

RhoA/ROCK2 信号通路在宫颈上皮内瘤样病变及宫颈癌组织中的临床意义

顾 颖,张 晔*

(南京医科大学附属无锡市妇幼保健院妇产科,江苏 无锡 214002)

[摘要] 目的:研究 RhoA、ROCK2 在宫颈上皮内瘤样病变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)及宫颈癌组织中的表达,探讨其与 CIN 疾病及宫颈癌进展的相关性。**方法:**应用免疫组化 S-P 法,检测 10 例宫颈炎、30 例不同级别 CIN、30 例宫颈癌组织中 RhoA、ROCK2 蛋白的表达情况,分析比较其表达与临床病理特征的关系。**结果:**① RhoA、ROCK2 蛋白在宫颈炎组织中的表达率均为 0%,在 CIN 宫颈组织中的表达率分别为 36.7%、30.0%,在宫颈癌组织中的表达率分别为 83.3%、76.7%,两者在宫颈癌组织中的表达水平高于 CIN 及宫颈炎组织($P < 0.01$),从 CIN 进展为宫颈癌,二者的阳性表达率呈递增趋势。② RhoA、ROCK2 蛋白表达与宫颈癌病理组织分级及淋巴结转移相关($P < 0.05$),与宫颈癌患者的年龄、临床分期无明显相关关系($P > 0.05$)。③ RhoA、ROCK2 蛋白二者表达水平呈正相关关系($P = 0.005$)。**结论:**RhoA、ROCK2 蛋白的表达水平与 CIN 疾病及宫颈癌进展呈正相关,检测 RhoA、ROCK2 对了解 CIN 及宫颈癌生物学行为和评估预后具有一定的临床价值。

[关键词] RhoA; ROCK2; 免疫组化; CIN; 宫颈癌

[中图分类号] R737.33

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)03-386-05

Expression and significance of RhoA and ROCK2 in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer

GU Ying, ZHANG Ye*

(Department of Obstetrics and Gynecology, Wuxi Hospital for Maternal and Child Health Care, Wuxi 214002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of RhoA and ROCK2 in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical cancer and its correlation with invasiveness. **Methods:** The expressions of RhoA and ROCK2 were examined respectively by immunohistochemical S-P method in 10 cases of cervicitis tissue, 30 cases of cervical intraepithelial neoplasia and 30 cases of cervical cancer. The correlation between the immunohistochemical results and the clinicopathological features were analyzed. **Results:** ① The expression rate of RhoA and ROCK2 were 0% in cervicitis tissues, 36.7% and 30.0% in cervical intraepithelial neoplasia, 83.3% and 76.7% in cervical cancer, respectively. The positive rate was significantly higher in the cervical cancer group than in the normal control group ($P < 0.01$). From cervicitis tissue to cervical intraepithelial neoplasia and to cervical cancer, the positive expression rates of RhoA and ROCK2 were gradually increased. ② RhoA and ROCK2 protein expression were correlated with histological grade and lymph node metastasis ($P < 0.05$), but not with age and clinical stage ($P > 0.05$). **Conclusion:** Expression of RhoA and ROCK2 may serve as a parameter for evaluating metastasis and prognosis in cervical cancer.

[Key words] RhoA; ROCK2; immunohistochemistry; cervical intraepithelial neoplasia; cervical cancer

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(3): 386-390]

肿瘤细胞转移,首先要黏附于宿主细胞表面,

再通过血液循环系统转移到远处。这个过程涉及多种基因产物之间的相互协调作用,其中调节细胞形态、移动、黏附的细胞骨架肌动蛋白起着重要的作用^[1]。小分子 G 蛋白 Rho 是参与细胞内信号转导的重要蛋白质,可调节细胞骨架重组及细胞运动黏

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金面上项目(08NM-UM081)

*通讯作者, E-mail: 18914137366@189.cn

附、细胞增殖、基因表达,与肿瘤的发生发展密切相关。近年来研究发现,Rho 家族蛋白与肿瘤发生发展的各个方面均有联系,包括肿瘤的生长和增殖、侵袭和转移细胞凋亡、肿瘤新生血管的形成等。Rho 家族成员特别是 RhoA 及其下游效应器 Rho 激酶 2 (Rho-associated kinase, ROCK2) 在多种肿瘤组织中表达增加并和肿瘤恶性程度相关,提示其在肿瘤发生和转移中具有重要作用,可能成为一种新的肿瘤标志物,用于判断良恶性及判断肿瘤转移能力及估计预后,具有潜在的重要临床价值,已成为研究热点之一。RhoA/ROCK2 信号转导通路及宫颈上皮内瘤样病变(CIN)及宫颈癌关系的研究尚未见报道,本研究利用免疫组化方法检测 RhoA、ROCK2 蛋白在各级 CIN 及宫颈癌中的表达,以探讨其与 CIN 疾病及宫颈癌进展的相关性,以期探索新的 CIN 及宫颈癌治疗靶点提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

