

Ran 在胃癌中的表达及其临床意义 *

范红伟 卢媛媛 吴 琼 顾 勇 安艳新 王 新[△]

(第四军医大学西京消化病医院国家肿瘤重点实验室 陕西 西安 710032)

摘要 目的 利用免疫组织化学的方法探讨小 G 蛋白 Ran 在胃癌中的表达及临床意义。方法 利用免疫组织化学染色法研究 74 例胃癌组织标本(其中高分化 25 例,中分化 24 例,低分化 25 例)及其毗邻正常组织中 Ran 的表达情况,并分析该蛋白表达水平与临床病理参数之间的关联。结果 (1) Ran 在胃癌组织中的染色强度明显高于正常组织。(2) 在癌组织中 Ran 表达于胞核和胞浆,其中又以胞核为主,在正常组织中 Ran 主要表达于胞浆。(3) Ran 的表达与患者年龄、性别无相关性(0.464, 0.912),与肿瘤分化、TNM 分期和转移与否有显著相关性(0.001、<0.001、<0.001)。结论:与正常组织相比,Ran 在胃癌组织中的表达显著增高,并且与肿瘤分化和病理分期存在显著正相关,其可能作为胃癌新的分子标志物,在肿瘤的发生发展中发挥重要作用。

关键词: Ran; 胃癌; 小 G 蛋白

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)08-1490-05

Expression of Ran and Clinicopathological Parameters
in Gastric Carcinoma*FAN Hong-wei, LU Yuan-yuan, WU Qiong, GU Yong, AN Yan-xin, WANG Xin[△](State Key Laboratory of Cancer Biology & Xijing Hospital of Digestive Diseases, Fourth Military Medical University,
Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of the small G protein Ran in gastric cancer and its clinical significance. **Methods:** Immunohistochemistry was used to detect the expression of Ran in 74 cases of gastric tumor tissues, among which there were 25 well-differentiated cases, 24 moderately-differentiated cases, and 25 poorly-differentiated cases, and their adjacent normal tissues. Analyze the relevance between the expression and the clinic pathological parameters. **Results:** (1) Ran was expressed greater in gastric cancer tissues than in normal gastric mucosa by immunohistochemical study. (2) In gastric cancer tissues, Ran was expressed in both nucleus and cytoplasm, but mainly in nucleus. However, in normal tissues, its expression was localized in cytoplasm. (3) Expression of Ran had no correlation with the patients' age and gender ($p=0.464, 0.912$), but was positively correlated with tumor differentiation ($P=0.001$), invasion ($P<0.001$), and pathological stage ($P<0.001$). **Conclusion:** Ran expression is up-regulated in gastric cancer and positively correlated with tumor differentiation and pathological stage. It could be taken as a new potential biomarker of gastric cancer, and may play an important role in the development of gastric cancer.

Key words: Ran; Gastric cancer; Small G Protein

Chinese Library Classification(CLC): R735.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)08-1490-05

前言

Ran(Ras—related nuclear)也称为 TC4,最初是作为人类 cDNA 的一个可译框而被发现,并首先从人类畸胎瘤细胞系中分离纯化得到的一种蛋白质^[1,2]。Ran 在真核细胞的一系列生物过程中,如 DNA 复制、RNA 的转录和加工、RNA 和蛋白质从核孔复合物的转运、有丝分裂和减数分裂的控制,尤其是纺锤体的组装、染色体的正确分配、核膜破裂和重组、在有丝分裂中纺锤体检查点的调节作用等方面,都有一定的作用。但 Ran 最广为人知的是其在 DNA 复制以及核浆转运 RNA 和蛋白质方面中的作用,Ran 蛋白及其 mRNA 高度选择性的表达在很多种肿瘤组织的癌细胞中,包括胃、结肠、胰腺、肺、头颈部肿瘤,

在这些器官的正常组织中 Ran 不表达或很少表达^[3-6]。Ran 这一优先表达于肿瘤组织的特性,对恶性肿瘤的转化和增殖起到诠释作用^[7]。但是以上研究仅限于细胞系水平,在组织中的深入研究并未见报道^[8]。本实验旨在探讨小 G 蛋白 Ran 在胃癌及其相应正常组织中的表达模式及与临床病理参数之间的关联,从而为临床胃癌的诊断提供一个新的参考依据。

