

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.02.018

检测 ROC1 在卵巢恶性上皮性肿瘤组织中的表达及临床意义研究*

李娜¹, 孙丽君¹, 李东林², 刘頌¹, 高家志¹

(1. 遵义医学院附属医院妇科, 贵州遵义 563000; 2. 贵州省人民医院妇科, 贵阳 550002)

[摘要] **目的** 探究 ROC1 在卵巢恶性上皮性肿瘤组织的表达及临床意义, 为卵巢上皮性恶性肿瘤的基因治疗提供新的思路。**方法** 选取 2005 年 10 月至 2007 年 10 月在遵义医学院附属医院行卵巢癌手术并进行了长达 5 年随访的 261 例卵巢癌患者, 对卵巢癌组织及相应周围正常组织中 ROC1 mRNA 及蛋白表达水平进行检测, 并将结果与患者的预后之间的相关性进行统计分析。**结果** ROC1 在卵巢癌组织中过度表达, 而在相对应周围正常组织中几乎不表达; ROC1 表达水平高低与患者的生存率存在负相关性。**结论** 卵巢癌患者中 ROC1 表达水平越高, 预后越差。

[关键词] ROC1; 卵巢肿瘤; 基因疗法; 预后, 存活率**[中图分类号]** R737.31**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)02-0202-03**Expression and clinical significance of ROC1 in women with epithelial ovarian cancer***Li Na¹, Sun Lijun¹, Li Donglin², Liu Song¹, Gao Jiazhizhi¹

(1. Department of Gynaecology, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China;

2. Department of Gynaecology, the People's Hospital of Guizhou, Guiyang, Guizhou 550002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and clinical significance of ROC1 in ovarian cancer tissues, to provide new ideas for the gene therapy of ovarian cancer. **Methods** 261 women with ovarian cancer underwent resection from December 2005 to December 2007 in the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College and with 5 years follow-up were enrolled. ROC1 mRNA transcription and protein expression level of ovarian cancer tissue and surrounding normal tissue were tested, and later the correlation between the results and patient's prognosis was statistically analyzed. **Results** ROC1 in ovarian cancer tissue was over-expressed, but almost no expression in surrounding normal ovarian carcinoma; ROC1 expression levels had a negative correlation with the survival rate of the patients. **Conclusion** ROC1 in ovarian cancer tissue was over-expressed, but almost no expression in surrounding normal ovarian carcinoma; ROC1 expression levels had a negative correlation with the survival rate of the patients.

[Key words] ROC1; ovarian neoplasms; gene therapy; prognosis, survival rate

泛素是一个相对分子质量小的多肽, 在生物体各类细胞中广泛存在。其能够通过泛素-蛋白酶体途径将被泛素标记的蛋白质底物特异性识别并迅速降解, 对多种细胞进程通路具有重要的调节作用, 尤其是恶性肿瘤的发生^[1]。而泛素-蛋白酶体途径包含了 3 种关键的酶: E1 泛素活化酶、E2 泛素结合酶和 E3 泛素连接酶。其中 ROC1 是 E3 泛素连接酶中的最重要的成分, 对于介导泛素-蛋白酶体途径起到了关键的作用^[2]。本研究为探究卵巢癌患者中 ROC1 表达情况及其与患者预后相关性, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2005 年 10 月至 2007 年 10 月在遵义医学院附属医院因卵巢恶性上皮性肿瘤行手术治疗(全面分期或肿瘤细胞减灭术)并进行了 5 年随访的 261 例患者病理标本, 所有患者诊断明确, 均有病理学支持诊断。年龄 28~68 岁, 平均 48.3 岁, 分期情况: I 期 58 例, II 期 81 例, III 期 77 例, IV 期 45 例; 病理类型: 浆液性癌 201 例, 黏液性癌 27 例, 子宫内膜样癌 25 例, 透明细胞癌 8 例; 除 I a 期和 I b 期且为高分化的患者外, 其余术后均辅助化学治疗, 早期患者 3~6 个疗程, 晚期患者 6~8 个疗程。

