

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.32.020

DLC1 和 RhoA 表达对乳腺癌淋巴道转移的影响*

欧小波¹, 周密², 冉启梅²

(遵义医学院珠海校区:1. 病理学教研室;2. 临床医学系, 广东珠海 519041)

[摘要] **目的** 探究肝癌缺失基因 1(DLC1)与 RhoA 表达对乳腺癌淋巴道转移的影响。**方法** 收集已发生淋巴结转移的乳腺癌病变组织标本 25 例,未发生淋巴结转移的乳腺癌病变组织标本 30 例,采用免疫组化(SP)法检测 DLC1 与 RhoA 在两组标本中的表达情况,应用统计学方法对实验结果进行分析。**结果** 在发生转移和未发生转移的乳腺癌病变组织中 DLC1 阳性率分别为 44.00%和 73.33%($\chi^2=4.889, P=0.027$),RhoA 阳性率分别为 92.00%和 50.00%($\chi^2=11.264, P=0.001$),spearman 等级相关分析显示 DLC1 与 RhoA 在乳腺癌病变组织中的表达呈负相关($r=-0.454, P=0.000$)。**结论** 乳腺癌淋巴道转移与 DLC1 低表达、RhoA 高表达密切相关。

[关键词] 基因缺失;RhoA;乳腺肿瘤;免疫组织化学;淋巴道转移

[中图分类号] R73

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)32-4519-03

The effect of DLC1 and RhoA in lymphatic metastasis of breast cancer*

Ou Xiaobo¹, Zhou Mi², Ran Qimei²

(1. Department of Pathology;2. Department of Clinical Medicine, Zhuhai Campus of Zunyi Medical University, Zhuhai, Guangdong 519041, China)

[Abstract] **Objective** Through detect the expression of DLC1 and RhoA protein in breast cancer tissues, investigate the effect of DLC1 and RhoA in lymphatic metastasis of breast cancer. **Methods** Totally 25 breast cancer specimens that had occurred lymph node metastasis and 30 breast cancer specimens that had not occurred lymph node metastasis were collected, the expression of DLC1 and RhoA were tested by immunohistochemistry, and the experimental data were analyzed by statistical methods. **Results** The positive rate of DLC1 in the breast cancer specimens that had occurred lymph node metastasis was 44.00%, that had not occurred lymph node metastasis was 73.33% ($\chi^2=4.889, P=0.027$), and the positive rates of RhoA in the two specimens were 92.00% and 50.00% ($\chi^2=11.264, P=0.001$). Spearman rank correlation analysis showed the expression of DLC1 and RhoA had a negative correlation in breast cancer tissues ($r=-0.454, P=0.000$). **Conclusion** The breast cancer lymphatic metastasis and is closely related to the low expression of DLC1 and the high expression of RhoA.

[Key words] gene deletion; RhoA; breast neoplasms; immunohistochemistry; lymphatic metastasis

1998 年, Yuan 等^[1]首次提出肝癌缺失基因 1(deleted in liver cancer 1, DLC1)作为抑癌基因位于人类染色体 8p21.3-22,其在肝癌、乳腺癌等恶性肿瘤中表达减少或缺失。Holeiter 等^[2]进行的细胞划痕实验和侵袭实验发现乳腺癌细胞 DLC1 表达缺失会导致细胞的运动和侵袭能力增强,证明了 DLC1 能抑制乳腺癌细胞转移。而 RhoA-ROCK 信号通路可参与细胞骨架重组,促进细胞运动、迁移^[3],在乳腺癌侵袭和转移中可能发挥一定作用^[4]。但国内外尚未见相关文献报道乳腺癌淋巴道转移中 DLC1 与 RhoA-ROCK 通路之间的联系,本文旨在应用免疫组化(SP)法检测 DLC1 和 RhoA 蛋白在乳腺癌组织中的表达情况,探究 DLC1 与 RhoA-ROCK 通路对乳腺癌淋巴道转移的影响,为乳腺癌患者的预后和靶向治疗提供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 25 例已发生淋巴结转移的乳腺癌病变组织标本和 30 例未发生淋巴结转移的乳腺癌病变组织标本均由遵义医学院第五附属(珠海)医院病理科提供,患者临床病例资料完整,均为女性,中位年龄为 49 岁。

1.2 试剂 兔源 DLC1 多克隆抗体(美国 GeneTex),兔源 RhoA 多克隆抗体(北京博胜经纬科技有限公司),免疫组化染色试剂盒、浓缩型 DAB 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公

