

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.05.0590

• 研究快报 •

## Ras 相关区域家族 10 蛋白在胃癌中的表达及其临床意义

张宇<sup>△</sup>, 卫子然<sup>△</sup>, 杨德君, 王长明, 颜荣林\*

第二军医大学长征医院胃肠外科, 上海 200003

**[摘要]** **目的** 探讨 Ras 相关区域家族 10(Ras-association domain family 10, RASSF10)蛋白在人类胃癌中的表达及其与胃癌患者预后相关的临床病理学参数的关系。**方法** 选取 2008 年 1 月至 2010 年 12 月 在第二军医大学长征医院手术切除的胃癌标本共 105 例。所有患者临床病理学资料详实,至少随访 5 年或随访至死亡。应用免疫组织化学方法检测胃癌组织中 RASSF10 的表达,并分析其与临床病理学参数和预后的关系。**结果** 免疫组化结果提示 RASSF10 在 105 例胃癌组织中阴性表达率为 61.9%(65/105)。RASSF10 表达水平与肿瘤大小、病理学分级、病理类型、T 分期、淋巴结转移有关( $P < 0.05$ ),而与患者年龄、性别、肿瘤部位、远处转移、AJCC 分期等无关( $P > 0.05$ )。Kaplan-Meier 分析显示 RASSF10 表达阴性患者有着更差的预后( $P < 0.05$ )。Cox 比例风险回归模型分析显示 RASSF10 表达( $HR = 0.528, P = 0.041$ )和 AJCC 临床分期( $HR = 4.994, P = 0.001$ )可作为胃癌患者的独立预后因子。**结论** RASSF10 蛋白在胃癌组织中表达下调,且与胃癌患者不良预后相关,提示其可能成为判断胃癌预后的潜在生物标记物。

**[关键词]** RASSF10;胃肿瘤;免疫组织化学;预后**[中图分类号]** R 735.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)05-0590-05

### Expression and clinical significance of Ras-association domain family 10 in gastric cancer

ZHANG Yu<sup>△</sup>, WEI Zi-ran<sup>△</sup>, YANG De-jun, WANG Chang-ming, YAN Rong-lin\*

Department of Gastrointestinal Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[Abstract]** **Objective** To examine the protein expression of Ras-association domain family 10 (RASSF10) in human gastric cancer and its association with clinicopathological parameters of prognosis in patients with gastric cancer. **Methods** A total of 105 gastric cancer specimens were collected in Changzheng Hospital, Second Military Medical University from Jan. 2008 to Dec. 2010. All patients had detailed clinicopathological data and were followed up for at least 5 years or till they were dead. Immunohistochemical (IHC) analysis was performed to detect RASSF10 expression in gastric carcinoma and adjacent normal tissues. The correlations between RASSF10 expression and clinicopathological factors, and patients' prognosis were evaluated through statistical analysis. **Results** The IHC results revealed that negative expression of RASSF10 was observed in 61.9% (65/105) of gastric cancer patients. The level of RASSF10 was significantly associated with the tumor size, pathological grade, pathological type, T stage and lymph node metastasis (all  $P < 0.05$ ), but not correlated with age, gender, tumor site, distant metastasis or AJCC staging (all  $P > 0.05$ ). Kaplan-Meier curve showed that negative expression of RASSF10 predicted significantly worsened prognosis of gastric cancer ( $P < 0.05$ ). Multivariate Cox regression analysis indicated that RASSF10 expression ( $HR = 0.528, P = 0.041$ ) and AJCC stage ( $HR = 4.994, P = 0.001$ ) were independent prognostic factors for the survival of gastric cancer patients. **Conclusion** RASSF10 protein is down-regulated in gastric cancer tissues and is associated with a poor prognosis of gastric cancer, which indicates that RASSF10 may serve as a potential prognostic biomarker for gastric cancer.

**[Key words]** RASSF10; stomach neoplasms; immunohistochemistry; prognosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(5): 590-594]

**[收稿日期]** 2015-12-27 **[接受日期]** 2016-01-27**[基金项目]** 上海市卫生与计划生育委员会科研课题(2014176). Supported by Scientific Research Program of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (2014176).**[作者简介]** 张宇,硕士生. E-mail: zhang-yu10086@163.com; 卫子然,硕士,讲师. E-mail: weiziran0010185@163.com<sup>△</sup>共同第一作者 (Co-first authors).