1.2 仪器及主要试剂 高速冷冻离心机(德国 Beckman Instruments 公司), Sorvall Heraeus 水平离心机(德国 Hanau 公司),

PCR 扩增仪(美国 MJ Research 公司), 凝胶成像系统电泳仪(美国 Pharmacia Biotech 公司), 冷冻超高速离心机(德国 Eppendorf, Kendro Laboratory 生产), 凝胶扫描成像系统(瑞典 Amersham Biotech 公司), 复合蛋白酶抑制剂(美国 Pierce 公司), Hybond-N+ 尼龙膜(美国 Amersham Pharmacia Biotech Limited 公司), DAB 显色系统、山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物公司)、兔抗 ROC1 一抗(NB100-1672, 美国 Novus 公司)。

1.3 方法 选取患者手术标本, 对标本中肿瘤组织及相应周围正常组织分别进行检测, 采用免疫组织化学定性分析 ROC1 在卵巢癌组织中的表达, RT-PCR 方法检测 ROC1 蛋白 mRNA 的转录情况, 采用 Western blot 法定量检测 ROC1 蛋白表达情况, 最后将检测结果与患者的预后进行相关性分析。

1.3.1 免疫组织化学方法检测 ROC1 在卵巢癌组织中的表达 取卵巢癌组织标本, 10% 甲醛液固定, 水洗后脱水, 浸蜡, 包埋制备标本, 切片, 贴片并干燥, 最后脱蜡至水。PBS 洗 3 次, 枸橼酸钠抗原修复, 加热至 95℃ 后冷却, 加含 3% H₂O₂ 工作液封闭 2 h, 1:500 兔抗 ROC1 抗体, 4℃ 孵育过夜, 加入 1:1000 稀释的二抗, 室温下孵育 2 h, DAB 显色, 复染, 封片。采用 AxioVision 2 plus 显微镜进行观察, 并采用 AxioVision 3.0 进行拍照分析。

1.3.2 RT-PCR 方法检测 ROC1 蛋白 mRNA 的转录 收集

* 基金项目: 贵州省科技厅联合基金资助项目(黔科合 J 字 LKZ[2012]50 号)。 作者简介: 李娜(1980-), 副主任医师, 硕士, 主要从事临床妇科肿瘤研究。

肿瘤细胞及相应周围正常组织细胞,采用 Trizol 提取总 RNA,检测纯度备用。(1)取 5 μ L 总 RNA 利用 M-MLV 逆转录酶合成逆转录产物 cDNA;利用 Primer BLAST 设计 ROC1 蛋白上游引物为 5'-GAU AGC ACC AGG CAG GAA U-3',下游引物为 5'-AUU CCU GCC UGG UGC UAU C-3',产物大小 512 bp;GAPDH 上游引物为 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG U-3',下游引物为 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA A-3',产物大小 265 bp。(2)取 5 μ L 逆转录产物进行 PCR 扩增:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 1 min,52 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,32 个循环;再 72 $^{\circ}$ C 条件下延伸 10 min。凝胶电泳系统分离扩增产物,观察扩增产物条带亮度并进行摄影。最后采用凝胶分析系统对扩增条带进行分析,基因的表达量用相应的平均灰度值代表,并除以 GAPDH 灰度值,结果作为 ROC1 mRNA 的相对表达量。

1.3.3 Western blot 法检测 ROC1 蛋白表达情况 取卵巢癌及周围正常组织标本,提取总蛋白并采用 Bradford 法检测蛋白浓度。取 30 μ g 总蛋白加入 15% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)中进行电泳,等溴酚蓝接近凝胶底部时

停止电泳,转移缓冲液转膜至硝酸纤维膜上,TBST 洗 2 遍,室温下 5% 脱脂奶粉封闭液封闭 1 h,加入 1:500 的 ROC1 抗体稀释液,4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜,TBST 水洗 3 次,每次 5~10 min,加入 1:2000 封闭液稀释的二抗室温孵育 2 h,TBST 洗膜后用 ECL 液显影。采用 FluorChem 5500,Alpha Innotech 处理图像,理论条带相对分子质量为 13×10^3 。

