

文章编号:1005-6947(2005)03-0168-05

· 胃癌专题研究 ·

Tiam1 和 Rac1 表达与胃癌病理生物学行为的关系

朱金明, 余佩武, 赵永亮

(第三军医大学西南医院 普通外科, 重庆 400038)

摘要:目的 探讨 T 淋巴瘤侵袭转移诱导因子 1 (Tiam1) 和 Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1 (Rac1) 表达与胃癌侵袭、转移间的关系。方法 应用链酶亲和素-生物素过氧化物酶复合物 (SABC) 免疫组化法检测 60 例胃癌及癌旁胃黏膜组织中 Tiam1 和 Rac1 蛋白的表达, 并分析其与胃癌临床病理参数间的关系。结果 (1) Tiam1 蛋白在癌旁胃黏膜组织中染色均为阴性, 在胃癌组织中 78.33% 染色呈阳性 ($P < 0.01$); (2) Rac1 蛋白染色阳性率在胃癌组织中 (71.67%) 显著高于癌旁胃黏膜组织 (18.33%) ($P < 0.01$); (3) 随胃癌组织分化程度的降低、浸润深度的增加、TNM 分期的升高及淋巴结转移的发生, Tiam1 和 Rac1 蛋白的染色阳性率皆升高 ($P < 0.05$)。但两者的表达水平与胃癌患者的性别、年龄、癌变原发部位及癌灶大小无关 ($P > 0.05$); (4) Tiam1 阳性胃癌组织中的 Rac1 蛋白表达水平显著高于 Tiam1 阴性者 ($P < 0.01$)。结论 (1) Tiam1 和 Rac1 的表达与胃癌浸润、转移密切相关; (2) 在胃癌组织中, Tiam1 和 Rac1 的表达水平呈正相关; (3) 对 Tiam1 和 Rac1 的联合检测有助于预测胃癌的病理生物学行为。

关键词: 胃肿瘤/病理学; T 淋巴瘤侵袭转移诱导因子 1; C3 肉毒素底物 1; 肿瘤转移

中图分类号: R735.2; R73

文献标识码: A

Relationship between the expression of Tiam1, Rac1 and the pathobiological behavior of gastric cancer

ZHU Jin-ming, YU Pei-wu, ZHAO Yong-liang

(Department of General Surgery, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between the expression of T lymphoma invasion and metastasis inducing factor 1 (Tiam1), ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) with the invasion and metastasis of gastric cancer. **Methods** The expressions of Tiam1 and Rac1 proteins in 60 cases of gastric cancer and paracarcinoma gastric mucosa tissues were detected using Strept Avidin-Biotin Complex (SABC) immunohistochemical method, and the correlation between the expression of Tiam1, Rac1 and clinicopathological parameters of gastric cancer were analysed. **Results** (1) There was negative staining of Tiam1 protein in paracarcinoma gastric mucosa tissues, while positive staining was detected in gastric cancer tissues (78.33%) ($P < 0.01$). (2) The positive staining rate of Rac1 in gastric cancer tissues (71.67%) was significantly higher than that in paracarcinoma gastric muscosa (18.33%) ($P < 0.01$). (3) As the degree of histologic differentiation of gastric cancer decreased, depth of invasion increased, stage of TNM was upgraded or lymph node metastasis appeared, the positive staining rate of Tiam1 and Rac1 proteins in gastric cancer tissues significantly increased ($P < 0.05$), but there was no obvious correlation between their expression with the sex, age of patient, primary pathological location or size of gastric cancer ($P > 0.05$). (4) The expression of Rac1 in patients with positive staining of Tiam1 was significantly

收稿日期:2004-09-22; 修订日期:2005-01-06。

作者简介:朱金明(1972-),男,河北邢台人,第三军医大学西南医院主治医师,博士研究生,主要从事胃肠道肿瘤侵袭转移机制及生物治疗方面的研究。

通讯作者:朱金明 电话:13658399172(手机); E-mail:wuzijien@sina.com。

higher than that in patients with negative staining ($P < 0.01$). **Conclusions** Positive correlation existed between the expression of Tiam1, Rac1 and the infiltration and metastasis of gastric cancer, which suggested that combined examination of Tiam1 and Rac1 in gastric cancer can be helpful to forecast its pathobiological behavior.

