

RalA RhoC 在非小细胞肺癌组织中的表达及意义 *

陈 丹 于 壮[△] 潘华政 杨 堃 刘相萍

(青岛大学医学院附属医院 山东 青岛 266003)

摘要 目的:观察 RalA 和 RhoC 基因在非小细胞肺癌组织细胞中的表达变化,探讨它们的表达在非小细胞肺癌发展和侵袭转移中的作用。方法:通过实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)检测 RalA、RhoC 在 60 例非小细胞肺癌患者的肿瘤组织和癌旁组织细胞中的表达,了解其与非小细胞肺癌临床病理学指标的关系。结果:RhoC 在非小细胞肺癌组织细胞中的表达较癌旁组织显著增高($P<0.05$),且与淋巴结的转移、TNM 分期和分化程度密切相关 ($P<0.05$)。而 RalA 在非小细胞肺癌组织细胞中的表达量低于癌旁组织 ($P<0.05$),与淋巴结转移无明显相关($P>0.05$)。二者在鳞、腺癌中表达均无差异($P<0.05$)。结论:肺癌组织细胞中 RhoC 表达升高及 RalA 表达异常下调与非小细胞肺癌的发生、发展及侵袭机制关系密切。

关键词 非小细胞肺癌 RhoC RalA 荧光定量 PCR

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)07-1296-04

The Expression and Significance of RhoC and RalA
in Non-Small Cell Lung Carcinoma*CHEN Dan, YU Zhuang[△], PAN Hua-zheng, YANG Kun, LIU Xiang-ping

(The Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, PR China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mRNA express of Ral A and RhoC in lung carcinoma and their clinical significance. **Methods:** The quantity of RhoC and RalA were detected by TaqMan probe based fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) in 60 cases of lung carcinoma, corresponding para-cancer tissues. **Results:** In lung carcinoma, the mean quantities of RhoC mRNA were higher than that in corresponding para-cancer tissues ($P<0.05$), and was closely related with lymph node metastases; TNM stage and histological grade. The mean quantities of RalA mRNA was higher in corresponding para-cancer tissues ($p<0.05$), and no significant association was found between RalA and lymph node metastases ($P>0.05$). In lung cancer, both RalA and RhoC mRNA have no difference between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. **Conclusion:** Preserved expressin of Rho C and defective expressin of RalA can be concerned with NSCLC.

Key words: Lung carcinoma; RhoC; RalA; Real-Time PCR

Chinese Library Classification (CLC): R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)07-1296-04

由于吸烟的流行,接近 20 世纪中叶时,肺癌的发病率和死亡率先是在发达国家,随后在发展中国家迅速增高。2002 年全球肺癌新发病例约 135 万,死亡病例约 118 万。无论从发病还是死亡病例来看,肺癌均为全球首位的癌症,由于病死率高(死亡/发病比 0.87),危害尤为显著。随着肺癌研究的深入,癌基因成为新的研究热点。作为原癌基因的代表,Ras 基因的点突变通常导致 Ras 从原癌基因向癌基因的转化。这样的功能改变对细胞的影响是多方面的,因为 Ras 参与了许多控制细胞分裂与死亡的信号传导路径。现已在肺癌、胰腺癌、结肠癌等多种癌症中检测到 Ras 基因的突变。目前研制的许多抗肿瘤药物也正是针对 ras 依赖性路径。因此,Ras 基因的深入探讨对癌症治疗的进展意义重大。Ras 家族为原癌基因的代表,包括 Ral 亚家族、Rho 亚家族等,它们编码的相关蛋白均属于小分子 GTP 酶超家族中 Ras 家族蛋白^[1]是 Ras 蛋白信号转导通路的下游分子

