

RASSF1A 和 TIP30 在大肠癌中的表达及临床意义

郝英豪, 赵 晶, 王天阳, 张国建, 张小艳, 王凤安
(河北医科大学第二附属医院肛肠外科, 河北 石家庄 050000)

[摘要] **目的** 探讨 RASSF1A 和 TIP30 在大肠癌的发生、恶性转化、侵袭和转移的作用和临床意义。 **方法** 应用免疫组织化学法检测大肠正常组织、大肠癌组织和大肠癌旁组织中 RASSF1A 和 TIP30 蛋白表达。综合分析它们与患者的年龄、性别、分化程度、淋巴结转移等临床病理因素相关性。采用 Spearman 等级相关分析 RASSF1A 和 TIP30 的相关性。 **结果** 在大肠正常组织、癌旁组织和癌组织中 RASSF1A 阳性率分别为 90%、72%、16%, TIP30 阳性率分别是 95%、70%、13%, 在大肠癌中 RASSF1A 和 TIP30 的表达与淋巴结转移、浸润深度、分化程度有关 ($P < 0.05$)。Spearman 等级相关分析 RASSF1A 和 TIP30 的表达呈正相关 ($r_s = 0.292$, $P < 0.05$)。 **结论** RASSF1A 和 TIP30 与大肠癌的发生、恶性转化、侵袭和转移的作用有关, 可能作为大肠癌的早期诊断和预后判断的一种新的潜在的分子标志物, 对大肠癌患者早期诊断, 评价恶性程度, 指导临床治疗, 判断预后具有一定临床意义。

[关键词] RASSF1A; TIP30; 大肠癌; 免疫组织化学

[中图分类号] R735.3⁴ **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 07 - 0049 - 05

RASSF1A and TIP30 Expression in Colorectal Cancer and Its Clinical Significance

HAO Ying - hao, ZHAO Jing, WANG Tian - yang, ZHANG Guo - jian, ZHANG Xiao - yan, WANG Feng - an
(Dept. of Anorectal surgery, The second Hocond Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang Hebi 050000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of RASSF1A and TIP30 in colorectal cancer and evaluate the clinical significance in tumorigenesis, malignant transformation, invasion and metastasis. **Methods** The expression of RASSF1A and TIP30 was detected by immunohistochemistry method in normal colorectal tissues, colorectal carcinoma and adjacent tissues of colorectal carcinoma. The correlation between their expression and the clinicopathological data of patients, including age, gender, the degree of differentiation, lymph node metastasis, was comprehensively analyzed. The correlation between RASSF1A and TIP30 was analyzed by spearman's rank correlation. **Results** The positive rates of RASSF1A in normal colorectal tissues, adjacent tissues of colorectal carcinoma, colorectal carcinoma were 90%, 72% and 16%, respectively, and TIP30 were 95%, 70% and 13%, respectively. The expression of RASSF1A and TIP30 were related to lymph node metastasis, depth of invasion and degree of tumor differentiation ($P < 0.05$). Spearman rank correlation analysis showed that positive correlation was showed between RASSF1A and TIP30 ($r_s = 0.292$, $P < 0.05$). **Conclusions** The expression of RASSF1A and TIP30 are related to colorectal tumorigenesis, malignant transformation, invasion and metastasis, and may be as new potential molecular markers for early colorectal tumorigenesis diagnosis and prognosis, and have a certain clinical significance for early diagnosis, evaluation of the degree of malignancy, clinical treatment and prognosis of patients with colorectal tumorigenesis.

[Key words] RASSF1A; TIP30; Colorectal cancer; Immunohistochemistry; Expression

[作者简介] 河北省医学科学研究重点项目 (07055)

