

· 论 著 ·

# G 蛋白信号转导调节因子 19 在结肠癌中的表达及临床意义\*

谢平凡, 谭 林, 周红兵, 陈维顺<sup>△</sup>

中南大学湘雅医学院附属株洲医院消化内科, 湖南株洲 412000

**摘要:**目的 探讨 G 蛋白信号调节蛋白 19 (RGS19) 在人结肠癌组织及癌旁组织中的表达情况, 分析其与结肠癌患者临床病理特征及预后的关系。方法 选取 2014 年 5 月至 2015 年 7 月该院收集的 100 例结肠癌组织及 30 例癌旁组织, 采用免疫组织化学法检测 RGS19 在癌组织及癌旁组织的表达水平, 使用 Kaplan-Meier 生存曲线分析 RGS19 表达对结肠癌患者存活率的影响, Cox 回归模型分析结肠癌的预后影响因素。结果 RGS19 在结肠癌组织中高表达率为 61.0%, 在癌旁组织高表达率为 33.3%, 结肠癌组织中 RGS19 阳性表达明显上升, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); RGS19 在结肠癌组织中的表达与 TNM 分期、N 分期和 M 分期有 ( $P < 0.05$ ), 而与肿瘤大小、T 分期、分化程度、年龄、性别无关 ( $P > 0.05$ ); RGS19 高表达患者的 5 年生存率低于低表达患者, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 单因素 Cox 回归分析显示 TNM 分期、T 分期、N 分期及 RGS19 的表达都可能是结肠癌患者预后的影响因素; 多因素 Cox 回归分析显示 RGS19 表达水平和 TNM 分期是影响结肠癌患者 5 年总生存率的独立因素。结论 RGS19 在结肠癌中高表达, 与结肠癌的侵袭、转移相关, 可能成为结肠癌诊治和预后判断的潜在生物标志物。

**关键词:**结肠癌; G 蛋白信号调节蛋白 19; 预后; 免疫组化

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2021.20.001      **中图法分类号:**R735.35

**文章编号:**1673-4130(2021)20-2433-05

**文献标志码:**A

## Expression and clinical value of regulator of G-protein signaling 19 in colon cancer\*

XIE Pingfan, TAN Lin, ZHOU Hongbing, CHEN Weishun<sup>△</sup>

Department of Gastroenterology, the Affiliated Zhuzhou Hospital of Xiangya

School of Medicine of Central South University, Zhuzhou, Hunan 412000, China

**Abstract: Objective** To investigate the expression of G protein signaling 19 (RGS19) in human colon cancer tissues and adjacent tissues, and to analyze its relationship with the clinicopathological characteristics and prognosis of colon cancer patients. **Methods** A total of 100 cases of colon cancer tissues and 30 cases of adjacent tissues were collected from May 2014 to July 2015 in the hospital. Immunohistochemistry was used to detect the expression level of RGS19 in cancer tissues and adjacent tissues. Kaplan-Meier survival plot was used to estimate the effect of expression of RGS19 on the survival rate of patients with colon cancer. Cox regression model was used to analyze the prognostic factors of colon cancer. **Results** The high expression rate of RGS19 in colon cancer tissue was 61.0%, and the high expression rate in adjacent tissues was 33.3%. The expression of RGS19 in colon cancer tissue was significantly increased, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The expression of RGS19 in colon cancer tissue was related to TNM stage, lymph node metastasis and distant metastasis ( $P < 0.05$ ), but not related to tumor size, T stage, differentiation degree, age, and gender ( $P > 0.05$ ). The 5-year survival rate of patients with high RGS19 expression was significant lower than RGS19 low expression patients, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Univariate Cox regression analysis showed that TNM stage, tumor invasion, lymphatic metastasis, and RGS19 expression level may be risk factors affecting the prognosis of colon cancer patients. Multivariate Cox regression analysis showed RGS19 expression level and TNM stage were independent prognostic factors that affected the 5-year overall survival rate of colon cancer patients. **Conclusion** RGS19 is highly expressed in colon cancer and is related to the invasion and metastasis of colon cancer. RGS19 may become a potential biomarker for the

\* 基金项目:湖南省自然科学基金项目(2019JJ60085;2018JJ3895)。

作者简介:谢平凡,女,硕士研究生在读,主要从事消化道肿瘤方面的研究。 △ 通信作者,E-mail:cws1962@qq.com。

本文引用格式:谢平凡,谭林,周红兵,等.G 蛋白信号转导调节因子 19 在结肠癌中的表达及临床意义[J].国际检验医学杂志,2021,42(20):2433-2437.

diagnosis, treatment and prognosis of colon cancer.

