

Rab23 在皮肤鳞状细胞癌中的表达 *

刘博强 唐 利 简 强 薛 柯 王 雷 李承新[△]

(第四军医大学第一附属医院全军皮肤病研究所 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究 Rab23 在皮肤鳞状细胞癌(SCC)中的表达及意义。方法:用免疫组化 S-P 法分别检测 30 例皮肤 SCC、15 例正常皮肤组织标本中 Rab23 的表达。结果:Rab23 在皮肤 SCC 和正常皮肤中阳性率分别为 90%和 13.3%,二者差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:Rab23 在皮肤 SCC 中高表达可能在皮肤 SCC 的发生发展过程中发挥作用。

关键词 Rab23 鳞状细胞癌 表达 免疫组化

中图分类号 R739.5 文献标识码 A 文章编号:1673-6273(2011)13-2474-03

Expression and Significance of Rab23 in Squamous Cell Carcinoma of Skin*

LIU Bo-qiang, TANG Li, JIAN Qiang, XUE Ke, WANG Lei, LI Cheng-xin[△]

(PLA Institute of Dermatology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To study the expression and significance of Rab23 in skin squamous cell carcinoma. **Methods:** Immunohistochemical S-P method was used to examine the expression of Rab23 protein in 30 cases of skin SCC and 15 cases of normal skin. **Results:** The positive rate of Rab23 in skin SCC and normal skin were 90% and 13.3% respectively and there was a significant difference between them. ($P<0.05$). **Conclusion:** Rab23 is overexpressed in skin SCC and may be related with carcinogenesis and malignant progress of skin SCC.

Key words: Rab23; Skin; Squamous cell expression; Immunohistochemistry

Chinese Library Classification(CLC): R739.5 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)13-2474-03

Rab23 是小 GTP 酶超家族 Rab 家族成员,最早在 1994 年分离出编码 Rab23 的 cDNA,主要表达于脑组织,与 Rab3a 和 Rab15 表达位置相同^[1]。2001 年在小鼠开脑综合征(open brain syndrome)的研究中发现它是 Hedgehog(Hh)信号通路的负调控因子,对小鼠胚胎神经管背侧发育起重要作用^[2]。在成年小鼠的脑、乳腺、胃、精巢、卵巢等组织中也发现 Rab23 的表达,提示 Rab23 参与了成体组织器官功能的维持^[3]。Yang 等发现 Rab23 可调控骨祖细胞 ATDC5 向软骨的分化^[4]。Huang 等发现在小鼠局灶性节段性肾小球硬化(FSGS, focal segmental glomerulosclerosis)模型中发现 Rab23 可通过促进系膜细胞合成和分泌胶原,加重病情^[5]。近来研究发现 Rab23 与多种肿瘤关系密切,甲状腺癌滤泡状癌、甲状腺乳头状癌中 Rab23 的 mRNA 水平比良性甲状腺滤泡腺瘤降低^[6],而在人肝癌^[7]、侵袭性胃癌^[8]、肺癌^[9]、乳腺癌^[10]中发现 Rab23 异常高表达,相应正常组织不表达,提示 Rab23 在肿瘤的发生发展中起作用。

皮肤 SCC 是最常见的皮肤恶性肿瘤之一,其发病率逐年增高,而发病机制仍不清楚。研究发现皮肤 SCC 的 Hh 信号通路过度激活^[11], Rab23 是 Hh 信号通路的负调控因子,其在正常皮肤和皮肤 SCC 中的表达和功能国内外尚无研究。

1 材料与方法

1.1 材料

组织标本均来自第四军医大学第一附属医院全军皮肤病研究所 2000 年~2010 年病理确诊的手术患者。其中皮肤 SCC 30 例,年龄 41~85 岁(平均 66.7 岁),男 21 例,女 9 例,曝光部

位 25 例,非曝光部位 5 例,高分化 17 例,低分化 13 例;正常皮肤为皮内痣边缘皮肤 15 例,年龄 42~72 岁(平均 60.1),男 7 例,女 8 例,曝光部位 13 例,非曝光部位 2 例。Rab23 抗体购自美国 Proteintech 公司 60056-1-Ig 鼠抗人单克隆抗体,免疫组化试剂盒购自 DAKO 公司。

1.2 实验方法

S-P 法(链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法)检测 Rab23 蛋白的表达。组织标本石蜡切片脱蜡至水,新鲜配制 3% H_2O_2 -甲醇灭活内源性过氧化物酶,0.01mol/L 枸橼酸/枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0),高压锅煮沸 2min,自然冷却 20min 后再冷水冲洗快速冷却,滴加 1:1000 稀释后一抗,4℃过夜,滴加二抗,37℃反应 1h, DAB 显色,脱水、透明、封片。