选取无锡市妇幼保健院 2002 年 1 月~2010 年 12 月 10 例宫颈炎、30 例 CIN 宫颈、30 例宫颈癌宫颈活检包埋蜡块,活检前均未作化疗、放疗。患者年龄 25~68 岁,平均年龄 45 岁,30 例 CIN: I 级 10 例,II 级 12 例,III 级 8 例;30 例宫颈癌按 FIGO 分期标准诊断: I 期 17 例,II 期 13 例,按分化程度组织学分级: I 级 10 例,II 级 9 例,III 级 11 例,手术限于 \leq II b 期,发生淋巴结转移者 9 例。对宫颈癌病例自发现患病开始随访至今均健在。病理标本以 10% 中性福尔马林固定、石蜡包埋切片,每例连续制作 3 张切片,厚度为 5 μ m,分别行 HE 染色和 RhoA、ROCK2 免疫组化染色。

浓缩型鼠抗人 RhoA 单克隆抗体和浓缩型鼠抗人 ROCK2 单克隆抗体为台湾 Abnova 公司产品。链菌素抗生物素-过氧化物酶(S-P)免疫组化试剂盒、氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒均购于福州迈新技术开发有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色

采用 S-P 法,RhoA 单克隆抗体稀释度(1:2 000)、鼠抗人 ROCK2 单克隆抗体稀释度(1:800)。石蜡切片经常规脱蜡和水化后,以柠檬酸盐缓冲液(pH6.0)进行抗原修复。依次滴加过氧化物酶阻断液(室温下孵育 10 min)、非免疫性动物血清(室温下孵育 10 min)、第一抗体 100 μ l(室温 1 h)、生物素标记的第

二抗体(室温下孵育 10 min)、S-P 溶液(室温下孵育 10 min),最后滴加新鲜配制的 DAB 显色剂显色 5 min,显微镜下观察染色情况。自来水冲洗、苏木素复染、脱水、透明、中性树胶封片。

1.2.2 结果判断

RhoA、ROCK2 主要分布于细胞浆,染色呈浅黄色-棕黄色,小片状或弥漫性分布。以阳性细胞的百分数及染色强度来判定^[4]。根据着色细胞的阳性百分比可分别评为 0 分($< 5\%$,阴性)、1 分(5%~25%,散发)、2 分(26%~50%,局部)、3 分(51%~75%,弥漫)和 4 分($> 75\%$)。根据染色的强度可分别评为 0 分(不着色)、1 分(弱着色)、2 分(中度着色)和 3 分(强着色)。将着色细胞的阳性百分比和染色强度的评分相乘,最后 RhoA、ROCK2 的评分(0~12)分别对应的 4 种表达强度:阴性(-):0~1 分、弱阳性(+):2~4 分、中度阳性(++) :5~8 分和强阳性(+++):9~12 分。

1.3 统计学方法

所有数据运用 SPSS13.0 统计软件进行分析。免疫组化结果各组间比较采用非参数检验(Pearson χ^2 检验、趋势检验、Wilcoxon 秩和检验),相关性分析采用 Spearman 等级相关分析法。统计采用双侧检验, $P < 0.05$ 认为差异显著, $P < 0.01$ 认为有极显著差异。

2 结果

2.1 RhoA、ROCK2 蛋白在各级 CIN 病变及宫颈癌中的表达情况

RhoA、ROCK2 蛋白在各级 CIN 病变及宫颈癌石蜡标本免疫组化染色显示:RhoA 在宫颈癌标本中高表达,主要定位于细胞浆,染色呈浅黄色-棕黄色(图 1);ROCK2 在宫颈癌标本中高表达,主要定位于细胞浆,免疫染色呈黄色-棕黄色颗粒(图 2)。

RhoA 蛋白在 10 例宫颈炎组织鳞状上皮中无阳性表达;在 30 例 CIN 组织中阳性表达率为 36.7% (11/30),其中 CIN I 级 10.0%,CIN II 级 41.7%,CIN III 级 62.5%;而 30 例宫颈癌组织 RhoA 蛋白阳性表达率为 83.3%(25/30),其中宫颈癌 I 期 76.5%,II 期 92.3%。RhoA 在不同宫颈组织中的表达均具有显著差别(组间两两比较,Pearson χ^2 检验, $P < 0.01$),随着宫颈病变进展,RhoA 的阳性表达率呈递增趋势(趋势检验, $P < 0.05$,表 1)。