**Key words:** colon cancer; G protein signaling 19; prognosis; immunohistochemistry

结肠癌是全球常见的恶性肿瘤之一,其死亡率位居所有肿瘤的第二位<sup>[1]</sup>。结肠癌患者早期临床症状不明显,大多数患者确诊时已是中晚期,已错过早期诊断及治疗的最佳时机。准确的早期诊断是治疗结肠癌的关键。G蛋白信号调节蛋白(RGS)家族是一类能负性调节G蛋白活性的多功能蛋白。RGS19,是第一个被发现的RGS家族成员,参与调节G蛋白偶联受体(GPCR)下游细胞信号活动并与细胞增殖和生长密切相关<sup>[2]</sup>。RGS19蛋白的转录水平改变与多种癌症的发生和发展有关。在卵巢癌<sup>[2]</sup>、胃癌<sup>[3]</sup>、前列腺癌<sup>[4]</sup>等癌细胞中均发现RGS19表达上调,进而促进癌细胞增殖。目前,RGS19在结肠癌中表达情况和作用的相关报道甚少。为了明确RGS19在结肠癌中的表达水平及其临床意义,本文比较了RGS19在结肠癌组织和癌旁组织中的表达,并进一步分析了RGS19在结肠癌中的表达与临床病理特征及预后的关系。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集本院2014年5月至2015年7月结肠癌根治手术切除的100例结肠癌及30例癌旁组织标本。癌旁组织距癌组织边缘>15 cm,病理证实无癌浸润。所有标本来源的病例均经病理学诊断为原发性腺癌,且术前均未接受放化疗及相关靶向药物治疗。根据美国联合癌症委员会第八版TNM分类<sup>[5]</sup>对这些病例进行TNM分期,根据病理标准确认分化程度(高、中、低)。本研究组织标本的获取及使用均经本院伦理委员会批准,所有患者对本研究均知情。通过电话对所有患者进行随访,以手术日期为起始时间,以死亡为终点时间,随访截止时间为2020年7月。共随访100例,失访0例。

## 1.2 方法

**1.2.1 免疫组化染色** 结肠癌组织及癌旁组织经石蜡包埋处理后,切片为4 μm厚度。切片经二甲苯脱蜡处理,梯度乙醇(100.0%、85.0%、75.0%、50.0%乙醇)及双蒸水浸泡水化处理。用3.0%过氧化氢消

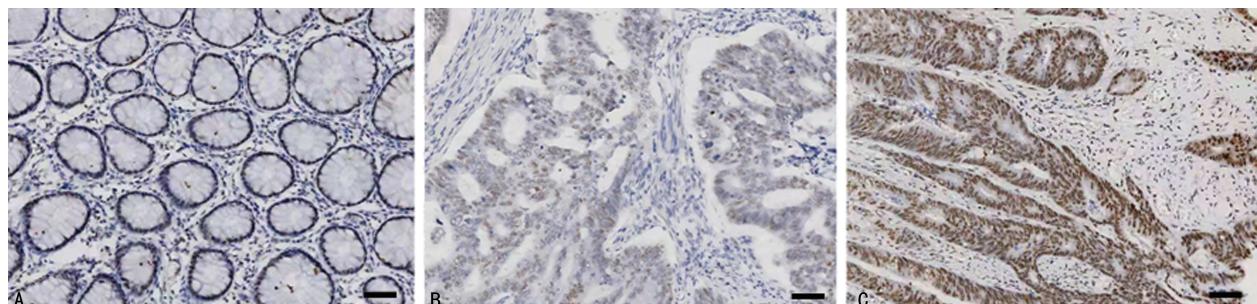
除内源性过氧化物酶活性,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗。水浴锅加热枸橼酸钠缓冲液(0.01 mol/L, pH 6.0)至90 °C恒温,浸入切片继续加热15~30 min进行抗原修复,随后自然冷却。切片经PBS清洗后用10.0%兔血清37 °C封闭10~15 min。弃去封闭液,加入RGS19一抗(稀释比例1:1 200),4 °C孵育过夜。次日将切片用PBS清洗后滴加生物素标记的二抗工作液,37 °C孵育20 min;PBS清洗,切片滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液,37 °C孵育20 min。PBS洗涤后进行DAB显色反应,以及苏木精复染细胞核。脱水和封片后置于显微镜下观察,每个切片中随机选择5个视野进行结果统计。

