

RASAL1 蛋白在食管鳞癌中的表达及其临床病理意义

姜时雨¹,汪亦品²,花悦¹,李力¹,陈晟¹,冷静^{2*}

(¹南京医科大学第一临床医学院 2009 年级,²肿瘤中心,病理学系,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:观察 Ras 蛋白激活物类似物-1(Ras protein activator like 1,RASAL1)蛋白在食管鳞癌组织中的表达情况及其与肿瘤病理分级的相关性,探讨其与食管鳞癌发生、发展的关系。方法:应用组织芯片技术及免疫组织化学实验检测 92 例食管鳞癌组织及其癌旁食管黏膜组织中 RASAL1 蛋白的表达,采用 LeicaQ550 图像分析仪定量分析免疫组化结果。结果:免疫组织化学实验结果表明,病理分型 I 型、II 型、III 型食管鳞癌组织中 RASAL1 蛋白的表达强度较癌旁食管正常黏膜组织明显下降,且癌组织中 RASAL1 蛋白表达下降程度与肿瘤分化程度呈一致趋势。计算机图像分析结果显示,与肿瘤周围正常对照组织相比,I 型和 III 型分别下降了 74.9%和 93.8%,统计学检验结果显示差异均有统计学意义(P 均 < 0.01)。结论:RASAL1 蛋白的表达下调与食管鳞癌的发生、发展密切相关,且可能与食管鳞癌的病理分型有关。

[关键词] RASAL1 蛋白;组织芯片;食管鳞癌;免疫组织化学

[中图分类号] R735.1

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2013)01-022-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20130105

食管癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,仅次于胃癌位居第 2 位,其发生、发展与肿瘤相关基因的表达异常,包括癌基因的过度表达和抑癌基因的失活等有关。Ras 家族是人类肿瘤中最常见的与转化活性有关的癌基因,参与调控细胞的一系列生物学行为,包括细胞增殖、分化、生存及凋亡等。研究显示,Ras 蛋白表达是食管癌变晚期阶段的一个分子学变化^[1]。Ras 蛋白激活物类似物-1(Ras protein activator like 1,RASAL1),也称 Ras GTP 酶激活蛋白 1(Ras GTPase-activating-like protein 1,Ras GAPs),可以抑制 Ras 的活性,当 RASAL1 的表达下降或缺失,Ras 蛋白活化,从而导致肿瘤的发生发展^[2-3]。目前,RASAL1 蛋白与食管癌的关系研究甚少,本研究应用免疫组织化学实验,检测人食管鳞癌组织芯片中食管鳞癌组织及其癌旁食管黏膜组织中 RASAL1 的蛋白表达水平,并结合临床病理资料进行分析,探讨其不同分化程度的食管鳞癌中的表达情况及其相关性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 芯片信息

含人食管鳞癌组织及癌旁食管黏膜组织的芯片

(经免疫组化验证)由上海芯超生物科技公司提供。芯片批号:OD-CT-DgEso01;芯片阵列编号:OD-CT-DgEso01-004;固定方式:福尔马林固定;总例数:92;总点数:184;点直径:1.5 mm;芯片厚度:4 mm(图 1)。

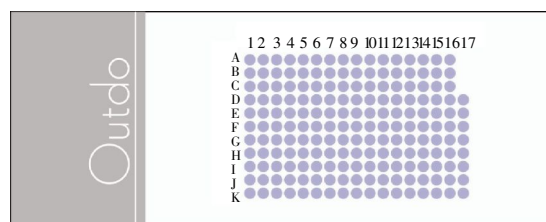


图 1 食管癌组织芯片 OD-CT-DgEso01

1.1.2 临床病理资料

食管癌患者芯片 OD-CT-DgEso01 附详细临床病例资料。92 例食管鳞癌组织中,男 65 例,女 27 例,年龄 29~78 岁,淋巴结转移 25 例,临床分期为 2~4 期。所有食管鳞癌按 WHO 食管癌组织学分级及分类标准进行并经免疫组织化学实验验证,其中食管鳞癌 I 型 41 例,II 型 41 例,III 型 10 例。每例以相应的癌旁正常食管黏膜组织作为对照,临床病理资料完整。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学实验

利用免疫组织化学 SP 法实验检测上述组织芯片 RASAL1 蛋白的表达。染色方法按免疫组织化学染色试剂盒说明书步骤进行;一抗为 RASAL1 羊抗人多克隆抗体,购自英国 Abcam 公司,工作浓度为

[基金项目] 江苏省大学生实践创新训练计划 (JX22227001)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: lengjing@njmu.edu.cn

1:50; 二抗为辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的兔抗羊 IgG, 以正常山羊血清代替一抗作为阴性对照。

1.2.2 结果分析方法

RASAL1 蛋白表达阳性者在细胞胞质或(和)细胞膜有棕黄色颗粒沉着, 界限清楚, 无明显背景着色。采用 LeicaQ550 图像分析仪定量分析免疫组化的结果, 每例样本于高倍镜(400 倍)下随机选取 3 个视野, 根据免疫组化染色的灰度值和视野面积测算每组样本的单位面积平均灰度值, 从而计算出 RASAL1 蛋白表达的强弱程度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析, 所有数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。检测结果采用成组 t 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

