

RIN1、SIAH2在胃癌组织中的表达及临床意义

高产, 王进, 杨丽敏

高产, 王进, 杨丽敏, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450052

高产, 在读硕士, 主要从事消化系统肿瘤的相关研究。

作者贡献分布: 此课题由高产与王进设计; 研究过程由所有作者共同完成; 论文写作由高产与杨丽敏完成。

通讯作者: 王进, 教授, 主任医师, 450052, 河南省郑州市建设东路1号, 郑州大学第一附属医院消化内科。

wangjin3@medmail.com.cn

电话: 0371-66862072

收稿日期: 2014-09-03 修回日期: 2014-10-08

接受日期: 2014-10-15 在线出版日期: 2014-12-08

Significance of expression of RIN1 and SIAH2 proteins in gastric carcinoma

Chan Gao, Jin Wang, Li-Min Yang

Chan Gao, Jin Wang, Li-Min Yang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Jin Wang, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe East Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. wangjin3@medmail.com.cn

Received: 2014-09-03 Revised: 2014-10-08

Accepted: 2014-10-15 Published online: 2014-12-08

Abstract

AIM: To examine the expression of Ras and Rab interactor 1 (RIN1) and seven in absentia homologue 2 (SIAH2) proteins in gastric carcinoma and to analyze their relationship with clinicopathological factors.

METHODS: The expression of RIN1 and SIAH2 was detected by immunohistochemistry in 80 gastric carcinoma and 40 normal gastric tissues.

RESULTS: The positive rates of RIN1 and SIAH2 protein expression were significantly higher in gastric carcinoma than in normal gastric tissues (61.2% vs 32.5%, 60.0% vs 27.5%, $P < 0.05$ for both). In gastric carcinoma, RIN1 expression was related to tumor size, clinical stage, histopathological grade, lymph node metastasis and depth of invasion ($P < 0.05$ for all), but not to patients' age or gender ($P > 0.05$ for both); SIAH2 expression was related to clinical

stage, histopathological grade, lymph node metastasis and depth of invasion ($P < 0.05$ for all), but not to tumor size ($P > 0.05$). There was a positive correlation between the expression of RIN1 and SIAH2 in gastric carcinoma ($r = 0.607$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: The overexpression of RIN1 and SIAH2 might play an important role in the progression, invasion and metastasis of gastric carcinoma, and they may be used as early diagnostic markers and therapeutic targets for gastric carcinoma.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: RIN1; SIAH2; Gastric carcinoma; Immunohistochemistry

Gao C, Wang J, Yang LM. Significance of expression of RIN1 and SIAH2 proteins in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(34): 5339-5343 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/5339.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i34.5339>

摘要

目的: 研究Ras及Rab作用因子1(Ras and Rab interactor 1, RIN1)、SIAH2在胃癌组织表达及其与临床病理因素的关系。

方法: 用免疫组织化学方法检测RIN1和SIAH2在80例胃癌及40例正常胃组织中的表达及相关性。

结果: RIN1和SIAH2蛋白阳性表达率胃癌中分别为61.2%和60.0%, 正常胃组织中分别为32.5%和27.5%, 胃癌组织与正常胃组织比较RIN1和SIAH2蛋白阳性表达率的差异有统计学意义($P < 0.05$), 胃癌中, RIN1表达与肿瘤大小、临床分期、组织学分级、浆膜浸润及淋巴结转移有关($P < 0.05$), 与性别、年龄无关($P > 0.05$), 而SIAH2表达与组织学分化程度、临床分期、淋巴结转移及浆膜浸润有关($P < 0.05$), 与肿瘤大小无关($P > 0.05$), RIN1和SIAH2在胃癌组织中的表达呈正相关($r =$

■背景资料

在我国胃癌属高发肿瘤, 近年来胃癌的发病有低龄化趋势, 但其早期诊断、治疗及预后仍不理想, 因而为胃癌的早期诊断及治疗寻找有效的生物学标志物成为目前的研究热点。研究表明Ras及Rab作用因子1(Ras and Rab interactor 1, RIN1)基因过表达加速MKN28细胞G₁期向S期转化促进细胞增殖, RIN可能成为胃癌治疗的一个潜在靶点, 进一步研究提出SIAH2可能作为乳腺癌治疗的靶点, 为乳腺癌的靶向治疗提供新的思路, 后续深入研究, 二者有望成为治疗胃癌新靶点。

