

# RhoE 在舌鳞状细胞癌中的表达及其对细胞迁移和侵袭的影响

赵开<sup>1</sup> 袁文红<sup>2</sup> 李文健<sup>3</sup> 迟增鹏<sup>4</sup> 王少如<sup>3</sup> 陈正岗<sup>2</sup>

1. 青岛大学口腔医学院, 青岛 266003;

2. 青岛大学附属青岛市市立医院口腔医学中心, 青岛 266071;

3. 大连医科大学口腔医学院, 大连 116044;

4. 潍坊医学院口腔医学院, 潍坊 261021

**[摘要]** **目的** 初步探讨 RhoE 在舌鳞状细胞癌 (TSCC) 中的表达水平, 及其对 TSCC 细胞迁移和侵袭的影响及相关机制。**方法** 选取在青岛大学附属青岛市市立医院口腔医学中心颌面外科 2017—2019 年手术切除的 TSCC 原发灶 48 例, 采用免疫组织化学法检测标本 (TSCC 组织、癌旁组织) 中 RhoE 的表达水平, 并提取标本的 RhoE mRNA 和蛋白进一步检测 RhoE 的表达水平。选取 TSCC SCC-4 和 CAL-27 细胞系进行体外实验, 采用瞬时转染法过表达 RhoE, 并应用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 及蛋白质免疫印记法检测过表达效率; 细胞划痕实验及 Transwell 细胞侵袭实验分别检测 TSCC 细胞的迁移和侵袭能力; 蛋白质免疫印记法检测相关蛋白 Rho 关联含卷曲螺旋结合蛋白激酶 1 (ROCK1)、基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 的表达水平; 采用 GraphPad Prism 8.2.1 软件对实验数据进行统计学分析。**结果** TSCC 组织中 RhoE 的表达水平显著低于癌旁组织 ( $P < 0.05$ ); 在体外实验中, 与空白对照组和阴性对照组相比, 过表达实验组 TSCC 细胞的迁移和侵袭能力显著降低 ( $P < 0.05$ ), 过表达实验组 ROCK1、MMP-2 及 MMP-9 表达显著降低 ( $P < 0.05$ )。**结论** RhoE 在 TSCC 组织中低表达, 上调 TSCC 细胞中 RhoE 表达可显著抑制其迁移和侵袭能力, 提示 RhoE 可能在调控 TSCC 转移、侵袭等恶性生物学行为过程中发挥作用, 为 TSCC 的基因治疗提供新的靶点。

**[关键词]** RhoE; 舌鳞状细胞癌; 细胞迁移; 细胞侵袭

**[中图分类号]** R 739.8 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2021.05.003



开放科学 (资源服务)  
标识码 (OSID)

**Effect of RhoE expression on the migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma** Zhao Kai<sup>1</sup>, Yuan Wenhong<sup>2</sup>, Li Wenjian<sup>3</sup>, Chi Zengpeng<sup>4</sup>, Wang Shaoru<sup>3</sup>, Chen Zhenggang<sup>2</sup>. (1. School of Stomatology, Qingdao University, Qingdao 266003, China; 2. Dept. of Stomatology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao University, Qingdao 266071, China; 3. School of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China; 4. College of Stomatology, Weifang Medical University, Weifang 261021, China)

Supported by: The National Natural Science Foundation of China (81372908). Correspondence: Chen Zhenggang, E-mail: chenzhg1973@163.com.

**[Abstract]** **Objective** This study aims to investigate the effect of RhoE expression on the migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma (TSCC). **Methods** Forty-eight TSCC cases were selected from the Maxillofacial Surgery Center of Qingdao Municipal Hospital from 2017 to 2019. The expression of RhoE in the specimens (TSCC and ad-

jacent tissues) was detected by immunohistochemistry, and RhoE mRNA and protein were extracted to further detect the expression of RhoE. SCC-4 and CAL-27 cells were selected for *in vitro* experiments. Transient transfection was used to overexpress RhoE. Real-time fluores-

**[收稿日期]** 2020-12-10; **[修回日期]** 2021-06-28

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目 (81372908)

