

• 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。 <sup>△</sup> 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

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

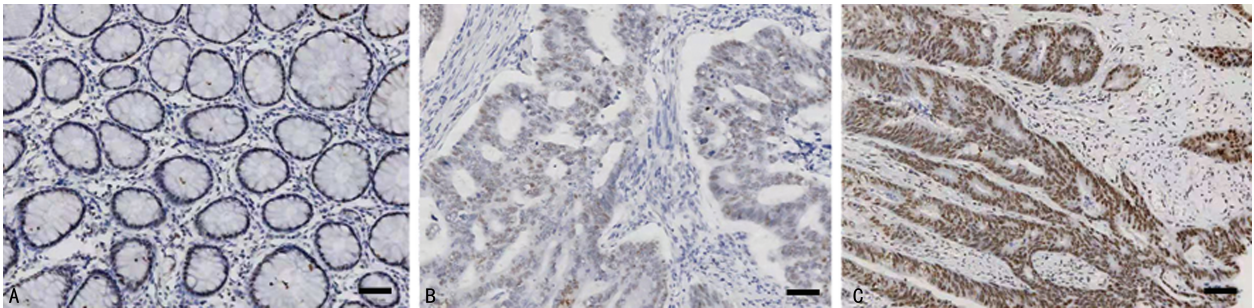
除内源性过氧化物酶活性,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗。水浴锅加热枸橼酸钠缓冲液(0.01 mol/L, pH 6.0)至 90 ℃恒温,浸入切片继续加热 15~30 min 进行抗原修复,随后自然冷却。切片经 PBS 清洗后用 10.0%兔血清 37 ℃封闭 10~15 min。弃去封闭液,加入 RGS19 一抗(稀释比例 1:1 200),4 ℃孵育过夜。次日将切片用 PBS 清洗后滴加生物素标记的二抗工作液,37 ℃孵育 20 min;PBS 清洗,切片滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液,37 ℃孵育 20 min。PBS 洗涤后进行 DAB 显色反应,以及苏木精复染细胞核。脱水和封片后置于显微镜下观察,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  $\chi^2$  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)	

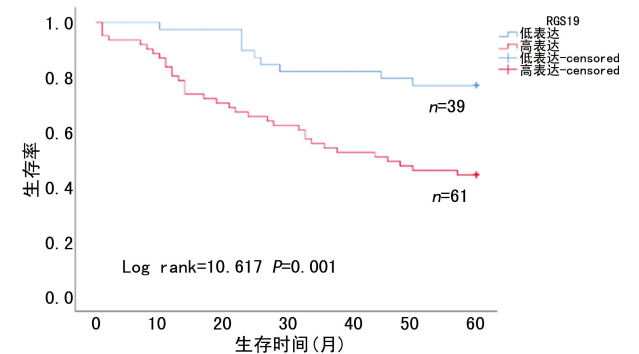


图 2 RGS19 高表达和低表达结肠癌患者的 Kaplan-Meier 生存曲线

**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( $\geq 5$ 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  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  3 个亚基组成。 $G\alpha$  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, $G\alpha$  与  $\beta$  和  $\gamma$  亚基解离,并与 GDP 分离而与 GTP 结合。与 GTP 结合的  $G\alpha$  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  $G\alpha$  亚基内在的 GTP 酶,使得与  $G\alpha$  亚基结合的 GTP 水解为 GDP,使  $G\alpha$  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  $G\alpha$  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>中均有 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/ $\beta$ -catenin 信号传导<sup>[16]</sup>。Wnt/ $\beta$ -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/ $\beta$ -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 Galpha(o)[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)