**1.2.2 结果判断** RGS19的免疫组织化学结果由两位独立研究人员进行评估。RGS19染色定位于细胞核内。按阳性细胞百分比计分:0.0%~5.0%为0分,>5.0%~25.0%为1分,>25.0%~50.0%为2分,>50.0%~75.0%为3分,>75.0%~100.0%为4分;按染色强度计分:无染色为0分,弱染色为1分,中度染色为2分,强染色为3分。根据上述两项得分的乘积来划分低表达组和高表达组:<6分为低表达,≥6分为高表达。

**1.3 统计学处理** 采用SPSS26.0软件进行统计学分析,计量资料用n表示,采用χ<sup>2</sup>检验分析RGS19在结肠癌及癌旁组织中的表达差异及与临床病理参数的关系;生存分析采用Kaplan-Meier生存曲线分析法,并用Log-rank检验其统计意义;Cox回归模型分析结肠癌预后影响因素。以P<0.05为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 RGS19在结肠癌组织中表达较癌旁组织高** 免疫组化结果显示RGS19蛋白阳性染色定位于细胞核内。统计结果显示在30例癌旁组织中,RGS19的高表达率为33.3%;而在100例结肠癌组织中,RGS19的高表达率为61.0%,高于癌旁组织,差异具有统计学意义(P<0.05),见表1和图1。



注:A为癌旁组织低表达;B为结肠癌组织低表达;C为结肠癌组织高表达。

图1 RGS19在癌旁组织和结肠癌组织中的免疫组化染色(×200,标尺50 μm)

表 1 RGS19 在结肠癌组织和癌旁组织中的表达[n(%)]

分组	n	RGS19		$\chi^2$	P
		低表达	高表达		
结肠癌组织	100	39(39.0)	61(61.0)	7.126	0.05
癌旁组织	30	20(66.7)	10(33.3)		

**2.2 RGS19 的表达与临床病理特征的关系** RGS19 在结肠癌组织中的表达与患者 N 分期、M 分期和 TNM 分期有关( $P < 0.05$ ), 而与性别、年龄、肿瘤大小、分化程度和 T 分期无关( $P > 0.05$ ), 见表 2。

表 2 结肠癌中 RGS19 的表达与临床病理特征的关系(n)

临床病理参数	n	RGS19		$\chi^2$	P
		低表达	高表达		
性别				0.033	0.855
男性	63	25	38		
女性	37	14	23		
年龄				0.343	0.558
≤60岁	40	17	23		
>60岁	60	22	38		
肿瘤大小				0.378	0.539
<5 cm	50	18	32		
≥5 cm	50	21	29		
分化程度				0.481	0.488
高分化	84	34	50		
低分化	16	5	11		
TNM 分期				15.703	0.001
I	15	7	8		
II	34	21	13		
III	38	10	28		
IV	13	1	12		
T 分期				3.255	0.071
T1+T2	26	14	12		
T3+T4	74	25	49		
N 分期				9.067	0.003
N0	53	28	25		
N1+N2	47	11	36		
M 分期				6.156	0.013
M0	87	38	49		
M1	13	1	12		

**2.3 RGS19 高表达和低表达结肠癌患者 5 年生存分析** 对本研究 100 例结肠癌患者随访 5 年, Kaplan-Meier 生存曲线分析显示, RGS19 低表达的患者中位生存时间为 52 个月, 高于 RGS19 高表达患者的 38 个月, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 3; RGS19 低表达的患者总生存率(76.9%)高于 RGS19 高表达