**[作者简介]** 赵开, 硕士, E-mail: 1142083797@qq.com

**[通信作者]** 陈正岗, 主任医师, 博士, E-mail: chenzhg1973@163.com

com

cence quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blot analyses were conducted to detect the overexpression efficiency. Scratch test and Transwell cell invasion tests were used to detect the migration and invasion ability of TSCC, respectively. The expression levels of Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase 1 (ROCK1), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) were detected by Western blot. Experimental data were analyzed by Graphpad prism 8.2.1 software. **Results** The expression level of RhoE in TSCC was significantly lower than that in adjacent tissues ( $P<0.05$ ). The migration and invasion abilities of TSCC were significantly lower than those in the control group ( $P<0.05$ ). The Western blot showed significantly lower expression levels of ROCK1, MMP-2, and MMP-9 in the experimental group than in the control group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** RhoE expression is low in TSCC. Over expression RhoE in TSCC can significantly decrease its migration and invasion abilities. Hence, RhoE may play an important role in regulating the metastasis and invasion of TSCC and provide a new target for gene therapy.

**[Key words]** RhoE; tongue squamous cell carcinoma; migration; invasion

舌鳞状细胞癌 (tongue squamous cell carcinoma, TSCC) 是当前口腔肿瘤中发病率最高的疾病, 因其恶性程度高、局部复发率高、颈部转移率高的特点, 总体生存率仅为 50%~60%<sup>[1]</sup>。目前治疗方法仍以手术治疗为主, 费用高, 创伤大, 术后多具有不可逆的口腔功能缺失<sup>[2]</sup>。靶向治疗是近年来医学领域的另一治疗途径, 对癌症相关基因和信号通路的研究, 有助于靶向药物的研发, 提高舌癌患者生存率。

小G蛋白即鸟苷酸调节蛋白, 是一类介导细胞信号转导的分子。Rho家族属于小G蛋白中的Ras超家族, 由21个基因组成, 可以编码至少23个蛋白, 包括Rho、Rac、Cdc42、Rnd、RhoBTB等5个亚族<sup>[3-4]</sup>。其中, RhoE蛋白是Rho家族中的一员, 相对分子质量约为 $2.9\times 10^3$ , 又称为Rnd3/Rho8。RhoE基因编码与RhoA、RhoB、RhoC高度相似, 具有同源性。但是, RhoE编码氨基酸在17、64、66位与Rho家族蛋白不同, 使RhoE只能以三磷酸鸟苷 (guanosinetriphosphate, GTP) 结合的形式存在, 不能被水解, 该特性使RhoE蛋白与Rho家族其他蛋白具有不同的功能和调节方式<sup>[5]</sup>。RhoE的基本作用不仅有内源性拮抗RhoA介导的肌动蛋白调节细胞运动, 促进细胞迁移、调节神经元极性, 也参与阻滞细胞周期、抑制细胞生长、诱导细胞凋亡和分化<sup>[6]</sup>。当前研究<sup>[7-8]</sup>中, RhoE蛋白在不同组织来源的癌症细胞中显示出不同的特点, 可能与不同癌症组织中微环境差异有关, 有关RhoE在TSCC中相关研究少见。

本研究检测TSCC组织中RhoE的表达水平, 并结合体外实验, 初步研究RhoE过表达对TSCC侵袭、转移的影响, 以便进一步了解RhoE在TSCC侵袭、转移中的作用, 为TSCC的研究与治疗提供新的参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂

1.1.1 临床病理资料 选取2017—2019年在青岛大学附属青岛市市立医院口腔颌面外科行舌肿物切除术, 并经本院病理科检查确诊为TSCC的患者48例, 其中男27例, 女21例; 年龄42~88岁, 平均 $(65.15\pm 11.34)$ 岁, TSCC标本收集经过青岛大学附属青岛市市立医院伦理委员会批准 (编号: 临2019048)。TSCC组织均取自TSCC包块中央, 癌旁组织取自癌组织边界外2 cm处, 上述标本部分由青岛市市立医院病理科制作石蜡标本, 部分冻存用于提取RNA及蛋白。

1.1.2 材料和试剂 人TSCC细胞系SCC-4由山东大学口腔医学院馈赠, CAL-27购于中南大学高等研究中心, 高糖型改良杜氏伊格尔培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、胎牛血清 (BI公司, 以色列), 青霉素/链霉素、胰蛋白酶 (Gibco公司, 美国), pCMV-FLAG-RhoE过表达质粒由空军军医大学基础医学院馈赠, 转染试剂 Lipofectamine 2000 (Invitrogen公司, 美国), 实时荧光定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒 (TaKaRa公司, 日本), qRT-PCR引物RhoE、磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH) 由上海生工生物工程有限公司合成, RIPA裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司), 兔抗人多克隆抗体RhoE (Affinity公司, 美国), Rho关联含卷曲螺旋结合蛋白激酶1 (Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase, ROCK1) 抗体蛋白 (Proteintech公司, 美国), 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) -2、

