

RhoC和IQGAP1蛋白在原发性肝细胞癌中的表达及意义

范玉梅, 张连峰, 赵媛, 陈莉莉

范玉梅, 张连峰, 赵媛, 陈莉莉, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450052

范玉梅, 在读硕士, 主要从事肝脏疾病的基础与临床研究.

作者贡献分布: 此课题由范玉梅与张连峰设计; 研究过程及统计分析由范玉梅与赵媛完成; 论文书写由范玉梅与陈莉莉完成.

通讯作者: 张连峰, 教授, 450052, 河南省郑州市建设路1号, 郑州大学第一附属医院消化内科. lfzhang1999@126.com

电话: 0371-66295933

收稿日期: 2011-08-06 修回日期: 2011-09-15

接受日期: 2011-09-23 在线出版日期: 2011-09-28

Significance of RhoC and IQGAP1 expression in hepatocellular carcinoma

Yu-Mei Fan, Lian-Feng Zhang, Yuan Zhao, Li-Li Chen

Yu-Mei Fan, Lian-Feng Zhang, Yuan Zhao, Li-Li Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Professor Lian-Feng Zhang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. lfzhang1999@126.com

Received: 2011-08-06 Revised: 2011-09-15

Accepted: 2011-09-23 Published online: 2011-09-28

Abstract

AIM: To detect the expression of RhoC and IQGAP1 proteins in hepatocellular carcinoma (HCC) and to analyze their clinicopathological significance.

METHODS: The expression of RhoC and IQGAP1 proteins was detected by immunohistochemistry in 56 HCC specimens and 15 normal liver specimens. The association of RhoC and IQGAP1 protein expression with clinicopathological parameters was analyzed.

RESULTS: The positive rates of RhoC and IQGAP1 expression were significantly higher in HCC than in normal liver tissue (66% vs 20%; 75% vs 13%, both $P < 0.05$). The expression of RhoC and IQGAP1 proteins was related to tumor differentiation and invasion in HCC (both $P < 0.05$). A positive correlation was noted between the expression of RhoC and that of IQGAP1 in HCC ($r = 0.631$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: RhoC and IQGAP1 play significant roles in promoting the progression of HCC. Expression of RhoC and IQGAP1 can be used as useful parameters for clinical assessment of biological behavior and prognosis of HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; RhoC; IQGAP1; Immunohistochemistry

Fan YM, Zhang LF, Zhao Y, Chen LL. Significance of RhoC and IQGAP1 expression in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(27): 2841-2845

摘要

目的: 探讨RhoC和IQGAP1蛋白在原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织中的表达及其临床病理意义.

方法: 采用免疫组织化学法分别检测56例原发性肝细胞癌和15例正常肝组织中RhoC及IQGAP1蛋白的表达, 并分析两者的相关性及其与临床病理因素的关系.

结果: RhoC和IQGAP1在原发性肝细胞癌组织中的表达明显高于正常组织(66% vs 20%; 75% vs 13%, 均 $P < 0.05$), 且两者的表达呈正相关($r = 0.631$, $P < 0.05$), 并与肿瘤组织的分化程度及门脉浸润等均密切相关(均 $P < 0.05$).

结论: RhoC及IQGAP1在原发性肝细胞癌的发生、发展中发挥重要的促进作用, 可考虑作为HCC临床评价肿瘤生物学行为及评估预后的指标.

关键词: 肝细胞癌; RhoC; IQGAP1; 免疫组织化学

范玉梅, 张连峰, 赵媛, 陈莉莉. RhoC和IQGAP1蛋白在原发性肝细胞癌中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2011; 19(27): 2841-2845

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2841.asp>

0 引言

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国常见的恶性肿瘤之一, 因其早期诊断困

■背景资料

原发性肝细胞癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 尽管新的防治手段不断出现, 预后仍较差. 这是因为HCC早期诊断困难、易发生浸润转移. 因而, 寻找有效的预防及治疗手段极为重要.

