

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.01.022

Rac1 和 Cdc42 在乳腺癌中的表达和临床意义 *

刘 颖 蔡 黔 乔如丽 黄亚琼 赵庆丽[△]

(解放军兰州军区兰州总医院乳腺科 甘肃 兰州 730000)

摘要 目的:研究 Rac1 和 Cdc42 在人乳腺癌中的表达及临床意义。**方法:**收集 339 例人乳腺癌组织样本,通过免疫组化的方法检测 Rac1 和 Cdc42 的表达情况,并分析其与乳腺癌临床病理学特征间的相关性。**结果:**Rac1 和 Cdc42 在正常乳腺组织中几乎不表达,而在肿瘤组织的阳性表达率分别为 35.9%和 38.5%,均较正常乳腺组织显著升高,差异均具有统计学意义($P < 0.001$ 和 $P < 0.05$)。卡方检验分析表明,二者的表达与患者的年龄、肿瘤大小、组织分化程度、HER2 状态无关($P > 0.05$),而与 TNM 分期、淋巴结转移、肿瘤侵袭、ER 状态和 Ki-67 表达有相($P < 0.05$)。相关性分析表明,Rac1 和 Cdc42 的表达与高 TNM 分期(r 分别为 0.443 和 0.295; P 均 < 0.001)、淋巴结转移阳性(r 均为 0.480 和 0.562; P 均 < 0.001)、肿瘤侵袭(r 分别为 0.412 和 0.440; P 均 < 0.001)、ER 阴性表达(r 分别为 -0.517 和 -0.342; P 均 < 0.001)以及 Ki-67 高表达(r 分别为 0.338 和 0.454; P 均 < 0.001)呈正相关。**结论:**在乳腺癌组织中,Rac1 和 Cdc42 作为癌基因表达增加,可能在乳腺癌恶性进程中发挥重要作用。

关键词:乳腺癌;Rac1;Cdc42;表达;临床意义

中图分类号:R737.9 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2015)01-92-04

Expression and Clinical Significances of Rac1 and Cdc42 in Breast Cancer*

LIU Ying, CAI Qian, QIAO Ru-li, HUANG Ya-qiong, ZHAO Qing-li[△]

(Department of Breast Surgery, Lanzhou General Hospital of CPLA, Lanzhou, Gansu, 730000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression and clinical significances of Rac1 and Cdc42 in human breast cancer. **Methods:** The expression of Rac1 and Cdc42 in 339 cases of human breast cancer specimens were detected by immunohistochemistry. The correlations of Rac1 and Cdc42 expression with breast cancer were also analyzed. **Results:** The expression of Rac1 and Cdc42 in breast cancer were 35.9% and 38.5% respectively, which were significantly higher than those of the normal breast tissue ($P < 0.001$, $P < 0.05$). The chi square test suggested that Rac1 or Cdc42 expression had no correlation with the age, tumor size, histology, HER2 status of breast cancer ($P > 0.05$), but was correlated with TNM stage, lymph node metastasis, tumor invasion, ER status and Ki-67 expression ($P < 0.05$). Correlation analysis suggested that the expressions of Rac1 and Cdc42 were positively correlated with advance TNM stage ($r = 0.443$ or 0.295 ; $P < 0.001$), positive lymph node metastasis ($r = 0.480$ or 0.562 ; $P < 0.001$), tumor invasion ($r = 0.412$ or 0.440 ; $P < 0.001$), negative ER status ($r = -0.517$ or -0.342 ; $P < 0.001$) and high Ki-67 level ($r = 0.338$ or 0.454 ; $P < 0.001$). **Conclusion:** In breast cancer, the expression of Rac1 and Cdc42 increased and correlated with the tumor progression. Rac1 and Cdc42 may play key roles in the progression of breast cancer.

Key words: Breast cancer; Rac1; Cdc42; Expression; Clinical significance

Chinese Library Classification (CLC): R737.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)01-92-04

前言

乳腺癌是全球女性发病率最高的恶性肿瘤^[1]。乳腺癌细胞的恶性增殖能力、远处侵袭能力以及对化疗药物的抵抗,使其成为威胁女性健康的“头号杀手”。癌基因的扩增或过表达在肿瘤的发生发展中发挥关键的作用^[2,3]。因此,深入探讨引起或参与乳腺癌发病的基因,明确其在乳腺癌进程中所扮演的角色,将为乳腺癌的临床治疗提供新的治疗靶点。