1 资料与方法

1.1 标本来源

选取 2008 年 5 月至 2010 年 6 月本院外科手术切除的经病理检查证实的石蜡包埋原发性胃癌标本 74 例。其中高分化胃癌 25 例,中分化胃癌 24 例,低分化胃癌 25 例。标本均经

* 基金项目 国家自然科学基金 (30973410); 国家自然科学基金面上项目 (30971337)

作者简介 范红伟(1984-)女,硕士生,主要研究方向:小 G 蛋白 Ran 与消化道肿瘤, E-mail: xdongye.1986@163.com

[△]通讯作者 王新, E-mail: wangx@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2011-11-10 接受日期: 2011-12-05)

10%甲醛固定、常规石蜡包埋,作4μm连续切片待测。所有标本根据影像学及临床表现或既往手术切除标本病理证实。

1.2 主要试剂

羊抗Ran多克隆抗体(Santa Cruz公司),中杉金桥公司的兔抗山羊超敏两步法试剂盒(PV-9003)、DAB显色试剂盒(中杉金桥公司)。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化 组织切片在60℃烤箱过夜。①常规脱蜡及水化:二甲苯I 10 min—二甲苯 II 10 min—无水乙醇 I 5 min--无水乙醇 II 5 min—95%乙醇 I 5 min—95%乙醇 II 5 min—90%乙醇 5 min—85%乙醇 5 min。②抗原修复:配制3g柠檬酸钠和0.4g柠檬酸于1L双蒸水中(pH 6.0),待高压锅中煮沸后将组织片置于其中高压修复2分钟。③过氧化氢酶阻断剂:室温下孵育15 min。④正常非羊动物血清室温下封闭30 min,加入Ran抗体(稀释浓度1:200),以PBS作为一抗作为阴性对照组,4℃孵育过夜。⑤复温30 min。⑥按照说明书,加入相应的试剂1(Polymer Helper)室温下孵育15 min,后加入试剂2(poly-HRP anti-Goat IgG),室温下孵育15 min,后进行DAB显色,苏木精复染,1%盐酸酒精分化,1%氨水返蓝,逆脱蜡、水化的顺序进行及中性树胶封片等。

1.3.2 表达强度判断标准 组化评分标准按照阳性细胞数和染色强度两个指标进行判断。(1)阳性细胞数 1%的记作0,阳性细胞数在2%~25%的记作1,26%~50%的记作2,51%~75%的记作3,>75%的记作4。(2)染色强度:无显色为0分,浅棕黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。总评分是按阳性细胞数评分+染色强度评分。分为4个等级:评分在0~1的为阴性(-),评分在2~4的为弱阳性(+),评分在5~8的为中度阳性(++),评分在9~12的为强阳性(+++)。

1.4 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件,对年龄、性别、TNM分期和转移与否这4组分别与表达强度之间是否存在差异,采用的是等级资料非参数秩和检验方法,对表达强度与分化这二者的关系采用Kendall's tau-b统计方法进行相关分析。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ran在胃癌组织中相对癌旁组织高表达

Ran在胃癌组织中的表达阳性率72.97%(54/74)与在正常组织表达阳性率47.29%(35/74)相比,有明显统计学意义。详见表1。

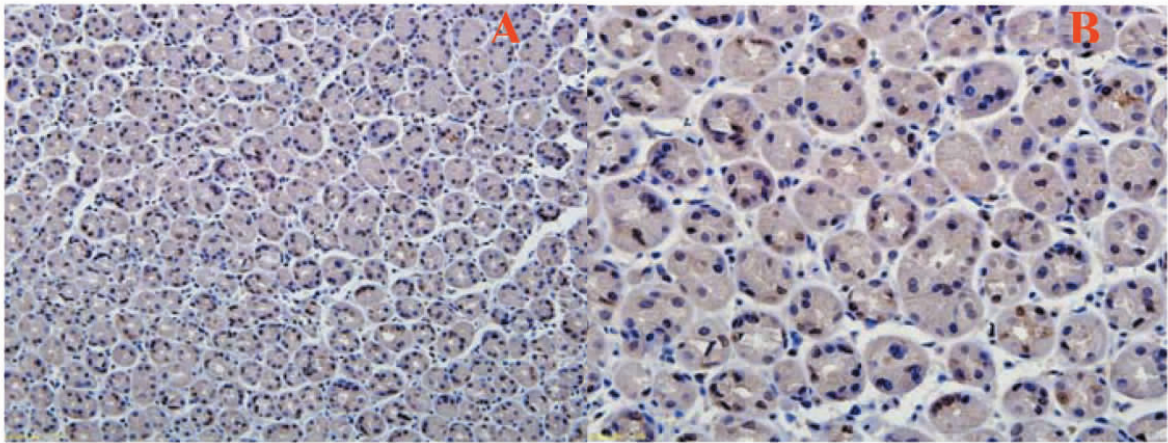
表1 Ran在胃癌组织中高表达
Table 1 Ran is up-regulated in gastric cancer

