

网络出版时间: 2017-5-22 17:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170522.1745.033.html>

◇ 经验与体会 ◇

RASAL2 在乳腺癌中的表达及临床意义

穆 婧, 汤 铜, 钱 波, 郑 璐, 童婷婷

摘要 应用免疫组织化学法检测 60 例乳腺癌组织及其癌旁组织中大鼠肉瘤蛋白活化因子 2 (RASAL2) 的表达情况, 分析 RASAL2 与乳腺癌临床发展及病理特征的相关性。结果显示 RASAL2 在乳腺癌组织中的表达明显低于癌旁组织, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 25.145, P < 0.001$)。RASAL2 在 Luminal B 型乳腺癌中的表达明显低于 Non-Luminal B 型, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.319, P = 0.038$)。且 RASAL2 的表达与雌激素受体、孕激素受体、淋巴结转移、TNM 分期和有无脉管侵犯有关 ($P < 0.05$)。RASAL2 在乳腺癌中低表达, 且与乳腺癌的发展和侵袭转移有关。

关键词 乳腺癌; RASAL2; 免疫组化

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)07-1085-03

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.033

乳腺癌是世界范围内女性最常见的恶性肿瘤^[1], 对乳腺癌发生发展中相关基因异常的探索, 已逐渐成为乳腺癌防治的研究热点。大鼠肉瘤蛋白活化因子 2 (ras protein activator like 2, RASAL2) 是一种 RasGTP 酶活性蛋白 (RasGAP), 由 RASAL2 基因编码, 定位于人染色体 1q25。近年的研究^[2]显示 RASAL2 具有潜在的肿瘤抑制作用, 与多种恶性肿瘤的转移与预后密切相关, 如卵巢癌、肺癌、星形细胞瘤等^[3-6]。而关于 RASAL2 在乳腺癌中的表达情况及其与临床病理资料的相关性, 目前国内外研究较少。该研究通过检测 RASAL2 在乳腺癌组织及癌旁组织中的表达情况, 分析其与乳腺癌临床病理资料的相关性, 初步探讨 RASAL2 与乳腺癌发生、发展的关系, 旨在为乳腺癌的诊断、治疗和预后判断等提供新的指标。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集安徽医科大学第二附属医院 2014 年 1 月~2016 年 1 月经手术切除的 60 例乳腺癌组织及癌旁组织 (距肿瘤 > 20 mm)。均为女性, 年龄 36~76 岁, 中位年龄 50 岁, 均病理诊断明确, 临床病理资料完整。术前均未接受过放疗、化疗及其他生物治疗, 无脏器转移及其他恶性肿瘤史。

1.2 临床病理资料 收集乳腺癌患者年龄、肿块大小、淋巴结转移情况、TNM 分期、组织学分级、雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER2)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR)、细胞增殖核抗原 (nuclear-associated antigen, Ki-67) 表达情况、脉管有无侵犯 10 个方面的临床病理资料。各临床资料的具体分组见表 1。

1.3 主要试剂 兔抗人 RASAL2 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司; 免疫组化试剂盒、浓缩型 DAB 显色试剂盒、PBS 缓冲液均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.4 免疫组织化学染色 标本经 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 按 4 μm 厚度切片。切片 60 $^{\circ}\text{C}$ 温箱烘烤 2 h, 脱蜡水化, 进行抗原修复; PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, 3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶活性 15 min; PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, 加正常山羊血清工作液室温封闭 15 min; 加 RASAL2 一抗 (1 : 150) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; PBS 冲洗 3 次, 每次 2 min, 二抗室温孵育 15 min; PBS 冲洗 3 次, 每次 2 min, DAB 显色; 苏木精复染, 脱水, 透明, 封片, 显微镜下观察。

1.5 结果判定 RASAL2 主要定位于胞质, 胞质出现棕黄色或棕褐色为着色细胞。高倍镜下随机观察 5 个视野, 每个视野计数 100 个细胞。着色面积百分比: 无着色为 0 分, 1%~25% 着色为 1 分, 26%~50% 着色为 2 分, 51%~75% 着色为 3 分, >75% 着色为 4 分。细胞着色强度: 无着色为 0 分, 浅着色为 1 分, 中等着色为 2 分, 强着色为 3 分。上述两项的乘积为最后得分 (即 0~12 分) 0~4 分为低表达样本,

2017-03-06 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1308085QH152); 安徽医科大学校科研基金联合资助项目 (编号: 2015xkj111)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院普外科, 合肥 230601

作者简介: 穆 婧, 女, 硕士研究生;

