

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.02.003

❖ 基础研究 ❖

RhoA 在乳腺癌中的表达及与淋巴管生成、淋巴结转移的关系

王鹏, 王遵义, 邵建强, 张勤, 张辉

(沧州市中心医院甲状腺乳腺外三科, 河北 沧州 061000)

【摘要】目的: 探讨 RhoA 在乳腺癌中的表达及与淋巴管生成、淋巴结转移的关系, 分析其潜在临床应用价值。**方法:** 选择 140 例乳腺癌患者和 70 例纤维瘤患者作为研究对象, 收集其手术切除石蜡标本, 采用免疫组化 S-P 法测定 RhoA 表达并标记淋巴管, 对淋巴管密度 (LVD) 进行计数。分析 RhoA 在乳腺癌中的表达情况与 LVD 以及临床病理学参数之间的关系。**结果:** 乳腺癌患者 RhoA 表达的阳性率和 LVD 值均高于纤维瘤患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。经 Spearman 相关性分析显示乳腺癌组织中 RhoA 表达与淋巴结转移、临床分期以及 LVD 值均呈现正相关 ($P < 0.05$)。**结论:** 乳腺癌中 RhoA 蛋白的表达可以促进乳腺癌淋巴管的新生, 与淋巴结转移、临床分期以及 LVD 值均呈现正相关, 可为乳腺癌淋巴道的转移抑制提供新的研究方向, 具有一定的临床应用价值。

【关键词】 乳腺癌; RhoA; 淋巴管生成; 淋巴结转移

【中图分类号】 R737.9 **【文献标志码】** A

Expression of RhoA in breast cancer and its relationship with lymphangiogenesis and lymph node metastasis

WANG Peng, WANG Zun-yi, SHAO Jian-qiang, ZHANG Qin, ZHANG Hui

(Department of Thyroid and Breast Surgery III, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061000, Hebei, China)

【Abstract】 Objective: To explore the expression of RhoA in breast cancer and its relationship with lymphangiogenesis and lymph node metastasis, analyze the relationship between the two, and to analyze its potential clinical application value. **Methods:** 140 patients with breast cancer and 70 patients with fibroids were selected as the research objects. The paraffin specimens were collected by surgical excision, RhoA expression was measured by immunohistochemical S-P method, and lymphatic vessels were also labeled by immunohistochemical S-P method, the lymphatic vessel density (LVD) was counted. The relationship between RhoA expression in breast cancer and LVD and clinicopathological parameters were analyzed. **Results:** The positive rate of RhoA expression and LVD value in breast cancer patients were significantly higher than those in fibroids, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Correlation analysis by Spearman showed that RhoA expression in breast cancer tissues was positively correlated with lymph node metastasis, clinical stage, and LVD value ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of RhoA protein in breast cancer can promote the formation of lymphatic vessels in breast cancer, and it is positively correlated with lymph node metastasis, clinical stage and LVD value, which can provide a new research direction for the inhibition of lymph node metastasis in breast cancer and has certain clinical application value.

【Key words】 Breast cancer; RhoA; Lymphangiogenesis; Lymph node metastasis

乳腺癌是妇女最为常见的恶性肿瘤之一, 且发病率逐渐上升, 大部分死亡均因癌细胞发生转移所引起, 其中最主要的转移方式为淋巴道转移, 故而对乳腺癌患者的淋巴道转移进行控制可以有效降低乳腺癌致死率^[1-2]。Rho 蛋白是一种小分子蛋白, 具有一定程度的酶活性, 在细胞增殖和分裂过程中有重要的生物学作用, 一般通过下游靶效应对细胞骨架

活动进行调节, 对细胞变形转移具有重要开关作用^[3-4]。研究^[5]显示, 肿瘤的发生、发展与 Rho 蛋白存在一定相关性, 主要包括新生血管形成、转移和侵袭细胞凋亡以及肿瘤增殖和生长等。RhoA 作为 Rho 家族蛋白一员, 在多种肿瘤组织高水平表达, 并与肿瘤恶性程度关系密切, 在肿瘤转移及发生中起着重要的作用^[6]。本研究探讨 RhoA 在乳腺癌中的表达及与淋巴管生成、淋巴结转移的关系, 分析其潜