组织分 Tissue types 型	N	Ran 表达 Expression of Ran				P 值 P Value
		-	+	++	+++	
胃癌 Gastric cancer	74	20	17	22	15	<0.001
正常组织 Normal tissues	74	39	23	7	5	

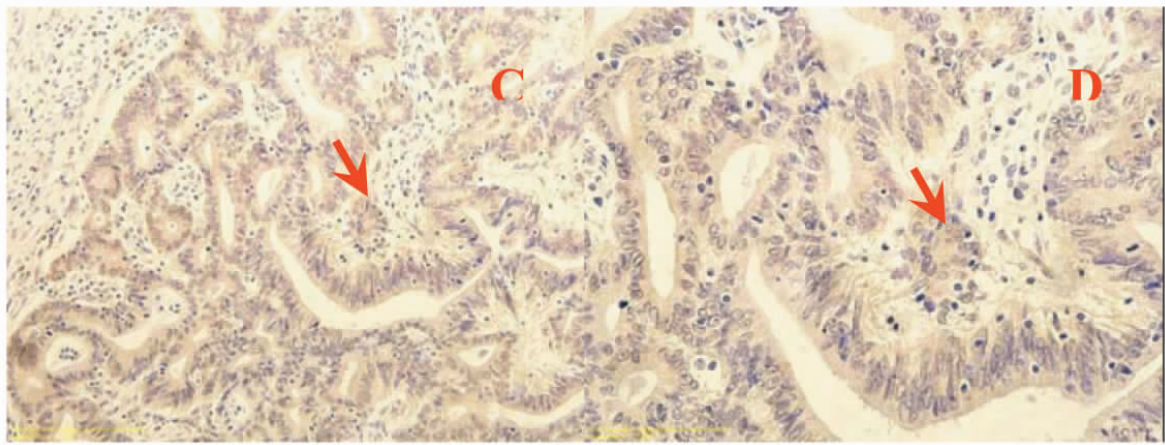
2.2 Ran在肿瘤细胞和正常上皮细胞中的表达定位差异

Ran在胃癌细胞中表达在胞浆和胞核,但以胞核为主,但是在正常细胞中表达很弱,表达模式是在胞浆。并且染色强度

从高分化胃癌-中分化-低分化胃癌组织呈现逐步加强趋势。见图1。

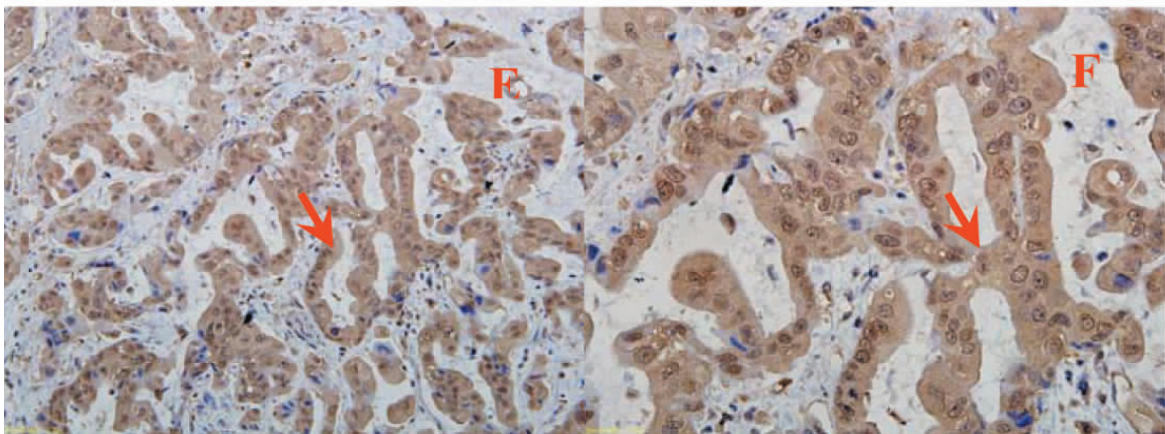


A 正常胃组织 200×
Normal gastric tissue 200×
B 正常胃组织 400×
Normal gastric tissue 400×



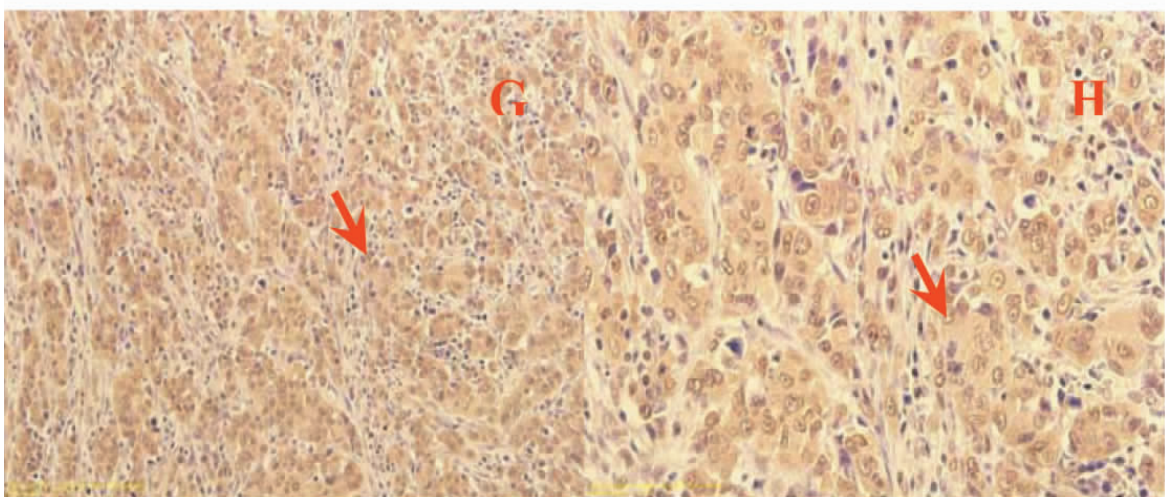
C 高分化胃癌 200×
Well-differentiated gastric cancer 200×

D 高分化胃癌 400×
Well-differentiated gastric cancer 400×



E 中分化胃癌 200×
Moderate-differentiated gastric cancer 200×

F 中分化胃癌 400×
Moderate-differentiated gastric cancer 400×



G 低分化胃癌 200×
Poor-differentiated gastric cancer 200×

H 低分化胃癌 400×
Poor-differentiated gastric cancer 400×

2.3 Ran 的表达与临床病理参数之间的关系
经统计 ,Ran 的表达与年龄、性别无统计学差异(0.464、0.912) ,与肿瘤分化、TNM 分期、转移呈正相关(0.001、<0.001、<0.001) ,见表 2。

表 2 Ran 表达与胃癌临床病理特征之间的关系
Table 2 The relationship between Ran and the clinicopathological features of gastric cancer

临床病理参数 Clinicopathological Parameter	N	Ran 表达 Expression of Ran				P 值 P Value
		-	+	++	+++	
年龄 Age						0.464
≤60	36	10	6	11	9	
>60	38	10	11	11	6	
性别 Gender						0.912
男 Male	61	16	15	18	12	
女 Female	13	4	2	4	3	
分化 Differentiation						0.001
高分化 Well-differentiated	25	10	7	7	1	
中分化 Moderate-differentiated	24	7	7	6	4	
低分化 Poor-differentiated	25	3	3	9	10	
TNM 分期 TNM staging						<0.001
+	44	17	15	8	4	
+	30	3	2	14	11	
转移 metastasis						<0.001
有 Yes	31	4	3	14	10	
无 No	43	16	14	8	5	