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81885602, E-mail: yanronglin12@sina.com

*Ras* 基因突变在人类肿瘤的发展及恶性进展中起着至关重要的作用<sup>[1-2]</sup>。*Ras* 癌基因参与调节多种生物过程,包括细胞生长与分化、膜转运、转录调控及细胞凋亡等<sup>[2-3]</sup>。近年来,研究者相继鉴定出编码 *Ras* 相关区域基因,称为 *Ras* 相关区域家族(*Ras*-association domain family, RASSF)<sup>[4-5]</sup>。脊椎动物 RASSF 包含 10 个成员<sup>[6-7]</sup>,其家族许多成员已被证实具有抑制多种肿瘤生长以及促进肿瘤凋亡的能力<sup>[4,8-12]</sup>。RASSF10 属于 RASSF 家族新发现的成员。先前已有报道发现 RASSF10 在多种正常组织中均有表达,而在肿瘤组织中频繁出现表达异常<sup>[13]</sup>。本课题组既往研究证实,RASSF10 在胃癌细胞系中表达缺失,同时功能学实验表明胃癌细胞系中过表达的 RASSF10 可抑制细胞生长和菌落形成能力,进而促进细胞凋亡的发生<sup>[14]</sup>。本研究通过检测胃癌组织和正常胃组织中 RASSF10 的表达情况,分析 RASSF10 表达与胃癌临床病理学参数的关系,以期评判胃癌预后提供依据。

## 1 资料和方法

1.1 一般资料 选取第二军医大学长征医院 2008 年 1 月至 2010 年 12 月经 10% 甲醛固定和石蜡包埋的胃癌组织和相对应的癌旁组织切片各 105 例。所有患者均经病理诊断确诊为胃癌腺癌。患者术前均未行放疗、化疗、分子靶向治疗、生物基因治疗等。患者临床资料完整。此研究经第二军医大学伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。

1.2 主要试剂 兔抗 RASSF10 多克隆抗体购自艾博抗上海有限公司(ab189999)。山羊抗鼠多克隆 IgG 抗体购自 Arigo 生物公司(ARG65350)。DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒购自 Beyotime 生物科技有限公司(P0202)。免疫组化试剂盒购自谷歌生物有限公司(G1210)。其他免疫组化所用试剂均购自 Beyotime 生物科技有限公司。

1.3 免疫组织化学法检测 RASSF10 蛋白表达 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶法(SP)进行免疫组织化学染色。使用 10% 甲醛固定胃癌组织标本后石蜡包埋。将蜡块固定于切片机,纵行 4  $\mu$ m 连续切片,石蜡切片脱蜡水化后用新鲜配制的 3% 过氧化氢液进行室温封闭,PBS 清洗干净后滴加正常山羊血清封闭液室温封闭 30 min,滴加 1:200 稀释比例的抗

RASSF10 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,37 $^{\circ}$ C 生物素化复温 1 h 后滴加山羊抗鼠二抗(ARG65350,1:500) 孵育 0.5 h,按照染色试剂盒说明滴加 HRP 标记工作液,DAB 显色。苏木素复染 1 min 并脱水后,使用中性透明树脂封片,室温放置至胶凝固。PBS 液代替一抗作为阴性对照。

1.4 免疫组织化学结果判定 在临床和病理双盲的情况下,由第二军医大学长征医院 2 名有经验的病理科医师对所有切片在显微镜下( $\times 100$ )观察 RASSF10 染色结果,采用半定量分析法,先按阳性细胞比例将 0、1%~25%、26%~50%、51%~75%、76%~100% 分别计为 0~4 分,再按染色强度将无、弱、中、强分别计为 0~3 分,两者相乘之积作为免疫组织化学半定量积分。积分 < 2 者判定为表达阴性,积分  $\geq 2$  者为表达阳性。

1.5 统计学处理 所有数据采用 SPSS 21.0 软件进行分析。RASSF10 与临床病理学参数的关系采用  $\chi^2$  检验和 Fisher 确切概率法分析。生存曲线分析采用 Kaplan-Meier 法,两组间的差异采用 Log-rank 检验。与生存率相关的预后因素的单因素和多因素分析采用 Cox 风险回归模型分析。检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 RASSF10 在胃癌组织中的表达 免疫组织化学染色显示,RASSF10 主要定位于细胞质(图 1)。105 例胃癌组织中 RASSF10 阳性表达率为 38.1% (40/105),低于癌旁组织(61.9%,65/105),差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

