

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.06.013

· 临床研究 ·

RhoA 和 Ezrin 在乳腺浸润性导管癌中的表达及其临床意义

马力¹, 刘月平², 耿翠芝¹, 王小玲², 张祥宏³(1. 河北医科大学第四医院乳腺中心, 河北石家庄 050091; 2. 河北医科大学第四医院病理科, 河北石家庄 050091; 3. 河北医科大学基础研究所病理实验室, 河北石家庄 050017)

[摘要] 目的: 探讨 RhoA 和 Ezrin 在乳腺浸润性导管癌中的表达及其临床意义。方法: 选用 2008 年 1 月至 12 月河北医科大学第四医院收治的乳腺浸润性导管癌患者术后石蜡标本 86 例。免疫组织化学染色检测肿瘤组织中 RhoA 和 Ezrin 的表达情况, 分析其临床病理意义及两者的相关性。结果: 86 例乳腺浸润性导管癌组织中, RhoA 的阳性表达率为 60.47%, 显著高于乳腺正常导管上皮组织的 20% ($P < 0.05$); Ezrin 的强阳性表达率为 65.12%, 显著高于乳腺正常导管上皮组织 ($P < 0.05$)。乳腺浸润性导管癌组织中 RhoA 的阳性表达和 Ezrin 的强阳性表达与患者年龄无关 ($P > 0.05$), 与腋淋巴结转移、组织学分级和 TNM 分期有关 (均 $P < 0.05$)。乳腺浸润性导管癌组织中 RhoA 的阳性表达和 Ezrin 的强阳性表达呈正相关 ($P < 0.01$)。结论: 乳腺浸润性导管癌高表达 RhoA 和 Ezrin, 并在导管癌的发生、发展过程中发挥作用。

[关键词] 乳腺浸润性导管癌; RhoA; Ezrin; 免疫组织化学

[中图分类号] R737.9; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)06-0653-04

Expressions of RhoA and Ezrin in breast infiltrating ductal carcinoma and their clinical significances

MA Li¹, LIU Yue-ping², GENG Cui-zhi¹, WANG Xiao-ling², ZHANG Xiang-hong³(1. Breast Research Center, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091, Hebei, China; 2. Department of Pathology, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091, Hebei, China; 3. Department of Experimental Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expressions of RhoA and Ezrin in breast infiltrating ductal carcinoma (BIDC) and their clinical significances. **Methods:** Eighty-six BIDC paraffin samples were obtained from Fourth Hospital of Hebei Medical University (Jan. 2008 to Dec. 2008). Immunohistochemical method was used to assess the expression of RhoA and Ezrin in tumor tissues. The relationship between RhoA and Ezrin expressions with the clinicopathological parameters was also analyzed. **Results:** The expression of RhoA and the strong expression of Ezrin in the 86 BIDC samples were 60.47% and 65.12%, respectively, which were both significantly higher than those in normal ductal epithelium groups (all $P < 0.05$). Neither the expression of RhoA nor the strong expression of Ezrin was correlated with patient's age ($P > 0.05$), and they were positively correlated with the axillary lymph node metastasis, histological grades, and TNM stages (all $P < 0.05$). A significant correlation was also found between the expression of RhoA and the strong expression of Ezrin in BIDC samples ($P < 0.01$). **Conclusion:** RhoA and Ezrin are highly expressed in IBDC tissues, and may play important roles in the carcinogenesis and progression of BIDC.

[Key words] breast infiltrating ductal carcinoma; RhoA; Ezrin; immunohistochemistry

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(6): 653-656]

[基金项目] 河北省青年自然科学基金资助项目(No. C2009001212); 河北省普通高校强势特色学科资助项目(No. 200552); 河北省卫生厅科研基金项目(No. 20090487)。Project supported by the Natural Science Foundation for Youth Scientists in Hebei Province (No. C2009001212), and the Scientific Foundation for Major Discipline in Higher Institutions of Hebei Province (No. 200552), and the Scientific Research Foundation from Health Bureau of Hebei Province (No. 20090487)