MMP-9、GAPDH、羊抗兔免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 二抗 (CST公司, 美国), Transwell小室 (Corning公司, 美国)。二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色试剂盒及其他免疫组化实验所用试剂由青岛市市立医院病理科及中心实验室提供。

## 1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 通过免疫组织化学染色法, 检测 TSCC 组织、癌旁组织病理切片中 RhoE 蛋白的表达水平。石蜡标本 4  $\mu\text{m}$  连续切片, 脱蜡及抗原修复后灭活内源性酶, 及封闭内源性生物素。在室温下羊血清蛋白封闭电荷, 抑制非特异性染色, 二抗室温孵育 30 min。显微镜下 DAB 染色, 苏木精复染细胞核, 树脂封片, 显微镜下观察。结果判定标准: 切片染色结果由 2 个不同的病理科医师共同判读。选片标准: 1) 切片染色对比度好, 背景清晰; 2) 阳性细胞定位准确; 3) 坏死、出血、受挤压组织及切片边缘不算作判断依据。在符合以上 3 个基本条件的前提下, 在高倍镜下选取 5 个视野评估阳性染色评估按照免疫反应得分 (immunoreactive score, IRS)<sup>[9]</sup>。IRS 分为染色强度 (staining intensity, SI) 和阳性细胞百分率 (percentage of positive cell, PP) 两部分。SI 评分标准: 0 分为无色, 1 分为淡黄色, 2 分为棕黄色, 3 分为棕褐色 (染色深浅需与背景着色相对比)。PP 评分标准: 0 分为阴性, 1 分为阳性细胞  $\leq 10\%$ ; 2 分为 11%~50%; 3 分为 51%~75%, 4 分为 76%~100%。IRS=SI $\times$ PP, 最终结果分为 4 个等级: 0 分为不表达, 1~4 分为弱表达 (+), 5~8 分为中度表达 (++) , 9~12 分为重度表达 (+++)。另外 IRS>3 认为是 RhoE 阳性表达, 否则视为 RhoE 阴性表达。

1.2.2 提取组织 RNA 及 qRT-PCR 实验 通过 qRT-PCR 检测 TSCC 组织标本及 SCC-4、CAL-27 细胞中 RhoE 的 RNA 表达水平。将冻存标本置入裂解液中, 研磨离心后取上清液, 分光光度计检验纯度、测定密度、去除基因组 DNA 后, 根据 TB Green™ qRT-PCR 法互补 DNA (complementary DNA, cDNA) 逆转录。于仪器中 37  $^{\circ}\text{C}$  放置 15 min 进行逆转录反应, 85  $^{\circ}\text{C}$  中 5 s 逆转录酶失活。qRT-PCR 反应液中加入 RhoE 引物, 引物上游序列为 5'-CTGCTCCATGTCTTCGCCAAGG-3'; 下游引物序列为 5'-GAAGTGTCCCACAGGCTCAACTC-3'。qRT-PCR 反应步骤: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火扩增 30 s, 累计 40 个循环, 荧光实时测量由 ABI PRISM 7000 型 qRT-PCR 仪自动完成, 采

用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  公式计算 mRNA 的相对表达水平。

1.2.3 提取组织蛋白及蛋白免疫印迹法检测 提取 TSCC 组织及癌旁组织蛋白并检测 RhoE 的蛋白表达水平。将冻存的组织标本称重后剪成碎块, 按照每 20 mg 加入 100  $\mu\text{L}$  的裂解液的比例混合均匀使用匀浆器充分匀浆、离心后, 收集上清液。二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法测定蛋白浓度, 100  $^{\circ}\text{C}$  变性后等量上样, 聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离, 采用湿转法转移蛋白至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜。PVDF 膜封闭 1 h 后, 一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜, 二抗摇床孵育 2 h, 加入电化学发光液曝光、显色, 采集图像, 使用 Image J 软件分析蛋白电泳图灰度值。