在临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择沧州市中心医院 2016 年 3 月至 2019 年 12 月收治的 140 例乳腺癌患者和 70 例纤维瘤患者作为研究对象,收集其手术切除石蜡标本,其中乳腺癌患者年龄(47.85 ± 3.21)岁。按照临床分期^[7]为 I 期 46 例、II 期 62 例、III 期 20 例和 IV 期 12 例。本研究经本院伦理委员会批准执行,所有患者均同意并签署知情协议书。纳入标准:其中乳腺癌组患者均经病理学检验明确诊断者,且排除合并严重心肝肾功能障碍者,所有患者及家属同意并签署知情协议书者;乳腺纤维瘤符合乳腺纤维腺瘤诊治专家共识^[8]中的相关诊断标准。排除标准:排除妊娠哺乳期患者,合并心肝肾功能障碍者;排除凝血功能障碍者;依从性差,中途退出者。

1.2 仪器和试剂

电热恒温水浴箱(北京市医疗设备厂)、烘片机、石蜡切片机、漂烘处理仪、包埋机以及脱水机(德国 LEICA),显微镜(OLYMPUS)。氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(货号 SK2020)均购于上海科顺生物科技有限公司,浓缩型抗人 RhoA 单克隆抗体(货号 TL-102)购于北京科昕生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 资料收集 收集乳腺癌患者年龄、肿瘤大小、淋巴结转移、ER、PR、HER-2、临床分期等相关资料。

1.3.2 免疫组织化学染色 采用 S-P 法对患者标本 RhoA 表达情况进行测定^[9],采用常规的脱蜡和水化操作对石蜡切片进行处理,之后通过 pH6.0 的高压柠檬酸盐缓冲液对其抗原进行修复处理。将下边同业进行依次滴加处理,具体如下:过氧化酶阻断液、非免疫性动物血清,分别在室温条件下孵育 10 min,100 mL 的第一抗体(碱性磷酸酶标记的羊抗鼠一抗),之后室温条件下孵育 60 min,第二抗体(辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗)、链菌素抗生素-过氧化物酶溶液,分别在室温条件下孵育 10 min,最后将 DAB 显色剂(新鲜配置)滴加其中,显色 5 min。并在显微镜下进行染色观察。通过自来水进行冲洗、苏木素进行复染、脱水和透明处理,并进行中性树脂封片处理。

1.3.3 判断结果 采用改良后的 Tanaka 定量计分法进行结果判定^[10],采用具有代表性的 5 个视野区域,在 200 倍镜下进行阳性细胞的计数和显色强度判定,其中阳性细胞百分率不小于 75% 为 4 分,

50% ~ 75% 为 3 分,25% ~ 50% 为 2 分,5% ~ 5% 为 1 分,阳性细胞百分率不超过 5%,为 0 分。显色强度棕褐色为 3 分,棕黄色为 2 分,浅黄色为 1 分,未着色为 0 分,两项相乘,即可得计算平均值。按照得分情况将其分为 4 个等级,其中 >9 分为强阳性(+++),5~8 分为中度阳性(++),2~4 分为弱阳性(+),0~1 分为阴性(-),其中 >1 分可判定为阳性,≤1 分判定为阴性。

1.3.4 淋巴管的判定和计数方法 参考 Weidner 推荐的方法对其淋巴管计数和判定进行分析^[11],被染成棕黄色的内皮细胞簇或者单个内皮细胞连成的不闭合或者闭合的线状管腔,即可作为一个可以计数的微淋巴管,被确定的首先要在 200 倍显微镜下进行微淋巴管密度(LMVD)最高区域的选择,之后再在 200 倍显微镜下选择 5 个显微视野,淋巴管密度(LVD)值即为计数平均值/镜下面积(0.74 mm²)。

