

RASSF1A 在乳腺癌中表达及临床意义

杜旺,汤铜,钱波,李佳,郑璐,童婷婷

(安徽医科大学第二附属医院普外科,安徽 合肥 230601)

摘要:**目的** 研究乳腺癌及癌旁组织中 RASSF1A 的表达情况,并探讨其与临床、病理资料的相关性。**方法** 收集 60 例乳腺癌及相应癌旁组织,通过免疫组化染色检测 RASSF1A 的表达情况;统计 60 例临床病例的各项临床、病理资料,并分析其相关性。**结果** RASSF1A 在乳腺癌组织中的表达阳性率为 35% (21/60),而在癌旁组织中 86.7% (52/60),癌旁组织中 RASSF1A 的表达明显高于乳腺癌组织 ($P < 0.05$);RASSF1A 的表达与淋巴结转移有无、组织学分级、脉管侵犯、人类表皮生长因子受体 2 (HER-2)、Ki-67 表达有关;TMN 分期中的 I 期、II 期以及部分 III A 期 (T3N1MO) 患者 RASSF1A 表达 48.4% (15/31) 高于 III 期 (除 T3N1MO 外) 患者 20.7% (6/29) ($\chi^2 = 5.053, P = 0.025$)。**结论** 相较于癌旁组织,乳腺癌组织中存在 RASSF1A 表达缺失的情况,其缺失表达与和淋巴结转移有无、组织学分级、脉管侵犯、HER-2、Ki-67、TMN 分期密切相关。

关键词: RASSF1A;乳腺癌;临床意义

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.03.019

Analysis of RASSF1A expression in breast cancer and its clinical significance

DU Wang, TANG Tong, QIAN Bo, LI Jia, ZHENG Lu, TONG Tingting

(Department of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230601, China)

Abstract:**Objective** To study the expression of RASSF1A in breast cancer and adjacent tissues, and to investigate the correlation between the expression of RASSF1A and clinical and pathological parameters. **Methods** Sixty cases of breast cancer and corresponding adjacent tissues were collected. The expression of RASSF1A was detected by immunohistochemical staining. The clinical and pathological parameters of 60 cases were collected and analyzed. **Results** The positive rate of RASSF1A expression in breast cancer tissues was 35% (21/60), and 86.7% (52/60) in the adjacent tissues. The positive rate of RASSF1A expression in adjacent tissues was significantly higher than that in the breast cancer tissues ($P < 0.05$). The expression of RASSF1A was correlated with lymph node metastasis, histological grade, vascular invasion, HER-2 and Ki-67. The positive rate of RASSF1A expression was 48.4% (15/31) in the stage I, II and III A (T3N1MO), and it was 20.7% (6/29) in patients with stage III (except for T3N1MO) ($\chi^2 = 5.053, P = 0.025$). **Conclusions** The expression of RASSF1A is absent in the breast cancer tissues compared with the adjacent tissues. It was correlated with lymph node metastasis, histological grade, vascular invasion, HER-2, Ki-67 and TMN stage.

Keywords: RASSF1A; breast cancer; clinical significance

乳腺癌是全球女性中最常见的恶性肿瘤之一,也是女性癌症死亡的首要原因。全球癌症数据显示,2012 年新发乳腺癌病例约 170 万,死亡病例约 52 万,新增病例和死亡病例分别占据全球女性癌症的 25% 和 15%^[1]。在中国情况同样严重,2016 年全国肿瘤登记中心最新发布数据显示,乳腺癌发病率和病死率分别占女性恶性肿瘤第 1 位和第 6 位^[2]。乳腺癌病因相当复杂,与遗传因素、激素、免疫及各种环境因素有关。随着人们对乳腺癌发病