1.3 结果判断

Rab23 的表达主要定位于胞浆,计数采用半定量方法,选择染色均匀的肿瘤区,400 倍视野下计数阳性细胞占视野细胞百分比,随机选取 5 个视野,求平均值。①按着色细胞占总数多少分 1~3 级, <25%为 1, 25%~49%为 2, >50%为 3;②按着色细胞强弱分级,无色为 0,浅黄色为 1,深黄色为 2,棕色为 3;③以上两项相加为表达强度,0 为阴性(-),1~2 为弱阳性(+),3~5 为阳性(++),>5 为强阳性(+++)。皮肤 SCC 按 Broders 病理分级,~ 级为高分化,~ 级为低分化。

1.4 统计学方法

采用卡方检验 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

* 基金项目 国家自然科学基金项目(30572099)

作者简介 刘博强(1983-)男,硕士,住院医师,研究方向 皮肤病与性病,电话:15102951229, E-mail: lbqlxy@163.com

△通讯作者 李承新 E-mail: lichengxinderm@yahoo.cn

(收稿日期 2011-03-06 接受日期 2011-03-31)

2.1 Rab23 在正常皮肤和皮肤 SCC 的表达

15 例正常皮肤表皮仅有 2 例弱阳性表达，其余均无表达 (图 1) ;30 例皮肤 SCC 有 27 例肿瘤组织阳性表达，均为胞浆阳性(图 2)。在皮肤 SCC 中阳性表达率明显高于正常皮肤($P<0.05$) ,详见表 1。

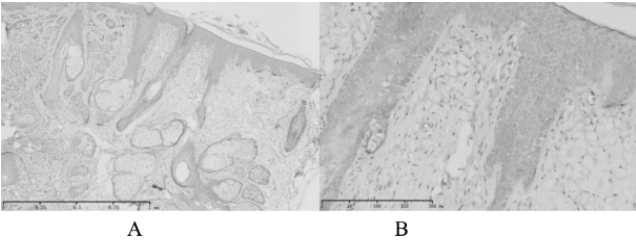


图 1 Rab23 在正常皮肤的表达
Figure1 Expression of Rab23 in normal skin
A: SPx10 ;B: SPx100

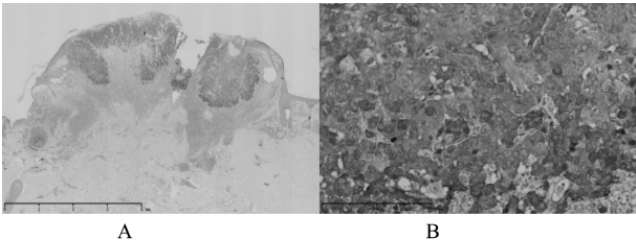


图 2 Rab23 在皮肤 SCC 的表达
Figure 2 Expression of Rab23 in skin SCC
A: SPx10 ;B: SPx100

2.2 皮肤 SCC 中 Rab23 的表达与临床病理特征的关系

Rab23 的表达在性别、年龄、部位及分化程度上的差异均无统计学意义(表 2 $P>0.05$)。

表 1 Rab23 在正常皮肤和皮肤 SCC 中的表达
Tab.1 The expression of Rab23 in nomal skin and skin SCC

Group(组)	n	Rab23			Positive rate (阳性率)	x ²	P
		(-)	(+)	(++~+++)			
Normal skin (正常皮肤)	15	13	2	0	13.30 %	25.65	<0.05
Skin SCC (皮肤 SCC)	30	3	2	25	90 %		

表 2 皮肤 SCC 中 Rab23 的表达与临床病理特征的关系
Tab.2 The relationship of Rab23 expression and clinical/pathological feature of skin

Group(组)	n	Rab23			Positive rate (阳性率)	x ²	P
		(-)	(+)	(++~+++)			
Sex(性别)							
Male(男)	21	2	0	19	90.50 %	0.017	>0.05
Female(女)	9	1	2	6	89 %		
Age(年龄)							
<60	9	1	1	7	88.90 %	0.17	>0.05
≥60	21	2	1	18	90.50 %		
Tumor location (肿瘤部位)							
Sun-Exposed (曝光部位)	25	2	2	21	92 %	0.667	>0.05
Sun-unexposed (非曝光部位)	5	1	0	4	80 %		
Differentiation (分化)							
High(高分化)	17	1	0	16	94.10 %	0.739	>0.05
Low(低分化)	13	2	2	9	84.60 %		