1.3.4 随访 嘱患者第 1 年每 3 个月门诊复查 1 次,后 1 年、半年门诊复查 1 次,如有复发,参照美国国立结合癌症网络(NCCN)治疗指南进行进一步治疗,如患者死亡,取消随访,以 2 年为限,统计所得资料。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件对数据进行分析处理,所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较行 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫组织化学结果分析 用 ROC1 蛋白抗体对卵巢癌组织及周围正常组织进行免疫组织化学分析后发现,卵巢癌细胞中 ROC1 蛋白表达明显高于周围正常组织。不同病理类型之间的表达也不同,见图 1、2。

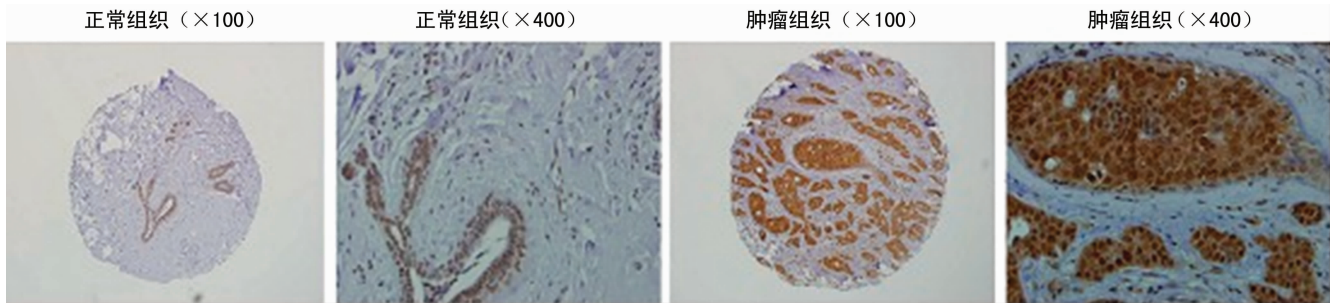


图 1 两组组织及细胞中 ROC1 蛋白表达情况

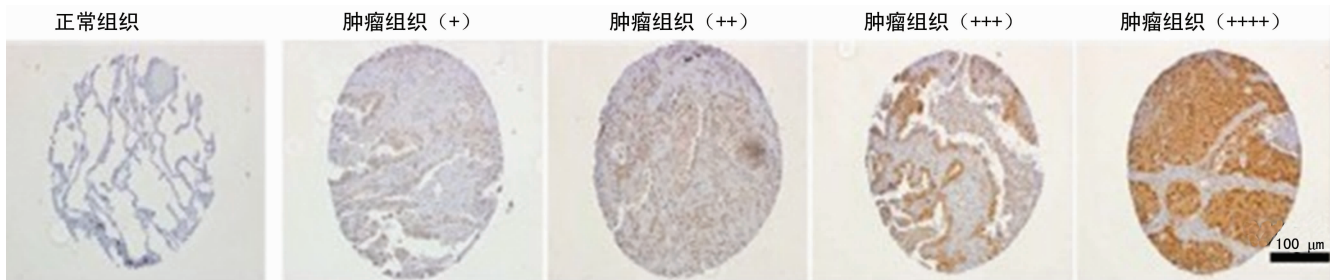
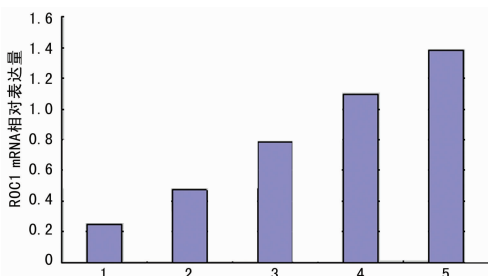


图 2 不同病理类型的组织内 ROC1 蛋白表达情况($\times 100$)