相关基因和分子机制认识的加深,许多引起细胞增殖或抑制凋亡的分子已经成为肿瘤治疗的新靶点^[3],其中有些可能成为推测乳腺癌患者预后的候选标志物^[4]。自被发现以来,RASSF1A 基因已经被广泛研究。多项研究表明,RASSF1A 几乎在全身正常组织器官中均表达,而在多种实体肿瘤中存在表达缺失^[5]。本文旨在研究 RASSF1A 在乳腺癌以及癌旁组织中的表达情况,并分析其临床意义,探讨其在乳腺癌发生发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 临床标本 收集安徽医科大学第二附属医院普外科 2015 年 3 月—2016 年 3 月经病理确诊的 60

基金项目:安徽医科大学校科研基金联合资助项目 (2015xkj111)

通信作者:汤铜,男,主任医师,硕士生导师,研究方向:甲状腺、乳腺肿瘤, E-mail:tt20164@126.com

例乳腺癌患者的癌组织及相应癌旁组织。其中女性 59 例,男性 1 例,年龄 34 ~ 74 岁,中位年龄 48 岁。所有患者术前均未进行新辅助化疗或放疗。标本离体后即福尔马林浸泡固定备用。本研究经医院医学伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。

1.2 临床和病理资料 根据所取标本对应住院号,在患者病历档案中提取所需各项临床、病理及影像资料,包括患者性别、年龄、肿瘤最大直径、淋巴结转移情况、肿瘤组织学分级、脉管侵犯情况、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、人类表皮生长因子受体 2(HER-2)、Ki-67、TMN 分期等资料。

1.3 试剂材料 RASSF1A 单克隆抗体 (Cat # ab23950 Abcam) 购自 Abcam 公司;免疫组化检测试剂盒购自北京中山金桥生物技术有限公司;石蜡切片制作所需材料试剂由安徽医科大学病理教研室提供。

1.4 制作石蜡切片、免疫组化染色及判定 将“1.1”项目中所固定好的标本经脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、贴片制成石蜡切片。按照试剂说明书进行染色步骤,并应用已知阳性切片作为阳性对照,用磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照。

RASSF1A 蛋白定位于胞质内,以棕色、棕褐色、黄色颗粒为阳性表达。结果判定标准,选取不重复的 5 个视野,按染色强度及阳性细胞所占的百分比综合计分。染色强度:无色计为 1 分,黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;阳性细胞数:小于等于总数的 10% 计为 1 分;在 >10% ~ 50% 之间计为 2 分; >50% 计为 3 分。染色强度得分与阳性细胞数得分相乘,1 分计为阴性“-”;2 ~ 4 分计为阳性“+”;≥ 6 分计为强阳性“+++”。

1.5 统计学方法 采用 SPSS17.0 统计软件进行处理分析,数据采用 χ^2 检验、Fisher 确切概率法等进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RASSF1A 在乳腺癌及癌旁组织表达情况

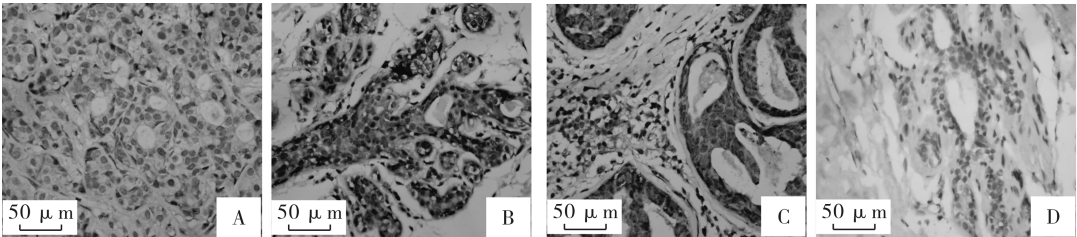
RASSF1A 蛋白定位于细胞质内,以棕色、黄色、棕褐色颗粒沉淀为阳性表达(见图 1)。经观察分析,在 60 例乳腺癌组织中,有 21 例呈阳性表达,而在 60 例癌旁组织中 52 例呈阳性表达。RASSF1A 蛋白在癌旁组织表达阳性率高于癌组织 ($P < 0.05$)。