^[2]。Ras 相关蛋白 RalA(Ras-related protein A)间接参与有丝分裂调节和 Ras 介导的肿瘤转化^[3],在细胞的生长及迁徙过程中起重要作用。目前 cDNA 芯片分析表明 RalA 在精原细胞瘤、肝癌、前列腺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤中表达高于正常组织^[4]。国内还未出现 RalA 在非小细胞肺癌中的研究。Ras 相关蛋白 C(Ras homolog C, RhoC)是 Rho 蛋白家族的主要成员,近来研究^[5-6]都表明 RhoC 基因可以调控肌动蛋白细胞骨架影响细胞迁移等,与多种恶性肿瘤的侵袭和转移密切相关。本研究采用荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)技术检测了非小细胞肺癌组织与癌旁组织中 RalA 和 RhoC 的表达,探讨二者在非小细胞肺癌的发生发展中的作用,为非小细胞肺癌的研究提供新的方向。

1 材料与方法

* 基金项目:青岛市科技计划项目(06-2-2-5-nsh-1),山东省科技发展计划项目(2010GWZ20206)

作者简介:陈丹(1985-),女,硕士研究生,主要研究方向:肿瘤学,电话:15269299505,

E-mail: 286147600@qq.com

[△]通讯作者:于壮, E-mail: yuzhuang2002@163.com

(收稿日期:2011-09-22 接受日期:2012-10-18)

1.1 临床资料

选择 2011-01 至 2011-08 在我院手术切除的 60 例新鲜肺癌组织(鳞癌、腺癌各 30 例)。选配对的癌旁组织(距癌组织边缘 3-5cm)标本为对照。术中切除后立即从原发肿瘤及周围正常肺组织中取直径约 5 mm 组织块, -80℃冰箱保存备用。取标本均与病人签订知情同意书。高中、低分化分别为 33 例、27 例;TNM 分期:I-II 期 31 例,III-IV 期 29 例。

1.2 检测方法

1.2.1 主要试剂 Trizol RNA 提取试剂购自美国 Gibeo 公司, TaKaRa PrimeScript™ RT-PCR (Peffect Real Time)(800 次量)购自大连宝生生物公司。引物和探针合成及 DNA 序列测定均由上海生物工程技术服务有限公司完成。

1.2.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成 所有组织标本按 Trizol 试剂操作说明书进行总 RNA 提取,用北京凯慕生物技术有限公司 SMA4000 紫外分光光度计测定其含量及纯度。RNA 纯度的测定:所提取的总 RNA 用紫外分光光度计测 OD260 / OD280 定量并检测其纯度,其中 OD260 / OD280 居于 1.8-2.0 之间认为合格,采用 TaKaRa 逆转录试剂盒按其标准步骤合成 cDNA。

1.2.3 引物特异性实验 引物的设计与合成从 GenBank 获得目的基因 mRNA 的全长序列,利用引物和探针设计软件 Primer Express 设计引物序列。所用的引物及内参照 GAPDH 引物及探针均委托上海生工公司合成。引物及探针序列如下: GAPDH:F:5'-TCATGGGTGTGAACCATGAGAA-3'R:5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3' Taqman:5'-TCATCAGCAATGCTCCTGCACCA-3' ;Ral-A:F5'-GTGAGCCATGTAAGTGTTA-3' R:5'-GATGGCAAGCATGAATA-3'Taqman:5'-GATGGCAA GCATGAATA-3' RhoC F5'-CCTCATGTGCTTCTCCATCGA3' R:5'-CTCGTCTTGCTCAGTTCCTT-3'Taqman:5'-TCTGCCCCAACGTGCCCATCAT-3'。分别对标本中的 RalA mRNA、RhoC mRNA 和内参照甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 进行 PCR 扩增。20μl 的反应体系中取 cDNA2μl,引物终浓度为 5μM。取扩增产物 5μl,经 2%琼脂糖凝胶电泳验证目的基因片段大小。