[作者简介] 马力(1975-),男,河北省石家庄市人,副主任医师,博士,从事乳腺肿瘤的临床和基础研究

[通信作者] 马力(MA Li, corresponding author), E-mail: mali1021@126.com

Rho(Ras homologue)家族主要包括 Rho(如 RhoA、B 和 C)、Rac 和 cdc42 三个亚家族,与 Ras 家族同属小 G 蛋白超家族成员,在信号通路中位于 Ras 的下游,在细胞增殖、黏附和迁移过程中发挥重要作用。Rho 家族成员,特别是 RhoA 在肿瘤发生、发展中具有重要作用。Ezrin(埃兹蛋白,又称为 cyto villin、p81 或 villin-2)为膜细胞骨架连接蛋白,是连接细胞膜和细胞骨架之间的 ERM(Ezrin-radixin-moesin)家族成员之一^[1]。本课题前期研究^[2]发现, Ezrin 可能参与了乳腺浸润性导管癌的发生和发展,并在细胞水平初步探讨了 RhoA 参与调节 Ezrin 的可能机制^[3]。本研究应用免疫组织化学的方法,观察了 RhoA 和 Ezrin 在乳腺浸润性导管癌组织中的表达及其与乳腺癌临床病理学指标的关系,同时探讨了两者的相关性。

1 材料与方法

1.1 研究对象和标本来源

选用 2008 年 1 月至 12 月间在河北医科大学第四医院外一科接受手术治疗的乳腺浸润性导管癌患者术后石蜡标本共 86 例。所有患者均为女性,年龄范围 27 ~ 84 岁。每例患者术前均未行化、放疗及内分泌治疗,按照《乳腺肿瘤 WHO 组织学分类、分级标准》(2003 年版)对全部切片进行组织学分型、分级,其中组织学 I 级 7 例、II 级 56 例、III 级 23 例。依照 AJCC 乳腺癌 TNM 临床分期(2003 年版)标准, TNM I 期 5 例、II 期 59 例、III 期 22 例。另外,取癌旁正常导管上皮组织(均取自距原发癌灶 > 5 cm 处的正常乳腺组织标本,并经病理证实)20 例作为对照。

1.2 主要试剂

鼠抗人 RhoA 单克隆抗体为 Abnova 公司产品,鼠抗人 Ezrin 单克隆抗体为 New Marker 公司产品,二抗(生物素标记的鼠抗人 IgG)采用通用型试剂盒,购自北京中杉生物技术公司。

1.3 免疫组化法检测 RhoA 和 Ezrin 蛋白的表达

实验按照 S-P 试剂盒说明进行。石蜡切片常规脱蜡至水,3% 过氧化氢孵育 10 min,高压法抗原修复,10% 山羊血清封闭,分别加入 RhoA 和 Ezrin 一抗,4 °C 过夜。滴加二抗 37 °C 孵育 20 min,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素 37 °C 孵育 20 min。DAB 显色,苏木精复染,中性树胶封片。每次染色均同步设阳性和阴性对照(RhoA 阳性对照为已知的阳性切片, Ezrin 阳性对照为正常肺组织,阴性对照采用 PBS 代替一抗,其他步骤不变)。

1.4 免疫组化染色结果的判定

RhoA 蛋白阳性细胞可见细胞质显示棕黄或棕褐色,判定标准以阳性细胞数 < 10% 定为阴性(-),阳性细胞数 ≥ 10% 定为阳性(+)^[4]。Ezrin 免疫阳性反应产物沿细胞膜内侧线性分布,呈棕黄色颗粒状,在胞质内也有着色;参考文献[5]按阳性表达细胞数和染色强度对 Ezrin 进行评价: - ,无表达; + , < 50% 细胞阳性表达且染色较浅; ++ , ≥ 50% 细胞阳性表达且染色较深,++ 视为强阳性表达。

1.5 统计学分析

采用 SPSS12.0 软件包,不同组间比较用 χ^2 检验,组间的相关性分析采用直线相关检验。P < 0.05 或 P < 0.01 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RhoA 和 Ezrin 蛋白在乳腺浸润性导管癌组织中的表达

20 例正常乳腺导管上皮组织中 4 例 RhoA 表达,阳性表达率为 20%(图 1A);而 86 例乳腺浸润性导管癌组织中 52 例 RhoA 蛋白阳性表达,阳性表达率为 60.47%(图 1B);RhoA 蛋白在乳腺浸润性导管癌组织中的阳性表达高于正常导管上皮组织($\chi^2 = 6.89, P < 0.05$)。Ezrin 在 20 例正常乳腺导管上皮组织中均为阴性表达(图 1C);而在 86 例乳腺浸润性导管癌组织中 56 例强阳性表达,强阳性表达率为 65.12%(图 1D);Ezrin 蛋白在乳腺浸润性导管癌组织中的强阳性表达高于正常导管上皮组织($\chi^2 = 7.59, P < 0.05$)。