3 讨论

Ran 属于小 G 蛋白家族 ,该家族其他成员有 Ras(Ras sarcoma), Rho(Ras homologous), Rab(Ras-like proteins in brain)和 Arf(ADP ribosylation factor)^[7]。Ran 具有所有小 G 蛋白都具有的 ~ 4 个保守的结构域 ,这 4 个结构域的共有序列从 到 分别为 GXXXXGKS(T) nxxG、N (T)KXD 和 EXSAX。I 和 的序列为 GTP 酶的活性部位 , 、 为 GDP/GTP 的结合部位^[8]。小 G 蛋白 Ran 最主要的功能是控制着大分子在细胞浆和细胞核之间转运的方向以及染色体、纺锤体和着丝粒的形成^[9-12]。在一个活的正在分裂的哺乳细胞中 ,每分钟有几百万的 Ran 分子进出细胞核^[13]。Ran 和 Ras 等等大多数 GTP 结合蛋白一样 ,有有活性的 RanGTP 和无活性 RanGDP 两种形式。其分别受 Ran 的调节 GEF (guanine nucleotide exchange factor)和 RanGAP(RanGTPase activating protein)精密调控。GEF/RCC1 在细胞核中可增加与 Ran 相连的 GDP 转化成 GTP ,而 RanGAP1(或 RanBP1)在胞浆中则会把 GTP 转化为 GDP。Ran 通过作用下游分子 TPX2 从而稳定微管并且促进了纺锤体的形成。通过下游分子 Crm1 控制分子的核浆转运。此外 ,Ran 信号通路的紊乱导致非整数倍染色体的增加 ,从侧面也说明了 Ran 在维持染色体和着丝粒的稳定方面起着至关重要的作用^[14,15]。在哺乳细胞中 Ran

扮演着癌基因的角色 ,与正常组织相比 ,Ran 在肿瘤组织中表达增高。但是在人成纤维细胞中急性沉默 Ran 的表达 ,细胞耐受性却良好 ,并未影响到细胞周期和有丝分裂中纺锤体的形成^[16] ,这可能与肿瘤的特异性有关。前期报道 ,Ran 与肿瘤的生长、增值、凋亡、侵袭和转移都有着密切关系^[8,17,19]。在前列腺、子宫、睾丸、结肠、肝脏和转移淋巴结组织中 ,Ran 在癌灶中的表达高于良性组织^[17]。此外 ,Ran 结合蛋白 RanBP7 和 RanBPM 优先表达于肿瘤组织 ,并且与癌细胞的增值有密切关系^[18,19]。在各种肿瘤中 ,Ran 的下游靶分子 Aurora A 和 TPX2 已被鉴定为是预示体细胞染色体的不稳定性 and 肿瘤不良预后的重要分子^[20]。研究表明高表达的 Ran 与肾透明细胞癌的侵袭和转移有明确关联^[21] ,在乳腺癌和卵巢癌中,Ran 的高表达与疾病的发展走向呈负相关。在胃癌的研究方面显示 ,Ran 在癌细胞中表达强度和所占比例明显高于正常细胞 ,但这仅限于细胞水平的研究^[8] ,在组织中的研究也仅限一例^[17]。本实验通过组织化学染色研究了 Ran 在 74 例胃癌及其相应正常组织中的表达情况 ,并且经统计 ,探讨其与胃癌的临床病理参数之间的关系 ,得出 Ran 与胃癌患者的年龄、性别无差异 ,与分化、TNM 分期和转移与否存在明显正相关的结论。故 Ran 在胃癌中的表达模式及功能机制研究为接下来进一步探讨胃癌的发生发展提供一定的方向和理论基础 ,也作为一个新的潜在靶向分子为今后胃癌的诊治提供新的

途径。

参考文献(References)