Rac1 和 Cdc42 同为小 G 蛋白超家族中的成员,不仅在维持细胞的正常功能中发挥作用,而且也参与了多种细胞生长信号路,能促进细胞的过度生长^[4-6]。Rac1 和 Cdc42 在脑胶质瘤、

卵巢癌、结直肠癌等多种肿瘤中的表达增加,并参与肿瘤的发生和发展^[7-9]。但有关 Rac1 和 Cdc42 在乳腺癌中的表达的研究较少。本研究收集了 88 例配对乳腺正常组织和癌组织以及 339 例乳腺癌临床组织标本,检测其 Rac1 和 Cdc42 的表达情况,并进一步分析其与乳腺癌临床病理学特征之间的相关性,旨在明确 Rac1 和 Cdc42 在乳腺癌进程中的作用,为乳腺癌的临床防治提供更多的参考依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

本研究共纳入了兰州军区兰州总医院乳腺外科和普外科

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81170400)

作者简介:刘颖(1982-),女,本科,主治医师,主要研究方向:乳腺癌外科治疗, E-mail: 497158129@qq.com

△ 通讯作者:赵庆丽(1962-),女,本科,研究方向:乳腺癌外科治疗,电话:0931-8995227, E-mail: zhaoqingli@163.com

(收稿日期:2014-06-28 接受日期:2014-07-25)

2009-2012 年确诊并手术切除的 88 例配对乳腺正常组织和癌组织以及 339 例人乳腺癌组织标本,所有的肿瘤病均经病理科证实为乳腺癌,并且有明确的组织分型、肿瘤分级以及激素表达状态。

1.2 主要试剂及实验方法

1.2.1 免疫组化方法 免疫组织化学染色采用北京中衫生物科技公司的试剂盒,按照说明书逐步操作,具体步骤如下:切片常规脱蜡,3% H₂O₂ 液封闭 30 min,微波抗原修复,正常二抗来源血清封闭 30 min;用抗体稀释液稀释一抗并滴加,4℃ 过夜,PBS 冲洗;滴加稀释好的辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素,室温孵育 30 min,然后 DAB 呈色,再用苏木素复染,中性树胶封片;使用一抗来源动物的正常血清做替代对照,用 PBS 为空白对照,以保证结果的特异性和可靠性。鼠抗人 Rac1 和 Cdc42 多克隆一抗均购自 Abcam 公司。

1.2.2 免疫组化的结果判定标准 免疫组化的结果判定由两位病理医师以独立、双盲的原对免疫染色进行评分。每一例标本的免疫组化评分(immunoreactivity score,IRS)结果进行均经过反复对比,最终的免疫组化评分为下列两项的乘积:① 阳性细胞的百分率 (<5%计 0 分、6-25%计 1 分、26-50%计 2 分、51-75%计 3 分、> 76%计 4 分)× ② 染色强度(阴性计 0 分,弱阳

性计 1 分、中度阳性计 2 分、强阳性计 3 分)。HER2 表达评分 3+ 记为阳性,1+ 或 - 记为阴性,2+ 继续性 FISH 检测判断。

1.3 统计学分析

本研究所有数据利用 SPSS13.0 软件进行分析。Rac1 和 Cdc42 的表达与临床病理学特征的关系采用 χ^2 检验,旨在观察在不同病理学特征中两种蛋白的表达是否有差异;Rac1 和 Cdc42 表达与临床病理学特征间的相关性采用 Spearman 等级相关分析,旨在分析两种蛋白的表达与不同病理学特征之间有无相关性,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Rac1 和 Cdc42 的表达与乳腺癌临床病理学特征间的关系

利用卡方检验分析发现在 88 例配对乳腺正常组织和癌组织中,Rac1 和 Cdc42 在正常乳腺组织中几乎不表达,而在肿瘤组织的阳性表达率分别为 35.9%和 38.5%,均较正常乳腺组织显著升高,差异均具有统计学意义($P < 0.001$ 和 $P < 0.05$,表 1)。乳腺癌组织中 Rac1 和 Cdc42 的阳性表达与乳腺癌 TNM 高分期、Ki67 高表达、ER 阴性表达、淋巴结转移阳性和肿瘤转移阳性均具有显著相关性($P < 0.01$,表 2),而与乳腺癌患者的年龄、肿瘤大小、组织分化、HER2 状态均无关($P > 0.05$,表 2)。

表 1 Rac1 和 Cdc42 在正常乳腺组织及乳腺癌组织中的表达差异

Table 1 Expression differences of Rac1 and Cdc42 between normal breast tissues and breast cancer tissues

	Rac1 expression		P	Cdc42 expression		P
	Negative	Positive		Negative	Positive	
Normal	9	1	<0.001	1	0	<0.05
Cancer	28	50		30	48	
Total	37	51		40	48	

Note: The Fisher's exact test was used for statistical analyses. $P < 0.05$ were considered statistically significant.