■同行评议者

卢宁, 副主任医师, 中国人民解放军兰州军区乌鲁木齐总医院肿瘤科

■研发前沿

RIN1及SIAH2是近几年备受关注肿瘤标志物,参与多种肿瘤发生、发展。具体作用机制尚未完全阐明,更深层次分子生物学水平研究成为当前重点。后续深入研究,胃癌的靶向治疗提供新的思路。

0.607, $P < 0.01$).

结论: RIN1、SIAH2过表达在胃癌组织的发展及浸润转移中具有重要的作用,二者的表达可能与胃癌的不良预后密切相关,他们有望成为胃癌的早期诊断指标和治疗靶点。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: RIN1; SIAH2; 胃癌; 免疫组织化学

核心提示: Ras及Rab作用因子1(Ras and Rab interactor 1, RIN1)、SIAH2在胃癌及正常组织中表达有统计学意义, RIN1、SIAH2的表达可能与胃癌的不良预后密切相关,二者有望成为治疗胃癌新靶点。

高产, 王进, 杨丽敏. RIN1、SIAH2在胃癌组织中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2014; 22(34): 5339-5343 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/5339.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i34.5339>

0 引言

在我国胃癌属高发肿瘤,近年来胃癌的发病有低龄化趋势,但其早期诊断、治疗及预后仍不理想,因而为胃癌的早期诊断及治疗寻找有效的生物学标志物成为当前的研究焦点。Ras及Rab作用因子1(Ras and Rab interactor 1, RIN1)作为Ras蛋白的效应因子,可抑制Ras活性^[1]。Ras蛋白在调控细胞生长以及信号转导通路中起重要作用, RIN1作为Ras蛋白的效应因子,其在多种恶性肿瘤发生、发展中起重要作用^[2]。SIAH2作为一种保守泛素连接酶,可使底物蛋白发生泛素化降解而发挥调节作用。SIAH2蛋白可通过多种信号转导通路参与肿瘤发生、发展,分别是SPRY2/脯氨酸羟化酶3(prolyl hydroxylase, PHD3)/Ras/人低氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor, HIF-1 α)通路。SIAH2作为Ras信号转导通路中重要的调节蛋白之一,参与多种肿瘤发生、发展, Schmidt等^[3]研究表明,抑制SIAH2蛋白表达, Ras通路受阻,肿瘤生长受限。最近研究表明, RIN1在非小细胞肺癌^[4]和胃癌^[5]中表达均上调并与其临床病理特征密切相关, SIAH2研究大多集中在体外,国内对RIN1、SIAH2在胃癌方面的联合报道甚少,本研究通过联合检测二者在胃癌和正常组织中的表达,探讨二者在胃癌发生发展过程中的作用,为临床的诊断治疗及判断预后提供理论依据。

■相关报道

Giallongo等的研究提示RIN1促进肿瘤细胞增殖可能的作用靶点是G₁/S期, Shan等的研究显示RIN1在膀胱癌组织中的表达显著高于癌旁组织, RIN1的表达量与癌组织的分型、癌组织中的Ki-67表达正相关,谷小虎等研究表明RIN1基因过表达加速MKN28细胞G₁期向S期转化促进细胞增殖, RIN1可能成为胃癌治疗的一个潜在靶点。

1 材料和方法

1.1 材料 选取郑州大学第一附属医院2011-06/2013-12手术切除或内镜下切除存档蜡块120例,所有标本均经病理明确诊断。其中胃腺癌80例,男47例,女33例;平均年龄54.7岁 \pm 2.4岁,最大年龄76岁,最小年龄34岁;根据组织学分级:高分化腺癌27例,中低分化腺癌53例;临床分期(国际通用TNM分期): I / II期38例, III/IV期42例;有淋巴结转移33例,无淋巴结转移47例;侵及浆膜者54例,未侵及浆膜者26例,正常胃组织40例,所有胃癌患者术前均未接受过放射、化学和免疫治疗。兔抗人RIN1多克隆抗体及鼠抗人SIAH2抗体均购自北京博奥森公司, S-P试剂盒及DAB显色剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测RIN1、SIAH2的表达: 所有标本均经40 g/L甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μ m厚连续切片,常规脱蜡,高温高压修复,具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行,用PBS代替一抗作空白对照,用已知阳性切片作阳性对照。