[作者简介] 郝英豪 (1982~), 男, 河北邢台市人, 在读硕士研究生, 主要从事肛肠外科临床及研究工作。

[通讯作者] 王凤安. E-mail:wfa2983@163.com

RASSF1A 是 RASSF1 基因家族 (至少 6 种) 中目前研究最广泛的基因之一。RASSF1A 基因的不同程度的甲基化导致表达降低或缺失与人类的实体肿瘤密切相关。TIP30, 是一种 30 kD 的 Tat (Transactivator of transcription) 结合蛋白 (Tat - Interactive Protein), 又称 HTATIP2 (HIV-1 Tat inter-active protein 2), 其作为人类免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 转录的辅助因子可以和 Tat 相互结合特异性地提高 HIV 增殖^[1], CC3 是一种与肿瘤转移抑制相关的基因^[2], 其与 TIP30 为同一蛋白。TIP30 基因是一个新的抑癌基因, 具有促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成和肿瘤浸润与转移等作用。分析比较 RASSF1A 和 TIP30 基因在正常大肠组织和大肠癌患者大肠癌旁组织及癌组织的表达差异, 探讨其在大肠癌的发生、恶性转化、侵袭和转移的作用, 为大肠癌患者早期诊断, 评价恶性程度, 指导临床治疗, 判断预后提供新的标记物。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集河北医科大学第二附属医院 2010 年 3 月至 2011 年 3 月经病理证实的大肠癌患者标本 50 例 (均有完整的随访资料), 取患者大肠癌组织、癌旁组织 (距癌组织 ≤ 5 cm)。20 例正常大肠组织 (为外伤需手术切除的正常大肠组织)。在 50 例大肠癌标本中: 男 31 例, 女 19 例, 年龄 36~78 岁, 平均 53.68 岁; 有淋巴结转移 22 例, 无转移 28 例; 达浆膜层 20 例, 未达浆膜层 30 例。根据 1989 年 WHO 肿瘤组织学分类: 高中分化 38 例, 低分化 12 例。所有入选病例皆未进行过放、化疗, 无长期服用非甾体抗炎药, 皮质激素类药物史。每例标本均经切片后 HE 染色镜检测再次复查认定。

1.2 主要试剂

鼠抗人 TIP30 单克隆抗体和鼠抗人 RASSF1A 单克隆抗体 (美国 SANTA CRUZ 公司), SP 试剂盒 (北京博奥森公司), DAB 法显色试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 标本制备

所有标本经 10% 甲醛溶液固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 连续 4 μ m 切片。

1.4 方法

采用免疫组织化学 SP 法 (链酶卵白素 - 过氧化酶法) 按试剂盒说明操作, 阴性对照用 PBS 液代替, 1 抗作为空白对照。1 抗 RASSF1A, TIP30

的工作浓度均为 1:200。

1.5 结果判定

所有切片采用盲法由两位病理科医师独立阅片。RASSF1A 定位于细胞浆。判定标准如下: 每张切片随机取 10 个高倍视野, 每个视野计 100 个细胞中的阳性细胞数, 取均值, 以百分数表示阳性指数。结果进行半定量分析: 0~10% 为 0 分; 11%~25% 为 1 分; 26%~50% 为 2 分; 51%~75% 为 3 分; 76%~100% 为 4 分。染色强度评分: 不着色为 0 分; 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分; 棕褐色为 3 分。半定量分析和染色强度评分相加之和: 0~1 分 (-); 2~3 分 (\pm); 4~5 分为 (+); 6~7 分为 (++)。将 (-) 和 (\pm) 定为阴性, (+) 和 (++) 定为阳性。TIP30 定位于细胞浆。阳性细胞染色百分比 > 30% 者判为阳性, < 30% 者为阴性^[3]。

1.6 统计学处理

应用 SPSS 统计软件包进行统计分析, RASSF1A 和 TIP30 的表达与临床病理因素之间的关系采用 χ^2 检验。RASSF1A 和 TIP30 的相关性采用 Spearman 等级相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RASSF1A 和 TIP30/CC3 在大肠正常组织、大肠癌旁和腺癌组织中的表达

免疫组织化学结果: RASSF1A 阳性染色位于细胞浆, 染色呈棕黄色。有的胞质内呈弥漫性均质性阳性, 细胞核不着色 (见图 1); TIP30 蛋白主要表达于细胞质, 阳性染色亦为棕黄色颗粒或团块 (见图 2)。RASSF1A 和 TIP30 在癌组织中的表达阳性率分别低于大肠正常组织和大肠癌旁组织 (见表 1)。

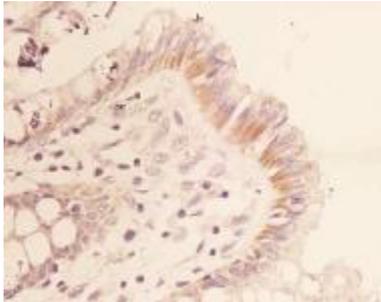
2.2 RASSF1A 和 TIP30 与大肠癌临床病理因素的相关性

RASSF1A 和 TIP30 的阳性表达与患者的发病年龄和性别均无关 ($P > 0.05$), 而与淋巴结转移、浸润深度、分化程度存在明显的相关性: 无淋巴结转移、浸润深度未及浆膜、分化程度较高者 RASSF1A 和 TIP30 的阳性表达率高; 反之, 则表达率低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