2.2 RASSF1A 在乳腺癌组织中表达与相关临床病理资料相关性分析

所收集 60 例乳腺癌临床标本中,有 21 例 RASSF1A 表达阳性。经分析,RASSF1A 蛋白的表达情况与性别、年龄、肿瘤最大直径、ER、PR 状态无相关性 ($P > 0.05$),而与有无淋巴结转移、组织学分级、脉管侵犯、HER-2、Ki-67 有相关性 ($P < 0.05$)。其中无淋巴结转移者 RASSF1A 表达阳性率为 60.0% (12/20),有淋巴结转移者 RASSF1A 表达阳性率为 22.5% (9/40);组织学分级 I 级者表达阳性率为 72.7% (8/11),组织学分级 II 级者表达阳性率为 35.5% (11/31),组织学分级 III 级者表达阳性率为 11.1% (2/18);有脉管侵犯者表达阳性率为 18.2% (4/22),无脉管侵犯者表达阳性率为 44.7% (17/38);HER-2 扩增者阳性表达率为 16.7% (5/30),HER-2 未扩增者阳性表达率为 56% (14/25)。Ki-67 表达 ≤ 14% 者阳性表达率为 54.17% (13/24),Ki-67 表达 > 14% 者阳性表达率为 22.2% (8/36)。其中 HER-2 状态检测首先经安徽医科大学第二附属医院病理科应用免疫组织化学染色方法检测,评分“0”或者“1+”的为 HER-2 阴性;评分“2+”者为交界性,需要进一步检测;评分“3+”为 HER-2 阳性。所收集 60 例临床病例中,HER-2 评分为“2+”的患者有 5 例未选择进一步做 FISH 检测。相关统计结果见表 1。

2.3 RASSF1A 在乳腺癌组织中表达与 TMN 分期相关性分析

经过提取病案资料分析,TMN 分期



注:A. 乳腺癌组织中 RASSF1A 蛋白表达阴性;B. 癌旁组织中 RASSF1A 蛋白表达阳性;C. 乳腺癌组织中 RASSF1A 蛋白表达阳性;D. 癌旁组织中 RASSF1A 蛋白表达阴性。

图 1 免疫组化检测 RASSF1A 在乳腺癌及癌旁组织表达情况 (×200)

表 1 60 例患者临床病理资料的相关性分析

项目	RASSF1A (+)	RASSF1A (-)	χ^2 值	P 值
性别			0.000	>0.99
男	1	1		
女	20	38		
年龄/岁			0.110	0.740
≤50	12	24		
>50	9	15		
肿瘤最大直/cm			1.071	0.585
≤2	7	9		
>2~5	11	21		
>5	3	9		
有无淋巴结转移			8.241	0.004
无	12	8		
有	9	31		
淋巴结转移数目/个			0.436	0.087
1~3	5	14		
4~9	3	13		
≥10	1	4		
组织学分级			11.401	0.003
I 级	8	3		
II 级	11	20		
III 级	2	16		
脉管侵犯			4.139	0.038
有	4	18		
无	17	21		
ER			0.170	0.681
阳性	13	22		
阴性	8	17		
PR			0.280	0.597
阳性	12	25		
阴性	9	14		
HER-2			9.330	0.002
阳性	5	25		
阴性	14	11		
Ki-67 表达			6.549	0.011
≤14%	13	11		
>14%	8	28		

注:各组织学分级之间采用 χ^2 检验的多重比较。

为局部早期(Ⅰ期、Ⅱ期以及部分ⅢA期(T3N1MO))的患者有31例,其中 RASSF1A 蛋白阳性表达率为 48.4%(15/31)。TMN 分期为局部晚期[Ⅲ期(除 T3N1MO 外)、Ⅳ期]的患者有29例,其中 RASSF1A 蛋白阳性表达率为 20.7%(6/29),乳腺癌局部早期患者中 RASSF1A 蛋白阳性表达率高于局部晚期患者,差异有统计学意义($\chi^2=5.053$, $P=0.025$)。