1.2.4 Real Time-PCR 采用罗氏 LightCycler 全自动荧光定量 PCR 仪。PCR 体系 20μl 包含 cDNA:2 μl Premix EX Taq:10 μl,超纯水 7.6 μl,上下游引物各 0.8 μl,探针:0.8 μl。探针终浓度:0.2 μl M。扩增程序:95℃预变性 30 S,95℃变性 5 S,60℃退火 35 S,72℃延伸 45 S,共 40 个循环,终末 72℃延伸 5min。计算机给出循环阈值(Ct 值),采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算组织中 RalA 和 RhoC 相对表达总量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS11.5 统计软件,对数据进行 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 引物特异性实验结果

扩增产物经电泳检测,在 115bp、136bp 和 150bp 处各有一条亮带,与预期 RalA、RhoC 和 GAPGH 基因扩增片段大小相符,且无任何杂带,证明引物特异性高,测序证明其与基因库中序列完全一致。经过 Blast 分析,引物序列具有特异。详见图 1

图 2。

2.2 非小细胞肺癌组织中 RalA、RhoC 的表达

非小细胞肺癌组织中 RalA mRNA $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的值为 0.681 ± 0.245 , 低于癌旁组织的 1.083 ± 0.94 ($P=0.039$);RhoC mRNA 的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值为 1.237 ± 0.852 , 高于癌旁组织的 0.883 ± 0.382 ($P=0.040$);RhoC mRNA $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的值在淋巴结转移病例中为 1.181 ± 0.186 ;无淋巴结转移病例中为 0.869 ± 0.433 。I-II 期与 III-IV 期中分别为 0.809 ± 0.139 、 1.270 ± 0.192 ;高中分化和低分化组分别为 0.632 ± 0.234 、 1.210 ± 0.139 。以上亚组中 $P < 0.05$ 均有统计学意义。其他亚组比较中 $P > 0.05$ 。详见表 1。

3 讨论

随着生物基因组学和生物信息学的不断发展以及功能基因组学研究的深入,基因表达研究已成为近几年来研究的重点。本实验在荧光实时定量 PCR(FQ-PCR)的基础上采用相对定量分析方法对 RalA、RhoC 在非小细胞肺癌组织及癌旁组织中的表达进行解析,同时选择管家基因 GAPDH 作为参比基因,对所有样品进行校正,然后再将不同样品之间的目的基因表达量进行比较,将取样、RNA 提取、纯化、反转录等过程的所有偏差均一化,同时 Taqman 探针在此基础上增加了一条荧光探针,消除了引物二聚体等因素对结果的影响,做到了精确的相对定量。

细胞迁徙是肿瘤细胞由原发灶侵入周围组织中必不可少的环节。肿瘤细胞迁徙的过程中需要通过很多结构屏障,通过细胞前进端质膜的突起、细胞尾部和细胞外基质的去黏附、细胞头部新黏附的建立以及细胞内肌动蛋白为基础的细胞的骨架收缩等,穿透基底膜、穿入脉管、侵入脉管。RalA 曾被 OX-FODR 等证实,在膀胱癌细胞系 UMUC-3 存在过度表达,抑制癌细胞系中活化的 RalA,其迁移能力下降^[7]。WANG 等在研究肝细胞肝癌时发现, Ral A 在正常肝组织、慢性肝炎、肝硬化、肝细胞肝癌中表达呈上升趋势,这为 Ral A 作为肝癌的诊断标志物提供了可能^[8]。国内最新研究免疫组化检测 RalA 在乳腺癌组织及癌旁正常组织中的表达中发现, RalA 在浸润性癌中表达下降,且与肿瘤分级相关^[9]。同时在 Ral A 在胰腺癌的研究中表明, Ral A 参与的 EGF 介导的细胞迁徙途径是 Ras 促癌效应的重要通道^[10]。Ral 家族新的研究为我们进一步明确肿瘤的发生发展机制开辟了新思路。本实验证明了 RalA 的表达量与非小细胞肺癌的发生发展呈负相关,癌旁组织相对于癌组织 RalA 占有表达优势,提示在 Ras 家族中,其亚家族仍存在表达量的差异。这一差异说明 RalA 在非小细胞肺癌中表达降低可能与肺癌的组织类型有关,也可能与组织中存在与 RalA 相互作用的蛋白,抑制 RalA 的活性有关。研究表明 Ral 家族成员存在 Ras-p21 的 GTP 结合区域和参与膜锚定,这说明 Ral 家族成员是通过膜定位作用的 G 蛋白^[11]。通常 Ral 家族成员的功能依赖于活化型与失活型 Ral 之间的循环转化能力,即 Ral 磷酸化和去磷酸化的能力。活化型 Ral 基因促进 G 蛋白与其他蛋白效应物的亲和力,并能促进 G 蛋白在细胞内的结合,在非小细胞肺癌组织中可能会存在与磷酸化有关的其他途径。另外 Ral 家族包含 RalA 和 RalB,二者具有高度同源的序列,且它们编码的蛋白质有 85%的氨基酸相同。RalA 和 RalB 与 H-ras、K-ras 或