表 2 Rac1 和 Cdc42 的表达与乳腺癌临床病理学特征间的关系

Table 2 Correlation of the Rac1/Cdc42 expression in breast cancer tissue with the clinicopathological characteristics of patients with breast cancer

Variable	No.	Rac1 expression		P	Cdc42 expression		P
		Positive (%)	Negative (%)		Positive (%)	Negative (%)	
Age(years)							
≤ 50	141	105 (74.5)	36 (25.5)	0.185 ^a	87 (59.6)	54 (40.4)	0.989 ^a
> 50	198	133 (67.2)	65 (32.8)		122 (61.6)	76 (38.4)	
Tumor size							
≤ 2 cm	142	95 (66.9)	47 (33.1)	0.280 ^a	83 (58.5)	59 (41.5)	0.311 ^a
> 2 cm	197	143 (72.6)	54 (27.4)		126 (64.0)	71 (36.0)	
TNM stage							
I~II	116	22 (19.0)	94 (81.0)	<0.0001 ^a	35 (30.2)	81 (69.8)	<0.0001 ^a
III~IV	223	144 (64.6)	79 (35.4)		128 (57.4)	95 (42.6)	
Lymph node metastasis							
Positive	228	195 (64.2)	33 (35.8)	<0.0001 ^a	184 (64.2)	44 (35.8)	<0.0001 ^a
Negative	111	43 (42.1)	68 (57.9)		25 (42.1)	86 (57.9)	
Histology differentiated							
Poorly	105	75 (71.4)	30 (28.6)	0.464 ^b	68 (64.8)	37 (35.2)	0.621 ^b
Moderately	106	78 (73.6)	28 (26.4)		66 (62.3)	40 (37.7)	
Well	128	85 (66.4)	43 (33.6)		75 (58.6)	53 (41.4)	

Tumor invasion							
Yes	254	206 (81.1)	48 (18.9)	<0.0001 ^a	188 (74.0)	66 (26.0)	<0.0001 ^a
No	85	32 (37.6)	53 (62.4)		21 (24.7)	64 (75.3)	
ER status							
Positive	185	90(48.6)	95(51.4)	<0.0001 ^a	86(46.5)	99(53.5)	<0.0001 ^a
Negative	154	148(96.1)	6(3.9)		123(78.6)	31(21.4)	
Her-2 status							
Positive	68	52(76.5)	16(23.5)	0.237 ^a	46(67.6)	22(32.4)	0.268 ^a
Negative	271	186(68.6)	85(31.4)		163(60.1)	108(39.9)	
Ki67 status							
Positive	227	184(81.1)	43(18.9)	<0.0001 ^a	179(78.9)	48(21.1)	<0.0001 ^a
Negative	112	54(48.2)	58(51.8)		40(35.7)	82(64.3)	

Note: aThe Fisher's exact test was used for statistical analyses. P<0.05 were considered statistically significant.

b The Pearson's chi square test was used for statistical analyses.

2.2 Rac1 和 Cdc42 的表达与乳腺癌临床病理学特征相关性的分析

利用 Spearman 相关性分析发现,Rac1 和 Cdc42 的表达与高 TNM 分期(r 均为 0.443 和 0.295;P 均<0.001)、淋巴结转移阳性 (r 均为 0.480 和 0.562;P 均<0.001)、肿瘤侵袭 (r 均为

0.412 和 0.440;P 均<0.001)、ER 阴性表达(r 均为 -0.517 和 -0.342;P 均<0.001) 以及 Ki-67 高表达 (r 均为 0.338 和 0.454;P 均<0.001)呈正相关。而 Rac1 和 Cdc42 表达与乳腺癌患者的年龄、肿瘤大小、组织分化、HER2 状态均无相关性(P>0.05)。

表 3 Rac1 和 Cdc42 的表达与乳腺癌临床病理学特征间的Spearman 等级相关分析

Table 3 Correlation of Rac1/Cdc42 expression with clinical histopathologic characteristics of breast cancer analyzed by Spearman Rank Correlation Analysis