司),PBS 缓冲液、枸橼酸盐缓冲液(博士德生物)。

1.3 方法 采用 SP 法,按试剂盒操作说明书操作。DLC1 抗体以 1:750 稀释,RhoA 抗体以 1:500 稀释。

1.4 结果判定 按阳性细胞占有癌细胞的比例和细胞显色深浅分别对本标进行评分,评分标准如下。(1)阳性细胞百分率:0%~15%细胞显色为 0 分,>15%~30%细胞显色为 1 分,>30%~50%显色为 2 分,>50%显色为 3 分。(2)显色深浅:不显色或显色不清为 0 分,浅黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分。二项乘积 0 分为阴性(-),1~2 分为阳性(+),3~4 分为中阳性(++),5~9 分为强阳性(+++)。

1.5 统计学处理 应用统计软件 SPSS17.0 进行数据分析,采用四格表 χ^2 检验比较各组间阳性率,spearman 等级相关分析法分析 DLC1 与 RhoA 的相关性。检验水准 $\alpha=0.05$ 。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DLC1 和 RhoA 蛋白的表达情况 DLC1 阳性部位主要为细胞质,呈棕黄色,见图 1~2;RhoA 阳性部位主要为细胞浆,呈棕黄色,见图 3~4。其中已发生淋巴结转移的病变组织与未发生转移的病变组织相比,DLC1 阳性率降低($P<0.05$),RhoA 阳性率则升高($P<0.01$),见表 1。

* 基金项目:贵州省科学技术基金资助项目(黔科合 J 字 LKZ[2011]40 号)。作者简介:欧小波(1979-),讲师,硕士,主要从事肿瘤病理学研究。

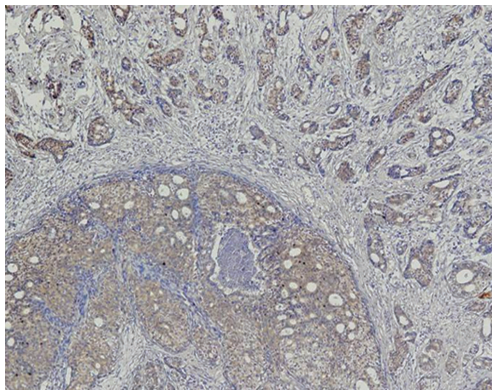


图 1 DLC1 在未发生淋巴结转移乳腺癌病变组织中的表达 (SP×100)

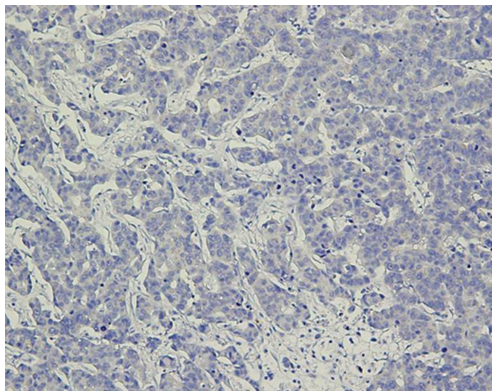


图 2 DLC1 在已发生淋巴结转移乳腺癌病变组织中的表达 (SP×200)

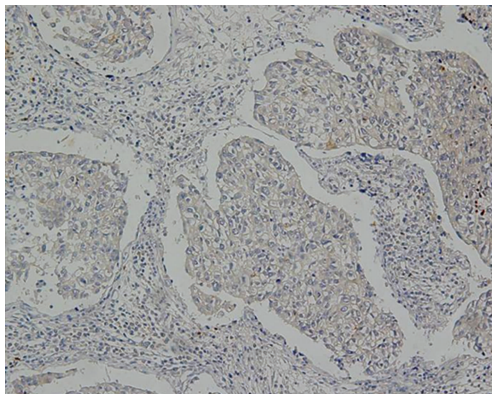


图 3 RhoA 在未发生淋巴结转移乳腺癌病变组织中的表达 (SP×200)

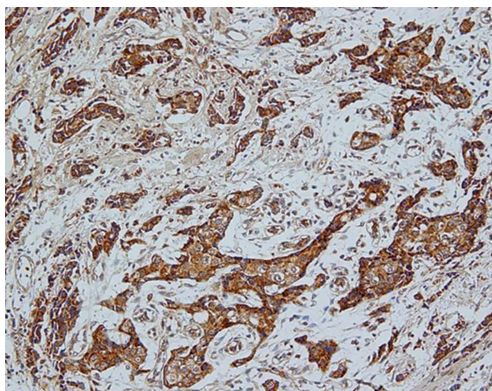


图 4 RhoA 在已发生淋巴结转移乳腺癌病变组织中的表达 (SP×200)

表 1 DLC1 与 RhoA 在两组中的表达

组别	n	DLC1		RhoA	
		阳性数(n)	阳性率(%)	阳性数(n)	阳性率(%)
未转移组	30	22	73.33	15	50.00
转移组	25	11	44.00	23	92.00