2.2 RhoA 和 Ezrin 蛋白表达与乳腺浸润性导管癌临床病理特征的关系

RhoA 阳性表达和 Ezrin 强阳性表达与乳腺浸润性导管癌临床病理特征之间的关系见表 1。≤ 50 岁和 > 50 岁两组间, RhoA 阳性表达率($\chi^2 = 0.27, P > 0.05$)和 Ezrin 强阳性表达率($\chi^2 = 0.25, P > 0.05$)均无差异;腋下淋巴结间转移的 0、1 ~ 3 和 ≥ 4 的三组间, RhoA 阳性表达率($\chi^2 = 5.17, P < 0.05$)和 Ezrin 强阳性表达率($\chi^2 = 6.15, P < 0.05$)均有显著差异;肿瘤组织学分级为 I 级、II 级、III 级的三组间, RhoA 阳性表达率($\chi^2 = 6.23, P < 0.05$)和 Ezrin 强阳性表达率($\chi^2 = 7.25, P < 0.05$)均有显著差异,且随分化程度的降低,两者的表达率增高; TNM 临床分期为 I、II 和 III 期的三组间, RhoA 阳性表达率($\chi^2 = 6.89, P < 0.05$)和 Ezrin 强阳性表达率($\chi^2 = 7.21, P < 0.05$)均有显著差异,且随着分期的增高,两者的表达率也增高。

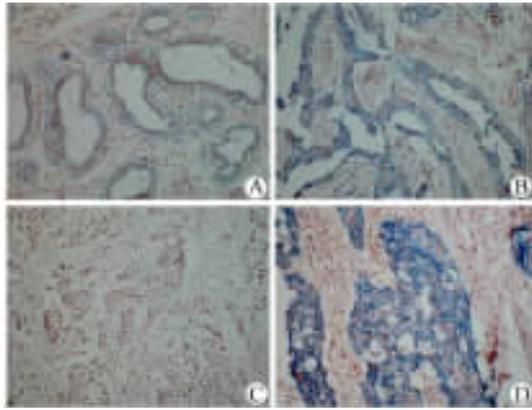


图 1 RhoA 和 Ezrin 蛋白在乳腺浸润性导管癌组织和癌旁导管上皮组织中的表达 (S-P, ×400)

Fig. 1 Expressions of RhoA and Ezrin in breast infiltrating ductal carcinoma and normal ductal epithelium tissues(S-P, ×400)

A: Expression of RhoA in normal ductal epithelium tissues; B: Expression of RhoA in breast infiltrating ductal carcinoma tissues; C: No expression of Ezrin in normal breast ductal epithelium tissues; D: Strongly positive expression of Ezrin in breast infiltrating ductal carcinoma tissues

表 1 RhoA 阳性表达和 Ezrin 强阳性表达与乳腺浸润性导管癌临床病理学指标的关系

Tab. 1 Relationship of expression of RhoA and strong expression of Ezrin with clinicohistological features of breast infiltrating ductal carcinoma

Clinicohistological feature	N	RhoA		Ezrin	
		n(%)	P	n(%)	P
Age					
≤50	47	27(57.5)	0.47	29(61.7)	0.44
>50	39	25(64.1)		27(69.2)	
Lymph node status					
0	57	30(52.6)		31(54.4)	
1~3	19	13(68.4)	0.02	15(79.0)	0.00
≥4	10	9(90.0)		10(100)	
Grade					
I	7	2(28.6)		2(28.6)	
II	56	30(53.6)	0.00	33(58.9)	0.00
III	23	20(87.0)		21(91.3)	
TNM stage					
I	5	1(20)			
II	59	33(55.9)	0.00	39(66.1)	0.00
III	22	18(81.8)		17(77.3)	

2.3 RhoA 和 Ezrin 蛋白在乳腺浸润性导管癌组织中表达的相关性

如表 2 所示,86 例乳腺浸润性导管癌组织中 RhoA 的阳性表达和 Ezrin 的强阳性表达呈正相关性($r = 0.77, P < 0.01$)。

表 2 乳腺浸润性导管癌中 RhoA 表达与 Ezrin 表达的相关性
Tab. 2 Correlation of RhoA expression with Ezrin expression in breast infiltrating ductal carcinoma tissues