3 讨论

RASSF1A 基因是 2000 年 Dammann 等^[6]在研究肺癌时通过酵母双杂交筛选法首次发现其位于人类 3 号染色体短棒 2 区第 1 条带第 2 亚带(3p21.3)上。RASSF1A 基因是 RASSF 中的一员。RASSF 包含了 10 个成员,分别是 RASSF1~10^[7]。其中 RASSF1~6 拥有 C 端 Ras 相关区域,而 RASSF7-10 则包含了 N 端 Ras 相关区域^[8]。其中,RASSF1 基因包含 8 个外显子(1 α 、1 β 、2 $\alpha\beta$ 、2 γ 、3、4、5 和 6)。通过不同启动子利用和可变剪接,RASSF1 基因在人体中可以产生 7 种转录本(RASSF1A-G),目前研究最多的是 RASSF1A 和 RASSF1C。RASSF1A 由外显子 1 α 、2 $\alpha\beta$ 、3、4、5、6 编码,其中外显子 3、4、5、6 编码 Ras 相关区域^[5,7]。RASSF1A 的 cDNA 全长 1873bp,其包含的开放阅读框架(ORF)编码一个分子量为 38.8kD 含有 340 个氨基酸的蛋白多肽^[6]。RASSF1A 蛋白含有多个重要的区域,从 N 端到 C 端分别为 SH3 结合区域、C1/DAG 结合域即蛋白激酶 C 保守区 1、ATM 激酶磷酸化位点、Ras 相关区域和一个 SARAH 序列^[9]。多项研究发现,RASSF1A 所包含的几个特定区域可能对其作为抑癌基因具有重要作用^[10-13]。

研究发现 RASSF1A 在多种人体肿瘤中存在表达缺失,而其表达缺失的主要原因是启动子 CPG 岛甲基化^[14-17]。作为一种抑癌基因,其缺失表达与肿瘤的发生、发展密切相关^[18]。本研究中,通过对乳腺癌及癌旁组织中 RASSF1A 表达量的检测发现,乳腺癌组织中的 RASSF1A 表达阳性率为 35%(21/60),而在癌旁组织中表达阳性率 86.7%(52/60),癌旁组织中 RASSF1A 蛋白的表达阳性率明显高于癌组织($P<0.05$),也证实 RASSF1A 的缺失表达可能参与肿瘤的发生过程。

有关 RASSF1A 的研究非常广泛,但有关其抑癌具体机制目前尚未完全明确。目前主要观点认为有促进凋亡、调节细胞周期以及促进微管稳定性三种作用机制及途径^[9]。Dammann 等^[6]首次发现 RASSF1A 时,便指出使肺癌细胞重新表达

RASSF1A 基因可抑制其集落形成、非锚定生长以及裸鼠成瘤的能力。研究发现,RASSF1A 的过表达能够促进细胞凋亡、细胞周期停滞和降低肿瘤细胞的致瘤性^[19]。除了发现 RASSF1A 蛋白在癌组织和癌旁组织表达差异有统计学意义,本研究也发现,在乳腺癌组织中 RASSF1A 表达和有无淋巴结转移、组织学分级、有无脉管侵犯、HER-2 状态、Ki-67 有相关性($P < 0.05$)。并且,TMN 分期为早期[Ⅰ期、Ⅱ期以及部分ⅢA 期(T3N1MO)]的患者 RASSF1A 蛋白阳性表达率为 48.4% (15/31)。TMN 分期为晚期[Ⅲ期(除 T3N1MO 外)、Ⅳ期]RASSF1A 蛋白阳性表达率为 20.7% (6/29) ($P < 0.05$)。这也是提示着,RASSF1A 在乳腺癌的发展过程中可能有重要作用。

综上所述,本研究进一步证实了 RASSF1A 作为一种候选抑癌基因的可行性。其在乳腺癌组织中低表达,而在癌旁组织高表达。有关临床、病理及影像资料与 RASSF1A 表达的相关性分析提示,RASSF1A 可以作为一种潜在的乳腺癌临床预后判断指标。

参考文献

[1] TORRE LA,BRAY F,SIEGEL RL,et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*,2015,65(2):87-108.