汤 铜, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:

tt20164@126.com

5~12 分为高表达样本。结果由两位病理科医师以盲法观察确定。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件进行分析, 采用 χ^2 检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RASAL2 在乳腺癌组织及癌旁组织中的表达情况 免疫组织化学染色结果显示: RASAL2 主要在胞质中表达, 乳腺癌组织中的高表达率为 36.67% (22/60), 癌旁组织中的高表达率为 81.67% (49/60), 癌组织明显低于癌旁组织, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 25.145, P < 0.001$) , 见图 1。

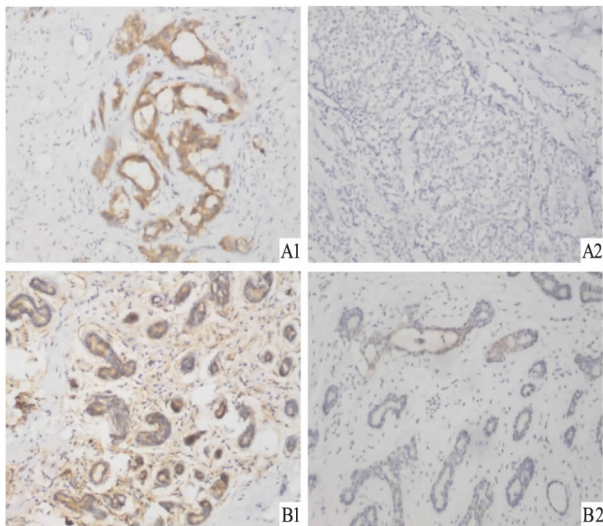


图 1 RASAL2 在乳腺癌及癌旁组织中的表达 Elivision 染色×100
A: 癌组织; B: 癌旁组织; 1: 高表达; 2: 低表达

2.2 RASAL2 表达与乳腺癌临床病理特征的关系

RASAL2 表达与患者年龄、肿瘤大小、组织学分级、HER-2、Ki-67 表达无明显相关性 ($P > 0.05$) , 但与 ER、PR、淋巴结转移、TNM 分期和有无脉管侵犯有关 ($P < 0.05$) , 见表 1。

2.3 RASAL2 在乳腺癌各分子亚型中的表达情况

RASAL2 在 Luminal A 型中高表达率为 31.25% (5/16) , Luminal B 型为 19.05% (4/21) , HER-2 过表达型为 50% (4/8) , 三阴型为 60% (9/15) , 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 7.139, P = 0.068$) 。 Luminal B 型中高表达率为 19.05% (4/21) , Non-Luminal B 型为 46.15% (18/39) , Luminal B 型明显低于 Non-Luminal B 型, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.319, P = 0.038$) 。

表 1 RASAL2 在乳腺癌组织中的表达水平与临床病理特征的关系 (n)

临床资料	n	RASAL2 表达		χ^2 值	P 值
		高	低		
年龄 (岁)					
≤45	17	8	9	1.103	0.294
>45	43	14	29		
肿瘤大小 (mm)					
≤20	14	6	8	0.301	0.583
>20	46	16	30		
淋巴结转移					
有	35	7	28	10.048	0.002
无	25	15	10		
TNM 分期					
I + II	37	19	18	8.963	0.003
III + IV	23	3	20		
组织学分级					
I + II	44	14	30	1.670	0.196
III	16	8	8		
ER					
阳性	36	9	27	5.275	0.022
阴性	24	13	11		
PR					
阳性	37	9	28	6.332	0.012
阴性	23	13	10		
HER-2					
阳性	12	5	7	0.161	0.688
阴性	48	17	31		
Ki-67					
高表达 (>14%)	42	15	27	0.055	0.815
低表达 (≤14%)	18	7	11		
脉管侵犯					
有	8	6	2	5.841	0.016
无	52	16	36		

3 讨论

Ras 通路是被研究最多的通路之一, 在多种恶性肿瘤的发生发展中起重要作用^[7]。通路上、下游调节因子, 鸟嘌呤核苷酸交换因子与 GTPase 活化蛋白 (GTPase activating proteins, GAPs) 共同调节 Ras 通路的“开”与“关”^[8-9]。RasGAPs 负调控 Ras 通路, 促进 Ras-GTP 水解, 使 Ras 活化蛋白失活, “关闭”Ras 通路, RasGAPs 的表达下调或缺失可造成 Ras 通路持续活化, 进而可影响肿瘤的发生发展及侵袭转移^[10-11]。RASAL2 是一种 RasGAPs, 被认为具有潜在抑癌作用^[2], 且 RASAL2 的表达下调与肿瘤的侵袭转移密切相关。

RASAL2 作为抑癌基因, 广泛参与卵巢癌、肺癌、星形细胞瘤等多种肿瘤的发生发展^[3-6]。目前 RASAL2 在乳腺癌中的表达情况及其与临床病理资料的相关性, 国内外研究较少。本研究结果显示, RASAL2 在乳腺癌中的表达明显低于癌旁组织, 同