RhoA	N	Ezrin [n(%)]			χ^2	r	P
		-	+	++			
-	34	19(55.9)	8(23.5)	7(20.6)	23.73	0.77	0.00
+	52	0	3(5.8)	49(94.2)			

3 讨 论

RhoA 蛋白是 Rho 蛋白家族中的重要成员之一,其主要功能是在细胞内外信号刺激下,调节肌动蛋白细胞骨架^[6]。此外,在细胞运动、增殖、凋亡、细胞周期调控以及恶性肿瘤细胞的浸润和转移等方面发挥重要作用^[7]。RhoA 蛋白和肿瘤细胞迁移、侵袭及转移表型的获得有直接的联系。在动物实验中,Yoshioka 等^[8]发现,在鼠 MM1 肝癌细胞中,RhoA 蛋白过度表达可调节以肌动蛋白为基础的收缩力,使肿瘤细胞运动能力增强并促进其迁移。在人体肿瘤中,RhoA 蛋白的异常表达与肿瘤的发生、发展密切相关。研究^[9-11]发现,RhoA 表达水平在卵巢癌、泌尿系肿瘤、肝癌中均出现显著高表达,进一步分析认为,RhoA 可能参与了多种恶性肿瘤的发生和发展。

Ezrin 作为 ERM 家族中第一个被发现的成员,是一个相对分子质量为 82 000 的磷酸化蛋白质,是 *Vil2* 基因的产物,其基因定位于 6q25^[12]。Ezrin 与肿瘤的发生、发展及转移有关,Ezrin 通过调节黏附分子和信号转导等途径,参与细胞与细胞、细胞与间质之间的相互作用,在肿瘤发生、浸润和转移过程中扮演着重要角色^[1]。研究^[13-14]发现,Ezrin 在子宫内膜癌、胰腺癌等很多肿瘤组织中的表达水平都显著高于正常组织。在妇科肿瘤、黑素瘤、胰腺癌中,Ezrin 表达增高可以促进肿瘤转移,与肿瘤患者预后不良密切相关^[15-16]。由以往的研究^[2]发现,Ezrin 的强阳性表达相对其阴性和阳性表达具有更明显的预后意义,所以此次实验重点观察 Ezrin 的强阳性表达结果。本研究结果显示,RhoA 的阳性表达和

Ezrin 的强阳性表达在乳腺癌中的表达均显著高于乳腺正常组织。同时实验发现, RhoA 和 Ezrin 的强阳性表达与乳腺浸润性导管癌的腋淋巴结状况、组织学分级以及 TNM 临床分期呈正相关。由此说明, 两者表达随乳腺浸润性导管癌恶性程度增加而增高, 提示其可能在乳腺癌浸润和转移中发挥了重要作用, 说明两者表达与乳腺癌预后不良有关。Jiang 等^[17]认为 RhoA 蛋白在乳腺癌中的表达与正常组织中相比差异无显著性意义。可见, 对 RhoA 蛋白在乳腺癌中表达的研究还存在一定的争议, 尚有待对更大样本进行分析论证。

前期研究^[2]发现, RhoA 可能作为上游分子调节了 Ezrin 的表达, 借此发挥其促进乳腺癌等恶性肿瘤的浸润和转移。本研究中, 实验在整体水平下观察了两者之间的关系。结果发现, 在乳腺浸润性导管癌组织中, RhoA 的阳性表达和 Ezrin 的强阳性表达呈正相关, 提示两者之间可能存在着相互作用, 进一步证明了前期的研究工作, 也与国外学者报道结果一致^[18]。目前, 关于 RhoA 促进肿瘤浸润、转移的机制研究主要集中在其调节细胞骨架结构方面。研究结果还提示, RhoA 促进肿瘤浸润、转移的机制十分复杂, 其可能作为上游分子调节了包括 Ezrin 在内的多种促肿瘤因子, 间接发挥促肿瘤浸润、转移的作用。

综上所述, RhoA 蛋白在乳腺浸润性导管癌的发生、发展过程中具有重要作用, RhoA 蛋白不但通过调节细胞骨架直接促进肿瘤细胞的运动、迁移, 而且可能参与了对 Ezrin 的调控, 对肿瘤的侵袭和转移有间接促进作用。目前可通过使用 RhoA 抑制剂来达到抑制肿瘤细胞增殖的目的, RhoA 蛋白及其他 Rho 家族成员有可能成为肿瘤治疗新的靶点。

[参 考 文 献]

[1] Martin TA, Harrison G, Mansel RE, Jiang WG. The role of the CD44/Ezrin complex in cancer metastasis [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2003, 46(2): 165-186.