Variable	Rac1 expression	p ^a	Cdc42 expression	p ^a
	Correlation coefficient (rs)		Correlation coefficient (rs)	
Age(years)	.079	0.149	0.001	0.987
Tumor size	-.061	0.260	-0.056	0.305
TNM stage	-.433	0.0001	-0.295	0.0001
Lymph node metastasis	.480	0.0001	0.562	0.0001
Differentiated status	.049	0.365	0.053	0.332
Tumor invasion	.412	0.0001	0.440	0.0001
ER status	-.517	0.0001	-0.342	0.0001
Her-2 status	.069	0.208	0.062	0.257
Ki67 status	.338	0.0001	0.454	0.0001

Note: a The Spearman correlation test was used for statistical analyses. P values <0.05 were considered statistically significant.

3 讨论

乳腺癌的治疗除了常规手术切除、化疗、放疗、内分泌治疗外, 分子靶向治疗也已经成为乳腺癌治疗不可或缺的一种手段。这不仅基于肿瘤分子生物学研究的进展,也是肿瘤治疗区域个体化的体现。目前,除了 HER2 基因之外,还没有其他能够用于临床检测和治疗用途的分子靶点。因此,探究新的乳腺癌治疗靶点,揭示其在乳腺癌恶性进程中的作用,对乳腺癌的临床治疗意义重大。

Rho 家族属于 Ras 超家族成员, 主要由 Rho(A,B,C)、Rac 和 Cdc42 等三个亚家族组成^[10,11],是细胞内重要的信号传导分子,在维系细胞的多种基本生命过程中发挥关键作用^[12,13]。Rho 家族成员处于 GDP 和 GTP 结合的死与激活状态的周期循环中, 到底偏向于何种状态取决于鸟嘌呤核苷酸交换因子

(GEFs)、鸟嘌呤核苷酸解抑制抑制(GDIs)和 GTP 酶活化蛋白(GAPs)等因子的共同调节^[11,14,15]。Rac1 和 Cdc42 是癌基因,其激活或过度表达能够导致细胞发生癌变^[9,16,17]。研究已证实活化的 Rac1 和 Cdc42 可以参与细胞信号调节通路,在细胞骨架形成、细胞凋亡、细胞迁移和侵袭以及转录调控等过程中发挥作用,尤其可促进肿瘤细胞的转移侵袭和血管生成^[18-20]。本研究发现 Rac1 和 Cdc42 在乳腺癌组织中高表达,而在乳腺正常组织中低表达,其表达与乳腺癌的淋巴结阳性转移、肿瘤侵袭的发生呈正相关,表明 Rac1 和 Cdc42 可能参与了乳腺癌转移的过程。此外,Rac1 和 Cdc42 的高表达与乳腺癌的高 TNM 分期相关,也表明 Rac1 和 Cdc42 在乳腺癌的发生发展中可能扮演着重要角色。此外,Rac1 和 Cdc42 高表达与 ER 低表达呈正相关,提示 Rac1 和 Cdc42 可能和乳腺癌细胞内分泌治疗抵抗存在着某种关系,但有待于进一步的研究证实。关于 Rac1 和 Cdc42 的表达

与乳腺癌组织分化的关系,本研究结果表明二者之间无显著相关性,而这方面的研究也未见相关报道。因此,Rac1 和 Cdc42 可能主要参与乳腺癌的侵袭和转移过程,与激素受体的表达存在某种联系。

乳腺癌的分子靶向治疗让很多乳腺癌患者获益,尤其是针对 HER2 所研发的曲妥珠单抗的临床使用使得 HER2 阳性的乳腺癌患者生存期显著延长,这归因于人们对乳腺癌发病机理的深入研究。但是乳腺癌的发生和发展是多基因参与的过程,寻找新的分子靶点仍旧具有重要意义。Rac1 和 Cdc42 不仅参与肿瘤生长的信号途径,而且有可能作为分子信号开关起到控制着下游信号途径。因此,随着人们对 Rac1 和 Cdc42 研究的深入,其有可能作为乳腺癌防治和预后预测的潜在靶点,有望能够在不久的将来应用于临床。

参考文献(References)