[2] 陈万青,郑荣寿,张思维,等. 2012 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. *中国肿瘤*,2016,25(1):1-8.

[3] SAAL LH,HOLM K,MAURER M,et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors,node metastasis,and ERBB2,and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma [J]. *Cancer Res*,2005,65(7):2554-2559.

[4] 田多,汤铜,钱波,等. 叉头盒蛋白 A1 (FOXA1) 在乳腺癌中的表达及其临床意义 [J]. *安徽医药*,2015,19(9):1691-1694.

[5] HESSON LB,COOPER WN,LATIF F. Evaluation of the 3p21.3 tumour-suppressor gene cluster [J]. *Oncogene*, 2007, 26 (52): 7283-7301.

[6] DAMMANN R,LI C,YOON JH,et al. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3 [J]. *Nat Genet*,2000,25(3):315-319.

[7] RICHTER AM,PFEIFER GP,DAMMANN RH. The RASSF pro-

teins in cancer;from epigenetic silencing to functional characterization [J]. *Biochim Biophys Acta*,2009,1796(2):114-128.

[8] SHERWOOD V,RECINO A,JEFFRIES A,et al. 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(2):303-311.

[9] GORDON M,BAKSH S. RASSF1A;Not a prototypical Ras effector [J]. *Small GTPases*,2011,2(3):148-157.

[10] FOLEY CJ,FREEDMAN H,CHOO SL,et al. Dynamics of RASSF1A/MOAP-1 association with death receptors [J]. *Mol Cell Biol*,2008,28(14):4520-4535.

[11] AVRUCH J,XAVIER R,BARDEESY N,et al. Rassf family of tumor suppressor polypeptides [J]. *J Biol Chem*,2009,284(17):11001-11005.

[12] HAMILTON G,YEE KS,SCRACE S,et al. ATM regulates a RASSF1A-dependent DNA damage response [J]. *Curr Biol*,2009,19(23):2020-2025.

[13] THALER S,HÄHNEL PS,SCHAD A,et al. RASSF1A mediates p21Cip1/Waf1-dependent cell cycle arrest and senescence through modulation of the Raf-MEK-ERK pathway and inhibition of Akt [J]. *Cancer Res*,2009,69(5):1748-1757.

[14] NILSSON TK,LÖF-ÖHLIN ZM,SUN XF. DNA methylation of the p14ARF,RASSF1A and APC1A genes as an independent prognostic factor in colorectal cancer patients [J]. *Int J Oncol*,2013,42(1):127-133.

[15] ZHONG S,YEO W,TANG MW,et al. Intensive hypermethylation of the CpG island of Ras association domain family 1A in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinomas [J]. *Clin Cancer Res*,2003,9(9):3376-3382.

[16] KUROKI T,TRAPASSO F,YENDAMURI S,et al. Promoter hypermethylation of RASSF1A in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*,2003,9(4):1441-1445.

[17] MURRAY PG,QIU GH,FU L,et al. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A tumor suppressor gene in Hodgkin's lymphoma [J]. *Oncogene*,2004,23(6):1326-1331.

[18] FERNANDES MS,CARNEIRO F,OLIVEIRA C,et al. Colorectal cancer and RASSF family—a special emphasis on RASSF1A [J]. *Int J Cancer*,2013,132(2):251-258.

[19] AGATHANGELOU A,COOPER WN,LATIF F. Role of the Ras - association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers [J]. *Cancer Res*,2005,65(9):3497-3508.

(收稿日期:2016-10-06,修回日期:2017-02-06)