ROCK2 蛋白在 10 例宫颈炎组织鳞状上皮中无阳性表达,在 30 例 CIN 组织中阳性表达率为 30.0%

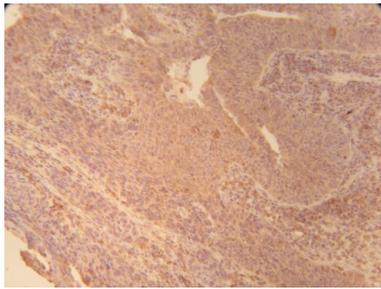


图 1 RhoA 在宫颈癌组织中阳性表达

Figure 1 Positive expression of RhoA in cervical cancer tissue

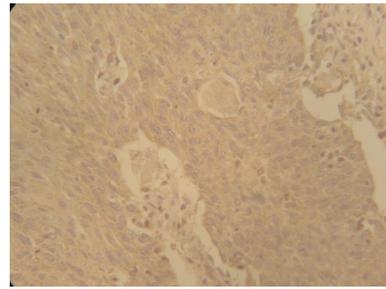


图 2 ROCK2 在宫颈癌组织中阳性表达

Figure 2 Positive expression of ROCK2 in cervical cancer tissue

表 1 RhoA 在不同宫颈组织中的表达

组织	n	RhoA 表达率(%)	P 值
宫颈炎	10	0(0/10)	
CIN I 级	10	10.0(1/10)	
II 级	12	41.7(5/12)	
III 级	8	62.5(5/8)	< 0.01
宫颈癌 I 期	17	76.5(13/17)	
II 期	13	92.3(12/13)	< 0.01

表 2 ROCK2 在不同宫颈组织中的表达

组织	n	ROCK2 表达率(%)	P 值
宫颈炎	10	0(0/10)	
CIN I 级	10	10.0(1/10)	
II 级	12	33.3(4/12)	
III 级	8	50.0(4/8)	< 0.01
宫颈癌 I 期	17	70.6(12/17)	
II 期	13	84.6(11/13)	< 0.01

(9/30), 其中 CIN I 级 10.0%, CIN II 级 33.3%, CIN III 级 50.0%, 而 30 例宫颈癌组织 ROCK2 蛋白阳性表达率为 76.7%(23/30), 其中宫颈癌 I 期 70.6%, II 期 84.6%。ROCK2 在不同宫颈组织中的表达具有显著差别 (组间两两比较, Pearson χ^2 检验, $P < 0.01$), 随着宫颈病变进展, ROCK2 的阳性表达率呈递增趋势 (趋势检验, $P < 0.05$, 表 2)。

2.2 宫颈癌中 RhoA、ROCK2 的表达与相关临床参数间的关系

宫颈癌中 RhoA、ROCK2 蛋白表达水平与病理组织学分级、淋巴结转移相关 (Wilcoxon 秩和检验, $P < 0.05$), 与患者年龄、临床分期无关 (Wilcoxon 秩

和检验, $P > 0.05$, 表 3)。

2.3 各级 CIN 病变及宫颈癌中 RhoA 与 ROCK2 的相关性分析

Spearman 等级相关分析显示 RhoA 与 ROCK2 的表达有相关性 ($P = 0.005$), 它们之间呈正相关关系 ($r = 0.423$, 表 4)。

3 讨论

宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤, 临床上宫颈癌的发展过程为不典型增生、原位癌、微小浸润癌至宫颈癌。CIN 是与宫颈浸润癌相关的一组癌前病变的总称, 包括宫颈不典型增生和宫颈原

表 3 宫颈癌中 RhoA、ROCK2 的表达与相关临床参数间的关系

临床参数	RhoA					ROCK2				
	-	+	++	+++	P	-	+	++	+++	P
年龄(岁)										
< 45	3	4	5	4		4	4	3	4	
≥ 45	2	3	7	4	> 0.05	3	4	5	3	> 0.05
临床分期										
I 期	4	5	6	4		5	5	4	3	
II 期	1	2	6	4	> 0.05	2	3	4	4	> 0.05
病理分级										
I~II 级	5	6	9	1		6	6	6	1	
III 级	0	1	3	7	< 0.05	1	2	2	6	< 0.05
淋巴结转移										
有	0	0	3	5		0	0	3	6	
无	5	7	9	3	< 0.05	7	8	5	1	< 0.05