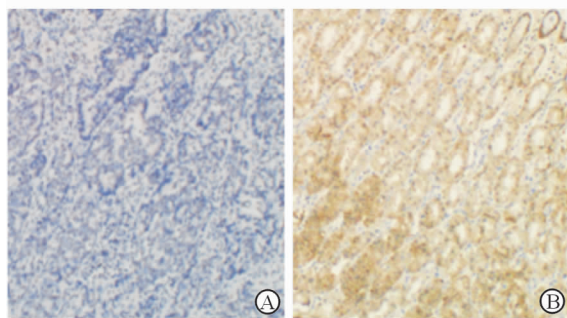


图 1 RASSF10 在胃癌组织(A)和相应癌旁正常组织(B)中的表达

Fig 1 RASSF10 expression in gastric cancer tissues (A) and adjacent normal gastric mucosa (B)

RASSF10: Ras-association domain family 10. Original magnification:  $\times 100$

2.2 RASSF10 在胃癌中的表达水平与临床病理学参数的关系 对 RASSF10 表达与患者的临床病理资料的关系进行分析,结果显示 RASSF10 的表达

水平与病理学分级、病理类型、肿瘤大小、T 分期、淋巴结转移等有关( $P < 0.05$ ),而与患者年龄、性别、肿瘤部位、远处转移、AJCC 分期等无关,详见表 1。

表 1 胃癌组织中 RASSF10 表达情况和临床病理学参数的关系

Tab 1 Association of RASSF10 expression with clinicopathological parameters in gastric cancer patients

Clinicopathological parameter	N	RASSF10 expression n(%)		$\chi^2$	P
		Positive	Negative		
Age (year)					
<60	41	17(41.5)	24(58.5)	0.324	0.569
≥60	64	23(35.9)	41(64.1)		
Gender				0.064	0.800
Male	62	23(37.1)	39(62.9)		
Female	43	17(39.5)	26(60.5)		
Pathological grade				14.072	0.000
I	8	8(100.0)	0(0.0)		
II-III	97	32(33.0)	65(67.0)		
Pathological type				20.919	0.000
Canalicular adenoma	15	13(86.7)	2(13.3)		
Signet ring cell carcinoma	27	12(44.4)	15(55.6)		
Other type	63	15(23.8)	48(76.2)		
Tumor size d/cm				6.191	0.013
<6	52	26(50.0)	26(50.0)		
≥6	53	14(26.4)	39(73.6)		
Tumor location				0.573	0.903
Cardia and gastric fundus	10	4(40.0)	6(60.0)		
Gastric body	30	13(43.3)	17(56.7)		
Gastric antrum	62	22(35.5)	40(64.5)		
Total stomach	3	1(33.3)	2(66.7)		
T stage				4.894	0.027
T1-T2	19	3(15.8)	16(84.2)		
T3-T4	86	37(43.0)	49(57.0)		
Lymph node metastasis				5.685	0.017
Negative	40	21(52.5)	19(47.5)		
Positive	65	19(29.2)	46(70.8)		
Distant metastasis				0.008	0.928
No	100	38(38.0)	62(62.0)		
Yes	5	2(40.0)	3(60.0)		
AJCC stage				0.445	0.505
I-II	41	14(34.1)	27(65.9)		
III-IV	64	26(40.6)	38(59.4)		

RASSF10: Ras-association domain family 10

2.3 RASSF10 表达与胃癌患者预后的关系 所有患者至少随访 5 年或随访至死亡。患者 5 年生存率为 34.7%,生存曲线见图 2A。RASSF10 表达阳性患者 5 年生存率为 56.4%,RASSF10 表达阴性患者 5 年生存率为 25.5%。Kaplan-Meier 生存曲线分析(图 2B)显示 RASSF10 阳性表达组中位生存时间为 47.9 个月,RASSF10 阴性表达

组中位生存时间为 34.8 个月,Log-rank 检验显示差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。单因素 Cox 分析提示胃癌患者的预后与 RASSF10 表达、T 分期、淋巴结转移、远处转移和 AJCC 分期等有关,将其纳入多因素分析后显示 RASSF10、AJCC 临床分期是影响总体生存率的独立危险因素( $P < 0.05$ ,表 2)。