1.2.2 免疫组织化学结果判定: RIN1蛋白阳性表达位于细胞质内,以胞浆着色判断阳性,呈棕黄色高表达, SIAH2蛋白阳性表达位于细胞核内,呈棕黄色颗粒。按染色强度: 0分无染色, 1分淡黄色, 2分黄色, 3分棕黄色, 每张切片在光镜下随机选取5个视野,每个视野计数200个细胞, 0分无阳性细胞, 1分阳性细胞 \leq 50%, 2分阳性细胞50%-75%, 3分阳性细胞 \geq 75%, 总分即为两者评分的乘积, 总分 \geq 4分为阳性表达,免疫组织化学染色由两位高年资病理科医师在双盲条件下进行评定。

统计学处理 采用SPSS17.0软件进行数据统计分析, 组间差异采用 χ^2 检验, 相关性研究采用Spearman等级相关分析, 以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 RIN1、SIAH2蛋白在胃癌及正常胃组织中表达 RIN1蛋白阳性表达位于细胞质及细胞核内,呈棕黄色高表达, SIAH2蛋白阳性表达位于细胞核内呈棕黄色颗粒(图1, 2), RIN1在胃癌中的阳性表达率为61.2%(49/80), 在正常胃组织中的阳性表达率为32.5%(13/40), 胃癌组织与正常胃组织比较RIN1阳性表达率的差异有统计学意义。

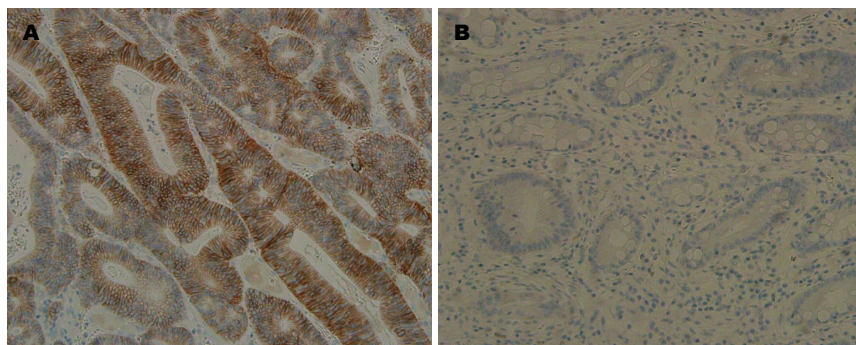


图 1 RIN1在各组织中表达(SP×200). A: 胃腺癌阳性表达; B: 正常胃组织阴性表达.

■创新盘点
RIN1在肺癌、卵巢癌、乳腺癌有相关报道, 国内外胃癌研究有限, SIAH2研究主要集中在体外, 然而, 国内对RIN1、SIAH2在胃癌方面的联合报道甚少.

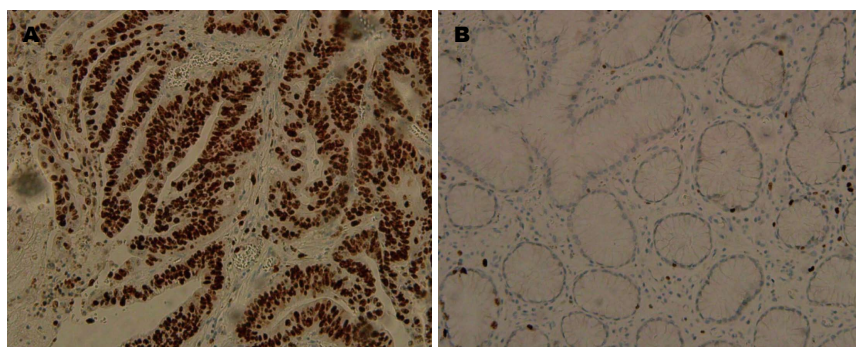


图 2 SIAH2在各组织中表达(SP×200). A: 胃腺癌阳性表达; B: 正常胃组织阴性表达.