2.2 ROC1 mRNA 转录情况 ROC1 mRNA 在卵巢癌肿瘤细胞及周围正常组织细胞中表达有显著差异,ROC1 mRNA 在肿瘤细胞中表达,随着恶性程度增高而升高。见图 3。



1: 正常组织;2: 肿瘤组织;3: 肿瘤组织(++);4: 肿瘤组织(+++);5: 肿瘤组织(++++)。

图 3 ROC1 mRNA 表达情况

2.3 ROC1 蛋白表达情况 Western blot 实验发现,卵巢癌细胞中表达的 ROC1 分子量与理论值相等,表明肿瘤细胞中过表达的蛋白的确为 ROC1 蛋白,见图 4。

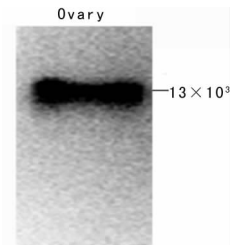


图 4 ROC1 蛋白 Western blot 结果

2.4 不同 ROC1 表达与卵巢癌预后生存曲线图 随着 ROC1 表达的程度逐渐升高,患者的病死率越高,见图 5。

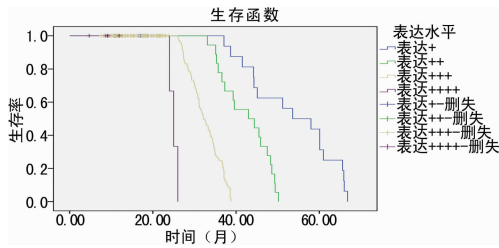


图 5 ROC1 蛋白表达与生存率之间的生存曲线图

3 讨论

卵巢癌在妇科恶性肿瘤中发病率第二,但病死率却是居妇科恶性肿瘤之首^[3]。目前,卵巢癌的发病原因尚不明确,主要与不育、妊娠次数少及使用促排卵药物、绝经晚、长期口服避孕药、饮食因素及遗传因素等有关^[4]。由于其位置特殊,早期通常无明显表现,预后较差。

泛素-蛋白酶体途径是介导蛋白质降解的过程^[1]。其中包含 E1 泛素活化酶、E2 泛素结合酶和 E3 泛素连接酶^[2]。E3 泛素连接酶可以促进细胞周期调节蛋白、转录因子及信号转导因子等多种蛋白底物的降解,功能失常会导致一系列的疾病,包括肿瘤^[5]。研究发现,其中的 F-box 蛋白 Skp2 在多种肿瘤组织中过度表达^[6],且能够促进 P27 的降解,促进肿瘤的进展。ROC1 是 E3 泛素连接酶环状结构中的核心部分,也是泛素-蛋白酶体系统中最关键的部分^[7],能够调节生理和病理状态下的多种细胞进程,如 DNA 修复、炎症反应、细胞凋亡等,在细胞生命活动中具有重要的意义。

近年来,随着研究的深入,在酵母菌^[8]、隐杆线虫^[9]、果蝇^[10]中均发现 ROC1 是细胞增殖不可缺少的关键物质,而且 ROC1 的缺失会导致细胞的凋亡或衰老死亡,经 ROC1 恢复表达可以逆转。但在实体肿瘤中的研究尚未大面积开展。Li 等^[11]研究发现,ROC1 在多种恶性肿瘤细胞中均有过度表达的情况,但在周围正常组织细胞中微量或者不表达。例如肺癌,在鳞癌中表达要高于腺癌及正常组织。Nai 等^[12]研究发现,在黑色素瘤中,ROC1 的表达与细胞周期素 D1 呈显著的负相关,即 ROC1 能够降解细胞周期素 D1 表达。