1.4 统计学分析

采用统计学专用软件 SPSS 20.00 对进行分析。计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,两样本比较采用独立样本 *t* 检验;计数资料采用 [*n*(%)]表示,采用卡方检验或 Fisher 精确检验;Spearman 相关性分析对 RhoA 在乳腺癌中的表达及与淋巴管生成、淋巴结转移的相关性进行分析。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 RhoA 的表达分布及 LVD 值水平分析

纤维瘤标本阴性表达,见图 1。乳腺癌患者 RhoA 阳性表达,见图 2。乳腺癌患者 RhoA 表达的阳性率和 LVD 值均高于纤维瘤患者,差异具有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 RhoA 的表达分布及 LVD 值水平分析 [$\bar{x} \pm s, n(\%)$]

组别	阳性	LVD
乳腺癌(<i>n</i> = 140)	94(67.14)	11.26 ± 0.69
纤维瘤(<i>n</i> = 70)	7(10.00)	4.58 ± 0.34
<i>t</i> / <i>χ</i> ² 值	48.234	72.657
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

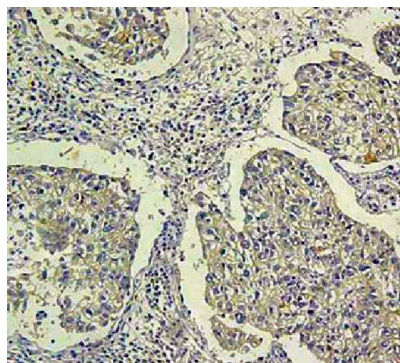


图 1 纤维瘤组织阴性(SP×200)

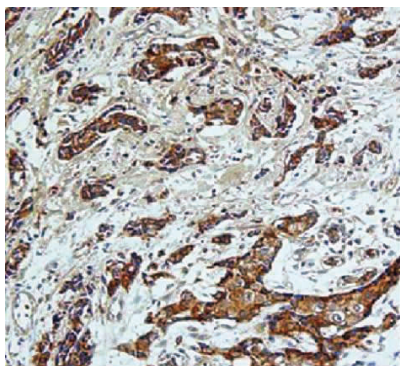


图2 乳腺癌组织阳性表达(SP×200)

2.2 乳腺癌组织中的 LVD 与 RhoA 表达的相关性

经 Spearman 相关性分析显示,乳腺癌组织中的 LVD 与 RhoA 表达呈现正相关($r = 0.315, P = 0.004$)。

2.3 乳腺癌组织中的 RhoA 表达与其临床病理参数的关系

乳腺癌组织中的 RhoA 表达与其年龄、肿瘤大小、孕激素受体(PR)、雌激素受体(ER)以及 HER-2 无相关性,与淋巴结转移($r = 0.783, P < 0.001$)和临床分期($r = 0.654, P < 0.001$)呈现正相关。见表 2。

表 2 乳腺癌组织中的 RhoA 表达与其临床病理参数的关系[n(%)]

项目	RhoA 阳性(n=94)	RhoA 阴性(n=46)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)			0.006	0.936
≥50	50(53.19)	24(52.17)		
<50	44(46.81)	22(47.83)		
肿瘤大小(cm)			0.185	0.667
≥2	48(51.06)	26(56.52)		
<2	46(48.94)	20(43.48)		
淋巴结转移			23.479	<0.001
有	70(74.47)	6(13.04)		
无	24(25.53)	40(86.96)		
ER			0.178	0.673
阳性	44(46.81)	24(52.17)		
阴性	50(53.19)	22(47.83)		
PR			0.075	0.785
阳性	54(57.45)	28(60.87)		
阴性	40(42.55)	18(39.13)		
HER-2			0.225	0.635
阳性	34(36.17)	14(30.43)		
阴性	60(63.83)	32(69.57)		
临床分期			6.656	0.001
I-II 期	64(68.09)	44(95.65)		
III-IV 期	30(31.91)	2(4.35)		

