

· 临床研究 ·

食管鳞癌组织中 RhoC mRNA 和蛋白的表达及意义*

赵志华¹, 樊青霞², 张蕾^{2△}, 李晟磊¹, 张云汉¹, 高冬玲¹

(郑州大学第一附属医院:1. 病理科;2. 肿瘤科 450052)

摘要:目的 探讨食管鳞癌、癌旁不典型增生及正常食管黏膜组织中 RhoC mRNA 和蛋白的表达及其与临床病理因素的关系。方法 应用原位杂交、免疫组化法检测 62 例食管鳞癌、31 例癌旁不典型增生及 62 例正常食管黏膜组织中 RhoC mRNA 和蛋白的表达情况。结果 在癌组织、癌旁不典型增生及正常黏膜组织中 RhoC mRNA 和蛋白的表达率依次降低, 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 其高表达与食管鳞癌的组织学分级、浸润深度及淋巴结转移密切相关($P < 0.05$); RhoC mRNA 与蛋白的表达呈正相关关系($P < 0.05$)。结论 RhoC mRNA 和蛋白的高表达可能在食管鳞癌的发生发展过程中起重要作用, 可望作为判断食管鳞癌侵袭转移能力的一项客观指标。

关键词:原位杂交;免疫组织化学;食管鳞癌;RhoC

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.15.011

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)15-1484-03

Expression and significance of RhoC and protein in esophageal squamous cell carcinoma^{*}Zhao Zhihua¹, Fan Qingxia², Zhang Lei^{2△}, Li Shenglei¹, Zhang Yunhan¹, Gao Dongling¹

(1. Department of Pathology; 2. Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

Abstract: Objective To investigate the clinicopathological of RhoC mRNA and protein expression in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), cancer-adjacent atypical hyperplasia epithelium and normal esophageal epithelium. **Methods** The expression of RhoC mRNA and protein in 62 cases of esophageal squamous carcinoma, 31 cases of cancer-adjacent atypical hyperplasia epithelium and 62 cases of normal esophageal epithelium tissues were detected with in situ hybridization and SP immunohistochemical method.

Results The expression of RhoC mRNA and protein decreased in turns in carcinoma, adjacent atypical hyperplasia epithelium and normal esophageal epithelium specimens, there were significant differences in group comparison ($P < 0.05$). For ESCC, the expression level of RhoC mRNA and protein were significantly related to the degree of differentiation, depth of invasion and lymph node metastasis ($P < 0.05$). There was the significant positive correlation between RhoC mRNA and RhoC protein ($P < 0.05$). **Conclusion**

The increased expression of RhoC mRNA and protein may play an important role in carcinogenesis, invasion, metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. RhoC may become an objective target to evaluate the potential of lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma.

Key words: in situ hybridization; immunohistochemistry; esophageal carcinoma; RhoC

RhoC 是 Rho 蛋白家族的重要成员之一,其主要功能是调节肌动蛋白的细胞骨架,肌动蛋白在细胞的增殖、生长和凋亡中起关键作用。研究显示 RhoC 的高表达与多种肿瘤的浸润和转移密切相关^[1-3]。本研究采用原位杂交、免疫组化技术检测 RhoC 基因在 62 例食管鳞癌、31 例癌旁不典型增生及 62 例正常食管黏膜组织的表达情况,并探讨其阳性表达在食管鳞癌发生发展中的临床病理意义,以期寻找食管鳞癌早期诊断和预后判断的指标。

1 资料与方法

1.1 一般资料 62 例手术切除标本取自食管癌高发区(河南省安阳市肿瘤医院)2006 年 2 月 26 日至 3 月 16 日的患者,所有病例术前均无化疗、放疗及免疫治疗史。其中男 36 例,女 26 例;年龄 38~75 岁,平均(60.6±9.5)岁。组织学分级 I 级 15 例,II 级 25 例,III 级 22 例;伴淋巴结转移者 20 例,无淋巴结转移者 42 例。7 例(浅层组)肿瘤浸润黏膜层、黏膜下层或浅肌层;55 例(深层组)肿瘤浸润深肌层或外膜层。全部病例