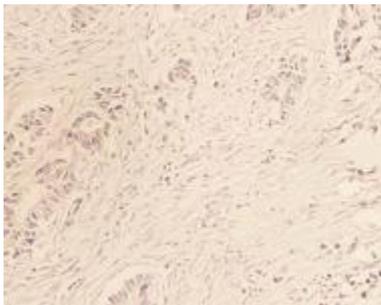
2.3 RASSF1A 和 TIP30 在大肠癌表达中的相关性

在 50 例大肠癌中发现: RASSF1A-TIP30- 18 例; RASSF1A+TIP30- 17 例; RASSF1A-TIP30+ 3 例; RASSF1A+TIP30+ 12 例。Spearman 等级相关

分析表明: RASSF1A 和 TIP30 成正相关 ($r_s = 0.292, P = 0.04$).



大肠正常组织 (×400)



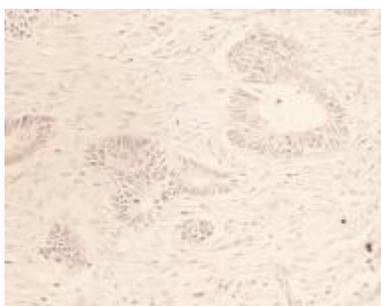
大肠癌组织 (×100)

图 1 RASSF1A 在大肠正常组织和大肠癌组织中表达的免疫组织化学

Fig. 1 The expression of RASSF1A in normal tissues and carcinoma of large intestine by immunohistochemistry



大肠正常组织 (×400)



大肠癌组织 (×100)

图 2 TIP30 在大肠正常组织和大肠癌组织中表达的免疫组织化学

Fig. 2 The expression of TIP30 in normal tissues and carcinoma of large intestine by immunohistochemistry

表 1 RASSF1A 和 TIP30 在大肠正常组织、大肠癌旁和腺癌组织中的表达

Tab. 1 Expression of RASSF1A and TIP30 in normal tissues, carcinoma and adjacent tissues

部 位	n	RASSF1A	TIP30
大肠正常组织	20	18(90)	19(95)
大肠癌旁组织	50	36(72) [△]	35(70) [△]
大肠癌组织	50	8(16) [▲]	6(13) [▲]

与正常大肠组织, [△] $P < 0.05$; 与大肠癌旁组织, [▲] $P < 0.05$.

表 2 RASSF1A 和 TIP30 与大肠癌临床病理因素的相关性 [n(%)]

Tab. 2 The correlation between clinicopathological factors and expression of RASSF1A and TIP30 [n(%)]

因 素	n	RASSF1A(+)	TIP30(+)
年龄 (岁)			
≤50	22	7(31.8)	8(36.4)
>50	28	10(39.3)	9(32.1)
性别			
男	31	4(12.9)	5(16.1)
女	19	2(10.5)	4(21.1)
淋巴结转移			
无	28	21(75)	20(71.4)
有	22	6(27.3) [▲]	7(31.8) [▲]
浸润深度			
未及浆膜	30	20(66.7)	18(60)
侵及浆膜	20	5(25) [△]	5(25) [△]
分化程度			
高中	38	26(68.4)	24(63.2)
低	12	4(33.3) [*]	2(16.7) [*]

与无淋巴结转移比较, [▲] $P < 0.05$; 与未侵及浆膜比较, [△] $P < 0.05$; 与高中分化比较, ^{*} $P < 0.05$.

3 讨论

RASSF1A 阳性表达主要分布于腺体黏膜层细胞, 黏膜下层亦可见到阳性细胞, 着色集中于细胞浆, 表现为棕黄色颗粒, 颗粒粗大不规则. 本研究显示: RASSF1A 表达在大肠正常黏膜上皮细胞的胞浆中, 与文献报道相同; 在癌旁组织中, RASSF1A 阳性细胞棕黄色颗粒细小, 主要位于黏膜浅层; 在大肠癌组织中, 则呈弥漫性表达. 本研究结果说明, RASSF1A 的表达在正常大肠黏膜、大肠癌旁组织和大肠癌组织中存在差异, 其原因很可能是由于病变的不同, RASSF1A 启动子超甲基