3 讨论

Rho 蛋白家族是一种具有细胞内分子开关功能的 GTP 酶^[10-12],可以在细胞外信号的强烈刺激下,与鸟苷酸结合并水解,使其在失活性(结合 GDP)与

活性型(结合 GTP)之间循环^[13]。而对肌动蛋白细胞骨架的调节是 Rho 蛋白家族的重要功能,另外,在调控细胞增殖、凋亡及恶性肿瘤细胞转移或浸润等方面起着较为重要的作用^[14]。Rho 蛋白通过改变细胞骨架组装,调控细胞迁移,进而影响肿瘤转移的整个过程^[15]。研究^[11]显示,RhoA 蛋白是 Rho 蛋白家族成员之一,与肿瘤细胞的侵袭和迁移关系密切。Arnold 等^[16]研究显示,与正常组织相比,结肠癌、乳腺癌及肺癌组织中 RhoA 蛋白的表达率相对较高。Wang 等^[17]认为,消化道肿瘤中 RhoA 蛋白的表达率明显较高。

微血管密度是评估血管生成的“金标准”,即对新生血管数目采用免疫组化法进行检测^[18]。而本文将 LVD 作为评估淋巴管生成的重要指标。文中结果显示,乳腺癌组织中存在一定量的新生淋巴管,而新生淋巴管的内皮存在相对较大的间隙,同时周围的足细胞也相对较少;且与纤维瘤相比,乳腺癌组织中的 LVD 值较高^[19]。这表明新生淋巴管对乳腺癌的远处转移及淋巴结的生成具有重要作用,而淋巴管数目的增加也提高了肿瘤细胞向管腔进入的风险^[20]。文中相关性结果提示 RhoA 蛋白的表达对肿瘤淋巴道转移和淋巴管新生具有一定的促进作用。研究^[21-22]显示,RhoA 蛋白的高水平表达还可一定程度刺激 VEGF 在肿瘤细胞株中的表达上调,对淋巴管新生的诱导效果还可被可溶性的 VEGFR-3 所阻断,故而 RhoA 蛋白还可能通过对 VEGF 和 VEGFR-3 进行调节,进而间接性的促进淋巴管的生成。另外,与 I-II 期乳腺癌患者相比,III-IV 期患者的 RhoA 蛋白阳性表达率更高,表明其与乳腺癌的发生发展以及转移关系较为密切。

综上所述,乳腺癌中 RhoA 蛋白的表达可以促进乳腺癌淋巴管的新生,与淋巴结转移、临床分期以及 LVD 值均呈正相关,可为乳腺癌淋巴道的转移抑制提供新的研究方向,具有一定的临床应用价值。

参考文献

- [1] Vautrin-Glabik A, Béatrice Botia, Kischel P, et al. IP 3 R3 silencing induced actin cytoskeletal reorganization through ARHGAP18/RhoA/mDia1/FAK pathway in breast cancer cell lines [J]. Biochimica Et Biophysica Acta Molecular Cell Research, 2018, 1865(7):945-958.
- [2] Andersson Y, Bergkvist L, Frisell J, et al. Long-term breast cancer survival in relation to the metastatic tumor burden in axillary lymph nodes [J]. Breast Cancer Research & Treatment, 2018, 171(2):359-369.
- [3] Al-Shboul O, Alfaqih M, Mustafa A, et al. Developmental changes in contraction of gastric smooth muscle cells in rats correlate with their differences in RhoA/ROCK pathway [J]. The journal of bio-