表 1 RalA RhoC 在非小细胞肺癌中的表达及与临床特征的关系
Table1 The relationship between RalA RhoC 2- $\Delta\Delta C_t$ values and clinical histopathological parameters

Pathological features	Case number	RalA 2- $\Delta\Delta C_t$	P-value	RhoC2- $\Delta\Delta C_t$	P-value
Gender			>0.05		>0.05
Male	39	0.642± 0.468		1.229± 0.856	
Female	40	0.801± 0.578		1.047± 0.687	
Age			>0.05		>0.05
≥60	27	0.748± 0.468		1.364± 0.910	
<60	33	0.653± 0.371		0.989± 0.654	
Tumor stage			>0.05		
I-II	31	0.821± 0.389		0.809± 0.139	<0.05
III-IV	29	0.505± 0.206		1.270 ± 0.192	
Histological pattern			>0.05		>0.05
Squamous cell carcinoma	30	0.873 ± 0.484		0.820 ± 0.188	
Adenocarcinoma	30	0.520 ± 0.380		0.796± 0.128	
Differentiation			>0.05		<0.05
High -moderate	33	0.706 ± 0.140		0.632 ± 0.234	
Poor	27	0.423 ± 0.147		1.210 ± 0.139	
Lymph node involvement			>0.05		<0.05
Negative	16	0.805 ± 0.171		0.869 ± 0.433	
Positive	44	0.490 ± 0.276		1.181± 0.186	

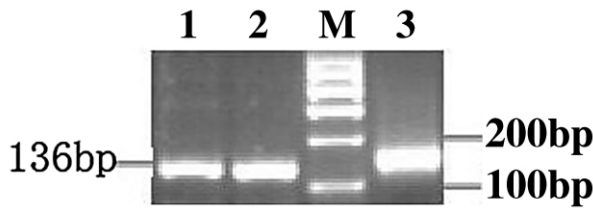


图 1 RT-PCR 检测 RalA 在肺癌中的表达

Figure 1 Reverse transcription-poymerasc chain reaction(RT-PCR)of RalA expression in human lung cancer tissues

1 代表内参 2、3 代表 RalA 在 115 bp 大小处的扩增条带
M, size marker; 1,GAPDH; 2 3 RalA.,

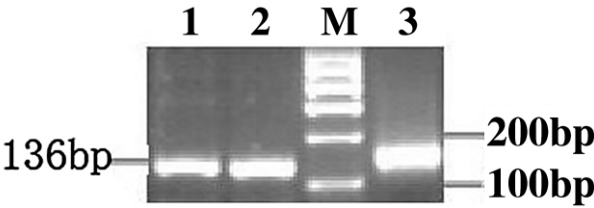


图 2 RT-PCR 检测 RhoC 在肺癌中的表达

Figure 2 Reverse transcription-poymerasc chain reaction (RT-PCR)of RhoC expression in human lung cancer tissues

3 代表内参 GAPDH 1、2 代表 RhoC 在 136 bp 大小处的扩增条带
M, size marker; 1 2, RhoC ;3,GAPDH.