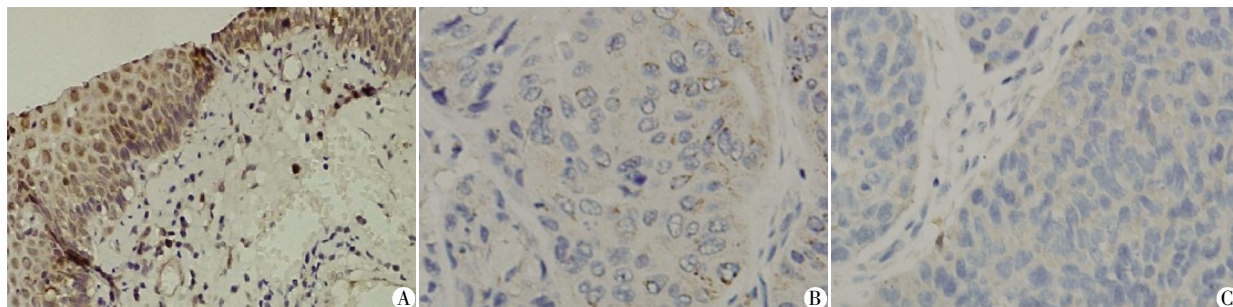
2 结果

2.1 组织芯片

HE 与免疫组化染色结果显示, 食管鳞癌组织芯片无明显脱片现象, 组织阳性信号清晰, 背景清洁。

2.2 RASAL1 蛋白在食管鳞癌、癌旁食管黏膜组织中的表达

免疫组织化学染色结果显示, RASAL1 蛋白主要定位于细胞胞质和(或)细胞膜(图 2), 与对照组的癌旁正常食管黏膜组织相比, 癌组织中 RASAL1 蛋白的表达明显下降; 计算机图像分析结果表明与肿瘤周围正常食管黏膜对照组织相比, 食管鳞癌 I 型、III 型 RASAL1 蛋白的表达分别下降了 74.9% 和 93.8%, t 检验结果表明差异均有极显著性 ($P < 0.01$)。表明 RASAL1 蛋白的表达强度随鳞癌分化程度的降低呈现降低的趋势。尽管 II 型食管鳞癌的表达水平也明显下降, 但由于 II 型食管鳞癌的分类比较复杂, 存在 I ~ II 型和 II ~ III 的过渡分型, 因此在本实验中没有统计 II 型的情况。各组 RASAL1 蛋白的表达与性别、年龄、淋巴结转移、临床分期等均无相关性 ($P > 0.05$)。图像分析和统计学检验的结果见表 1。



食管癌组织芯片检测结果。A: 癌旁食管黏膜组织, 见鳞状上皮呈棕黄色染色阳性, 表明 RASAL1 蛋白表达阳性; B: I ~ II 型食管鳞癌组织, 高度~中度分化, 胞浆中 RASAL1 蛋白染色较弱, 表达水平下降; C: III 型食管癌组织, 低度分化, 胞浆中 RASAL1 染色弱, 表达水平低。

图 2 RASAL1 蛋白在食管鳞癌中的表达(SP 法, $\times 400$)

表 1 食管鳞癌 RASAL1 蛋白表达免疫组织化学检测结果

组织类型	样本数	单位面积平均灰度值	P 值 ^a
癌旁对照组织	51	2.99 \pm 2.20	
食管鳞癌 I 型	41	0.75 \pm 0.45	0.001 5
食管鳞癌 III 型	10	0.19 \pm 0.04	0.003 2

a: 与癌旁对照组织相比。

3 讨论

大量研究表明, 食管癌的发生、发展涉及多种癌基因、抑癌基因等, 癌基因不可逆的积累突变和表达失调是恶性肿瘤发生的重要分子机制, 因此探索与食管癌相关的基因或蛋白质, 发现具有诊断意义的肿瘤标记物, 一直是亟待解决的课题。

Ras 是最早发现的人类原癌基因, 当 Ras 基因激活后成为致癌活性的癌基因。其编码相对分子量

为 21 000 的蛋白, 即 Ras 蛋白, 活化状态的 Ras 蛋白可造成细胞不可控制地增殖、恶变。同时细胞凋亡减少, 细胞间接触抑制增强也加速了这一过程^[4-5]。Ras 蛋白属于小 GTP 结合蛋白, RASAL1 是 1 种 Ras GTP 酶激活蛋白 (Ras GTPase-activating-like protein, Ras-GAP), 由近年新发现的位于第 12 号染色体(12q24.13)上钙离子依赖性的 RASAL1 基因编码^[6], 具有 Ras-GAP 活性, 作用机制与 GAP 相似, 其与 Ras 蛋白结合后, 能快速将 GTP 水解成 GDP, 从