化,使抗原的表位充分暴露的结果。

目前研究认为 DNA 甲基化是除杂合性缺失与碱基突变之外导致基因表达异常的第三大原因^[4]。基因组的正常甲基化对维持细胞、组织、器官的正常功能是必须的。但发生异常甲基化,则会形成细胞内的无序状态从而促进肿瘤的发生^[5]。在小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 细胞系中启动子区 CpG 岛的高甲基化导致 RASSF1A 基因约 100% 表达失活^[6]。Dammann 等^[6]用去甲基化试剂 5-氮杂-2'脱氧胞苷处理 A549 细胞株后, RASSF1A 可重新表达。Xu 等^[7]研究发现结直肠癌 31 种基因启动子 CpG 岛的甲基化状态中有 17 种基因的甲基化与其早期发生有关。Wagner 等^[8]发现,结直肠癌细胞系及原发性结直肠癌中存在的 RASSF1A 甲基化。这些结果提示 RASSF1A 的表达失活部分是由 RASSF1A 启动子区 CpG 岛的高甲基化所引起。根据 Knudson 的二次打击学说,对于 RASSF1A 而言,第一次打击很可能是其启动子区的高甲基化而引起的表观遗传学改变,然后第二次打击 (基因突变和杂合性丢失) 可能使其发生肿瘤。此外 RASSF1A 在凋亡的信号转导、微管稳定性和细胞周期循环方面有潜在的作用^[9]。RASSF1A 可以抑制 Cyclin D1 的积聚,使细胞周期停滞在 G1/S 期^[10]。从而抑制肿瘤细胞的生长。

本研究显示, RASSF1A 在正常大肠黏膜、大肠癌旁组织和结肠癌组织的阳性表达率分别为 90%、72%、16%,表达呈现下调趋势,均有统计学意义 ($P < 0.05$)。这与文献报道相一致^[11]。RASSF1A 从正常大肠黏膜、大肠癌旁组织到结肠癌组织阳性表达减少这一趋势说明 RASSF1A 可能参与了大肠癌的发生及恶性转化。RASSF1A 的阳性表达与分化程度成正比,与文献报道不一致^[12],这可能由于研究例数较少所致。RASSF1A 与浸润深度、淋巴结转移呈明显的负相关,说明 RASSF1A 的下调表达促进了肿瘤的侵袭、转移。据此,我们推测 RASSF1A 可能作为大肠癌的早期诊断和预后判断的一种新的潜在的标记物, TIP30 基因 (Tat interacting protein 30) 是由 Shtivelman 等^[2]发现的一个新的抑癌基因。TIP30 可以促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞生长^[1,13]和新生血管生成^[14],以及抑制骨桥蛋白形成^[15]等,从而抑制肿瘤的浸润与转移。在多种肿瘤的研究中发现, TIP30 表达有明显下调的趋势。在肝癌中, TIP30 在癌旁和癌组织中都能检测到表达^[16],但在癌组织中的表达明显降低。在乳腺癌中 TIP30 的表达与 HER-2/neu 原

癌基因的表达呈正相关,且 TIP30 基因的表达与乳腺癌的肿瘤分级、大小、及有无转移无关。在腺样囊性癌中, TIP30 表达缺失,而在正常涎腺组织中高表达^[17,18]。在肠癌中,肠癌的发生与 TIP30 的表达水平下降或缺失有关,并和抑癌基因 p53 有密切的关系^[19]。本实验结果显示, TIP30 阳性染色位于细胞浆,在正常大肠黏膜、癌旁组织、癌组织中的表达率分别为 95%、70%和 13%,呈现下调表达趋势,但在正常大肠组织、癌旁组织中的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$),提示 TIP30 参与了大肠癌的发生,可能是鉴别大肠肿瘤较好的分子生物学标志物之一。本实验 TIP30 与大肠癌临床病理因素相关性的研究显示, TIP30 阳性表达分化程度成正相关,而与浸润深度,淋巴结转移,呈负相关。这与文献报道一致^[20]。提示 TIP30 可能参与细胞的分化,影响细胞恶性程度促进肿瘤的侵袭、转移并与临床分期密切相关。据此,笔者推测 TIP30 可能作为判断大肠癌预后的一个潜在分子标志物。

本研究 Spearman 等级相关分析表明, RASSF1A 和 TIP30 在大肠癌表达呈明显的正相关 ($r_s = 0.292, P < 0.05$),提示联合检测 RASSF1A 和 TIP30 的表达能更客观的反映大肠癌的恶性程度。