($\chi^2 = 8.826, P = 0.003$), SIAH2在胃癌中的阳性表达率为60.0%(48/80), 而在正常胃组织中阳性表达率为27.5%(11/40), 胃癌组织与正常胃组织比较SIAH2阳性表达率的差异亦有统计学意义($\chi^2 = 11.27, P = 0.001$).

2.2 RIN1、SIAH2的蛋白表达与胃癌临床病理指标的关系 胃癌中, RIN1、SIAH2阳性表达均与肿瘤临床分期、远处转移、组织学分化程度及浆膜浸润有关($P < 0.05$), 与性别、年龄无关($P > 0.05$), 而RIN1阳性表达还与肿瘤大小相关($P < 0.05$)(表1).

2.3 胃癌中RIN1和SIAH2蛋白表达的一致性分析 胃癌组织中, RIN1和SIAH2表达均为阳性的有44例, 均为阴性的有27例, 两者表达呈正相关($r = 0.607, P < 0.01$).

3 讨论

肿瘤的发生涉及多种基因、多种因素共同参与, 具体机制未明, 多数学者认为肿瘤发生与原癌基因的激活关系密切, 目前研究^[2]表明, *Ras*基因突变参与多种肿瘤发生发展, RIN1作为*Ras*蛋白的效应因子, 参与多种恶性肿瘤发生、发展. 研究^[6]表明RIN1可通过多种细胞信号表达, 影响肿瘤细胞增殖、浸润、转移, 首先, RIN1作为*Ras*信号通路效应分子, 通过竞争性结合干扰信号转导, 抑制*Ras*介导细胞转化; 其次, RIN1作为Rab5a GTPase的鸟苷酸交换因子, 通过与Rab5

结合, 使*Ras*发生泛素化介导EGFR内陷降解, 促进细胞的内吞作用. RIN1不仅参与多种细胞表面信号传导受体的内吞、信号传导及降解, 而且可激活ABL酪氨酸激酶活性, 介导细胞骨架重建, 稳定细胞表面的表皮生长因子受体^[7], 促进细胞增殖、黏附以及增加化疗药物伊马替尼的耐药性^[8], 伊马替尼通过抑制ABL酪氨酸激酶活性, 而发挥药效作用, 进一步研究^[9]表明, 伊马替尼抑制细胞增殖周期进程为G₁/S期, G₁/S期可能为RIN1促进肿瘤细胞增殖作用靶点. 近年来RIN1在肿瘤中研究备受关注, 膀胱癌组织中, RIN1阳性表达显著高于癌旁组织, RIN1的阳性表达与肿瘤组织学分级、淋巴结浸润转移、Ki-67表达正相关, RIN1高表达5年生生存率较低表达明显降低^[2]. RIN1在非小细胞肺癌中高表达, 与肺癌的临床分期、淋巴结浸润转移及低生存率正相关^[10]. 谷小虎等^[11]研究表明RIN1基因过表达加速胃癌MKN28细胞G₁期向S期转化促进细胞增殖, RIN1可能成为胃癌治疗的一个潜在靶点, 本实验研究中, RIN1蛋白在胃癌和正常组织中阳性表达率差异具有统计学意义, RIN1表达与肿瘤大小、组织学分化程度、临床分期、淋巴结转移及浆膜浸润有关($P < 0.05$), 提示RIN1在肿瘤发生、发展中起作用作用, 且与肿瘤侵袭、转移相关, 有望成为胃癌早期诊断、判断预后新指标, 然而目前RIN1许多作用机制尚未完全清楚, 仍需进一步研究.

■应用要点
联合检测二者在胃癌组织中表达, 为胃癌早期诊断、治疗、疗效观察和预后判断提供思路, 后续深入研究, 二者有望成为治疗胃癌新靶点.