■同行评议者

禄韶英, 副主任医师, 西安交通大学医学院第一附属医院普外科

■研发前沿

研究发现RhoC与IQGAP1与人类多种肿瘤的发生、发展密切相关,有可能作为判断恶性肿瘤进展和预后的新的指标。而两者在恶性肿瘤中的联合性研究极少报道。

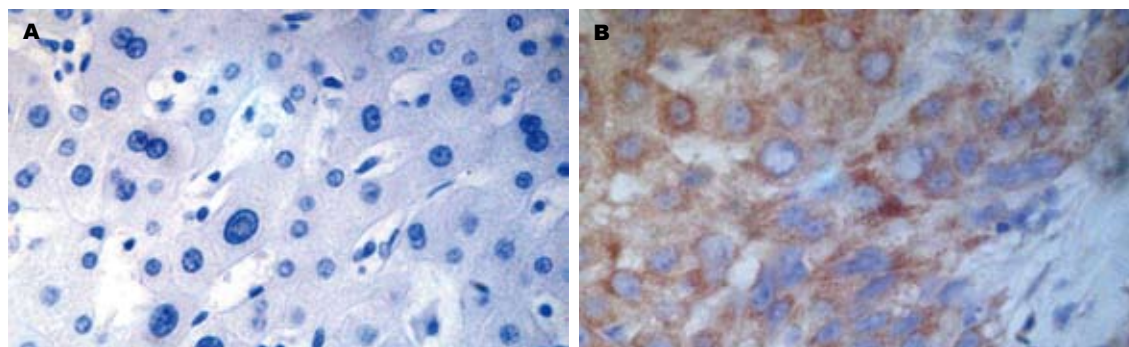


图1 RhoC蛋白的表达(SP×400)。A: 正常组织阴性; B: 肝癌组织强阳性。

难、易发生转移,并缺乏有效的治疗方法,预后极差。故探讨HCC的发生及转移机制,寻找有效预防及治疗的手段,是目前迫切需要解决的问题。RhoC(Ras homologous C)属于小分子G蛋白超家族中的Rho亚家族,是Rho信号转导通路的重要分子。文献报道,RhoC在肝癌、胃癌、结肠癌等多种肿瘤中高表达,并与肿瘤的浸润转移高度相关^[1-3]。IQGAP1(IQ motif containing GTPase activating protein 1)是一种Ras鸟苷三磷酸酶活化蛋白,因其含有类似于Ras GAPs催化域的广泛序列和位于N端的4个可与钙调蛋白相互作用的IQ模体而被命名。研究表明,IQGAP1在肝癌、胃癌、结肠癌等多种肿瘤的复发转移中也发挥了显著的促进作用^[4-6],被认为是一种致癌基因^[7]。目前,在肝癌中有关RhoC与IQGAP1的联合性研究尚无报道。本研究采用免疫组织化学法分别检测RhoC及IQGAP1蛋白在56例HCC和15例正常组织中的表达及与临床病理因素的关系,并探讨其相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 郑州大学第一附属医院2010-03/2011-03手术切除的56例肝癌标本,取15例同期肝血管癌旁病理证实为正常肝组织的组织为正常对照。肝癌患者中男48例,女8例,年龄34-65岁。术前均未接受化疗放疗及免疫治疗,病理学均确诊为原发性肝细胞癌,其中高分化癌14例,中分化癌22例,低分化癌20例;有门脉浸润14例,无浸润42例;HCC病理学分级参照Edmondson分级,I-II级17例,III~IV级39例;肿瘤大于或等于5 cm者22例,小于5 cm者34例。试剂RhoC山羊抗多克隆抗体为美国SantaCruz生物技术公司产品,IQGAP1兔抗人单克隆抗体为EPITMICS生物技术公司产品,SP检测试剂盒、DAB显色试剂盒,

均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法 标本经甲醛固定石蜡包埋,连续4 μm切片。采用免疫组织化学染色PV-9000两步法。DAB显色,苏木素复染,操作步骤严格按照说明书进行。实验中以已知的阳性组织作阳性对照,PBS代替一抗作阴性对照。以细胞胞质和/或胞膜出现黄色颗粒为阳性细胞,随机选取5个高倍视野计数,以阳性细胞数和着色强度乘积判断结果。着色强度计分:0分为无色,1分为淡黄色,2分为棕黄色,3分为棕褐色。阳性细胞计分:0分为阴性,1分为阳性细胞≤10%,2分为11%-50%,3分为51%-75%,4分为>75%。两者得分乘积结果:≤3分者为(-);4-8分者为(+);>8分者为(++),+和++均视为阳性。