2.2 DLC1 和 RhoA 在乳腺癌病变组织中表达的相关性 spearman 等级相关分析显示 DLC1 与 RhoA 在乳腺癌病变组织中的表达呈负相关($r = -0.454, P < 0.01$), 见表 2。

表 2 乳腺癌病变组织中 DLC1 与 RhoA 表达的相关性

DLC1	RhoA			
	-	+	++	+++
-	3	7	5	2
+	2	3	3	0
++	9	6	1	0
+++	8	6	0	0

3 讨 论

乳腺癌作为女性最常见的恶性肿瘤之一^[5], 以淋巴道为主要转移途径, 抑制乳腺癌细胞的浸润和转移是临床上治疗乳腺癌的重要手段, 因此探索乳腺癌淋巴道转移的相关因素对抑制肿瘤转移和治疗乳腺癌具有重大的意义。

DLC1 由 Yuan 等^[1]在原发性肝癌中首次分离和报道的, 其功能结构域主要有 3 个, 分别是 SAM、RhoGAP 和 START, 其中 RhoGAP 被普遍认为是抗肿瘤的主要结构域^[6], 其抗肿瘤的主要机制是使 RhoGTPase 活化, 有活性的 RhoGTP 被转变为无活性的 RhoGDP, 从而使 Rho 失活, 抑制癌细胞增殖和转移。

RhoA 是 Rho 蛋白家族中的一个小分子蛋白, 其常见的下游靶效应分子为 Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(Rho associated coiled coil forming protein kinase, ROCK), ROCK 可接受 RhoA 转导的活化信号, 参与细胞内肌动蛋白细胞骨架重组, 从而改变细胞形态、影响细胞运动及迁移能力^[7]。

已有研究报道, DLC1 作为抑癌因子在乳腺癌中表达下调, 抑制乳腺癌细胞的增殖和转移^[8]。Roessler 等^[9]的研究发现 DLC1 表达缺失的肝癌患者预后情况较差, 证明了 DLC1 是影响肿瘤患者预后的因素之一。在我国也有学者做了 DLC1 与肿瘤预后的相关研究, 比如 Feng 等^[10]采用免疫组化技术检测乳腺癌组织中 DLC1 的表达, 发现 DLC1 与淋巴道转移相关。本研究采用 SP 法检测, 发现在已发生淋巴结转移的 25 例乳腺癌病变组织中, DLC1 阳性率为 44.00%; 而在未发生转移的 30 例病变组织中, DLC1 阳性率为 73.33%, 实验结果表明, 相较于无转移的乳腺癌病变组织, DLC1 在发生了淋巴结转移的乳腺癌病变组织中表达下调, 说明 DLC1 在乳腺癌淋巴道转移中发挥着抑制作用。

据文献报道, RhoA 在各种恶性肿瘤比如乳腺癌、宫颈癌等的转移过程中充当着极其活跃的角色^[11-12]。本研究结果发现在已发生淋巴结转移的 25 例乳腺癌病变组织中, RhoA 阳性率达 92.00%, 在 30 例未转移的乳腺癌病变组织中, RhoA 阳性率达 50.00%, 实验证明, RhoA 在发生了转移的乳腺癌病变组织中表达明显强于未发生转移。

Wang 等^[13]在乳腺癌骨转移方面的研究显示 DLC1 可以抑制 Rho 通路而降低乳腺癌骨转移, 然而, 关于乳腺癌淋巴道

转移中 DLC1 与 RhoA-ROCK 通路之间的联系国内外尚未见文献报道。本研究结果表明,发生淋巴结转移的乳腺癌病变组织相较于未发生转移的 DLC1 表达下调,而 RhoA 表达上调, spearman 等级相关分析显示,二者的表达呈负相关,由此证实了 DLC1 作为 RhoA 蛋白的反向调控蛋白,可能通过下调 RhoA 的表达而抑制乳腺癌淋巴道转移。RhoA 表达下调导致 ROCK 接受的活化信号减弱,于是 RhoA-ROCK 信号通路的作用受到抑制,从而影响细胞内肌动蛋白细胞骨架重组^[7],降低细胞运动和迁移能力,因而抑制乳腺癌淋巴道转移。

总之,本实验通过免疫组化检测初步表明 DLC1 表达下调及 RhoA 表达上调跟乳腺癌淋巴道转移密切相关,DLC1 可能通过下调 RhoA 的表达来抑制乳腺癌淋巴道转移。DLC1 和 RhoA 很可能成为临床抑制乳腺癌细胞浸润和转移的新靶点,至于彼此间具体的分子机制尚待从基因水平进一步探究。

参考文献

- [1] Yuan BZ, Miller MJ, Keck CL, et al. Cloning, characterization, and chromosomal localization of a gene frequently deleted in human liver cancer (DLC-1) homologous to rat Rho GAP[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(10): 2196-2199.
- [2] Holeiter G, Heering J, Erlmann P, et al. Deleted in liver cancer 1 controls cell migration through a Dial-dependent signaling pathway[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(21): 8743-8751.
- [3] Sahai E, Marshall CJ. RHO-GTPases and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(2): 133-142.
- [4] 赵筱倩, 刘晓. RhoA、ROCK 在乳腺癌组织中的表达及其意义[J]. *放射免疫学杂志*, 2012, 25(4): 439-442.
- [5] 郑莹, 吴春晓, 张敏璐. 乳腺癌在中国的流行状况和疾病特征[J]. *中国癌症杂志*, 2013, 23(8): 561-569.
- [6] Lahoz A, Hall A. DLC1: a significant GAP in the cancer

genome[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(13): 1724-1730.