均经常规病理证实为食管鳞状细胞癌。标本离体 0.5 h 内迅速取材,每例标本分别取无坏死区癌灶、癌旁 3 cm 以内及远端正常黏膜 3 个部分。每部分用 40 g/L 多聚甲醛液固定,常规脱水,石蜡包埋,连续切片,切片厚度 4~6 μm,分别用于 HE、原位杂交及免疫组化染色。

1.2 方法

1.2.1 试剂与方法 预杂交液、SA-Bio-AP、BCIP/NBT 均购自武汉博士德生物技术有限公司。原位杂交 5'端生物素标记、全硫代修饰单链核苷酸探针由北京奥科生物技术有限公司合成。RhoC 探针序列 5'-CGT TGG GGC AGA AGT GCT TCA CCT C-3'。羊抗人 RhoC 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,SP 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。具体操作步骤按说明书进行。

1.2.2 结果判定 原位杂交的阳性计算方法采用 9 分评分制^[6]:高倍镜下随机选取 5 个视野(每个视野观察细胞数不少于 200 个),按照阳性细胞比例计分:小于或等于 10%为 1 分,

* 基金项目:河南省高校杰出科研人才创新工程项目(2007kycx005);河南省教育厅自然科学研究资助计划资助项目(2010A310020)。△

通讯作者:Tel:(0371)66295562;E-mail:ZhangLei68616@yahoo.com.cn。

表 1 正常食管黏膜、癌旁不典型增生组织及食管鳞癌组织中 RhoC mRNA 和蛋白的表达

组织	n	RhoC 蛋白阳性率(%)	χ^2	P	RhoC mRNA 阳性率(%)	χ^2	P
正常黏膜组织	62	19.4			21.0		
癌旁组织	31	35.5	54.250	0.000	32.3	47.735	0.000
癌组织	62	83.9			80.6		

表 2 食管鳞癌组织中 RhoC mRNA 和蛋白表达与临床病理学参数的关系

病理学参数	n	RhoC 蛋白阳性率(%)	χ^2	P	RhoC mRNA 阳性率(%)	χ^2	P
性别							
男	36	83.3	0.018	0.892	80.6	0.000	0.983
女	26	84.6			80.8		
年龄(岁)							
≥60	33	78.8	1.348	0.246	81.8	0.062	0.803
<60	29	89.7			79.3		
组织学分级							
I	15	53.3			53.3		
II	25	92.0	13.744	0.001	88.0	9.520	0.009
III	22	95.5			90.9		
浸润深度							
浅层组	7	42.9			42.9		
深层组	55	89.1	9.812	0.002	85.5	7.219	0.007
淋巴结转移							
无	42	76.2	5.678	0.017	73.8	3.898	0.048
有	20	100			95.0		

10%~50%为 2 分,大于 50%为 3 分;按染色强弱计分:阴性为 0 分;淡蓝色染色为 1 分;深蓝色染色为 2 分,紫蓝色染色为 3 分。然后按照阳性细胞得分×染色强弱得分计总分,总分小于 3 为阴性,总分大于或等于 3 为阳性。免疫组化结果判定,采用双盲法观察结果,以镜下细胞质或细胞膜中出现黄色或棕黄色颗粒为其阳性判定标准^[7]。无着色细胞为阴性,有着色细胞无论面积和强度大小均为阳性。

1.3 统计学处理 数据采用 SPSS13.0 统计软件处理,不同食管组织中 RhoC mRNA 和蛋白表达差别及其与临床病理学参数的关系行 χ^2 检验,RhoC mRNA 和蛋白表达的相关性行 Spearman 相关分析。检验水准 $\alpha=0.05, P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RhoC mRNA 在食管鳞癌组织中的表达及其与临床生物学行为的关系 RhoC mRNA 阳性表达主要位于癌细胞的胞质内,呈紫蓝色颗粒。在食管鳞癌组织、癌旁不典型增生组织和正常食管黏膜组织中,RhoC mRNA 阳性表达率为 80.6%、32.3%、21.0%。3 组间 RhoC mRNA 表达的比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1 和插 II 图 1。RhoC mRNA 的阳性表达与食管鳞癌的组织学分级、浸润深度及淋巴结转移密切相关(均 $P<0.05$),而与患者的性别、年龄无关($P>0.05$),见表 2。