患者总生存率(44.3%), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见图 2。

表 3 RGS19 表达与结肠癌患者 5 年生存时间的关系

变量	n	生存时间[M(95%CI), 月]	P
RGS19			
低表达	39	52(48~57)	0.001
高表达	61	38(33~44)	
年龄			
≤60岁	40	44(37~50)	0.763
>60岁	60	44(39~49)	
肿瘤大小			
<5 cm	50	43(38~49)	0.643
≥5 cm	50	44(38~50)	
分化程度			
高分化	84	45(41~49)	0.274
低分化	16	36(23~48)	
TNM 分期			
I+II	49	52(47~56)	<0.001
III+IV	51	36(30~42)	
T 分期			
T1+T2	26	53(47~58)	0.017
T3+T4	74	41(40~48)	
N 分期			
N0	53	50(45~54)	0.004
N1+N2	47	37(31~44)	
M 分期			
M0	87	47(43~51)	<0.001
M1	13	21(12~29)	
性别			
男性	63	46(41~51)	0.314
女性	37	40(33~47)	

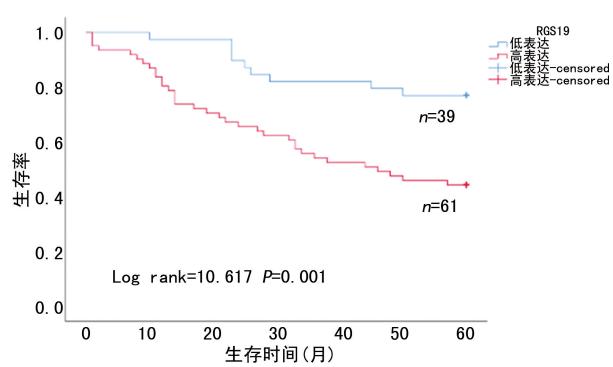


图 2 RGS19 高表达和低表达结肠癌患者的 Kaplan-Meier 生存曲线

**2.4 结肠癌患者预后的影响因素分析** 单因素 Cox 回归分析显示结肠癌 RGS19 的表达与 TNM 分期、T 分期、N 分期一样,都是影响结肠癌患者预后的因素;

多因素Cox回归分析显示RGS19表达水平和TNM

分期是影响结肠癌患者预后的独立因素( $P < 0.05$ )，

见表4。

表4 影响结肠癌患者预后的单因素及多因素分析

变量	单因素		多因素	
	风险比率(95%CI)	P	风险比率(95%CI)	P
性别(男性 vs. 女性)	1.362(2.498~0.743)	0.318	—	—
年龄(>60岁)	1.099(0.592~2.040)	0.764	—	—
肿瘤大小(≥5 cm)	0.868(0.477~1.581)	0.644	—	—
分化程度(低分化 vs. 高分化)	1.528(0.709~3.297)	0.279	—	—
TNM期(Ⅲ~Ⅳ vs. Ⅰ~Ⅱ)	3.375(1.729~6.588)	<0.001	5.981(1.820~19.655)	0.003
T分期(T3+T4 vs. T1+T2)	2.734(2.734~6.482)	0.022	1.579(0.632~3.947)	0.328
N分期(N1+N2 vs. N0)	2.430(1.307~4.516)	0.005	0.349(0.119~1.019)	0.054
RGS19(高表达 vs. 低表达)	3.897(1.731~8.772)	0.001	3.029(1.315~6.979)	0.009

注:—表示无数据。

### 3 讨 论

结肠癌是胃肠道常见的恶性肿瘤。随着结肠癌筛查的广泛开展,作为筛查目标人群的老年人中结肠癌的死亡率有所下降,但50岁以下的人群中结肠癌的发病率和死亡率却一直在增加<sup>[6]</sup>。结肠癌的诊断主要依靠临床表现和辅助检查。早期结肠癌患者症状不明显或轻微,是导致结肠癌不能被早发现和早治疗的主要原因。本研究通过检测结肠癌和癌旁组织RGS19的表达,并分析其与结肠癌患者临床病理特征和预后的关系,旨在为结肠癌诊断提供新的肿瘤标志物。