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件进行数据分析,统计方法采用Kruskal-Wallis H检验及pearson相关分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 RhoC与IQGAP1在HCC及正常组织中的表达 RhoC蛋白染色阳性信号呈棕黄或棕褐色,主要位于肝癌细胞胞浆(图1)。在HCC组织中RhoC蛋白呈弥漫性或灶性分布,以弥漫性为主。RhoC蛋白在HCC组织及正常组织中的阳性表达率分别为:66%、20%,两者差异具有统计学意义($P < 0.05$)。IQGAP1蛋白染色阳性信号呈棕黄或棕褐色,位于肝癌细胞胞膜或胞浆(图2)。IQGAP1蛋白在HCC组织及正常组织中的阳性表达率分别为:75%、13%,两者差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 RhoC与IQGAP1在HCC组织中的表达与其临床病理参数间的关系 RhoC与IQGAP1蛋白在HCC组织中的表达与肿瘤大小、患者的性别、年龄均无关($P > 0.05$),但均与肿瘤的TNM分级、分化程度及门脉浸润有关($P < 0.05$,表1)。

2.3 RhoC与IQGAP1在HCC组织中表达的相关分

■相关报道

Wu等应用Western blotting技术对胃癌的研究发现,胃癌组织中的RhoC与IQGAP1蛋白水平明显升高,且两者呈正相关。

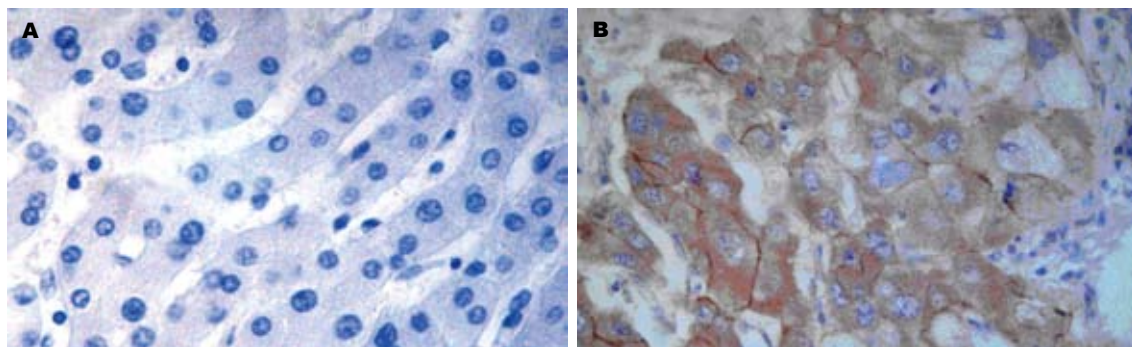


图 2 IQGAP1蛋白的表达(SP×400). A: 正常组织阴性; B: 肝癌组织强阳性.

■创新盘点

本试验应用免疫组织化学法联合检测RhoC与IQGAP1蛋白在HCC及正常肝组织中的表达,从而在蛋白水平上探讨两者与HCC各项临床病理参数之间的关系,为RhoC与IQGAP1作为判断HCC生物学行为的重要参考指标提供理论依据.

表 1 肝癌组织中RhoC、IQGAP1与临床病理参数的相关性

因素	n	RhoC蛋白表达					IQGAP1蛋白表达				
		-	+	++	阳性率(%)	P值	-	+	++	阳性率(%)	P值
性别											
男	48	17	18	13	64.6	0.285	14	18	16	70.8	0.134
女	8	2	2	4	75.0		0	4	4	100.0	
年龄(岁)											
<50	18	5	8	5	72.2	0.809	5	7	6	72.2	0.736
≥50	38	14	12	12	63.2		9	15	14	76.3	
分化程度											
高、中	36	18	11	7	50.0	0.001	13	14	9	63.9	0.005
低	20	1	9	10	95.0		1	8	11	95.0	
肿瘤大小(cm)											
≥5	22	9	6	7	59.1	0.669	7	8	7	68.2	0.421
<5	34	10	14	10	70.6		7	14	13	79.4	
TNM分级											
I-II	17	11	4	2	35.3	0.002	9	6	2	47.1	0.001
III-IV	39	8	16	15	79.5		5	16	18	87.2	
脉浸润											
有	14	1	6	7	92.9	0.013	0	5	9	100.0	0.003
无	42	18	14	10	57.1		14	17	11	66.7	

表 2 RhoC与IQGAP1在HCC组织中表达的相关性

IQGAP1	RhoC		合计	χ ² 值	P值
	(-)	(+)-(++)			
(-)	12	2	14		
(+)-(++)	7	35	42		
合计	19	37	56	0.631	0.000

性析 RhoC与IQGAP1在HCC组织中表达呈正相关($r = 0.631, P < 0.05$, 表2).