1.2.4 细胞培养和转染 TSCC 的 SCC-4 和 CAL-27 细胞均在 5%  $\text{CO}_2$  恒温孵育箱中环境为 37  $^{\circ}\text{C}$  下, 使用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中培养。细胞生长良好状态下转染过表达 RhoE 质粒, 转染分组分别为空白对照组 (仅加转染混合液的 SCC-4、CAL-27 细胞, 分别为 SCC-4 空白对照组、CAL-27 空白对照组)、阴性对照组 (加入转染混合液及空质粒载体的 SCC-4、CAL-27 细胞, 分别为 SCC-4 阴性对照组、CAL-27 阴性对照组)、过表达实验组 (转染 RhoE 基因过表达质粒载体的 SCC-4、CAL-27 细胞, 分别为 SCC-4 过表达实验组、CAL-27 过表达实验组)。转染前 1 d 将各组 SCC-4 和 CAL-27 细胞 ( $2\times 10^5$  个/孔) 分别接种于不同的 6 孔板内, 无血清培养基培养。待贴壁细胞融合达 80%~90% 时参照 Lipofectamine 2000 产品说明书进行转染, 转染 6 h 后更换新鲜培养液, 于孵育箱内培养一定时间后进行相应的细胞水平或分子水平的检测。

1.2.5 提取细胞 RNA 及 qRT-PCR 实验 通过 qRT-PCR 检测空白对照组、阴性对照组、过表达实验组中 SCC-4、CAL-27 细胞的 RhoE mRNA 表达水平。提取各组细胞总 RNA, 紫外分光光度计检测其浓度和纯度, 按照 TaKaRa 试剂盒说明书进行反转录及 qRT-PCR 反应, 每组均设 3 个副孔, 引物序列及 qRT-PCR 反应条件、统计学分析见 1.2.2。

1.2.6 提取细胞蛋白及蛋白免疫印迹法实验 通过提取细胞蛋白并进行蛋白免疫印迹实验, 检测空白对照组、阴性对照组、过表达实验组中 SCC-4、CAL-27 细胞的 RhoE 蛋白表达量, 各组细胞的蛋白质应用 RIPA 裂解液提取, 蛋白免疫印迹法实验步骤同 1.2.3。

1.2.7 细胞划痕实验 通过细胞划痕实验检测空白

对照组、阴性对照组、过表达实验组中 SCC-4、CAL-27 细胞迁移能力的变化。各组细胞于相应 6 孔板内转染后至细胞融合达到 80%~90% 时,用 200  $\mu\text{L}$  枪头按照 6 孔板背部间隔 0.5~1.0 cm 的 5 条横线进行划痕; PBS 冲洗, 更换无血清 DMEM 后在孵育箱中培养; 显微镜下观察 0、24、48 h 的划痕愈合情况及拍照, 使用 Image J 软件进行测量并以  $S_0$ 、 $S_{24}$ 、 $S_{48}$  记录各组细胞 0、24、48 h 的愈合面积, 应用  $(S_0 - S_x) / S_0$  公式计算各组不同时间内的相对愈合面积。

**1.2.8 Transwell 侵袭实验** 通过 Transwell 侵袭实验检测空白对照组、阴性对照组、过表达实验组中 SCC-4、CAL-27 细胞的侵袭能力的变化。将含人工基质胶的 Transwell 小室置于 24 孔板, 上、下室均加入 500  $\mu\text{L}$  无血清培养基, 孵育箱中水化 2 h 后待用。各组细胞转染 48 h 后, 收集细胞, 在无血清 DMEM 中重悬计数。上室加入 500  $\mu\text{L}$  细胞悬液 (每毫升  $3 \times 10^5$  个), 下室加入 750  $\mu\text{L}$  含 10% 胎牛血清的 DMEM。孵育箱内培养 36 h 后, 弃原培养液, PBS 冲洗后, 用棉签拭去未侵袭细胞。甲醛固定 20 min 后结晶紫染色 30 min, 显微镜下观察并随机选取 5 个视野拍照计数, 观察各组之间穿透膜细胞