而使 Ras 蛋白失活^[7-8],进而抑制肿瘤的发生发展,起到抑癌的作用^[9];若 RASAL1 表达下降或缺失,会使得 Ras 蛋白活性异常增高,继而增加肿瘤发生、发展的可能性^[2]。

正常情况下 RASAL1 蛋白在多种组织中表达^[3],且在内分泌组织高表达,如肾上腺、唾液腺以及垂体,而在髓样细胞、肌肉、神经和基质组织中 RASAL1 呈低表达^[10]。有研究显示,RASAL1 在结直肠癌中表达的下调,减弱了对 Ras 的抑制作用,Ras 活化信号增强,从而诱导结直肠癌的发生,加速其进展^[11]。另因 RASAL1 缺失导致 Ras 活化进而引起恶性肿瘤的假说,已经在前列腺癌、乳癌、肺癌等多种肿瘤中得到证实^[12],且研究证实,在体外培养的肿瘤细胞系中,阻止 RASAL1 基因的表达可以有效地诱导人原始细胞癌变^[13]。RASAL1 抑癌基因的作用在胃癌、鼻咽癌等肿瘤细胞株中下调,提示 RASAL1 基因及其编码蛋白具有肿瘤抑制功能^[14-15]。但目前 RASAL1 蛋白在食管癌中的表达情况及其与食管癌发生、发展的关系,国内外研究极少。

我国食管癌绝大多数是鳞癌,根据病理分型,可分为 I 型、II 型、III 型,且分化程度逐渐降低。本研究免疫组织化学实验结果提示,RASAL1 蛋白在 I 型、II 型、III 型中的表达强度分别较癌旁食管黏膜组织下降,计算机图像分析测定的结果显示与肿瘤周围正常对照组织相比,I 型、III 型中 RASAL1 蛋白的表达水平分别下降了 74.9%和 93.8%,经两两比较及统计分析,各组之间的差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。据此我们推测 RASAL1 蛋白的低表达与食管鳞癌的发生及进展有密切关系,而且随食管鳞癌分化程度的降低,RASAL1 的阳性率呈进一步下调的趋势。同时本研究还显示 RASAL1 蛋白表达与性别、年龄、淋巴结转移、临床分期无相关性($P > 0.05$)。

综上所述,RASAL1 蛋白的表达下降在食管鳞癌发生、发展中起着重要的作用,且 RASAL1 表达变化发生于 Ras 活性改变之前,因此进一步研究 RASAL1 基因的分子功能可以为食管鳞癌的早期诊断以及分子靶向治疗提供参考和实验依据。

[参考文献]

- [1] Grewal T, Koese M, Tebar F, et al. Differential regulation of RasGAPs in cancer[J]. *Genes Cancer*, 2011, 2(3): 288-297
- [2] Bernards A, Settleman J. GAPs in growth factor signalling [J]. *Growth Factors*, 2005, 23(2): 143-149
- [3] Jin H, Wang X, Ying J, et al. Epigenetic silencing of a Ca²⁺-regulated Ras GTPase-activating protein RASAL defines a new mechanism of Ras activation in human cancers [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(30): 12353-12358
- [4] Ahmadian MR, Zor T, Vogt D, et al. Guanosine triphosphatase stimulation of oncogenic Ras mutants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(12): 7065-7070
- [5] Kosloff M, Selinger Z. Substrate assisted catalysis-application to G proteins [J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(3): 161-166
- [6] Walker SA, Kupzig S, Bouyoucef D, et al. Identification of a Ras GTPase-activating protein regulated by receptor-mediated Ca²⁺ oscillations [J]. *EMBO*, 2004, 23(8): 1749-1760
- [7] Bar-Sagi D, Hall A. Ras and Rho GTPases: a family reunion [J]. *Cell*, 2000, 103(2): 227-238
- [8] Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins [J]. *Cell*, 2007, 129(5): 865-877
- [9] Bernards A, Settleman J. Loss of the Ras regulator RASAL1: another route to Ras activation in colorectal cancer [J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(1): 46-48
- [10] Der CJ, Van Dyke T. Stopping Ras in its tracks [J]. *Cell*, 2007, 129(5): 855-857
- [11] Ohta M, Seto M, Ijichi H, et al. Decreased expression of the Ras-GTPase activating protein RASAL1 is associated with colorectal tumor progression [J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(1): 206-216
- [12] Almoguera C, Shibata D, Forrester K, et al. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-Ras genes [J]. *Cell*, 1988, 53(4): 549-554
- [13] Kolfschoten IG, van Leeuwen B, Berns K, et al. A genetic screen identifies PITX1 as a suppressor of RAS activity and tumorigenicity [J]. *Cell*, 2005, 121(6): 849-858
- [14] Kupzig S, Deaconescu D, Bouyoucef D, et al. GAP1 family members constitute bifunctional Ras and Rap GTPase-activating proteins [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(15): 891-900
- [15] Dote H, Toyooka S, Tsukuda K, et al. Aberrant promoter methylation in human DAB2 interactive protein (hDAB2IP) gene in breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(6): 2082-2089

[收稿日期] 2012-09-19