Key words: STOMACH NEOPLASMS/pathol; TIAM1; RAC1; NEOPLASMS, METASTASIS

CLC number: R735.2; R73

Document code: A

肿瘤细胞的侵袭、转移与其运动能力密不可分,因细胞骨架结构特性所致运动能力的差异,是肿瘤细胞与正常细胞以及不同转移潜能肿瘤细胞间生物遗传素质差异的具体表现。T淋巴瘤侵袭转移诱导因子1(Tiam1)和Ras相关的C3肉毒素底物1(Rac1)正是作为重要的细胞骨架结构调节因子,而与肿瘤的侵袭、转移密切相关^[1,2]。本研究旨在通过检测人胃癌及癌旁胃黏膜组织中Tiam1和Rac1蛋白的表达情况,初步分析其相互间及与胃癌临床病理参数间的关系。

1 临床资料

1.1 资料来源

选取本院2002年10月~2003年10月外科手术切除的60例新鲜胃癌组织标本及其距肿瘤约3~5cm的癌旁胃黏膜组织,均经病理学确诊。男39例,女21例;年龄32~79(平均 58.6 ± 11.3)岁。所有病例均有完整的临床病理资料(表1)。术前均未行放疗或化疗。乳头状腺癌7例,管状腺癌24例,低分化腺癌10例,黏液腺癌6例,印戒细胞癌9例,未分化癌4例;伴淋巴结转移34例,无淋巴结转移26例。依胃癌分化程度将其归为两大类:乳头状腺癌、管状腺癌为分化较好组;低分化腺癌、黏液腺癌、印戒细胞癌、未分化癌为分化较差组。胃癌病理诊断参照1980年全国胃癌协作会议制定的标准,病理组织学分型及PTNM分期分别根据世界卫生组织(WHO)和1988年国际抗癌联盟(UICC)颁布的方案实施。

1.2 方法

将所有标本制成 $5\mu\text{m}$ 厚连续石蜡切片,分别行HE及免疫组织化学染色。主要试剂为兔抗人/鼠Tiam1及Rac1多克隆抗体(美国Santa Cruz公司,货号分别为c-16,c-14),工作浓度皆为1:100。免疫组化采用链酶亲和素-生物素过氧化物酶复合物(streptavidin-biotin complex, SABC)法,染色程序参照即用型SABC免疫组化检测试剂盒(武汉博士德

生物工程有限公司,货号SA1020)说明书操作。切片脱蜡,热抗原修复,一抗 37°C 孵育2h,加生物素标记的二抗 37°C 孵育30min,加SABC复合物 37°C 孵育30min。Tiam1蛋白检测采用DAB显色,苏木素复染,中性树胶封片;Rac1蛋白检测采用AEC显色,苏木素复染,水溶性封片剂封片。每组染色均以PBS缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定

高倍镜下每张切片选择10个有代表性的视野,每个视野计数100个肿瘤细胞,共计数1000个细胞。Tiam1和Rac1蛋白阳性染色为在细胞内(膜、浆)呈黄色或红色颗粒,界限清楚,无明显背景着色。Tiam1和Rac1蛋白表达评估标准:(1)按染色强度计分。0分为无色,1分为淡黄色或淡红色,2分为棕黄色或棕红色,3分为黄褐色或红褐色。(2)按阳性染色细胞百分率计分。0分为阳性细胞数 $\leq 10\%$,阳性细胞数 $10\% \sim 25\%$ 为1分, $25\% \sim 50\%$ 为2分, $> 50\%$ 为3分。将(1)×(2)的结果分为以下等级:0分为阴性(-),1~2分为弱阳性(+),3~4分为阳性(++), > 5 分为强阳性(+++)。