总之, RASSF1A 和 TIP30 可能是具有较高敏感性的肠上皮特异性标志物,在大肠癌的发生过程中起着重要作用。通过联合检测 RASSF1A 和 TIP30 有助于鉴别良、恶性大肠肿瘤和指导临床治疗与判断患者的预后。

[参考文献]

- [1] XIAO H, TAO Y, GREENBLATT J, et al. A cofactor, TIP-30, specifically enhances HIV-1 Tat-activated transcription [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 2 146 - 2 151.
- [2] SHTELVELMAN E. A link between metastasis and resistance to apoptosis of variant small cell lung carcinoma [J]. Oncogene, 1997, 14: 2 167 - 2 173.
- [3] AMIOKA T, KITADAI Y, TARAKA S, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression predicts lymph node metastasis of human gastric carcinomas invading the submucosa [J]. Eur J Cancer, 2002, 38(10): 1 413 - 1 419.
- [4] LI Y, WEI Q, CAO F, et al. Expression and promoter methylation of the RASSF1A gene in sporadic breast cancers in Chinese women [J]. Oncol Rep, 2008, 19(5): 1 149 - 1 153.
- [5] ROBERTT P, LAUREN E, PATRICIAM, et al. Methylation profiling of benign and malignant breast lesions and its

- application to cytopathology [J]. *Mod Pathol*, 2003, 16 (11):1 095.
- [6] DAMMANN R, LIC, YOON J H, et al. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21. 3 [J]. *NatGenet*, 2000, 25(3):315.
- [7] XU X L, YU J, ZHANGHY, et al. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10 (23):3 441 - 3 454.
- [8] WAGNERKJ, COOPERWN, GRUNDYRG, et al. Frequent RASSF1A tumour suppressor gene promoter methylation in Wilms' tumour and colorectal cancer [J]. *Oncogene*, 2002, 21 (47):7 277 - 7 282.
- [9] PFEIFERGP, DAMMANNR. Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2005, 70(5):576 - 583.
- [10] GUOW, DONGZ, CHEN Z, et al. Aberrant CpG island hypermethylation of RASSF1A in gastric cardia adenocarcinoma [J]. *Cancer Invest*, 2009, 27(4):459 - 465.
- [11] 付静, 张雁军, 鲁庆阳, 等. 结肠癌组织RASSF1A基因转录表达和启动子区甲基化研究[J]. *现代医学生物进展*, 2010, 10(223):4 513 - 4 516.
- [12] 朱崎, 肖伟升, 欧瑜, 等. RASSF1A基因在结直肠癌中的表达及临床意义[J]. *当代医学*, 2010, 16(26):45 - 46.
- [13] WHITMAN S, WANG X, SHALABY R, et al. Alternatively spliced products CC3 and TC3 have opposing effects on apoptosis[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20:583 - 593.
- [14] NICAMHLAIOIBH R, SHTIVELMAN E. Metastasis suppressor CC3 inhibits angiogenic properties of tumor cells in vitro[J]. *Oncogene*, 2001, 20:270 - 275.
- [15] ZHAO J, LU B, XEH, et al. Thirty-kilodalton Tat-interacting protein suppresses tumor metastasis by inhibition of osteopontin transcription in human hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2008, (1):265 - 275.
- [16] JIANG Z M, LU C T. Attenuated salmonella mediated fusion genes inhibit tumor angiogenesis in BALB/c mice with human salivary adenoid cystic carcinoma [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2005, 26:609 - 612.
- [17] ZHANG X, ZHAN J, LI X D, et al. Construction of adenovirus vector expressing TIP30 gene and its tumor suppressing effects in vitro and in vivo [J]. *Chin J Oncol*, 2004, 26:85 - 88.
- [18] ZHANG L, LU C T. The study of tumor inhibitor gene TIP-30 protein expression in salivary adenoid cystic carcinoma [J]. *J Oral Maxillofac*, 2003, 12:117 - 118.
- [19] ITOM, JIANGC, KRISTY-KRUMMM, et al. TIP30 deficiency increases susceptibility to tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 2003, 63:8 763 - 8 767.
- [20] 张霞, 欧阳学农, 李晓东, 等. 肠癌组织中TIP30基因的表达与转移、预后间的关系及机制[J]. *第二军医大学学报*, 2005, 26(5):488 - 491.

(2012-02-21 收稿)