

RCAS1 蛋白在肾透明细胞癌中的表达及其与临床病理特征的关系

张 涛¹, 欧阳新平², 何平平³, 陈 敏⁴, 雷建军², 吕运成², 王 波¹, 罗志刚¹

(1. 南华大学附属第二医院泌尿外科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学医学院生理学教研室;
3. 南华大学护理学院; 4. 衡阳市中心血站)

摘要: **目的** 探讨表达于 SiSo 细胞系上的受体结合癌抗原(RCAS1)在肾透明细胞癌(RCC)中的表达及临床意义。**方法** 应用免疫组织化学法检测 RCAS1 在 62 例 RCC 组织及 14 例癌旁肾组织中的表达, 用 Western blot 分别检测了 3 例肾透明细胞癌和 3 例癌旁肾组织中 RCAS1 的蛋白表达, 并分析了 RCAS1 蛋白的表达与临床病理特征的关系。**结果** 免疫组织化学检查 RCC 组织中 RCAS1 表达率为 79.0% (49/62), 与癌旁组织表达率 14.3% (2/14) 比较, 差异有显著性 ($P < 0.01$)。RCAS1 在 RCC 的表达随着病理分级降低而增高 ($P < 0.05$), 与 RCC 的病理分化程度呈负相关 ($P < 0.01$), 与 RCC 的临床分期呈正相关 ($P < 0.01$)。Western blot 检测 RCAS1 蛋白结果显示, RCC 组织中的 RCAS1 表达明显高于癌旁组织 ($P < 0.01$)。**结论** RCAS1 在 RCC 中高表达, 且与其病理分级、临床分期相关, 检测 RCAS1 的表达有助于对 RCC 的病理分级、临床分期和预后的判断。

关键词: RCAS1; 肾透明细胞癌; 癌旁肾组织; Western blot; 定量 PCR

中图分类号: R-332; R322.61

文献标识码: A

Relationship Between Expression of RCAS1 and Clinical Pathological Features in Renal Cell Carcinoma

ZHANG Tao, OUYANG Xinping, HE Pingping, et al

(Department of Urology, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1) in renal cell carcinoma (RCC) and to study their significance in the progression and prognosis of the RCC. **Methods** Expression of RCAS1 was detected by immunohistochemistry technique in 62 cases of RCC and 14 cases of pare-cancerous renal tissue. The expression of RCAS1 was also investigated by western blot in 6 cases with renal tissues (3 cases of RCC and 3 cases of pare-cancerous tissue). The relationship between expression of RCAS1 and clinical pathological features was analyzed. **Results** The ratio of RCAS1 protein expression was increased in RCC tissues (79.0%) compared with pare-cancerous tissue (14.3%, $P < 0.01$) using streptavidin-biotin pemxidase (S-P) method. Within the specimens of RCC group, the differences were statistically significant among WHO pathological grade and clinical stage ($P < 0.05$). There was a negative correlation between the RCAS1 expression and pathological grades ($P < 0.01$), however, there was a positive correlation between the expression of RCAS1 and clinical grades ($P < 0.01$). The expression of RCAS1 in RCC tissues assessed by Western blot was high than pare - cancerous tissues ($P < 0.01$). **Conclusion** High expression of RCAS1 in RCC tissues was related to the tumor clinical stage and tumor pathological grade. Detection of RCAS1 expression in RCC was useful to study the pathological grade, clinical stage and prognosis.

收稿日期: 2012-11-06

基金项目: 衡阳市科学技术发展计划(2011KJ49).

作者简介: 张涛, 硕士, 主治医师, 研究方向: 泌尿系肿瘤, E-mail: 17490587@qq.com. 通讯作者罗志刚, 博士, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 泌尿系肿瘤, E-mail: luo6398@sina.com.