N-ras 有 50%的基因序列相同^[12]。当分别研究 RalA 和 RalB 对细胞迁移作用时,发现 RalA 和 RalB 在这一过程中发挥着相反的作用。Oxford G^[13]等人的实验结果表明 RalB 是促进细胞迁移的,而 RalA 是阻碍细胞迁移的。但这一研究结果目前仍受到争议。癌组织中 RalA 的表达量下降可能与 Ral 家族在肿瘤细胞的迁徙过程中可能存在不同的作用通道有关。目前 RalA 发挥作用的通路仍不明确,其下调的具体意义和相关机制有待进一步研究。

RhoC 基因是 ras 基因超家族的一个成员,其定位于 1p13-p21,编码含 193 个氨基酸的 RhoC 蛋白,RhoC 蛋白及其效应分子 RhoC 的主要功能是通过调节肌动蛋白细胞骨架,加快细

胞迁徙的速率,在细胞的增殖、生长和凋亡中起关键作用。近来研究显示 RhoC 的异常表达与多种肿瘤的浸润和淋巴结转移密切相关^[14]。Clark^[15]等首次证实了 RhoC 蛋白在黑色素肿瘤细胞的转移过程中发挥重要作用,其后陆续有研究显示 RhoC 蛋白的高表达与乳腺癌、肝癌、胃癌的分期及转移具有相关性^[16-18]。其中在乳腺癌的研究中显示,90%以上的炎性乳癌都出现 RhoC GTP 酶的过度表达,而非炎性乳腺癌仅 36%表达,表明 RhoC 与乳腺癌的侵袭性行为呈正相关^[19]。特异性干扰 RhoC 的表达可抑制癌细胞的增长和侵袭能力^[20]。本实验证实 RhoC 在非小细胞肺癌中高表达且与淋巴结转移、肿瘤临床分期显著相关,机制可能为 RhoC 的高表达活化了相关的下游蛋白,引

起肌动蛋白的收缩丝组装并与粘着斑复合物结合,使细胞的运动能力增强,最终导致了肺癌细胞向淋巴结转移。RhoC 促肿瘤转移的机制可能如下^[21]。①破坏细胞极性,这在上皮-间质转化中起重要作用,在许多侵袭性肿瘤中可观察到;②使细胞丧失黏附连接;③提高细胞运动能力及重塑细胞外基质能力,使肿瘤细胞具有局部浸润性。随着对 RhoC 研究的深入,RhoC GTP 酶的作用机制将进一步得以明确,RhoC 将有可能成为判断恶性肿瘤侵袭转移性能新的指征,成为临床上影响恶性肿瘤患者预后的一个新因素,也为非小细胞肺癌相关疫苗的产生提供了新的可能。

总之,RalA、RhoC 在非小细胞肺癌中的表达提示其在非小细胞肺癌演进中具有重要作用,有可能成为今后非小细胞肺癌基因治疗的重要靶分子,为研究非小细胞肺癌致癌机制和治疗提供了新的方向。

参考文献 (References)