1.4 统计学分析

采用SPSS10.0统计软件。率的比较采用 χ^2 检验或Fisher精确概率算法(双侧);相关分析采用Spearman检验。

2 结果

2.1 Tiam1, Rac1在胃癌及癌旁胃黏膜组织中的表达

(1)癌旁胃黏膜Tiam1蛋白染色为阴性(0/60),而在60例胃癌组织中47例(78.33%)染色阳性,差异有极显著性($P < 0.01$)。胃癌组织中Tiam1蛋白染色呈棕黄色阳性颗粒,颜色浓淡不一,不均一性分布于癌细胞的胞膜及胞浆部位。(2)胃癌Rac1蛋白染色阳性率(43/60,71.67%)显著高于癌旁胃黏膜的阳性率(11/60,18.33%),差

异有极显著性 ($P < 0.01$)。在不同分化程度胃癌组织及其不同区域内,可见大量阳性染色癌细胞呈异质性分布。癌细胞内可见 Rac1 蛋白染成粗大的红色颗粒,颜色浓淡不一,不均一性分布于胞膜及

胞浆内。癌旁胃黏膜组织仅见弱阳性染色细胞散在分布,且 Rac1 蛋白染成细小的淡红色颗粒,较均匀地分布于胞膜、胞浆内或呈局部聚集性地分布于核周胞浆等部位(图 1~4,表 1)。

表 1 Tiam1 和 Rac1 蛋白在胃癌及正常胃黏膜组织中的表达

分组	n	Tiam1 的表达					Rac1 的表达				
		(-)	(+)	(++)	(+++)	阳性率(%)	(-)	(+)	(++)	(+++)	阳性率(%)
胃癌	60	13	7	21	19	78.33	17	9	21	13	71.67
正常胃黏膜	60	60	0	0	0	0.00	49	11	0	0	18.33
P 值	-	-	-	-	-	<0.01	-	-	-	-	<0.01

图 1 癌旁胃黏膜细胞 Tiam1 蛋白阴性染色(SABC × 200)

图 2 胃腺癌细胞 Tiam1 蛋白阳性染色(SABC × 200)

图 3 癌旁胃黏膜细胞 Rac1 蛋白弱阳性染色(SABC × 200)

图 4 胃腺癌细胞 Rac1 蛋白阳性染色(SABC × 200)

2.2 Tiam1 和 Rac1 表达与胃癌临床病理参数的关系

(1) Tiam1 蛋白在胃癌组织中的表达水平与患者性别、年龄、癌灶原发部位及大小无关 (r 依次为 $-0.038, 0.092, 0.031$ 和 -0.012 ; 均 $P > 0.05$), 各组间阳性染色率亦无统计学差异 (χ^2 依次为 $0.087, 0.513, 0.059$ 和 0.009 ; 均 $P > 0.05$), 但与胃癌组织分化程度、浸润深度、TNM 分

期及淋巴结转移存在显著相关性 (r 依次为 $0.347, 0.314, 0.319$ 和 0.356 ; $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。随胃癌组织分化程度的降低、浸润深度的增加、TNM 分期的升高及伴有淋巴结转移的发生, Tiam1 蛋白阳性染色率呈逐渐增强趋势, 组间比较差异有显著性 (χ^2 依次为 $7.215, 5.908, 6.104$ 和 7.625 ; $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。(2) Rac1 蛋白在胃癌组织中的表达水平与患者性别、年龄、癌灶原发部位

及癌肿大小无关(r 依次为 $-0.081, 0.003, 0.041$ 和 0.048 ; 均 $P > 0.05$), 各组间阳性染色率亦无统计学差异(χ^2 依次为 $0.398, 0.001, 0.135$ 和 0.140 ; 均 $P > 0.05$), 但与胃癌组织分化程度、浸润深度、TNM 分期及淋巴结转移存在显著相关性(r 依次为 $0.312, 0.317, 0.301$ 和 0.346 ; $P < 0.05$