- [1] Ralf F. Bischoff, Herwig Ponstingl. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC 1[J]. Nature, 1991, 354 (6348):80-82
- [2] 曹允考,张贵学,陈大元等. GTPase Ran 及其生物学作用[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(3):6-9
Cao Yun-kao, Zhang Gui-xue, Chen Da-yuan, et al. GTPase Ran and its biological role[J]. Journal of Cell Biology, 2004, 26(3):6-9(In Chinese)
- [3] Karsten W. Regulating access to the genome:nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle[J]. Cell, 2003, 112(11): 441-451
- [4] Alex M, Erin C.Towards a quantitative understanding of mitotic spindle assembly and mechanics[J]. Cell Science, 2010, 123(20): 3435-3445
- [5] Athale CA, Dinarina A, Mora CM, et al. Regulation of microtubule dynamics by reaction cascades around chromosomes [J]. Science, 2008, 322:1243-1247
- [6] Dinarina A, Pugieux C, Corral M. M, et al. Chromatin shapes the mitotic spindle[J]. Cell, 2009, 38: 502-513
- [7] Krister W, Kent LR, Channing JD, et al. The Ras superfamily at a glance[J]. Journal of Cell Science, 2005, 118: 843-846
- [8] Koichi A, Tetsuro S, Hiroko T, et al. Ran,a Small GTPase Gene, Encodes Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) Epitopes Capable of Inducing HL-A-A33-restricted and Tumor-Reactive CTLs in Cancer Patients[J]. Clinical Cancer Research, 2004, (10):6695-6702
- [9] Jesse CG, Kerry B. Microtubule motors in eukaryotic spindle assembly and maintenance[J]. Semin.Cell Dev. Biol, 2010, 21:248-254
- [10] Gatlin JC, Matov A, Danuser G,et al. Directly probing the mechanical properties of the spindle and its matrix[J]. Cell Biol, 2010, 188:481-489
- [11] Goshima G, Kimura A. New look inside the spindle: microtubule-dependent microtubule generation within the spindle[J].Curr. Opin. Cell Biol, 2010, 22: 44-49
- [12] Needleman DJ, Groen A, Ohi R, et al. Fast microtubule dynamics in meiotic spindles measured by single molecule imaging: evidence that the spindle environment does not stabilize microtubules [J].Mol. Biol.Cel, 2009, 21:323-333
- [13] Walczak CE, Cai S, Khodjakov A. Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis[J]. Nat. Rev. Mol. Cell Biol, 2010, 11, 91-102
- [14] Liu D, Vader G, Vromans MJ. Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of Aurora B kinase from kinetochore substrates[J]. Science, 2009, 323:1350-1353
- [15] Emberley ED, Gietz RD, Campbell JD, et al. RanBPM interacts with psoriasin in vitro and their expression correlates with specific clinical features in vivo in breast cancer[J]. BMC Cancer, 2002, 2:28-34
- [16] Fang X, Pedro MC, Thomas MG, et al. A Survivin-Ran Complex Regulates Spindle Formation in Tumor Cells [J]. Molecular and cellular biology, 2008: 5299-5311
- [17] Kimi H, Ichiro T, Ryo M, et al. Screening of potential molecular targets for colorectal cancer therapy [J]. International Journal of General Medicine, 2009,2:243-257
- [18] Li SR, Gyselman VG, Dorudi S, et al. Elevated levels of RanBP7 mRNA in colorectal carcinoma are associated with increased proliferation and are similar to the transcription pattern of the protooncogene c-myc[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 271:537-543
- [19] Karsten W. Regulating Access to the Genome: Nucleocytoplasmic Transport throughout the Cell Cycle[J]. Cell, 2003, (112): 441-451
- [20] Carter SL, Eklund AC, Kohane IS, et al. A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers[J]. Nat. Genet, 2006, 38:1043-1048
- [21] Hideyuki A, Takao K, Hiromichi S, et al. High expression of Ran GTPase is associated with local invasion and metastasis of human clear cell renal cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2008, 122: 2391-2397

(上接第 1475 页)

- [13] Hegi M E, Diserens A C, Gorlla T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma [J]. N Engl J Med, 2005, 352(10): 997-1003
- [14] Hegi M E, Diserens A C, Godard S, et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(6): 1871-1874
- [15] Esteller M, Hamilton S R, Burger P C, et al. Inactivation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia[J]. Cancer Res, 1999, 59(4): 793-797
- [16] Pulling L C, Divine K K, KlInge D M, et al. Promoter hypermethylation of the O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene: more common in lung adenocarcinomas from never-smokers than smokers and associated with tumor progression[J]. Cancer Res, 2003, 63 (16): 4842-4848
- [17] Ramirez JL, Taron M, Balana C, et al. Serum DNA as a tool for cancer patient management[J]. Rocs Akad Med Bialymst, 2003, 48: 34-41
- [18] Weaver KD, Grossman SA, Herman JG. Methylated tumor-specific DNA as a plasma biomarker in patients with glioma [J]. Cancer Invest, 2006, 24(1): 35-40
- [19] Balana C, Ramirez J L, Taron M, et al. O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase methylation in serum and tumor DNA predicts response to 1,3-bis(2-chloroethyl)- 1-nitrosourea but not to temozolamide plus cisplatin in glioblastoma multiforme[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(4): 1461-1468
- [20] Ramirez J L, Taron M, Balana C, et al. Serum DNA as a tool for cancer patient management [J]. Rocz Akad Med Bialymst, 2003, 48: 34-41