- [1] Hum Genet. The ras-related ral gene maps to chromosome [J]. Roussey Merck MF, Bernheim A, Chardin, 1988, 79(2):132-136
- [2] Wolthuis R M, Zwartkruis F, Moen TC, et al. Ras-dependent activation of the small GTPase Ral[J]. Curr Biol, 1998, 8(8): 471-474
- [3] Reuther G W, Der C J. The Ras branch of small GTPases; Ras family members do not fall from the tree [J]. Curr Opin Cell Biol, 2000, 12 (2): 157-165
- [4] Moreno Aspitia A. Clinical overview of sorafenib in breast cancer[J]. Future Oncol, 2010, 6(5): 655-633
- [5] 王伟, 杨连粤, 黄耿文, 等. RhoC 基因的过量表达与肝细胞癌的侵袭转移[J]. 中华肿瘤杂志, 2004, 26(5): 279-282
Wang Wei, Yang Lian-yue, Huang Geng-wen, et al. Overexpression of RhoC and the correlation with invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. Chinese Journal of Oncology, 2004, 26 (5): 279-282
- [6] Kollison EA, Kleer C, Wu M, et al. A torvastatin prevents RhoC isoprenylation, invasion and metastasis in human melanoma cell [J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2(10): 941-948
- [7] Oxford G Owens C R, Titus B J, et al. RalA and RalB: antagonistic relatives in cancer cell migration [J]. Cancer Res, 2005, 65 (16): 7111-7120
- [8] Wang K, Chen Y, Liu S, et al. Immunogenicity of Ral A and its tissue-specific expression in hepatocellular carcinoma [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2009, 22(3): 735-743
- [9] Sahai E, Marshall CJ. Rho GTPases and cancer [J]. Nature Rev Cancer, 2002, 2(2): 133-142
- [10] Gildea J J, Harding M A, Seraj M J, et al. The role of Ral A in epidermal growth factor receptor-regulated cell motility [J]. Cancer Res, 2002, 62(4): 982-985
- [11] 孙强. Ral 家族和肿瘤[J]. 实用肿瘤学杂志, 2008, 22(4): 379-381
Sun Qiang. Ral family and tumor [J]. Journal of Clinical Oncology, 2008, 22(4): 379-381
- [12] Chardin, P, Tavittian, A. The ral gene: A new ras related gene isolated by the use of a synthetic probe [J]. The EMBO Journal, 1986, 5: 2203-2208
- [13] Suzuki J, Yamazaki Y, Li G, et al. Involvement of Ras and Ral in chemotactic migration of skeletal myoblasts [J]. Mol Cell Biol, 2000, 20 : 4658-4465
- [14] 肖胜军, 曾思恩, 蒙国照. 应用组织芯片检测 Ral A 在乳腺癌中的表达及意义[J]. 广东医学, 2010, 32(9): 1174-1176
Xiao Sheng-jun, Zeng Guo-zhao. The Expression and significance of RalA in breast cancer with Tissue microarray [J]. Guangdong Medical Journal, 2010, 32(9): 1174-1176
- [15] Clark EA, Golub TR, Lander ES, et al. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC [J]. Nature, 2000, 406(6795): 532-535
- [16] Kusama T, Mukai M, Tatsuta M, et al. Inhibition of transendothelial migration and invasion of human breast cancer cells by preventing geranylgeranylation of RhoC [J]. Int J Oncol, 2006, 29(1): 217-223
- [17] Wang W, Yang LY, Huang GW. Genomic analysis reveals RhoC as a potential marker in hepatocellular carcinoma with poor prognosis [J]. Br J Cancer, 2004, 90(12): 2349-2355
- [18] Liu N, Zhnag G, Bi F, et al. RhoC is essential for the metastasis of gastric cancer [J]. J Mol Med, 2007, 85(10): 1149-1156
- [19] Van den Eynden GG, Van der Auwera I, Van Laere S, et al. Validation of a tissue microarray to study differential protein expression in inflammatory and non-inflammatory breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2004, 85(1): 13-22
- [20] Sun H w, Tongs L, He J, et al. RhoA and RhoC siRNA inhibit the proliferation and invasiveness activity of human gastric carcinoma by Rho / PI3K / Akt pathway [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(25): 3517-3522
- [21] Wang W, Yang LY, Huang GW, et al. Genomic analysis reveals RhoC as a potential marker in hepatocellular carcinoma with poor prognosis [J]. Br J Cancer, 2004, 90(12): 2349-2355