■名词解释

泛素连接酶: 通过C端底物结合域(substrate binding domain, SBD)及N端环形催化结构域(ring finger domain, RFD)二者共同完成同底物蛋白相合、泛素化降解过程, SIAH2通过底物蛋白泛素化降解参与多种信号通路转导。

表 1 胃癌组织中RIN1、SIAH2阳性表达与临床病理参数的关系 $n(\%)$

临床病理因素	<i>n</i>	RIN1阳性	χ^2 值	<i>P</i> 值	SIAH2阳性	χ^2 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)			1.980	0.159		0.076	0.783
≤50	36	19(52.8)			21(58.3)		
>50	44	30(68.2)			27(61.4)		
性别			1.689	0.194		0.138	0.711
男	47	26(55.3)			29(61.7)		
女	33	23(69.7)			19(57.6)		
肿瘤直径(cm)			6.036	0.014		2.360	0.124
<3	43	21(48.8)			23(53.5)		
≥3	37	28(75.6)			26(70.2)		
分化程度			4.850	0.028		6.299	0.012
高分化	27	12(44.4)			11(40.7)		
中低分化	53	37(69.8)			37(69.8)		
临床分期			5.877	0.015		7.026	0.008
I / II	38	18(47.4)			17(44.7)		
III / IV	42	31(73.8)			31(73.8)		
淋巴结转移			4.981	0.026		8.216	0.004
有	33	25(75.8)			26(78.8)		
无	47	24(51.1)			22(46.8)		
浸润深度			5.823	0.016		7.445	0.006
未及浆膜	26	11(42.3)			10(38.4)		
侵及浆膜	54	38(70.3)			38(70.4)		

人SIAH2作为保守的E3泛素连接酶,介导底物蛋白泛素化降解进而发挥调节作用^[12],底物蛋白泛素化可介导细胞转录调控、凋亡、分裂增殖以及低氧应激。SIAH2可通过多种信号通路影响肿瘤的发生、发展^[13],近来研究^[14]指出, SIAH2可通过Ras信号通路发挥其致癌机能, SIAH2在肺癌高表达,表达存在各类型肺癌组织,与组织学分化程度明显相关,在乳腺癌研究^[15]中也得出一致结论,进一步研究^[16]为乳腺癌的分子靶向治疗提供了新的思路, SIAH2有望成为乳腺癌治疗的靶点。然而在胃癌中研究有限,本实验通过免疫组织化学方法检测SIAH2在胃癌组织及正常组织表达情况,结果表明SIAH2在胃癌阳性表达率高于正常组织,差异具有统计学意义, SIAH2表达与组织学分化程度、临床分期、淋巴结转移及浆膜浸润有关,因此SIAH2可能作为癌基因促进肿瘤发展及转移,与RIN1一样有望成为胃癌早期诊断、判断预后新指标。

胃癌发生机制尚未完全清楚, RIN1、SIAH2在其发生发展、侵袭转移中起到协同作用,可能其存在共同Ras信号转导通路,具体机制仍需进一步研究,联合检测二者在胃癌组织中表达,为胃癌早期诊断、治疗、疗效观察和预后判断

提供思路,后续深入研究,二者有望成为治疗胃癌新靶点。

4 参考文献

- Wang Y, Colicelli J. RAS interaction with effector target RIN1. *Methods Enzymol* 2001; 332: 139-151 [PMID: 11305092 DOI: 10.1007/s13277-011-031]
- Shan GY, Zhang Z, Chen QG, Yu XY, Liu GB, Kong CZ. Overexpression of RIN1 associates with tumor grade and progression in patients of bladder urothelial carcinoma. *Tumour Biol* 2012; 33: 847-855 [PMID: 22249975 DOI: 10.1007/s13277-011-0311-1]
- Schmidt RL, Park CH, Ahmed AU, Gundelach JH, Reed NR, Cheng S, Knudsen BE, Tang AH. Inhibition of RAS-mediated transformation and tumorigenesis by targeting the downstream E3 ubiquitin ligase seven in absentia homologue. *Cancer Res* 2007; 67: 11798-11810 [PMID: 18089810 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06]
- Tomshine JC, Severson SR, Wigle DA, Sun Z, Belefard DA, Shridhar V, Horazdovsky BF. Cell proliferation and epidermal growth factor signaling in non-small cell lung adenocarcinoma cell lines are dependent on Rin1. *J Biol Chem* 2009; 284: 26331-26339 [PMID: 19570984 DOI: 10.1074/jbc.M109.03351]
- Yu HF, Zhao G, Ge ZJ, Wang DR, Chen J, Zhang Y, Zha TZ, Zhang K, Zhang M, Tan YF, Zhou SJ, Jiang C. High RIN1 expression is associated with poor prognosis in patients with gastric adenocarcinoma. *Tumour Biol* 2012; 33: 1557-1563 [PMID: 22562267 DOI: 10.1007/s1]
- Xu L, Lubkov V, Taylor LJ, Bar-Sagi D. Feedback