或 $P < 0.01$)。随胃癌组织分化程度的降低、浸润深度的增加、TNM 分期的升高及伴有淋巴结转移的发生, Rac1 蛋白阳性染色率呈逐渐增强趋势, 组间比较有统计学差异(χ^2 依次为 $5.844, 6.033, 5.454$ 和 7.176 ; $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (表 2)。

表 2 Tiam1 和 Rac1 蛋白表达与胃癌临床病理参数的关系

病理参数	n	Tiam1 的表达					P 值	Rac1 的表达					P 值
		(-)	(+)	(++)	(+++)	阳性率(%)		(-)	(+)	(++)	(+++)	阳性率(%)	
性别													
男	39	8	5	12	14	79.49	> 0.05	10	8	14	7	74.36	> 0.05
女	21	5	2	9	5	76.19		7	1	7	6	66.67	
年龄(岁)													
<50	14	4	2	3	5	71.43	>0.05	4	2	5	3	71.43	> 0.05
≥50	46	9	5	18	14	80.43		13	7	16	10	71.74	
原发部位													
胃窦	26	6	3	10	7	76.92	>0.05	8	4	8	6	69.23	>0.05
胃体	19	4	2	8	5	78.95		5	3	6	5	73.68	
胃底	15	3	2	3	7	80.00		4	2	7	2	73.33	
肿瘤长径(cm)													
≤5	33	7	4	13	9	78.79	>0.05	10	5	11	7	69.70	>0.05
>5	27	6	3	8	10	77.78		7	4	10	6	74.07	
组织类型													
分化好	31	11	2	10	8	64.52	< 0.01	13	6	9	3	58.06	<0.05
分化差	29	2	5	11	11	93.10		4	3	12	10	86.12	
侵袭深度													
T ₁ + T ₂	24	9	4	4	7	62.50	<0.05	11	3	8	2	54.17	<0.05
T ₃ + T ₄	36	4	3	17	12	88.59		6	6	13	11	83.33	
TNM 分期													
I+II	28	10	4	9	5	64.29	<0.05	12	5	9	2	57.14	<0.05
III+IV	32	3	3	12	14	90.63		5	4	12	11	84.38	
淋巴结转移													
无	26	10	5	7	4	61.54	<0.01	12	4	8	2	53.85	<0.01
有	34	3	2	14	15	91.18		5	5	13	11	85.29	

2.3 Tiam1 及 Rac1 表达的关系

Tiam1 (+) 胃癌组织中 Rac1 的阳性染色率 (40 / 47, 85.11%) 远高于 Tiam1 (-) 者中的 Rac1 染色阳性率 (3 / 13, 23.08%) ($\chi^2 = 19.296, P < 0.01$); 而且 Tiam1 与 Rac1 蛋白表达呈正相关 ($r = 0.567, P < 0.01$) (表 3)。

表 3 胃癌组织中 Tiam1 与 Rac1 表达的关系

组别	n	Rac1 (+)	Rac1 (-)
Tiam1 (+)	47	40	7
Tiam1 (-)	13	3	10

3 讨论

近年的研究显示,细胞骨架在维持细胞形态和运动的同时,还可整合内、外源信号,参与细胞分泌、接触抑制、增殖和凋亡等多种生物活动,与肿瘤细胞恶性转化及侵袭、转移密切相关^[3]。

Rho 家族(Ras homologue family, Rho)是与肿瘤侵袭、转移密切相关的小 G 蛋白^[4,5], Rac1 则是其重要成员之一。Rac1 蛋白存在 Rac1-GDP(失活状态)和 Rac1-GTP(激活状态)两种形式。Rac1 的生物功能发挥依赖于这两种活性形式间的转换,且具有调节细胞骨架重组,影响细胞形体极化,促进细胞运动与迁移,抑制细胞凋亡的作用^[6,7]。Tiam1 则属于 Dbl (diffuse B-cell lymphoma oncogene family) 家族成员,具有催化 GTP / GDP 转换的功能,是 Rac1 的特异性鸟苷酸转换因子,可以促进 Rac1 与 GTP 结合,激活 Rac1,进而产生一系列生物学效应^[8]。