表 4 RhoA 与 ROCK2 的相关性分析

Table 4 RhoA and ROCK2 correlation analysis (n)

RhoA	ROCK2				合计
	-	+	++	+++	
-	24	0	0	0	24
+	2	7	1	0	10
++	1	5	6	2	14
+++	1	1	3	7	12
合计	28	13	10	9	60

位癌。根据宫颈上皮细胞异常的程度可分为 3 级: CIN I、CIN II、CIN III。CIN 的转归有 3 个方向:消退或逆转、病变稳定、进展为宫颈浸润癌。宫颈癌前病变的早期筛查和合理干预是防治宫颈癌的重要环节,研究 CIN 疾病及宫颈癌进展对于早期筛查宫颈癌有重要作用。

Rho 家族蛋白质是小 G 蛋白的 Ras 超家族成员,是一组分子量为 20 000~30 000 的鸟苷酸结合蛋白,具有 GTP 酶活性。Rho 家族蛋白参与调节了细胞的多种生命过程,包括肌动蛋白的细胞骨架重组、细胞黏附、细胞运动、细胞周期进展、细胞分裂以及基因转录等^[5]。RhoA 是 Rho 家族的重要成员,RhoA 有两种构象,即与 GDP 结合的非活化态和与 GTP 结合的活化态,在这两种状态之间的转换使它们能够发挥一种类似“分子开关”的作用。活性态的 RhoA 能激活下游的信号转导通路,行使其功能。已经发现的 RhoA 下游效应分子包括 ROCK、p21 活化激酶 (p21-activated kinase,PAK)、PKN、Citron、PI3K 等,这些分子介导了 RhoA 的作用^[6]。ROCK 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员,是目前功能研究最为清楚的 RhoA 下游靶效应分子。在细胞内 ROCK 至少有 2 种异构体:ROCK1(ROCK β 或 p160ROCK)和 ROCK2(ROCK α 或 Rho 激酶)。它的分子结构包括氨基酸的催化结构域、中间的 Rho 结合的卷曲螺旋结构域和羧基端 PH 结构域。ROCK 是 Rho/ROCK 信号转导通路的主要效应分子,Rho/ROCK 通路介导细胞骨架重组、张力丝和黏着斑形成、血管重塑、细胞分化、基因表达、细胞凋亡和对钙离子的敏感性等。ROCK 接受 Rho 传递的活化信号,发生多个氨基酸位点的磷酸化而激活,并介导其下游一系列磷酸化/脱磷酸化反应。肌球蛋白磷酸酶是活化 ROCK 的底物,接受 Rho/ROCK 的活化信号发生磷酸化而使自身失活,失活的肌球蛋白磷酸酶不能将肌球蛋白轻链 (myosin light chain,MLC)脱磷酸化,使得细胞浆内磷酸化 MLC 水平提高,肌动肌球蛋白交联增加,从而促进肌动蛋白微丝骨架的

聚合^[2,7],进而调控细胞的形态、极性、细胞骨架的重建以及细胞迁移、细胞增殖、细胞转录、恶性肿瘤细胞的浸润和转移等多种生物学行为^[8]。

以往有关 Rho 家族蛋白的研究主要集中在白细胞运动游走方面,近年来研究发现,Rho 家族蛋白与肿瘤发生发展的各个方面均有联系,包括肿瘤的生长和增殖、侵袭和转移、细胞周期进展、细胞凋亡、肿瘤新生血管的形成等。已有不少研究证明了 RhoA 及其下游效应蛋白 ROCK2 能够使细胞发生恶性转化,表现出增殖能力增强、抵抗凋亡、易于侵袭转移,在某些肿瘤组织中也发现 RhoA 及其下游效应蛋白 ROCK2 的表达发生了改变,而且其表达的改变与肿瘤的恶性程度密切相关。对结肠癌、乳腺癌、肺癌、睾丸精原细胞瘤、卵巢癌、头颈癌等的研究也均发现有 RhoA 表达的异常增高,其上调和(或)过表达与肿瘤恶性程度、不良预后相关^[9-12]。Xiao 等^[13]报道 RhoA/ROCK2 级联的途径引起快速的肌动蛋白重塑促进乳腺癌细胞骨架的运动,从而促进乳腺癌细胞的侵袭运动。于月成等^[11]发现 RhoA/ROCK2 在卵巢癌中表达升高,其高表达与肿瘤低分化、淋巴转移和短生存期相关。