Key words: renal cell carcinoma; RCAS1; immunohistochemistry; real time PCR; Western blot

肾透明细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是泌尿系统最主要的肿瘤之一,在发达国家也是十大恶性肿瘤之一。患有进展期 RCC 的病人预后差,五年存活率低于 5%^[1-3]。目前,转移性 RCC 的治疗面临着巨大的挑战,因此 RCC 的早诊断和早治疗是临床上急需解决的难题。

表达于 SiSo 细胞系上的受体结合癌抗原(receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells, RCAS1)是 1996 年 Sonoda 等^[4]发现的一种肿瘤相关抗原。RCAS1 具体的生理功能目前尚不清楚。近来,研究者们发现在子宫颈癌、肺癌、胃癌、乳腺癌、卵巢癌、肝细胞癌和前列腺癌等中均发现有 RCAS1 表达,且可能与某些肿瘤的转移浸润相关^[5-6]。在前列腺癌中,RCAS1 表达与进展期病理分级和高 Gleason 评分密切相关,这些结果提示 RCAS1 表达可能与恶性肿瘤的进展有关^[7]。本文主要研究了肾透明细胞癌组织和癌旁肾组织中 RCAS1 的表达情况,以探讨 RCAS1 表达与肾透明细胞癌的病理分级和临床分期的相关性,为肾透明细胞癌的早期诊断和早期治疗寻找新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

羊抗人 RCAS1 多克隆抗体(Cell Signaling Technology Inc)、DAB 显色剂和免疫组化染色 SP 试剂盒(武汉博士德生物有限公司)、其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 肾癌及癌旁组织 HE 染色 取手术中切除的肾癌及癌旁组织块,10% 中性甲醛固定后,常规石蜡包埋,4 μm 切片。切片脱蜡后蒸馏水洗 2 min,苏木素进行染色 3~5 min,自来水冲洗 3~5 min。1% 盐酸酒精分色,伊红染色 3~5 min,蒸馏水进行冲洗 2~5 min。酒精脱水、透明、封片后在显微镜下进行观察和摄片。切片均经有经验的病理学专家证实为肾透明细胞癌 62 例及癌旁组织 14 例。

1.2.2 免疫组织化学染色法检测肾透明细胞癌组织中 RCAS1 蛋白的表达 石蜡切片进行脱蜡及水化后,PBS(pH=7.4)清洗 3~4 次。新鲜的柠檬酸缓冲液(pH=6)加热至沸腾修复抗原,冷却后用自来水冲洗切片两次,在用 PBS(pH=7.4)冲洗 2~3 次。内源

性过氧化物酶阻断剂室温下孵育 10~15 min 阻断内源性过氧化物酶的活性,再用非免疫性动物血清室温下封闭 10~15 min。每张切片加 50~100 μL 一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS 冲洗 3~4 次后每张切片加 50~100 μL 生物素标记的二抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30~45 min。PBS 冲洗 3~4 次后滴加 50~100 μL 链酶菌抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30~45 min。PBS 冲洗 3~4 次后滴加 100~200 μL DAB 工作液,光镜下边观察边显色 5~10 min。自来水冲洗,苏木素复染,1% 盐酸分化,自来水冲洗返蓝,梯度酒精脱水,透明,中性树胶封片。观察摄像^[8]。

1.2.3 Western 印迹检测 RCAS1 蛋白的表达 先使用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预先冷却的 PBS 液清洗细胞 3 次,加入 50 μL 含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解缓冲液,置于冰上 15 min,刮下细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\times g$ 进行离心 15 min,取上清,BCA 法检测蛋白质浓度水平。各个组分别取 60 μg 的蛋白质,与蛋白质分子量的标准品同时进行 SDS-PAGE 电泳,聚丙烯酰胺积层胶的浓度为 5%,RCAS1 分离胶的浓度为 8%。将蛋白质移到 PVDF 膜,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 使用 5% 脱脂奶粉进行封闭 2 h,加入羊抗人 RCAS1 抗体(1:400)孵育过夜,洗膜后使用辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000)进行,4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 6 h,TBST 缓冲液洗膜 3 次。蛋白印迹荧光检测试剂盒显示于 X 光片,显影和定影后,凝胶图像分析系统对胶片进行扫描和半定量分析。实验重复 3 次。

1.3 结果的判断与分级

RCAS1 蛋白表达均以细胞核上棕黄色颗粒为表达阳性。在高倍镜下选择 10 个有代表性视野计数 100 个肿瘤细胞,由两位经验丰富的病理医师观察评定:未见阳性细胞为 0 级,阳性细胞数 >25% 为 1 级,阳性细胞数 25%~50% 之间为 2 级,阳性细胞数 >50% 为 3 级。

1.4 统计学分析

数据结果使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 SPSS12.0 软件处理实验数据,采用单因素方差分析进行多组间分析。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 免疫组织化学法检测肾透明细胞癌组织中的 RCAS1 表达