2.2 RhoC 蛋白在食管鳞癌组织中的表达及其与临床生物学行为的关系 RhoC 蛋白的阳性信号呈浅黄色至深黄色颗粒,主要定位于细胞的胞质中,食管鳞癌组织、癌旁不典型增生组织与正常食管黏膜组织中的表达率比较,差异有统计学意义

($P<0.05$)。结果见表 1 和插 II 图 2。由表 2 可知 RhoC 蛋白的阳性表达与食管鳞癌的组织学分级、浸润深度及淋巴结转移密切相关(均 $P<0.05$),而与患者的性别、年龄无关($P>0.05$)。

2.3 RhoC mRNA 及蛋白在食管鳞癌组织中表达的相关性分析 在 RhoC 蛋白表达阳性的 52 例患者中,46 例 mRNA 表达阳性,而在 RhoC 蛋白表达阴性的 10 例患者中有 6 例 mRNA 表达阴性,RhoC 蛋白及 mRNA 在食管鳞癌组织中的表达呈正相关($r=0.451, P<0.01$),结果见表 3。

表 3 RhoC mRNA 及蛋白在食管鳞癌中表达的相关性分析

RhoC 蛋白表达	n	RhoC mRNA 表达		r	P
		+	-		
+	52	46	6	0.451	0.000
-	10	4	6		

3 讨论

RhoC 基因定位于 1p13-p21,基因全长 6 768 bp,包括 6 个外显子和 5 个内显子;RhoC 基因编码产物含 193 个氨基酸,与 RhoA 蛋白有 92%的同源性,与 RhoB 有 85%的同源性,是相对分子质量大约为 21×10^3 的 GTP 结合蛋白,具有 GTP 酶活性,能结合并水解鸟苷酸,使其在活性 GTP 结合型与失活性 GDP 结合型之间循环,从而在细胞信号转导通路中作为信号转换器或分子开关,作用于细胞骨架或其靶蛋白而产生多种生物学效应^[8-9]。近年来,先后有文献报道,RhoC 高表达或活性

升高与乳腺癌、黑色素瘤、胰腺癌、结肠癌、膀胱癌、非小细胞肺癌和胃癌等多种肿瘤的侵袭转移密切相关^[10-12]。

本实验采用原位杂交及免疫组化法检测了食管鳞癌中 RhoC mRNA 和蛋白的表达。结果显示在正常食管黏膜中, RhoC mRNA 和蛋白的表达均低于癌组织 ($P < 0.05$), 提示 RhoC 表达升高可能参与食管黏膜上皮细胞的恶性转化过程, 这可能与食管鳞癌的发生有关。RhoC mRNA 和蛋白的阳性表达率随癌组织浸润深度的加深而明显升高 ($P < 0.05$), RhoC mRNA 和蛋白的阳性表达率在有淋巴结转移的癌组织中明显高于无淋巴结转移癌组织 ($P < 0.05$), 提示 RhoC mRNA 和蛋白的异常表达可能与食管鳞癌的浸润及淋巴结转移密切相关, 此结果与多位学者在乳腺癌中的研究一致^[13-15]。本研究结果还显示, RhoC mRNA 和蛋白的阳性率随食管鳞癌分化程度的降低而明显下降 ($P < 0.05$), 提示 RhoC 基因在诱导肿瘤细胞分化过程中起重要作用。张惠忠等^[16]报道 RhoC 蛋白的表达与食管癌的分化程度无关 ($P > 0.05$), 出现这种差异的原因可能与标本的来源、数量及研究方法的不同有关。食管鳞癌中 RhoC mRNA 与其蛋白的表达呈正相关关系, 提示 RhoC mRNA 表达和蛋白表达具有一致性, 其 mRNA 的表达是蛋白表达的基础, 符合基因表达的中心法则, 食管鳞癌中 RhoC mRNA 的表达率略低于其蛋白的表达, 提示可能存在 RhoC 基因转录后调节。