数的差别。

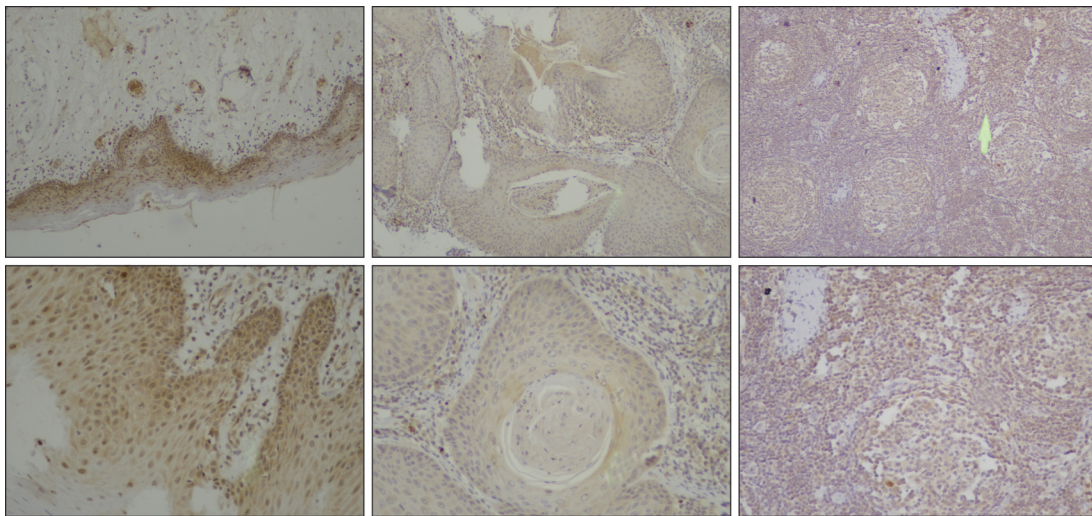
### 1.3 统计学方法

免疫组化结果检验采用卡方检验, 实验数据以均数 $\pm$ 标准误表示, 应用 GraphPad Prism 8.2.1 软件进行作图统计分析, 两组间比较采用独立样本  $t$  检验, 多组间比较用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 RhoE 在 TSCC 中的表达水平

**2.1.1 免疫组织化学染色结果** 结果显示: RhoE 蛋白的免疫组织化学染色阳性表达位置主要在胞质, 着色呈棕黄色 (图 1)。在 48 例 TSCC 组织样本中, 有 28 例样本为 RhoE 阳性表达, 所占比例为 58.3% (28/48); 余 20 例样本为 RhoE 阴性表达, 所占比例为 41.7% (20/48)。而在 40 例癌旁组织样本中, 有 33 例样本为 RhoE 阳性表达, 所占比例为 82.5% (33/40); 余 7 例样本为 RhoE 阴性表达, 所占比例为 17.5% (7/40)。综上, TSCC 和癌旁组织的 RhoE 表达有差异 ( $P < 0.05$ )。



左: 癌旁组织; 中: 癌组织; 右: 阳性对照。上:  $\times 100$ ; 下:  $\times 400$ 。

图 1 TSCC、癌旁组织及阳性对照的 RhoE 免疫组化染色结果

Fig 1 Immunohistochemical staining results of RhoE in TSCC, paracancerous tissue and positive control

**2.1.2 TSCC 及癌旁组织中 RhoE mRNA 和蛋白的表达水平** qRT-PCR 及蛋白免疫印迹法检测结果显示: TSCC 组织中, RhoE mRNA 和蛋白表达量均显著低于癌旁组织 ( $P < 0.05$ , 图 2), 与癌旁组织相比, RhoE 在 TSCC 组织中表达下降。

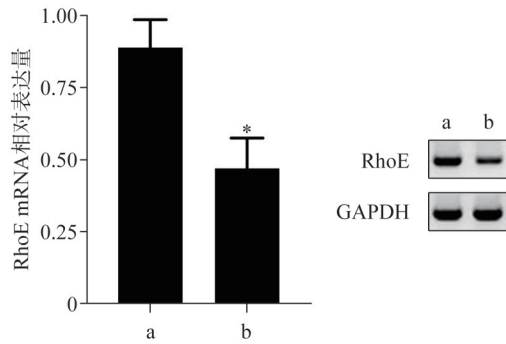
### 2.2 TSCC 细胞中 RhoE 过表达的检测结果

qRT-PCR 实验结果显示: SCC-4 过表达实验

组、CAL-27 过表达实验组细胞中 RhoE mRNA 表达水平较各自空白对照组及阴性对照组均显著上调 ( $P < 0.05$ , 图 3)。

蛋白免疫印迹实验结果: SCC-4 过表达实验组、CAL-27 过表达实验组细胞中 RhoE 蛋白的表达量较各自空白对照组及阴性对照组均显著增高 ( $P < 0.05$ , 图 3), 与 qRT-PCR 结果一致。这说明与