各组肾组织的免疫组织化学结果(图 1、表 1),

在所有的肾透明细胞癌病例中 RCAS1 的表达率为 79.0% (49/62), 癌旁肾组织 (14 例) 中仅 2 例呈弱阳性表达, 表达率为 14.3% (2/14), 两者之间差异有显著性($\chi^2 = 21.69, P = 0.0048$)。

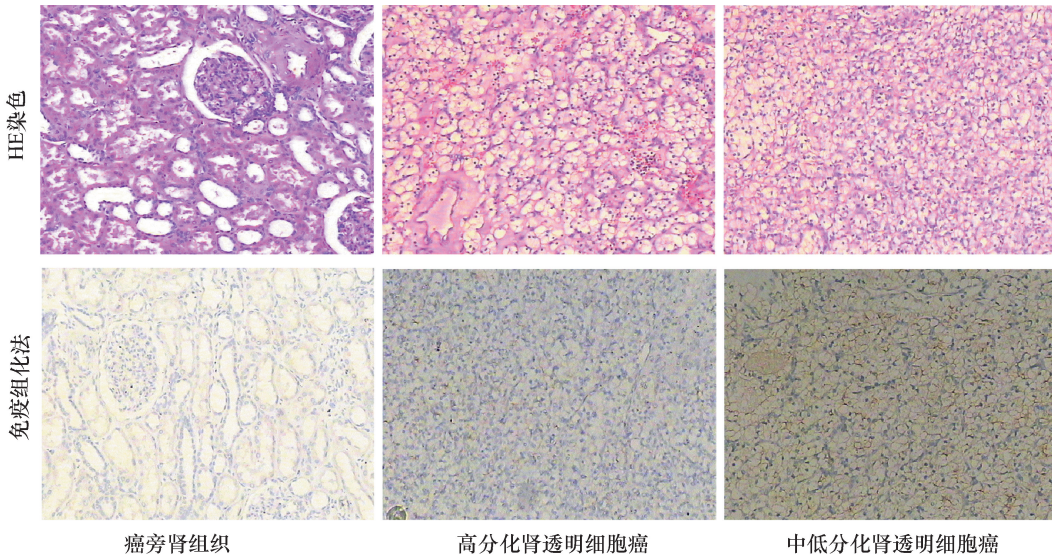


图 1 肾透明细胞癌 HE 染色 (×200) 和免疫组化法 (×200) 检测 RCAS1 表达

2.2 Western blot 检测肾透明细胞癌肾组织中的 RCAS1 蛋白表达

采用 Western blot 方法检测了 3 例肾透明细胞癌肾组织和 3 例癌旁肾组织中 RCAS1 蛋白表达, 结果显示肾透明细胞癌组织中 RCAS1 的蛋白表达 (0.50 ± 0.04) 明显高于癌旁肾组织 (0.11 ± 0.02), 两组之间差异有显著性 ($P < 0.01$, 图 2)。

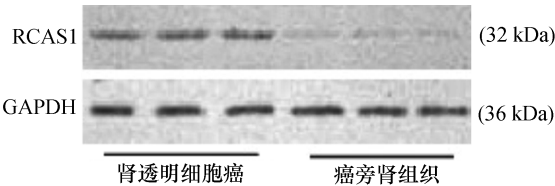


图 2 肾透明细胞癌和癌旁肾组织 RCAS1 蛋白表达

2.3 肾透明细胞癌病理分级与表达率的分析

在肾透明细胞癌肾组织中 RCAS1 的表达阳性率随肾透明细胞癌的分化程度的降低而上升 (表 2)。RCAS1 在高分化和中低分化的肾透明细胞癌阳性表达率分别为 62.1% 和 93.9%, χ^2 检验显示 RCAS1 表达在高分化组和中低分化组之间差异有

表 1 RCAS1 在肾透明细胞癌和癌旁肾组织中的表达

组别	n	阳性 (例)	阴性 (例)	阳性率 (%)
肾透明细胞癌	62	49	13	79.0
癌旁组织	14	2	12	14.3

显著性($\chi^2 = 33.23, P < 0.01$)。

表 2 RCAS1 表达强度与肾透明细胞癌病理分级的关系 (例)

