反,互相作用,互相制约使机体处于一种动态平衡。Rac1、CyclinD1 功能增强或 p21 蛋白功能障碍均可导致恶性肿瘤的增殖、侵袭和远处转移。

移有关,浸润较深、分化较差、淋巴结转移阳性的患者 Vav1 蛋白表达更强。提示 Vav1 蛋白的表达可以用于预测结直肠癌发生进展情况,早期动态检测该蛋白水平的变化,及时掌握肿瘤在患者体内的发展变化,帮助临床全面综合地认知结直肠癌患者的具体情况,选择效果更好、副作用最小、个体化的治疗方案。

与此同时,在我们的研究中,为进一步探讨 Vav1 蛋白在恶性肿瘤中的具体的作用机制,还检测了 Rac1、CyclinD1、p21 蛋白在癌组织和癌旁组织中的表达。Rac1 属于 Rac 亚家族,位于染色体 7p22,全长 29kb,该基因通过与二磷酸鸟嘌呤核苷 (guanosine diphosphate, GDP) 结合导致该基因失活,

加速了肿瘤细胞的增殖^[15,16]。p21 蛋白由 ras 基因编码,也是最早发现的人类癌基因之一,其分子量是 21 000。p21 蛋白具有 GTP 酶活性,通过结合 GTP 来激活靶分子磷酸酶 C 将刺激信号传递到细胞内,而当它水解 GTP,则作用消失。当肿瘤发生后,肿瘤组织通过某种作用机制作用于 p21 蛋白,使之失去了水解 GTP 的功能,p21 蛋白将刺激信号持续地向细胞内传递,导致细胞癌变,肿瘤细胞快速增殖^[17,18]。Rac1、CyclinD1 促进肿瘤细胞的增殖,肿瘤组织向四周浸润和转移,p21 则抑制信号冲动的传导,它们作用相反,互相作用,互相制约使机体处于一种动态平衡。Rac1、CyclinD1 功能增强或 p21 蛋白功能障碍均可导致恶性肿瘤的增殖、侵袭和远处转移。

本研究的结果显示, Rac1、CyclinD1 在结直肠癌中的表达明显高于癌旁组织, 而 p21 蛋白在癌旁组织中的表达明显高于癌组织。分析这 3 种蛋白与患者临床病理特征的关系, 结果显示 Rac1 与肿瘤的分化情况、淋巴结转移有关; CyclinD1 表达与肿瘤的浸润深度、淋巴结转移有关。说明 Rac1、CyclinD1 蛋白在结直肠癌进展中发挥了作用。但本研究还发现 p21 蛋白与患者的临床病理特征无明显关系, 我们分析这可能是由于 p21 蛋白在结直肠癌的不同阶段发挥的作用不同, 且本研究样本量有限, 因而 p21 与患者临床病理特征的关系在本研究中并不明显。Spearman 相关分析结果显示结直肠癌中 Vav1 与 Rac1、CyclinD1 存在正相关关系, 与 p21 存在负相关关系, 因此我们分析认为 Vav1 蛋白可能通过调控 Rac1、CyclinD1 基因, 促进了两者在恶性肿瘤里的表达, 同时抑制了 p21 蛋白的抑制作用, 进一步加速了两者在恶性肿瘤里的表达, 从而导致了结直肠癌的进展、侵袭和转移。但 Vav1 蛋白的具体作用机制还有待进一步深入。

我们通过研究证实 Vav1 蛋白在结直肠癌患者中高表达, 并与肿瘤的增殖、侵袭和远处转移有关, 因此 Vav1 蛋白可以作为预测结直肠癌患者肿瘤发展程度、预后的重要指标。Vav1 蛋白可能通过促进 Rac1、CyclinD1 的表达、抑制 p21 蛋白的抑制作用从而使肿瘤侵袭和转移。

参考文献:

- [1] Zou ZY, Liu HL, Ning N, et al. Clinical significance of pre-operative neutrophil lymphocyte ratio and platelet lymphocyte ratio as prognostic factors for patients with colorectal cancer[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(3):2241-2248.
- [2] Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, et al. Integrative analyses of colorectal cancer show immunoscore is a stronger predictor of patient survival than microsatellite instability[J]. *Immunity*, 2016, 44(3):698-711.
- [3] Qi Y, Kong FM, Deng Q, et al. Clinical significance and prognostic value of Vav1 expression in non-small cell lung cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(8):2491-2497.
- [4] Du MJ, Chen XD, Zhou XL, et al. Estrogen induces Vav1 expression in human breast cancer cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6):e99052.
- [5] Hofbauer SW, Krenn PW, Ganghammer S, et al. Tiam1/Rac1 signals contribute to the proliferation and chemoresistance, but not motility, of chronic lymphocytic leukemia cells[J]. *Blood*, 2014, 123(14):2181-2188.
- [6] Li H, Xiao W, Ma J, et al. Dual high expression of STAT3 and cyclinD1 is associated with poor prognosis after curative resection of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(11):7989-7998.
- [7] Sun Y, Tan X, Tang Z, et al. Knockdown of nucleostemin can inhibit the proliferation of esophageal carcinoma cells in vitro through upregulating p21[J]. *Hepatogastroenterology*, 2014, 61(136):2247-2252.
- [8] Torabizadeh Z, Nosrati A, Tahvildari S. Human epidermal growth factor receptor expression in colorectal cancer and its relationship with clinicopathological characteristics[J]. *Middle East J Dig Dis*, 2016, 8(1):24-30.
- [9] Pourahmad S, Pourhashemi S, Mohammadianpanah M. Colorectal cancer staging using three clustering methods based on preoperative clinical findings [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(2):823-827.
- [10] Katzav S. Vav1: a Dr. Jekyll and Mr. Hyde protein—good for the hematopoietic system, bad for cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30):28731-28742.
- [11] Sebban S, Farago M, Rabinovich S, et al. Vav1 promotes lung cancer growth by instigating tumor-microenvironment cross-talk via growth factor secretion [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(19):9214-9226.
- [12] Rozenchan PB, Pasini FS, Roela RA, et al. Specific upregulation of RHOA and RAC1 in cancer-associated fibroblasts found at primary tumor and lymph node metastatic sites in breast cancer [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36 (12): 9589-9597.
- [13] Chang JS, Su CY, Yu WH, et al. GIT1 promotes lung cancer cell metastasis through modulating Rac1/Cdc42 activity and is associated with poor prognosis [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(34):36278-36291.
- [14] Yan Y, Ouellette MM. Rac1 GTPase in pancreatic cancer [J]. *Aging (Albany NY)*, 2015, 7(9):609-610.
- [15] Sarkar S, Kanoi A, Bain J, et al. Correlation between cyclin D1 expression and standard clinicopathological variables in invasive breast cancer in Eastern India [J]. *South Asian J Cancer*, 2015, 4(4):155-159.
- [16] Xu S, Gu G, Ni Q, et al. The expression of AEG-1 and Cyclin D1 in human bladder urothelial carcinoma and their clinicopathological significance [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(11):21222-21228.
- [17] Liu W, Liu Y, Liu H, et al. Tumor suppressive function of p21-activated kinase 6 in hepatocellular carcinoma [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(47):28489-28501.
- [18] Lv H, Gao G, Zhang L, et al. Polo-like kinase 3 inhibits osteosarcoma cell proliferation and tumorigenesis via cooperative interaction with p21 [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12 (5):6789-6796.