3 讨论

Ras同源基因(Rho)亚家族蛋白是一类与Ras同源的小GTP结合蛋白, 包括Rho(RhoA, RhoB, RhoC), Rac, Cdc42等家族成员, 它循环于活性

GTP结合型与失活性GDP结合型之间, 作为分子开关控制细胞信号转导途径, 产生多种生物学效应^[8-10]. RhoC是Rho信号转导通路的重要分子, 通过破坏细胞极性、使细胞丧失黏附连接、提高细胞运动能力及重塑细胞外基质能力、增加血管生长因子以促进肿瘤血管形成和增加肿瘤细胞进入血液的可能性, 使肿瘤细胞具有浸润、转移的能力^[11]. 本研究显示, RhoC在HCC组中的表达较正常组明显增高, 其表达水平与HCC组织的分化程度、TNM分级水平、血管的浸润密切相关, 这与Wang等^[12]的研究结果相一致. 提示RhoC过表达在HCC的侵袭转移过程中起着重要的促进作用. 我们由此推测RhoC高表达提示高转移、差预后, 其表达水平也许能为我们提供一个判断预后的标志.

■应用要点

本实验通过研究RhoC与IQGAP1蛋白在HCC中的表达及二者的相关性, 发现二者共同在HCC的发生、发展及转移中起了重要的促进作用. 联合监测两种蛋白的表达, 对HCC的诊断及预后判断具有重要的意义, 为HCC的防治提供新的思路和理论依据.

■同行评价

本文选题恰当, 有一定的新意, 具有较好的学术价值。

IQGAP1是一个分子量为189 kDa的细胞骨架结合蛋白, 含有类似于Ras-GAPs的催化域和4个可与钙调蛋白相互作用的IQ模体, IQGAP1的上述结构可与多种蛋白结合, 通过接收和发射各种信号调节细胞迁移、细胞间黏附、细胞极性、增殖等各种细胞功能, 促进细胞的增殖及迁移^[13-16]。据报道, IQGAP1可直接与E-cadherin结合, 下调E-cadherin, 降低细胞间的黏附力^[16,17]。在早期的研究中发现IQGAP1具有调节细胞骨架结构从而提高细胞运动能力的功能^[18], 在细胞黏附和迁移的信号网络中发挥关键作用。IQGAP1还能够通过调节有丝分裂原激活蛋白激酶途径, 可以影响细胞增殖和分化^[19]。降低细胞间黏附力、增强细胞活动性, 促进增殖, 减少分化这些特征是恶性肿瘤复发转移的关键因素。本研究显示, IQGAP1蛋白在HCC组织中过表达, 且在低分化组中的表达显著高于高、中分化组, 表明IQGAP1与HCC的分化程度有关, 分化越低, 表达越高。此外, 在门脉浸润组表达的阳性率明显高于无门脉浸润组, 表明IQGAP1可能对HCC的浸润转移起促进作用。这与上面提到的IQGAP1的调节功能相一致, 支持IQGAP1是致癌基因的观点。

IQGAP1是Rho家族GTPases中Rac和Cdc42下游调控因子^[20,21], Rac/Cdc42与IQGAP1相互作用, 使后者与E-cadherin黏附复合体相互作用, 进而破坏细胞骨架与E-cadherin黏附复合体的连接, 从而利于肿瘤的侵入和转移^[22]。本研究显示, RhoC与IQGAP1在HCC组织中的表达呈正相关, 且随着TNM分期及门脉浸润的增加, 两者的表达均升高, 提示RhoC和IQGAP1共同参与HCC的发生及浸润、转移等生物学行为。RhoC和IQGAP1相互作用的机制目前尚不清楚, 有待进一步研究。Wu等^[23]报道, 通过siRNA抑制IQGAP1的表达可以阻碍激活的RhoC的转移作用, 而抑制RhoC的表达对激活的IQGAP1的转移作用无任何影响, 这为寻找可能的抑癌靶点带来了启示, 可能为HCC的治疗提供一种新的治疗策略。

RhoC与IQGAP1在HCC组织中的表达均明显高于正常组织, 且与HCC的浸润转移密切相关, 提示RhoC与IQGAP1高表达的HCC具有更强的侵袭能力, 两者可以作为评估HCC发生及浸润转移的有效指标。联合检测两者对HCC的诊断及预后判断具有重要的意义。另外, 本研究未能统计患者生存期, 无法比较其与临床病理因素的关系, 是本研究的不足之处, 还需进一步研究。