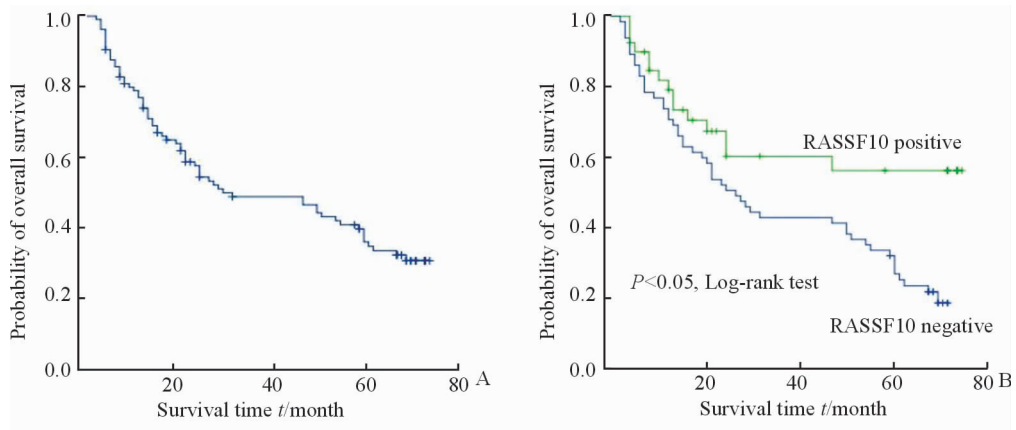


图2 105例胃癌患者的生存曲线

Fig 2 Survival curves of 105 patients with gastric cancer

A: Overall survival curves of 105 patients with gastric cancer; B: Survival curves of gastric cancer patients with different RASSF10 expression statuses. RASSF10: Ras-association domain family 10

表2 影响胃癌预后的单因素和多因素分析

Tab 2 Univariate and multivariate analyses of overall survival of gastric cancer patients

Clinicopathological factor	Univariate analyses		Multivariate analyses	
	HR(95%CI)	P	HR(95%CI)	P
Age	0.642(0.394,1.045)	0.075		
Gender	0.796(0.490,1.293)	0.357		
Tumor location	0.977(0.681,1.402)	0.901		
Pathological type	1.041(0.740,1.463)	0.818		
Pathological grade	5.418(0.751,39.065)	0.094		
Tumor size	1.559(0.956,2.540)	0.075		
T stage	2.052(1.043,4.037)	0.037	0.867(0.381,1.971)	0.733
Lymph node metastasis	4.063(2.228,7.409)	0.000	1.296(0.557,3.015)	0.548
Distant metastasis	3.232(1.137,9.188)	0.028	1.850(0.646,5.296)	0.252
AJCC stage	5.884(3.221,10.750)	0.000	4.994(1.998,12.486)	0.001
RASSF10 expression	0.471(0.265,0.840)	0.011	0.528(0.286,0.975)	0.041

RASSF10: Ras-association domain family 10

### 3 讨论

胃癌是严重危害人类健康的最常见的恶性肿瘤之一,是世界上仅次于肺癌、乳腺癌、结肠癌的第4大高发肿瘤,并且是全球范围内死亡率排名第2的恶性肿瘤<sup>[15]</sup>。尽管胃癌的诊断和治疗已取得了较大进展,但其总体预后仍然较差,能得到根治性手术的胃癌患者只有50%左右,这也导致了其5年生存率一直较低<sup>[16]</sup>。胃癌的发病过程是一个集遗传、环境和生活习惯于一体的复杂过程,确切发病机制目前仍不清楚。因此,深入研究胃癌发生、发展的分子机制,探寻能够准确评判胃癌预后的生物标记物及

临床治疗的有效治疗靶点,具有重要的临床意义。

RASSF10是新近发现的 RASSF 家族成员,其基因位于11p15.2,含1952个碱基。既往研究已经将 RASSF10 视为一个潜在的肿瘤抑制基因,并且其 mRNA 表达水平在脑胶质瘤<sup>[17]</sup>、甲状腺癌<sup>[13]</sup>等恶性肿瘤原发灶和转移灶均有明显的下降。本研究旨在更好地阐明 RASSF10 在胃癌发病中所起的作用。通过免疫组织化学染色方法的检测结果显示, RASSF10 在胃癌组织中表达阳性率为38.1%,远低于癌旁组织中 RASSF10 的表达阳性率(61.9%,  $P < 0.05$ )。通过对临床病理资料采用统计学软件分析显示,胃癌患者的肿瘤大小、病理学分级、病理类型、T