3 讨论

Rab 家族成员主要发挥囊泡转运的作用，结合 GDP 的 Rab 分子位于胞浆，结合了 GTP 的 Rab 分子可结合到囊泡膜上 ,募集马达分子 ,发挥转运囊泡的作用^[13]。Rab5 是目前研究比较清楚的参与囊泡转运的分子 ,Rab23 和 Rab5 在囊泡存在

共定位 ,提示 Rab23 参与了细胞内的囊泡转运^[12] ,但其转运何种物质及调控转运的机制仍不清楚。囊泡转运的异常可导致多种疾病包括恶性肿瘤 ,Rab 家族成员与多种肿瘤密切相关。Rab5 在胰腺癌中可通过囊泡转运调节 Notch 信号通路，促进胰腺癌细胞系的增殖^[15] ,Rab5a 是 Rab5 的 3 个同源基因之一 ,可促进肺癌的侵袭转移 ,并调节多个侵袭转移相关基因的表达^[16]。

Rab25 的高表达与卵巢癌的侵袭性相关^[17]。Rab23 在皮肤 SCC 中高表达,可能通过囊泡转运导致蛋白质的转运异常,参与皮肤正常角质形成细胞的恶性转化及皮肤 SCC 的侵袭和转移。

2001 年 Eggenschwiler 等用基因突变的方法,观察 Rab23 在小鼠脊髓神经管发育中的作用,发现 Rab23 和 Sonic Hedgehog (Shh)相拮抗,可抑制 Hh 信号通路^[2]。Hh 信号通路除了在胚胎发育中起重要作用,还与包括皮肤 SCC 在内的多种肿瘤的密切相关,其过度激活可促进皮肤鳞癌细胞系的增殖^[11]。Rab23 是 Hh 信号通路的负调控因子,其高表达理论上起抑制 Hh 信号通路进而抑制皮肤 SCC 进展的作用,Rab23 在皮肤 SCC 高表达可能是 Hh 信号通路的负反馈调节。

然而近来有研究发现,除了负调控 Hh 信号通路,Rab23 还存在其他作用机制。Liu 等发现 Rab23 在肝癌中的表达水平与癌组织大小正相关,干涉掉 Rab23 后肝癌细胞系的凋亡增加,增殖能力降低^[7]。Hh 信号通路在多种肿瘤中表现为促进癌细胞的增殖,Rab23 在肝癌中表现为促进肝癌细胞的增殖,与其负调控 Hh 信号通路的传统观点相矛盾。Jenkins 等的研究为 Rab23 不通过 Hh 信号通路起作用提供了更直接的证据,在斑马鱼中用 morpholino 下调 Rab23 表达后,脊索和脊索前板标记显示在原肠胚早期内包和会聚延伸运动障碍,心脏标记显示心脏向中线会聚的延迟和向前迁移减少,而 Hh 信号通路的水平没有变化,说明 Rab23 可不依赖于 Hh 信号通路调控细胞迁移^[18]。Hou 等发现 Rab23 的高表达与胃癌细胞系的侵袭转移能力正相关,在胃癌细胞系 Hs746T 中干涉掉 Rab23 后其侵袭迁移能力下降,细胞系 AGS 中过表达 Rab23 后侵袭迁移能力增强,说明 Rab23 可促进胃癌的侵袭迁移^[4]。尽管皮肤 SCC 中 Hh 信号通路异常激活,但 Rab23 也可能不通过负调控 Hh 信号通路,而通过其他作用机制影响肿瘤的增殖、侵袭和迁移能力,Rab 在皮肤 SCC 中作用仍有待研究。

Rab 家族蛋白本身是可溶性蛋白,定位于胞浆,经类异戊二烯修饰后结合到特定的细胞器和囊泡膜上^[13]。Rab23 在本实验所有阳性表达的皮肤 SCC 切片中均位于胞浆内,与侵袭性胃癌^[8]中表达位置相同,但在肝癌^[3]和肺癌^[5]的研究中发现 Rab23 表达于细胞核,其在不同肿瘤组织表达位置不同的原因仍不清楚。

本实验首次发现 Rab23 在皮肤 SCC 中高表达,可能与皮肤 SCC 的发生、发展相关。目前针对肿瘤分子特征的分子诊断和靶向治疗成为研究热点,本实验为皮肤 SCC 诊断和治疗的提供新的靶点。

参考文献(References)