本试验及前期试验研究结果表明:ROC1 在卵巢癌组织中阳性表达率明显高于卵巢良性肿瘤组织和正常卵巢组织^[13-14],ROC1 表达水平高低与患者的生存率存在负相关性。ROC1 mRNA 在卵巢癌肿瘤细胞及周围正常组织细胞中表达差异有统计学意义($P < 0.05$),ROC1 蛋白在肿瘤细胞中表达随着恶性程度增高而升高。本研究还发现 ROC1 蛋白在透明细胞癌组织的表达高于其他类型的卵巢癌组织,且该蛋白的表达水平与肿瘤的病理分级有关($Z/\chi^2 = 9.0704, P < 0.05$),其原因可能与 ROC1 基因在不同类型的卵巢癌发生发展中的作用不同有关。近期有研究表明 E3 泛素连接酶 CRL4-CDT2/DCAF2 可以成为潜在的上皮性卵巢癌化学治疗的靶点^[15]。

ROC1 蛋白过度表达潜在的生物学原理及与卵巢癌的恶性行为的关系目前尚不清楚。作者下一步将研究卵巢恶性肿瘤的血清 ROC1 的表达,探讨血清 ROC1 是否有预测卵巢癌的价值。

推测 ROC1 蛋白可作为卵巢恶性肿瘤,特别是恶性程度较高的透明细胞癌预后的生物学指标,对卵巢癌的临床治疗具有重要的意义,同时可能成为基因治疗的一个靶点。

参考文献

[1] Willis MS, Patterson C. Into the heart: The emerging role

of the ubiquitin-proteasome system[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 41(4): 567-579.

- [2] Gray WM, Hellmann H, Dharmasiri S, et al. Role of the arabidopsis RING-H2 protein RBX1 in RUB modification and SCF function[J]. *Plant Cell*, 2002, 14(9): 2137-2144.
- [3] 王少华, 杜冠华. 肿瘤合理用药[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 720-726.
- [4] 万德森. 临床肿瘤学[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 465-466.
- [5] Nakayama KI, Nakayama K. Ubiquitin ligase, set al. ; cell-cycle control and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006(6): 369-381.
- [6] Gstaiger M, Jordan R, Lim M, et al. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(9): 5043-5048.
- [7] Petroski MD, Deshaies RJ. Function and regulation of Cullin-RING ubiquitin ligases[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(1): 9-20.
- [8] Swaroop M, Wang YX, Miller P, et al. Yeast homolog of human SAG/ROC2/Rbx2/Hrt2 is essential for cell growth, but not for germination: chip profiling implicates its role in cell cycle regulation[J]. *Oncogene*, 2000, 19(24): 2855-2866.
- [9] Sasagawa Y, Urano T, Kohara Y, et al. Caenorhabditis elegans RBX1 is essential for meiosis, mitotic chromosomal condensation and segregation, and cytokinesis[J]. *Genes Cells*, 2003, 8(11): 857-872.
- [10] Nouredine MA, Donaldson TD, Thacker SA, et al. Drosophila Roc1a encodes a RING-H2 protein with a unique function in processing the Hh signal transducer Ci by the SCF E3 ubiquitin ligase[J]. *Dev Cell*, 2002, 2(6): 757-770.
- [11] Li JJ, Soengas MS, Yi S. ROC1/RBX1 E3 ubiquitin ligase silencing suppresses tumor cell growth via sequential induction of G 2-M arrest, apoptosis, and senescence[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(12): 4974-4982.
- [12] Nai G, Marques M. Role of ROC1 protein in the control of cyclin D1 protein expression in skin melanomas [J]. *Pathol Res Pract*, 2011, 207(3): 174-181.
- [13] Liu X, Wang H, Ma J, et al. The expression and prognosis of Emil and Skp2 in breast carcinoma; associated with PI3K/Akt pathway and cell proliferation[J]. *Med Oncol*, 2013, 30(4): 735.
- [14] 李娜, 孙丽君, 明祖谦, 等. ROC1/RBX1 在卵巢癌组织中的表达及其与临床病理因素相关性[J]. *中国妇幼保健*, 2013(3): 430-432.
- [15] Pan WW, Zhou JJ, Yu C, et al. Ubiquitin E3 ligase CRL4CDT2/DCAF2 as a potential chemotherapeutic target for ovarian surface epithelial cancer[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(41): 29680-29691.

(收稿日期: 2015-08-08 修回日期: 2015-09-16)