- regulation of Ras signaling by Rabex-5-mediated ubiquitination. *Curr Biol* 2010; 20: 1372-1377 [PMID: 20655225 DOI: 10.1016/j.cub.2010.06.051]
- 7 Balaji K, Mooser C, Janson CM, Bliss JM, Hojjat H, Colicelli J. RIN1 orchestrates the activation of RAB5 GTPases and ABL tyrosine kinases to determine the fate of EGFR. *J Cell Sci* 2012; 125: 5887-5896 [PMID: 22976291 DOI: 10.1242/jcs.113688]
- 8 Thai M, Ting PY, McLaughlin J, Cheng D, Müschen M, Witte ON, Colicelli J. ABL fusion oncogene transformation and inhibitor sensitivity are mediated by the cellular regulator RIN1. *Leukemia* 2011; 25: 290-300 [PMID: 21102429 DOI: 10.1038/leu.2010.268]
- 9 Giallongo C, La Cava P, Tibullo D, Barbagallo I, Parrinello N, Cupri A, Stagno F, Consoli C, Chianza A, Palumbo GA, Di Raimondo F. SPARC expression in CML is associated to imatinib treatment and to inhibition of leukemia cell proliferation. *BMC Cancer* 2013; 13: 60 [PMID: 23383963 DOI: 10.1186/1471-2407-13-60]
- 10 Wang Q, Gao Y, Tang Y, Ma L, Zhao M, Wang X. Prognostic significance of RIN1 gene expression in human non-small cell lung cancer. *Acta Histochem* 2012; 114: 463-468 [PMID: 21925717 DOI: 10.1016/j.acthis.2011.08.008]
- 11 谷小虎, 邢晓静, 胡劲杨. RIN过表达对人胃癌细胞MKN28增殖的影响研究. *肿瘤学杂志* 2013; 19: 825-831
- 12 Hu G, Chung YL, Glover T, Valentine V, Look AT, Fearon ER. Characterization of human homologs of the *Drosophila* seven in absentia (sina) gene. *Genomics* 1997; 46: 103-111 [PMID: 9403064 DOI: 10.1006/geno.1997.4997]
- 13 House CM, Möller A, Bowtell DD. Siah proteins: novel drug targets in the Ras and hypoxia pathways. *Cancer Res* 2009; 69: 8835-8838 [PMID: 19920190 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1676]
- 14 Ahmed AU, Schmidt RL, Park CH, Reed NR, Hesse SE, Thomas CF, Molina JR, Deschamps C, Yang P, Aubry MC, Tang AH. Effect of disrupting seven-in-absentia homolog 2 function on lung cancer cell growth. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 1606-1629 [PMID: 19001609 DOI: 10.1093/jnci/djn365]
- 15 孟媛, 董经宇, 甄娟, 宋敏, 李柏林. SIAH2与P-ERK在乳腺癌中的表达及其临床意义. *中国组织化学与细胞化学杂志* 2011; 20: 220-226
- 16 吴珏堃, 唐勇, 邱万寿. SIAH2在乳腺癌及癌旁组织中的差异表达及其临床意义. *岭南现代临床外科* 2012; 12: 403-406

■同行评价

本文选题新颖并具有科学性, 内容客观, 实验方法成熟, 观点新颖, 具有一定的科学意义.

编辑 郭鹏 电编 闫晋利