[2] 马 力, 张祥宏, 邢凌霄, 李月红, 王小玲, 王永军. Ezrin 与乳腺浸润性导管癌发生发展及预后的关系研究 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2008, 30(4): 279-283.

[3] 马 力, 刘月平, 张祥宏, 邢凌霄, 王俊灵, 耿翠芝. RhoA 信号转导通路对乳腺癌细胞 Ezrin 表达的影响 [J]. *癌症*, 2009, 28(2): 131-135.

[4] 任潇毅, 张 林, 吴亚群. 乳腺癌中 Rho A 蛋白表达及其与 Cyclin D1 和 P21 WAF1/ Cip1 蛋白表达的相关性 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2005, 14(6): 658-662.

[5] Mathew J, Hines JE, Obafunwa JO, Burr AW, Toole K, Burt AD. CD44 is expressed in hepatocellular carcinomas showing vas-

cular invasion [J]. *J Pathol*, 1996, 179(1): 74-83.

[6] Rosman DS, Phukan S, Huang CC, Pasche B. TGFBR1 * 6A enhances the migration and invasion of MCF-7 breast cancer cells through RhoA activation [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(5): 1319-1328.

[7] Cardone RA, Bagorda A, Bellizzi A, Busco G, Guerra L, Paradiso A, et al. Protein kinase A gating of a pseudopodial-located RhoA/ROCK/p38/NHE1 signal module regulates invasion in breast cancer cell lines [J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(7): 3117-3127.

[8] Yoshioka K, Nakamori S, Itoh K. Overexpression of small GTP2 binding protein RhoA promotes invasion of tumor cells [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(8): 2004-2010.

[9] Horiuchi A, Kikuchi N, Osada R, Wang C, Hayashi A, Nikaido T, et al. Overexpression of RhoA enhances peritoneal dissemination: RhoA suppression with lovastatin may be useful for ovarian cancer [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(12): 2532-2539.

[10] Kamai T, Yamanishi T, Shirataki H, Takagi K, Asami H, Ito Y, et al. Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(14): 4799-4805.

[11] Li XR, Ji F, Ouyang J, Wu W, Qian LY, Yang KY. Overexpression of RhoA is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2006, 32(10): 1130-1134.

[12] 湛凤凰, 曹 利, 胡成平, 李桂源. 鼻咽癌中与已知基因同源的差异表达 cDNA 序列 [J]. *湖南医科大学学报*, 1999, 24(2): 103-106.

[13] Ohtani K, Sakamoto H, Rutherford T, Chen Z, Kikuchi A, Yamamoto T, et al. Ezrin, a membrane-cytoskeletal linking protein, is highly expressed in atypical endometrial hyperplasia and uterine endometrioid adenocarcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2002, 179(1): 79-86.

[14] Akisawa N, Nishimori I, Iwamura T, Onishi S, Hollingsworth MA. High levels of Ezrin expressed by human pancreatic adenocarcinoma cell lines with high metastatic potential [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 258(2): 395-400.

[15] Moilanen J, Lassus H, Leminen A, Vaheri A, Butzow R, Carpen O. Ezrin immunoreactivity in relation to survival in serious ovarian carcinoma patients [J]. *Gynecol Oncol*, 2003, 90(2): 273-281.

[16] Makitie T, Carpen O, Vaheri A, Kivela T. Ezrin as a prognostic indicator and its relationship to tumor characteristics in uveal malignant melanoma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42(11): 2442-2449.

[17] Jiang WG, Watkins G, Lane J, Cunnick GH, Douglas-Jones A, Mokbel K, et al. Prognostic value of Rho GTPase and Rho guanine nucleotide dissociation inhibitors in human breast cancers [J]. *Clin Can Res*, 2003, 9(15): 6432-6440.

[18] Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and merlin: Integrators at the cell cortex [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(8): 586-599.

[收稿日期] 2010-08-24

[修回日期] 2010-09-27

[本文编辑] 王 莹