GPCR介导的信号传导通路在调节细胞稳态及应激响应中起着重要作用<sup>[7]</sup>。GPCR通过与G蛋白偶联来调节细胞内相关酶活性,产生第二信使作用于下游效应蛋白,从而将配体信号由细胞外传递至细胞内,改变细胞功能活性。G蛋白由α、β和γ3个亚基组成。Gα亚基与GDP结合,以无活性状态存在;当GPCR与配体结合而激活后,Gα与β和γ亚基解离,并与GDP分离而与GTP结合。与GTP结合的Gα亚基处于活性状态,参与下游信号传导途径。RGS是一类GTP酶激活蛋白,可激活Gα亚基内的GTP酶,使得与Gα亚基结合的GTP水解为GDP,使Gα亚基失活,从而负调节GPCR介导的信号通路<sup>[7]</sup>。RGS家族蛋白拥有130个氨基酸的保守结构域及结合激活的Gα亚基<sup>[8]</sup>。迄今为止,有研究发现RGS蛋白调节G蛋白信号转导通路参与多种细胞生物过程,包括细胞增殖、分化、质膜运输、细胞运动和胚胎发育等<sup>[9]</sup>。目前RGS家族已被发现有20多位成员<sup>[10]</sup>,其中至少有14种RGS蛋白被证明参与多种癌症的发生和发展进程<sup>[11]</sup>,其中研究较多的是RGS17、RGS20。RGS19在肿瘤中的作用也广泛受到关注,但目前相关研究结论不一。SAKAGUCHI等<sup>[12]</sup>通过

GEO数据库、Oncomine数据库和TCGA数据库分析了RGS19在不同肿瘤和正常组织中的基因和蛋白表达水平,结果显示RGS19在膀胱癌、乳腺癌和肾癌组织中的表达均高于正常组织<sup>[3]</sup>。同样在其他临床研究中发现卵巢癌<sup>[2]</sup>、胃癌<sup>[3]</sup>、胰腺癌<sup>[13]</sup>、肺癌<sup>[14]</sup>中有RGS19蛋白表达增加。然而,另外一些研究报道RGS19在白血病、肺癌和淋巴瘤中的表达低于正常组织<sup>[3]</sup>。在本研究中,RGS19在结肠癌组织中的高表达率(61.0%)明显高于癌旁组织(33.3%),这与肺癌<sup>[13]</sup>、卵巢癌<sup>[15]</sup>中的研究结论一致。研究发现在小鼠F9畸胎瘤细胞中,低表达的RGS19会抑制Wnt/β-catenin信号传导<sup>[16]</sup>。Wnt/β-catenin信号通路的异常激活与结肠癌肿瘤细胞的过度增殖和恶变有关,参与结直肠癌的发生;而阻断Wnt/β-catenin通路可抑制肿瘤的生长<sup>[17]</sup>。另外,JI等<sup>[18]</sup>研究发现上调RGS19可增加畸胎瘤细胞Akt的磷酸化水平,上调细胞周期蛋白D1/3,从而促进肿瘤细胞增殖。这些研究提示,RGS19能通过多重机制调控肿瘤细胞的增殖,参与肿瘤的发生和发展<sup>[2]</sup>。

在本研究中,RGS19高表达的结肠癌患者与RGS19低表达的患者相比,总生存时间明显缩短,总生存率降低。RGS19表达是结肠癌患者预后不良的独立危险因素。SAKAGUCHI等<sup>[12]</sup>在关于舒尼替尼耐药的肾透明细胞癌的研究中也有相似的发现,即RGS19高表达患者的总生存时间及无复发生存时间均低于低表达患者,并通过Cox分析发现RGS19是肾透明细胞癌的独立危险因子。众所周知,影响结肠癌预后的因素包括肿瘤的快速增殖和肿瘤的侵袭、转移。本研究结果显示结肠癌中高表达RGS19与淋巴结转移、远处转移和TNM分期有关,RGS19高表达者远处转移早,生存时间短,预后差。因此,检测RGS19的表达水平对判定结肠癌的侵袭转移与预后

有一定临床价值。RGS19 促进肿瘤侵袭转移的机制尚未明确。WANG 等<sup>[19]</sup>研究发现, RGS19 能结合 GIPC 蛋白, 激活 PI3K/Akt 通路。该通路是介导细胞增殖、存活和迁移的常见信号通路; 同时 Akt 磷酸化使 MDM2 从细胞质转移到细胞核, 可使 p53 核失活, 可进一步增强肿瘤细胞的侵袭转移能力<sup>[20]</sup>。本研究推测在结肠癌中 RGS19 可能有相似的作用机制。以上研究提示, RGS19 在结肠癌中上调可能参与了结肠癌的发生和转移, 可成为结肠癌预后判定的潜在指标, 有必要就其具体机制, 从分子水平、细胞水平和临床水平进行多层面的研究。