- [1] Poortmans P, Marsiglia H, De Las Heras M, et al. Clinical and technological transition in breast cancer [J]. Rep Pract Oncol Radiother, 2013,18(6):345-352
- [2] Jubb AM, Harris AL. Biomarkers to predict the clinical efficacy of bevacizumab in cancer[J]. Lancet Oncol, 2010,11(12):1172-1183
- [3] Buxton IL, Yokdang N, Matz RM. Purinergic mechanisms in breast cancer support intravasation, extravasation and angiogenesis[J]. Cancer Lett, 2010,291(2):131-141
- [4] Hoang MV, Whelan MC, Senger DR. Rho activity critically and selectively regulates endothelial cell organization during angiogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004,101(7):1874-1879
- [5] Sawada N, Li Y, Liao JK. Novel aspects of the roles of Rac1 GTPase in the cardiovascular system [J]. Curr Opin Pharmacol, 2010,10(2): 116-121
- [6] Brandes V, Schelle I, Brinkmann S, et al. Protection from Clostridium difficile toxin B-catalysed Rac1/Cdc42 glucosylation by tauroursodeoxycholic acid-induced Rac1/Cdc42 phosphorylation [J]. Biol Chem, 2012,393(1-2):77-84
- [7] De Toledo M, Anguille C, Roger L, et al. Cooperative anti-invasive effect of Cdc42/Rac1 activation and ROCK inhibition in SW620 colorectal cancer cells with elevated blebbing activity [J]. PLOS ONE, 2012,7(11):e48344
- [8] Meseke M, Rosenberger G, Forster E. Reelin and the Cdc42/Rac1 guanine nucleotide exchange factor alphaPIX/Arhgef6 promote dendritic Golgi translocation in hippocampal neurons [J]. Eur J Neurosci, 2013,37(9):1404-1412
- [9] Zhang L, Gallup M, Zlock L, et al. Rac1 and Cdc42 differentially modulate cigarette smoke-induced airway cell migration through p120-catenin-dependent and -independent pathways [J]. Am J Pathol, 2013,182(6):1986-1995
- [10] Blattner SM, Hodgins JB, Nishio M, et al. Divergent functions of the Rho GTPases Rac1 and Cdc42 in podocyte injury [J]. Kidney Int, 2013,84(5):920-930
- [11] Parrini MC, Camonis J. Cell motility: The necessity of Rac1 GDP/GTP flux[J]. Commun Integr Biol, 2011,4(6):772-774
- [12] Ferri N, Contini A, Bernini SK, et al. Role of small GTPase protein Rac1 in cardiovascular diseases: development of new selective pharmacological inhibitors [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2013, 62 (5): 425-435
- [13] Valderrama F, Thevapala S, Ridley AJ. Radixin regulates cell migration and cell-cell adhesion through Rac1 [J]. J Cell Sci, 2012,125(Pt 14):3310-3319
- [14] Mao Y, Finnemann SC. Essential diurnal Rac1 activation during retinal phagocytosis requires alphavbeta5 integrin but not tyrosine kinases focal adhesion kinase or Mer tyrosine kinase [J]. Mol Biol Cell, 2012,23(6):1104-1114
- [15] Stanley AC, Wong CX, Micaroni M, et al. The Rho GTPase Rac1 is required for recycling endosome-mediated secretion of TNF in macrophages[J]. Immunol Cell Biol, 2013 LID - 10.1038/icb.2013.90 [doi]
- [16] Reyes SB, Narayanan AS, Lee HS, et al. alphavbeta8 integrin interacts with RhoGDI1 to regulate Rac1 and Cdc42 activation and drive glioblastoma cell invasion[J]. Mol Biol Cell, 2013,24(4):474-482
- [17] Zins K, Lucas T, Reichl P, et al. A Rac1/Cdc42 GTPase-specific small molecule inhibitor suppresses growth of primary human prostate cancer xenografts and prolongs survival in mice [J]. PLOS ONE, 2013,8(9):e74924
- [18] Shen G, Zhou E, Alspaugh JA, et al. Wsp1 is downstream of Cin1 and regulates vesicle transport and actin cytoskeleton as an effector of Cdc42 and Rac1 in Cryptococcus neoformans [J]. Eukaryot Cell, 2012,11(4):471-481
- [19] Mendoza-Catalan MA, Cristobal-Mondragon GR, Adame-Gomez J, et al. Nuclear expression of Rac1 in cervical premalignant lesions and cervical cancer cells[J]. BMC Cancer, 2012,12:116
- [20] Franke K, Otto W, Johannes S, et al. miR-124-regulated RhoG reduces neuronal process complexity via ELMO/Dock180/Rac1 and Cdc42 signalling[J]. EMBO J, 2012,31(13):2908-2921