目前有关 RhoA/ROCK2 蛋白在宫颈癌组织中的表达及其临床意义的研究未见报道。本文采用免疫组化方法检测 10 例宫颈炎、30 例不典型增生宫颈、30 例宫颈癌组织中 RhoA 和 ROCK2 蛋白的表达发现,RhoA 和 ROCK2 蛋白在宫颈炎组织不表达,而在宫颈癌组织中呈高度表达,RhoA 和 ROCK2 与病理组织分级呈正相关,随分级增高,二者的表达呈逐渐增高的趋势,说明随着宫颈癌恶性程度的增加,RhoA 蛋白和 ROCK2 蛋白表达呈正向表现,RhoA 和 ROCK2 的表达可作为反映宫颈癌进展和恶性程度的参考指标。研究还发现 RhoA/ROCK2 的表达与肿瘤转移密切相关,有淋巴结转移组的 RhoA 蛋白表达率为 9/9(100%),高于无淋巴结转移组的 RhoA 蛋白表达率 16/21(76.2%),有淋巴结转移组的 ROCK2 蛋白表达率为 9/9(100%),高于无淋巴结转移组的 ROCK2 蛋白表达率 14/21(66.7%),差异均有显著性意义,提示 RhoA/ROCK2 信号转导可能在宫颈癌浸润和转移中发挥了一定的作用。在宫颈癌 RhoA 蛋白阳性表达病例中 ROCK2 蛋白阳性表达率为 88.9%(32/36),大于阴性表达率 11.1%(4/36),RhoA 和 ROCK2 蛋白表达呈正相关。

总之,RhoA 和 ROCK2 蛋白在 CIN 宫颈组织中

有不同程度的表达,在宫颈癌组织中高表达,RhoA/ROCK2 信号在宫颈恶性病变的发展侵袭和转移中可能发挥着一定的作用。RhoA/ROCK2 信号通路的检测有助于 CIN 疾病、宫颈癌的生物学行为的评价,将为临床肿瘤的生物学治疗提供某些理论依据。目前已有研究通过使用 RhoA 抑制剂来达到抑制肿瘤细胞增殖的目的,RhoA/ROCK2 信号通路有可能成为肿瘤治疗的新靶点。然而本研究设计的样本量有限,还需进一步扩大样本量、延长病例观察时间并进行数据分析,探讨 Rho/ROCK 信号通路及 CIN 及宫颈癌预后的关系,分析临床应用价值。而且 Rho/ROCK 信号通路所起的作用是宫颈癌发生发展过程中的重要机制,还是一种伴随事件尚需进一步研究证实。

[参考文献]

[1] Pennacchietti S, Michieli P, Galuzzo M, et al. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene[J]. *Cancer Cell*, 2003, 3(4):347-361

[2] Wettschureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology[J]. *J Mol Med*, 2002, 80(10):629-638

[3] Imamura F, Mukai M, Ayaki M. Y-27632, an inhibitor of Rho-associated protein kinase, suppresses tumor cell invasion via regulation of focal adhesion kinase [J]. *Jpn J Cancer Res*, 2000, 91(8):811-819

[4] Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissues [J]. *Hum Pathol*, 1990, 21(6):607-612

[5] Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton [J]. *Science*, 1998, 279(5350):509-514

[6] Fujisawa K, Madaule P, Ishizaki T, et al. Different regions of Rho determine Rho-selective binding of different classes of Rho target molecules [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(30):18943-18949

[7] Kimura K, Ito M, Amano M, et al. Reagulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-Kinase)[J]. *Science*, 1996, 273(5272):245-248

[8] Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, et al. Cell migration: integrating signals from front to back [J]. *Science*, 2003, 302(5651):1704-1709

[9] Fritz G, Brchetti C, Bahl F, et al. Rho GTPases in human breast tumors: expressed and mutation analyses and correlation with clinical parameters [J]. *Br J Cancer*, 2002, 87(6):635-640

[10] Kamaï T, Arai K, Sumi S, et al. The rho/rho kinase pathway is involved in the progression of testicular germ cell tumour[J]. *BJU Int*, 2002, 89(4):449-453

[11] 于月成, 辛晓燕, 吴维光, 等. Rho 和 ROCK 蛋白在上皮性卵巢癌中的表达及临床意义 [J]. *现代肿瘤医学*, 2006, 14(4):461-464

[12] Abraham MT, Kuriakose MA, Sacks PG, et al. Motility related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer[J]. *Laryngoscope*, 2001, 111(7):1285-1289

[13] Fukata Y, Oshiro N, Kinoshita N, et al. Phosphorylation of adducin by Rho-kinase plays a crucial role in cell motility [J]. *J Cell Biol*, 1999, 145(2):347-361

[收稿日期] 2011-11-05