病理分级	n	0	1	2	3
高分化	29	11	11	6	1
中低分化	33	2	2	9	20

2.4 肾透明细胞癌病理分级与表达强度的关系

表 2 所示在肾透明细胞癌肾组织中 RCAS1 表达强度随肾透明细胞癌的分化程度的降低而增高。Wilcoxon 秩和检验显示 RCAS1 表达强度在高分化和中低分化癌中差异有显著性 ($\mu = -5.04, P < 0.01$)。Spearman 相关分析示 RCAS1 的表达与病理分级呈负相关 ($r = -0.64, P < 0.01$)。

2.5 肾透明细胞癌临床分期与表达率的分析

从免疫组化结果显示, RCAS1 的表达率与肾透明细胞癌不同临床分期有关。RCAS1 在 III + IV 和 I + II 的阳性表达率分别为 91.7% 和 61.5%, χ^2 检验示 III + IV 期和 I + II 期表达率的差异有显著性 ($\chi^2 = 12.22, P < 0.01$)。Wilcoxon 秩和检验结果显示 RCAS1 表达强度在 III + IV 期和 I + II 期间差异

有显著性 ($\mu = -4.80, P < 0.05$)。采用 Spearman 相关分析结果显示在肾透明细胞癌中 RCAS1 表达与临床分期呈正相关 ($r = 0.57, P < 0.01$)。见表 3。

表 3 肾透明细胞癌临床分期与 RCAS1 表达强度的关系(例)

临床分期	n	0	1	2	3
I + II	26	10	9	5	2
III + IV	36	3	5	8	20

3 讨 论

RCAS1/EBAG9 是一个雌激素反应性基因,最先在人乳腺癌细胞的 cDNA 文库中克隆。研究^[9]表明雌激素孵育人乳腺癌细胞可诱导 RCAS1/EBAG9 的表达。Razvi 等^[10]发现 RCAS1/EBAG9 的表达率在子宫颈腺癌、子宫颈鳞状上皮细胞癌、子宫内膜腺癌和卵巢癌分别为 87%、87%、66% 和 58%,并且发现 RCAS1/EBAG9 的表达与肿瘤进展有关。Kubokawa 等^[11]发现有 98% 的胃癌表达 RCAS1/EBAG9,且 RCAS1 mRNA 水平在胃腺癌组织中的表达明显高于非癌组织。Leelawat 等^[12]发现在进展期结肠癌中 RCAS1/EBAG9 表达明显高于正常的结肠组织。这些结果提示 RCAS1/EBAG9 可能与肿瘤的进展、转移有关。上述研究也发现,RCAS1 在肿瘤细胞的胞膜和胞浆均有表达,而胞核表达少见。本研究结果表明 RCAS1/EBAG9 在肾透明细胞癌中主要表达于胞膜,胞浆表达很少而胞核未见表达。RCAS1/EBAG9 在癌旁肾组织中表达率低且表达微弱,而 RCAS1/EBAG9 在肾透明细胞癌中的表达率明显高于癌旁组织。Kubokawa 等发现虽然 RCAS1/EBAG9 在正常细胞中表达,但是其表达的模式与癌细胞明显不同,如 RCAS1 表达与正常胃黏膜细胞的核周,而在癌细胞中大多数表达于胞质和胞膜^[13]。因此,RCAS1/EBAG9 表达的亚细胞定位改变可能与肿瘤的发生发展有关。

本研究同时发现 RCAS1/EBAG9 表达率和表达强度均与肾透明细胞癌病理分级有关。随着肾透明细胞癌病理分化程度降低,RCAS1/EBAG9 表达率升高而表达强度增高,且肾透明细胞癌的病理分级与 RCAS1/EBAG9 表达呈负相关。RCAS1/EBAG9 表达与低细胞分化和高度进展等肿瘤的特性有关,

如宫颈腺癌、前列腺癌和肾细胞癌的侵袭性和预后与 RCAS1/EBAG9 表达密切相关^[14-16]。

本文作者进一步分析了 RCAS1/EBAG9 表达率和表达强度与肾透明细胞癌临床分期的关系,结果显示随着肾透明细胞癌临床分期的增高,RCAS1/EBAG9 表达率升高而表达强度增高。且肾透明细胞癌的临床分期与 RCAS1/EBAG9 表达呈正相关性。Nakahubo 等^[17]发现 RCRCAS1 高表达与食管鳞状上皮细胞癌患者其术后生存率有关,多因素分析显示 RCAS1 可能是一个预测食管鳞状上皮细胞癌的独立预后因素。本研究结果与文献报道相符,提示 RCAS1 可能作为肾透明细胞癌预后的一个判断指标。