综上所述, RhoC 基因的高表达与食管鳞癌的发生、浸润转移有关, 可作为一项提示食管鳞癌转移潜能的生物学指标, 检测其在食管鳞癌中的表达对于判断肿瘤浸润、转移能力及预后评估具有重要临床应用价值。

参考文献:

- [1] Zhao L, Wang H, Li J, et al. Overexpression of Rho GDP-dissociation inhibitor is associated with tumor progression and poor prognosis of colorectal cancer [J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(9): 3994-4003.
- [2] Kurucz R, Belian E, Treue D, et al. Regulation of mRNA expression in drug-sensitive and drug-resistant gastric carcinoma cells is independent of YB-1 expression [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(2): 693-698.
- [3] Nishimori H, Yasoshima T. Inhibition of osteopontin reduces liver metastasis of human pancreatic cancer xenografts injected into the spleen in a mouse model [J]. *Surg Today*, 2010, 40(4): 347-356.
- [4] Jaubert-Possamai S, Le Trionnaire G, Bonhomme J, et al. Gene knockdown by RNAi in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* [J]. *BMC Biotechnol*, 2007, 7: 63-69.
- [5] Zhang RG, Zhao JJ, Yang LQ, et al. RNA interference-mediated hTERT inhibition enhances TRAIL-induced apoptosis in resistant hepatocellular carcinoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(4): 1013-1019.
- [6] 李晟磊, 刘宗文, 赵秋民, 等. 食管鳞癌组织中 RECK mRNA 和蛋白的表达及意义 [J]. *中国肿瘤临床*, 2007, 34(22): 1280-1283.
- [7] 陈轩, 王子卫, 张可. 生存素基因 mRNA 和蛋白在胃癌中表达及其意义 [J]. *重庆医学*, 2008, 37(13): 1453-1455.
- [8] Zang S, Chen F, Dai J, et al. RNAi-mediated knockdown of Notch-1 leads to cell growth inhibition and enhanced chemosensitivity in human breast cancer [J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(4): 893-899.
- [9] Zhao L, Zhang C, Liao G, et al. RNAi-mediated inhibition of PDGF-D leads to decreased cell growth, invasion and angiogenesis in the SGC-7901 gastric cancer xenograft model [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(1): 42-48.
- [10] Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z, et al. Rho GTPase function in tumorigenesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1796(2): 91.
- [11] Heasman SJ, Ridlev AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(9): 690.
- [12] 赵增强, 余佩武, 赵永亮, 等. RhoC 蛋白在胃癌中的表达及其临床意义 [J]. *重庆医学*, 2005, 34(5): 738-739.
- [13] Kleer CG, Van Golen KL, Zhang YH, et al. Characterization of RhoC expression in benign and malignant breast disease [J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(2): 579-584.
- [14] Van den Eynden GG, Van der Auwera I, Van Laere S, et al. Validation of a tissue microarray to study differential protein expression in inflammatory and non-inflammatory breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2004, 85(1): 13-22.
- [15] Yuan Z, Su J, You JF, et al. Correlation of expression of RhoC with invasiveness of breast cancer cells in vitro [J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2007, 29(12): 898-903.
- [16] 张惠忠, 刘金耿, 魏益平, 等. 食管鳞癌 RhoC 和 OPN 蛋白的表达及其对患者预后的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2006, 26(11): 1612-1615.

(收稿日期: 2010-05-06 修回日期: 2010-11-06)

(上接第 1483 页)

Model for end-stage liver disease score to serum sodium ratio index as a prognostic predictor and its correlation with portal pressure in patients with liver cirrhosis [J]. *Liver Int*, 2007, 27(4): 498-506.

- [15] Huo TL, Wang YW, Yang YY, et al. Model for end-stage liver disease score to serum sodium ratio index as a prognostic predictor and its correlation with portal pressure in patients with liver cirrhosis [J]. *liver international*, 2007,

142(11): 498-506.

- [16] Tamar H, Taddei MD, Mario Strazzabosco MD. Hepatic Venous Pressure Gradient (HVPG), Serum Sodium (SNa), and Model of End-stage Liver Disease Score (MELD) Prognostic Significance and Correlations [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2007, 41(7): 641-643.

(收稿日期: 2010-12-10 修回日期: 2011-03-10)