分期、淋巴结转移等与胃癌组织中 RASSF10 的表达关系密切( $P < 0.05$ ),而与胃癌患者性别、年龄、肿瘤部位、远处转移、AJCC 分期等无关( $P > 0.05$ )。肿瘤远处转移、AJCC 分期与 RASSF10 阳性率无关,或许是因为大部分已发生远处转移的晚期肿瘤患者选择保守治疗而非手术,因而纳入研究进行分析的手术切除标本并不具备代表性。预后因素分析显示,RASSF10 阴性表达患者的 5 年生存时间(率)低于 RASSF10 阳性表达患者,分别是 34.8 个月(25.5%)和 47.9 个月(56.4%)。

综上所述,RASSF10 蛋白在胃癌中的表达异常下调,且其表达水平与胃癌患者不良预后密切相关,提示 RASSF10 蛋白在胃癌发生、发展中可能发挥重要作用,可作为治疗和判定预后的预测因子。本研究仍存在诸多不足之处,如纳入样本量较小、影响胃癌预后的因素分析不全面,未能将手术、化疗、放疗、综合治疗等方面进行分层分析等,未来需要进一步增加样本量,扩大对影响因素的分析,进一步确定 RASSF10 与胃癌患者预后相关因素的关系。

#### [参考文献]

- [1] Campbell S L, Khosravi-Far R, Rossman K L, Clark G J, Der C J. Increasing complexity of Ras signaling[J]. *Oncogene*, 1998, 17(17 Reviews): 1395-1413.
- [2] Downward J. The ins and outs of signalling [J]. *Nature*, 2001, 411: 759-762.
- [3] Malumbres M, Pellicer A. RAS pathways to cell cycle control and cell transformation [J]. *Front Biosci*, 1998, 3: d887-d912.
- [4] Dammann R, Li C, Yoon J H, Chin P L, Bates S, Pfeifer G P. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21. 3 [J]. *Nat Genet*, 2000, 25: 315-319.
- [5] Ponting C P, Benjamin D R. A novel family of Ras-binding domains [J]. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21: 422-425.
- [6] Richter A M, Pfeifer G P, Dammann R H. The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1796: 114-128.
- [7] Sherwood V, Recino A, Jeffries A, Ward A, Chalmers A D. The N-terminal RASSF family: a new group of Ras-association-domain-containing proteins, with emerging links to cancer formation [J]. *Biochem J*, 2009, 425: 303-311.
- [8] Hesson L B, Cooper W N, Latif F. Evaluation of the 3p21. 3 tumour-suppressor gene cluster [J]. *Oncogene*, 2007, 26: 7283-7301.
- [9] Akino K, Toyota M, Suzuki H, Mita H, Sasaki Y, Ohe-Toyota M, et al. The Ras effector RASSF2 is a novel tumor-suppressor gene in human colorectal cancer [J]. *Gastroenterology*, 2005, 129: 156-169.
- [10] Kudo T, Ikeda M, Nishikawa M, Yang Z, Ohno K, Nakagawa K, et al. The RASSF3 candidate tumor suppressor induces apoptosis and G<sub>1</sub>-S cell-cycle arrest via p53 [J]. *Cancer Res*, 2012, 72: 2901-2911.
- [11] Eckfeld K, Hesson L, Vos M D, Bieche I, Latif F, Clark G J. RASSF4/AD037 is a potential ras effector/tumor suppressor of the RASSF family [J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 8688-8693.
- [12] Allen N P, Donninger H, Vos M D, Eckfeld K, Hesson L, Gordon L, et al. RASSF6 is a novel member of the RASSF family of tumor suppressors [J]. *Oncogene*, 2007, 26: 6203-6211.
- [13] Schagdarsurengin U, Richter A M, Wöhler C, Dammann R H. Frequent epigenetic inactivation of RASSF10 in thyroid cancer [J]. *Epigenetics*, 2009, 4: 571-576.
- [14] Wei Z, Chen X, Chen J, Wang W, Xu X, Cai Q. RASSF10 is epigenetically silenced and functions as a tumor suppressor in gastric cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 432: 632-637.
- [15] Ferlay J, Shin H R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin D M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127: 2893-2917.
- [16] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63: 11-30.
- [17] Hill V K, Underhill-Day N, Krex D, Robel K, Sangan C B, Summersgill H R, et al. Epigenetic inactivation of the RASSF10 candidate tumor suppressor gene is a frequent and an early event in gliomagenesis [J]. *Oncogene*, 2011, 30: 978-989.