- [7] Wetttschreck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology [J]. *J Mol Med*, 2002, 80(10): 629-638.
- [8] Muehlich S, Hampl V, Khalid S, et al. The transcriptional coactivators megakaryoblastic leukemia 1/2 mediate the effects of loss of the tumor suppressor deleted in liver cancer 1[J]. *Oncogene*, 2012, 31(35): 3913-3923.
- [9] Roessler S, Long EL, Budhu A, et al. Integrative genomic identification of genes on 8p associated with hepatocellular carcinoma progression and patient survival[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(4): 957-966.
- [10] Feng Y, Zhou HX, Li JH, et al. Expression of deleted in liver cancer 1 and phosphorelated focal adhesion kinase in breast cancer[J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2011, 31(8): 1448-1451.
- [11] Ma L, Liu YP, Zhang XH, et al. Relationship of RhoA signaling activity with ezrin expression and its significance in the prognosis for breast cancer patients[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2013, 126(2): 242-247.
- [12] Gilkes DM, Xiang L, Lee SJ, et al. Hypoxia-inducible factors mediate coordinated RhoA-ROCK1 expression and signaling in breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: E384-393.
- [13] Wang Y, Lei R, Zhuang X, et al. DLC1-dependent parathyroid hormone-like hormone inhibition suppresses breast cancer bone metastasis[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(4): 1646-1659.

(收稿日期: 2015-06-11 修回日期: 2015-07-29)

(上接第 4518 页)

- 2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates[J]. *Cancer*, 2010, 116(3): 544-573.
- [2] 李连弟, 饶克勤. 中国 11 市县肿瘤发病率和死亡登记资料统计分析(1988~1992)[J]. *中国肿瘤*, 2000, 10(5): 435-447.
- [3] Ibister WH, Frase J. Large-bowel cancer in the young: anational survival study[J]. *Dis Colon Rectum*, 1990, 33(3): 363-366.
- [4] You Y. Young-onset colorectal cancer; is it time to pay attention[J]. *Arch Intern Med*, 2012, 172(3): 287-289.
- [5] Neufeld D, Shpitz B, Bugaev N, et al. Young-age onset of colorectal cancer in Israel[J]. *Tech Coloproctol*, 2009, 13(2): 201-204.
- [6] Soliman AS, Bondy ML, Levin B, et al. Colorectal cancer in Egyptian patients under 40 years of age[J]. *Int J Cancer*, 1997, 71(1): 26-30.
- [7] Yilmazlar T, Zorluoglu A, Ozguc H, et al. Colorectal cancer in young adults[J]. *Tumori*, 1995, 81(3): 230-233.
- [8] Ibister WH. Colorectal cancer below age 40 in the Kingdom of Saudi Arabia[J]. *Aust N Z J Surg*, 1992, 62(8):

468-472.

- [9] 冷凯, 诸鹤亭. 青年人大肠癌临床分析[J]. *四川医学*, 2003, 23(5): 474.
- [10] Feliciotti F, Paganini AM, Guerrirri M, et al. Results of laparoscopic vs open resections for colon cancer in patients with a minimum follow-up of 3 years[J]. *Surg Endosc*, 2002, 16(8): 1158-1161.
- [11] Franklin ME, Kazantsev GB, Abrego D, et al. Laparoscopic surgery for stage colon cancer long term follow-up[J]. *Surg Endosc*, 2000, 14(7): 612-616.
- [12] Polliand C, Barrat C, Raselli R, et al. Colorectal cancer: 74 patients treated by laparoscopic resection with a mean follow-up of 5 years[J]. *Ann Chir*, 2002, 127(9): 690-696.
- [13] Lee W, Lee D, Choi S, et al. Transanal endoscopic microsurgery and radical surgery for T1 and T2 rectal cancer [J]. *Surg Endosc*, 2003, 17(8): 1283-1287.
- [14] Jones HG, Radwan R, Davies M, et al. Clinicopathological characteristics of colorectal cancer presenting under the age of 50[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2015, 30(4): 483-489.

(收稿日期: 2015-06-28 修回日期: 2015-09-16)