- [1] Olkkonen VM, Peterson JR, Dupree P, et al. Isolation of a mouse cDNA encoding Rab23, a small novel GTPase expressed predominantly in the brain [J].Gene. 1994, 138(1-2): p. 207-211
- [2] Eggenschwiler JT, Espinoza E, Anderson KV, et al. Rab23 is an essential negative regulator of the mouse Sonic hedgehog signalling pathway [J].Nature. 2001 Jul 12; 412(6843): 194-198
- [3] 黄淑红,杨凌,谢国蕊等. Rab23 在小鼠不同器官中表达的研究[J].山东大学学报(理学版). 2008,43(1):1-4
- [4] Huang S,Yang L,Xie G, et al. The expression of the Rab23 protein in different organs of mice [J].Journal of Shandong University(Natural Science). 2008,43(1):1-4
- [4] Yang L, Clinton JM, Blackburn ML, et al.Rab23 regulates differentiation of ATDC5 chondroprogenitor cells [J].J Biol Chem, 2008. 283

- (16): p.10649-10657
- [5] Huang TH, Shui HA, Ka SM, et al.Rab 23 is expressed in the glomerulus and plays a role in the development of focal segmental glomerulosclerosis [J].Nephrol Dial Transplant, 2009. 24(3): p. 743-754
- [6] Denning KM, Smyth PC, Cahill SF, et al.A molecular expression signature distinguishing follicular lesions in thyroid carcinoma using preamplification RT-PCR in archival samples [J].Mod Pathol, 2007. 20(10): p. 1095-1102
- [7] Liu YJ, Wang Q, Li W, et al. Rab23 is a potential biological target for treating hepatocellular carcinoma [J].World J Gastroenterol,2007, 13 (7): 1010-1017
- [8] Hou Q, Wu YH, Grabsch H, et al. Integrative genomics identifies RAB 23 as an invasion mediator gene in diffuse-type gastric cancer [J]. Cancer Res, 2008, 68(12): 4623-4330
- [9] Huang S, Yang L, An Y, et al. Expression of hedgehog signaling molecules in lung cancer [J].Acta Histochem, 2010, 23; [Epub ahead of print]
- [10] 曾超,刘亚莉,胡玉珍等. Rab23 对乳腺癌细胞生长增殖的抑制作用[J].现代生物医学进展. 2009,9(20):3811-3815
- [10] Zeng C,Liu YL,Hu YZ, et al. Inhibitory effect of Rab23 on growth and proliferation of breast cancer cells[J]. Progress in Modern Biomedicine,2009,9(20):3811-3815
- [11] 白育萍,刘海燕,高滢等. 皮肤鳞状细胞癌皮损和细胞系中 Patched1 及 Gli1 表达的检测[J].中国皮肤性病学杂志, 2008,22(7): 388-390
- [11] Bai YP,Liu HY,Gao Y, et al. Immunohistochemistry Detection on the Expression of Patched-1 and Gli-1 in Squamous Cell Carcinoma Cell Lines [J].Chin J Derm Venereol, 2008,22(7):388-390
- [12] Evans TM, Ferguson C, Wainwright BJ, et al. Rab23, a negative regulator of hedgehog signaling, localizes to the plasma membrane and the endocytic pathway [J].Traffic,2003, 4(12): 869-884
- [13] 唐蓓. 囊泡转运中的 Rab 小 G 蛋白与马达分子[J].Chinese Journal of Cell Biology, 2008, 30: 462-466
- [13] Tang B. Rab Small GTPases and Motor Proteins in Vesicular Transport. [J] Chinese Journal of Cell Biology, 2008, 30: 462-466
- [14] Wang Y, Ng EL, Tang BL, et al. Rab23: what exactly does it traffic? [J]. Traffic, 2006, 7(6): 746-750
- [15] 张娟,余和芬,王泽生等. Rab5 在胰腺癌细胞 BxPC3 中对 Notch1 活性的调节[J].Basic& C lin ical iMedicine,2008, 28(7): 723-728
- [15] Zhang J,YU HF,Wang ZS, et al. Regulation ofNotch1 act ivity by Rab5 in pancreatic cancer BxPC3 cells [J].Basic& C linical Medicine,2008, 28(7): 723-728
- [16] 史忠诚,李钰,傅松滨等. Rab 5a 基因在肿瘤转移中的作用研究[J].遗传, 2005,27(5) : 694- 698
- [16] Shi ZC,Li Y,Fu SB, et al. The Roles of rab5a Gene in the Mechanism of Tumor Metastasis [J].HEREDITAS,2005,27(5) : 694- 698
- [17] 樊杨,辛晓燕.Rab25 卵巢癌基因治疗的新靶点[J].国妇幼健康研究,2006,17(3)239-241
- [17] Fan Y,Xin XY. Rab25 a new target site of gene therapy for ovarian cancer [J].Chinese Journal of Maternal and Child Health Research, 2006,17(3)239-241
- [18] Dagan Jenkins, Andrew Wilkie. Rab23 regulates cell migration independent of hedgehog signaling in zebrafish: new insight into the Carpenter syndrome phenotype [J]. Mechanisms of Development, 2009,6:S121