时还显示 RASAL2 的表达与 ER、PR、淋巴结转移、TNM 分期和有无脉管侵犯有关,提示 RASAL2 可能与乳腺癌的侵袭转移有关。侵袭转移是乳腺癌患者预后的重要影响因素,因此推测 RASAL2 可作为乳腺癌不良预后评估的指标。研究^[12-13]显示,超过 50% 的乳腺癌中存在 Ras-ERK 通路高度活化,推测其可能与 RASAL2 表达下调有关,且 RASAL2 可能参与了乳腺癌的恶性转化。McLaughlin et al^[2]发现, RASAL2 在原发性乳腺癌中低表达, RASAL2 的表达下调可促进肿瘤的侵袭转移,其原因可能与 RASAL2 启动子区的高度甲基化相关。本研究结果还显示,乳腺癌 4 种分子亚型中, RASAL2 在 Luminal B 型乳腺癌中表达率最低,显著低于 Non-Luminal B 型。提示 RASAL2 的表达水平及作用可能与乳腺癌分子亚型相关。Feng et al^[14]研究发现 RASAL2 在三阴性乳腺癌中表达上调,其通过下调 miR-203 表达,激活 RAC1 来促进乳腺癌的侵袭和转移。这与本研究结果不一致,可能与样本量偏小有关。

综上所述, RASAL2 在乳腺癌中表达下调,并与乳腺癌的侵袭转移相关,是乳腺癌发展过程中一个重要的调节因子。相关的研究有望为乳腺癌的诊断、治疗及预后评估提供一定的指导价值。但 RASAL2 在乳腺癌各分子亚型中的具体作用及其机制尚不明确,仍有待进一步研究及证实。

参考文献

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] McLaughlin S K, Olsen S N, Dake B, et al. The RasGAP gene, RASAL2, is a tumor and metastasis suppressor [J]. *Cancer Cell*,

- 2013, 24(3): 365-78.
- [3] Huang Y, Zhao M, Xu H, et al. RASAL2 down-regulation in ovarian cancer promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(16): 6734-45.
- [4] Weeks A, Okolowsky N, Golbourn B, et al. ECT2 and RASAL2 mediate mesenchymal-amoeboid transition in human astrocytoma cells [J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(2): 662-74.
- [5] Li N, Li S. RASAL2 promotes lung cancer metastasis through epithelial-mesenchymal transition [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 455(3-4): 358-62.
- [6] Wang Z, Wang J, Su Y, et al. RASAL2 inhibited the proliferation and metastasis capability of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(10): 18765-71.
- [7] Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(11): 761-74.
- [8] Bos J L, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins [J]. *Cell*, 2007, 129(5): 865-77.
- [9] Vigil D, Cherfils J, Rossman K L, et al. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(12): 842-57.
- [10] Bernardis A. GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1603(2): 47-82.
- [11] Maertens O, Cichowski K. An expanding role for RAS GTPase activating proteins (RAS GAPs) in cancer [J]. *Adv Biol Regul*, 2014, 55: 1-14.
- [12] von Lintig F C, Dreilinger A D, Varki N M, et al. Ras activation in human breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2000, 62(1): 51-62.
- [13] Mueller H, Flury N, Eppenberger-Castori S, et al. Potential prognostic value of mitogen-activated protein kinase activity for disease-free survival of primary breast cancer patients [J]. *Int J Cancer*, 2000, 89(4): 384-8.
- [14] Feng M, Bao Y, Li Z, et al. RASAL2 activates RAC1 to promote triple-negative breast cancer progression [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(12): 5291-304.

Expression of RASAL2 in breast cancer and its clinical significance

Mu Jing, Tang Tong, Qian Bo, et al

(Dept of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract The expression of Ras protein activator like 2 (RASAL2) was detected by immunohistochemistry in 60 samples of breast cancer tissues and adjacent paracancerous tissues. The correlation between RASAL2 expression and clinicopathological characteristics was analyzed. The present data showed that the expression of RASAL2 in breast cancer tissue was significantly lower than that in adjacent paracancerous tissue ($\chi^2 = 25.145, P < 0.001$). The expression of RASAL2 in Luminal B breast cancer was significantly lower than that in Non-Luminal B breast cancer ($\chi^2 = 4.319, P = 0.038$). The expression level of RASAL2 was correlated with ER, PR expression, lymph node metastasis, TNM stage and vascular invasion ($P < 0.05$). The expression of RASAL2 is obviously decreased in breast cancer tissue than in adjacent paracancerous tissue, and its low expression is correlated with the development and metastasis of breast cancer.

Key words breast cancer; RASAL2; immunohistochemistry