志谢: 感谢李惠详、宁寒冰及刘蔚在本试验中给予的大力帮助。

4 参考文献

- 1 Blockade of Rho/Rho-associated coiled coil-forming kinase signaling can prevent progression of hepatocellular carcinoma in matrix metalloproteinase-dependent manner. *Hepatol Res* 2008; 38: 810-817
- 2 Zhou J, Zhu Y, Zhang G, Liu N, Sun L, Liu M, Qiu M, Luo D, Tang Q, Liao Z, Zheng Y, Bi F. A distinct role of RhoB in gastric cancer suppression. *Int J Cancer* 2011; 128: 1057-1068
- 3 Wang H, Zhao G, Liu X, Sui A, Yang K, Yao R, Wang Z, Shi Q. Silencing of RhoA and RhoC expression by RNA interference suppresses human colorectal carcinoma growth in vivo. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 123
- 4 White CD, Khurana H, Gnatenko DV, Li Z, Odze RD, Sacks DB, Schmidt VA. IQGAP1 and IQGAP2 are reciprocally altered in hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterol* 2010; 10: 125
- 5 Morris LE, Bloom GS, Frierson HF, Powell SM. Nucleotide variants within the IQGAP1 gene in diffuse-type gastric cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 42: 280-286
- 6 Hayashi H, Nabeshima K, Aoki M, Hamasaki M, Enatsu S, Yamauchi Y, Yamashita Y, Iwasaki H. Overexpression of IQGAP1 in advanced colorectal cancer correlates with poor prognosis-critical role in tumor invasion. *Int J Cancer* 2010; 126: 2563-2574
- 7 Osman M. An emerging role for IQGAP1 in regulating protein traffic. *ScientificWorldJournal* 2010; 10: 944-953
- 8 The role of RhoC in the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. *Med Oncol* 2011 Jun 15. [Epub ahead of print]
- 9 Wang W, Wu F, Fang F, Tao Y, Yang L. Inhibition of invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells via targeting RhoC in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6804-6812
- 10 Clinical significance of Rho GDP dissociation inhibitor 2 in colorectal carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2011 Jun 24. [Epub ahead of print]
- 11 Wang W, Wu F, Fang F, Tao Y, Yang L. RhoC is essential for angiogenesis induced by hepatocellular carcinoma cells via regulation of endothelial cell organization. *Cancer Sci* 2008; 99: 2012-2018
- 12 Wang W, Yang LY, Yang ZL, Huang GW, Lu WQ. Expression and significance of RhoC gene in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1950-1953
- 13 Kim H, White CD, Sacks DB. IQGAP1 in microbial pathogenesis: Targeting the actin cytoskeleton. *FEBS Lett* 2011; 585: 723-729
- 14 Johnson M, Sharma M, Henderson BR. IQGAP1 regulation and roles in cancer. *Cell Signal* 2009; 21: 1471-1478
- 15 Nakhaei-Nejad M, Zhang QX, Murray AG. Endothelial IQGAP1 regulates efficient lymphocyte transendothelial migration. *Eur J Immunol* 2010; 40: 204-213
- 16 Noritake J, Watanabe T, Sato K, Wang S, Kaibuchi K. IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *J Cell Sci* 2005; 118: 2085-2092

- 17 White CD, Brown MD, Sacks DB. IQGAPs in cancer: a family of scaffold proteins underlying tumorigenesis. *FEBS Lett* 2009; 583: 1817-1824
- 18 Mataraza JM, Li Z, Jeong HW, Brown MD, Sacks DB. Multiple proteins mediate IQGAP1-stimulated cell migration. *Cell Signal* 2007; 19: 1857-1865
- 19 Brown MD, Sacks DB. IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP. *Trends Cell Biol* 2006; 16: 242-249
- 20 Wang JB, Sonn R, Tekletsadik YK, Samorodnitsky D, Osman MA. IQGAP1 regulates cell proliferation through a novel CDC42-mTOR pathway. *J Cell Sci* 2009; 122: 2024-2033
- 21 Bielak-Zmijewska A, Kolano A, Szczepanska K, Maleszewski M, Borsuk E. Cdc42 protein acts upstream of IQGAP1 and regulates cytokinesis in mouse oocytes and embryos. *Dev Biol* 2008; 322: 21-32
- 22 Hage B, Meinel K, Baum I, Giehl K, Menke A. Rac1 activation inhibits E-cadherin-mediated adherens junctions via binding to IQGAP1 in pancreatic carcinoma cells. *Cell Commun Signal* 2009; 7: 23
- 23 Wu Y, Chen YC, Sang JR, Xu WR. RhoC protein stimulates migration of gastric cancer cells through interaction with scaffold protein IQGAP1. *Mol Med Report* 2011; 4: 697-703

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则¹ $P<0.05$, ² $P<0.01$; 第3套为³ $P<0.05$, ⁴ $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t=4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴。(5)致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。