综上所述, RGS19 在结肠癌患者中呈高表达, 是影响患者预后的独立因素, 可作为结肠癌诊断、预后判断的标志物以及治疗的新靶点<sup>[20]</sup>。

## 参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA cancer J clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] TSO P H, YUNG L Y, WANG Y, et al. RGS19 stimulates cell proliferation by deregulating cell cycle control and enhancing Akt signaling[J]. Cancer lett, 2011, 309(2): 199-208.
- [3] KIRIKOSHI H, KATOH M. Expression of human GIPC1 in normal tissues, cancer cell lines, and primary tumors[J]. Int J Mol Med, 2002, 9(5): 509-513.
- [4] HU D, JIANG L, LUO S, et al. Development of an autophagy-related gene expression signature for prognosis prediction in prostate cancer patients[J]. J Transl Med, 2020, 18(1): 160.
- [5] WEISER M R. AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2018, 25(6): 1454-1455.
- [6] AHMED M. Colon Cancer: A Clinician's Perspective in 2019[J]. Gastroenterology Res, 2020, 13(1): 1-10.
- [7] O'BRIEN J B, WILKINSON J C, ROMAN D L. Regulator of G-protein signaling (RGS) proteins as drug targets: progress and future potentials[J]. J Biol Chem, 2019, 294(49): 18571-18585.
- [8] 朱小彬, 朱霞, 于一帆, 等. G 蛋白信号转导调节蛋白 (RGS) 研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 30(6): 248-253.
- [9] VRIESLD, FARQUHAR M G. RGS proteins: more than just GAPs for heterotrimeric G proteins[J]. Trends Cell Biol, 1999, 9(4): 138-144.
- [10] NUNN C, MAO H, CHIDIAC P, et al. RGS17/RGSZ2 and the RZ/A family of regulators of G-protein signaling [J]. Semin Cell Dev Biol, 2006, 17(3): 390-399.
- [11] TSO P H, WANG Y, YUNG L Y, et al. RGS19 inhibits Ras signaling through Nm23H1/2-mediated phosphorylation of the kinase suppressor of Ras[J]. Cell Signal, 2013, 25(5): 1064-1074.
- [12] SAKAGUCHI T, YOSHINO H, SUGITA S, et al. Bromodomain protein BRD4 inhibitor JQ1 regulates potential prognostic molecules in advanced renal cell carcinoma [J]. Oncotarget, 2018, 9(33): 23003-23017.
- [13] KATOH M. Functional proteomics, human genetics and cancer biology of GIPC family members[J]. Exp Mol Med, 2013, 45(6): e26.
- [14] TSO P H, WANG Y, WONG S Y S, et al. RGS19 enhances cell proliferation through its C-terminal PDZ motif [J]. Cell signal, 2010, 22(11): 1700-1707.
- [15] HURST J H, MENDPARA N, HOOKS S B. Regulator of G-protein signalling expression and function in ovarian cancer cell lines[J]. Cell Mol Biol Lett, 2009, 14(1): 153-174.
- [16] FEIGIN M E, MALBON C C. RGS19 regulates Wnt-beta-catenin signaling through inactivation of Galphao(J)[J]. J Cell Sci, 2007, 120(19): 3404-3414.
- [17] SAWA M, MASUDA M, YAMADA T. Targeting the Wnt signaling pathway in colorectal cancer[J]. Expert Opin Ther Targets, 2016, 20(4): 419-429.
- [18] JI Y R, KIM H J, PARK S J, et al. Critical role of Rgs19 in mouse embryonic stem cell proliferation and differentiation[J]. Differentiation, 2015, 89(1/2): 42-50.
- [19] WANG L, LAU J S, PATRA C R, et al. RGS-GAIP-interacting protein controls breast cancer progression[J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(12): 1591-1600.
- [20] SANGPHECH N, OSBORNE B A, PALAGA T. Notch signaling regulates the phosphorylation of Akt and survival of lipopolysaccharide-activated macrophages via regulator of G protein signaling 19 (RGS19)[J]. Immunobiology, 2014, 219(9): 653-660.

(收稿日期:2020-12-12 修回日期:2021-05-17)