研究^[1,2,9]表明,Tiam1 和 Rac1 在人类正常组织中低表达或不表达,但在乳腺癌、肺癌、结肠癌、卵巢癌等多种肿瘤细胞或组织中呈高表达,且其表达水平与肿瘤细胞分化程度及侵袭、转移能力密切相关。本实验结果也支持这一观点。笔者发现,Tiam1 蛋白在癌旁胃黏膜组织中均为阴性表达,而在胃癌组织中阳性表达率为 78.33% ($P < 0.01$)。Rac1 蛋白在胃癌组织中的阳性染色率远高于其在癌旁胃黏膜组织中的阳性率 ($P < 0.01$)。同时还观察到,随胃癌组织分化程度的降低、浸润深度的增加、TNM 分期的升高及淋巴结转移的发生,Tiam1 和 Rac1 蛋白的阳性染色率呈逐渐增强趋势,组间差异显著 ($P < 0.05$);但其表达强度与患者的性别、年龄、癌变原发部位及癌肿大小无相关性,组间染色阳性率差异亦不显著 ($P > 0.05$)。

已知胃癌的发生发展是一个多基因、多因素参与的复杂过程,它们之间的协同或拮抗最终影响到胃癌的生物学进程及结局。本研究发现,Tiam1 蛋白(+)胃癌组织中的 Rac1 蛋白染色阳性率显著高于 Tiam1 蛋白(-)者中的相应值 ($P < 0.01$),两者的表达水平呈正相关,且其随胃癌临床病理参数改变而变化的趋势也一致。此现象提示,Tiam1 与 Rac1 在胃癌病理演变过程中可能起协同作用或相互间存在正调控影响。有人^[10]在离体实验中将脂

质体携带的 Tiam1 反义核酸导入高转移肺癌细胞,特异性封闭 Tiam1 基因的表达,可导致肺癌细胞侵袭、转移能力降低,且其细胞内 Rho 蛋白含量也显著减少。该研究结果似乎支持 Tiam1 对 Rho 基因表达具有正调控作用的假设,但具体机制尚未明确。

本研究提示,Tiam1 和 Rac1 是评价胃癌恶性程度的有价值指标,或许可作为反映胃癌生物学行为的标志物;通过对其进行联合检测,有助于预期胃癌的浸润、转移情况及患者的预后。但 Tiam1 和 Rac1 的表达是否系影响胃癌患者预后的独立因素,尚需收集更多的样本并完善随访资料作后续调查。另外,有关 Tiam1 与 Rac1 间可能存在的调控影响及机制,尚须进一步研究。

参考文献:

- [1] Minard ME, Kim LS, Price JE, *et al.* The role of the Guanine nucleotide exchange factor Tiam1 in cellular migration, invasion, adhesion and tumor progression [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2004, 84(1):21-32.
- [2] Malliri A, Collard JG. Role of Rho-family proteins in cell adhesion and cancer [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15(5):583-589.
- [3] Pawlak G, Helfman DM. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, 11(1):41-47.
- [4] 陈维荣, 刘刚敏, 蔡高阳, 等. 直肠癌 RhoC 基因表达与临床病理特点的关系 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(9):691-693.
- [5] 郑岩松, 吕新生, 林永堃, 等. RhoC 基因在原发性肝癌中的表达及其意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 11(9):528-530.
- [6] Etienne MS, Hall A. Rho GTPases in cell biology [J]. *Nature*, 2002, 420(6916):629-635.
- [7] Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way [J]. *Dev-Biol*, 2004, 265(1):23-32.
- [8] Mertens AE, Roovers RC, Collard JG. Regulation of Tiam1-Rac signalling [J]. *FEBS Lett*, 2003, 546(1):11-16.
- [9] Fritz G, Brchetti C, Bahlmann F, *et al.* Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters [J]. *Br J Cancer*, 2002, 87(6):635-644.
- [10] 李兆忠, 张玲, 毛海婷, 等. Tiam1 反义基因抗肿瘤侵袭转移作用的研究 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2002, 9(4):269-271.