- medical research, 2019, 6(5): 323 - 331.
- [4] Mohammad G, Alsharif HM, Siddiquei MM, *et al.* Rho-Associated Protein Kinase-1 Mediates the Regulation of Inflammatory Markers in Diabetic Retina and in Retinal Muller Cells [J]. *Annals of clinical & laboratory science*, 2018, 48(2): 137 - 145.
- [5] Yi H, Wang K, Jin H, *et al.* Overexpression of Rho-Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 2 Is Correlated with Clinical Progression and Poor Prognosis in Breast Cancer [J]. *Medical science monitor international medical journal of experimental & clinical research*, 2018, 24(9): 4776 - 4781.
- [6] Zhong Z, Grasso L, Sibilla C, *et al.* Prion-like protein aggregates exploit the RHO GTPase to cofilin signaling pathway to enter cells [J]. *Embo Journal*, 2018, 37(6): e97822 - e97829.
- [7] 刘宇, 单本杰, 沈国栋, 等. AP1S1 基因在乳腺癌中的表达与临床意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(10): 1535 - 1541.
- [8] 王殊, 谢菲. 乳腺纤维腺瘤诊治专家共识 [J]. *中国实用外科杂志*, 2016, 36(7): 752 - 754.
- [9] 张宇, 桑奔, 朱贤龙, 等. Hugel-1 通过激活 RhoA 促进脑胶质瘤细胞的侵袭和迁移 [J]. *中华神经外科杂志*, 2018, 34(12): 1274 - 1280.
- [10] 唐秋琳, 郎楠, 李黎博, 等. 鸟苷酸交换因子 P92GEF 通过靶向调控 RhoA 抑制肿瘤细胞增殖侵袭 [J]. *现代生物医学进展*, 2019, 5(16): 3018 - 3027.
- [11] 王晓杰, 滕宇, 顾勖, 等. ROCK1 基因敲除对乳腺癌细胞系迁移及侵袭的影响 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2019, 31(3): 25 - 31.
- [12] Ozdemir ES, Jang H, Gursoy A, *et al.* Unraveling the molecular mechanism of interactions of the Rho GTPases Cdc42 and Rac1 with the scaffolding protein IQGAP2 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(10): 25 - 43.
- [13] Armando GP, Luca P. Irreversible Activation of Rho-activated Kinases Resulted from Evolution of Proteolytic Sites within Disordered Regions in Coiled-coil Domain [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 8(2): 2 - 12.
- [14] 孙光顺, 梅杰, 周萌, 等. RhoA 在肿瘤中的作用机制 [J]. *国际肿瘤学杂志*, 2019, 46(11): 686 - 691.
- [15] 丁宇, 陈薇, 李世军. 勿动蛋白及其信号通路分子 Rho A 与 Rho 相关蛋白激酶在高血压心肌肥厚与纤维化中的作用 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2019, 10(6): 641 - 644.
- [16] Arnold C, Demirel E, Feldner A, *et al.* Hypertension-evoked RhoA activity in vascular smooth muscle cells requires RGS5 [J]. *FASEB journal*, 2018, 32(4): 2021 - 2035.
- [17] Wang J, Li H, Yao Y, *et al.* β -Elemene Enhances GAP-43 Expression and Neurite Outgrowth by Inhibiting RhoA Kinase Activation in Rats with Spinal Cord Injury [J]. *Neuroscience*, 2018, 383(6): 12 - 21.
- [18] Karoor V, Fini MA, Loomis Z, *et al.* Sustained Activation of Rho GTPases Promotes a Synthetic Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Phenotype in Npr1 Null Mice [J]. *Arteriosclerosis*, 2018, 38(1): 154 - 163.
- [19] 裴蓓, 成琳. 不同分子分型乳腺癌患者预后与淋巴结转移率的相关性分析 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(7): 776 - 781.
- [20] Schnepf V, Vlot AC, Kugler K, *et al.* Barley susceptibility factor RACB modulates transcript levels of signalling protein genes in compatible interaction with *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(2): 393 - 404.
- [21] Belal H, Nakashima M, Matsumoto H, *et al.* De novo variants in RHOBTB2, an atypical Rho GTPase gene, cause epileptic encephalopathy [J]. *Human Mutation*, 2018, 39(8): 1070 - 1075.
- [22] Inês GC, Richards DM, Metz J, *et al.* A role for Mitochondrial Rho GTPase 1 (MIRO1) in motility and membrane dynamics of peroxisomes [J]. *Traffic*, 2018, 19(3): 52 - 59.
- (收稿日期: 2020 - 05 - 06 修回日期: 2020 - 07 - 22)