本研究发现 RCAS1/EBAG9 在肾透明细胞癌中高表达,而在癌旁组织中不表达或弱表达,RCAS1/EBAG9 高表达与肾透明细胞癌的病理分级和临床分期有相关性。这些结果提示检测 RCAS1/EBAG9 的表达可能是评价肾透明细胞癌恶性程度和临床预后的一个重要辅助指标。

参考文献:

[1] Saini S,Majid S,Dahiya R. The complex roles of Wnt antagonists in RCC [J]. Nat Rev Urol,2011,8(12):690-699.

[2] Zhang ZL,Chen W,Li YH,et al. Stage T1N0M0 renal cell carcinoma;the prognosis in Asian patients [J]. Chin J Cancer,2011,30(11):772-778.

[3] 许韩峰,金炜,刘先东,等. 肾盂癌和肾细胞癌患者血、尿基质金属蛋白酶 9 值的比较[J]. 南华大学学报:医学版,2007,35(6):899-900.

[4] Sonoda K,Nakashima M,Kaku T,et al. A novel tumor-associated antigen expressed in human uterine and ovarian carcinomas [J]. Cancer,1996,77(8):1501-1509.

[5] Sonoda K,Miyamoto S,Kobayashi H,et al. The level of RCAS1 expression is inversely correlated with the number of vimentin-positive stromal cells in epithelial ovarian cancer [J]. Int J Gynecol Cancer,2009,19(5):838-843.

[6] Wicherek L,Basta P,Galazka K,et al. RCAS1 decidual immunoreactivity and RCAS1 serum level during cesarean section with respect to the progression of labor [J]. Am J Reprod Immunol,2008,59(2):152-158.

(下转第 139 页)

- [7] Takahashi S,Urano T,Tsuchiya F,et al. EBAG9/RCAS1 expression and its prognostic significance in prostatic cancer [J]. Int J Cancer,2003,106(3):310-315.
- [8] 周钰娟,廖前进,张秋菊,等. 金樱子对大鼠糖尿病肾脏的实验研究[J]. 南华大学学报:医学版,2007,35(3):332-335.
- [9] Ho CK,Nanda J,Chapman KE,et al. Oestrogen and benign prostatic hyperplasia:effects on stromal cell proliferation and local formation from androgen [J]. J Endocrinol,2008,197(3):483-491.
- [10] Razvi K,Sonoda K,Lee YS,et al. A preliminary study of the immunohistochemical detection of a novel tumour marker,22-1-1 antigen,in gynaecological cancer specimens [J]. Ann Acad Med Singapore,1999,28(3):392-394.
- [11] Kubokawa M,Nakashima M,Yao T,et al. Aberrant intracellular localization of RCAS1 is associated with tumor progression of gastric cancer [J]. Int J Oncol,2001,19(4):695-700.
- [12] Leelawat K,Watanabe T,Nakajima M,et al. Upregulation of tumour associated antigen RCAS1 is implicated in high stages of colorectal cancer [J]. J Clin Pathol,2003,56(10):764-768.
- [13] Sonoda K,Miyamoto S,Nakashima M,et al. The biological role of the unique molecule RCAS1:a bioactive marker that induces connective tissue remodeling and lymphocyte apoptosis [J]. Front Biosci,2008,13(1):1106-1116.
- [14] Wolf J,Reimer TA,Schuck S,et al. Role of EBAG9 protein in coat protein complex I-dependent glycoprotein maturation and secretion processes in tumor cells [J]. FASEB J,2010,24(10):4000-4019.
- [15] Sonoda K. Novel therapeutic strategies to target RCAS1, which induces apoptosis via ectodomain shedding [J]. Histol Histopathol,2011,26(11):1475-1486.
- [16] Tsujitani S,Saito H,Oka S,et al. Prognostic significance of RCAS1 expression in relation to the infiltration of dendritic cells and lymphocytes in patients with esophageal carcinoma [J]. Dig Dis Sci,2007,52(2):549-554.
- [17] Nakakubo Y,Hida Y.,Miyamoto M,et al. The prognostic significance of RCAS1 expression in squamous cell carcinoma of the oesophagus [J]. Cancer Lett,2002,177(1):101-105.

(此文编辑:蒋湘莲)