阴性对照及空白对照相比, RhoE在2种细胞的过表达实验组中均表达上调。



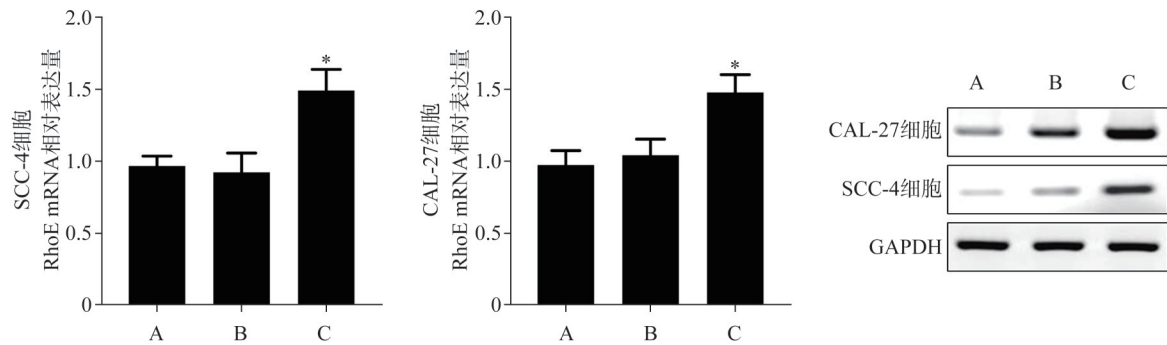
左: RhoE的 mRNA 表达水平; 右: RhoE 的蛋白表达水平; a: 癌旁组织; b: TSCC 组织; \*P<0.05。

图 2 TSCC 及癌旁组织的 qRT-PCR 和蛋白免疫印迹结果

Fig 2 Expression of RhoE mRNA and protein in TSCC and adjacent tissues

### 2.3 细胞划痕实验结果

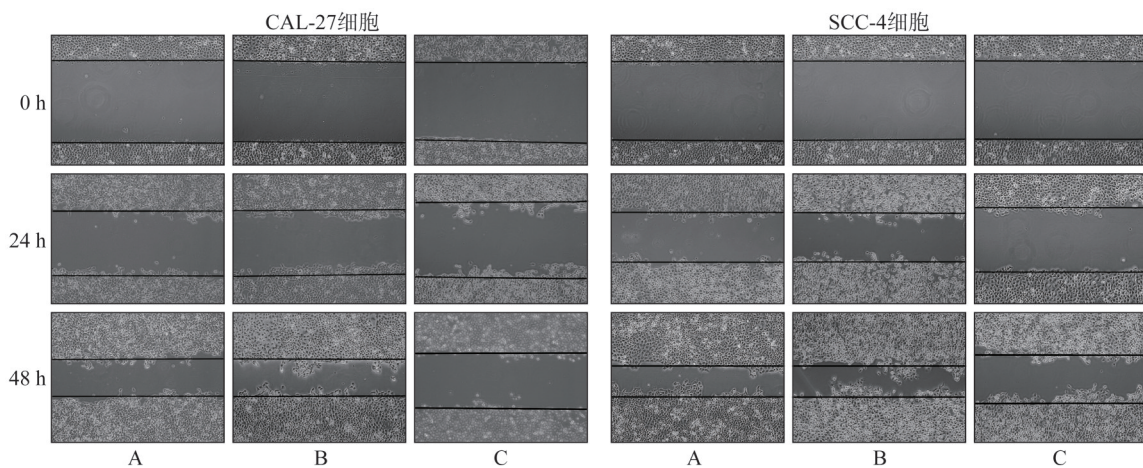
结果显示: SCC-4 过表达实验组、CAL-27 过



左: RhoE 在 SCC-4 细胞系中 mRNA 表达水平; 中: RhoE 在 CAL-27 细胞系中 mRNA 表达水平; 右: 在 SCC-4、CAL-27 细胞系中 RhoE 蛋白的电泳图。A、B、C 分别表示空白对照组、阴性对照组、过表达实验组, \*P<0.05。

图 3 RhoE 过表达 qRT-PCR 及蛋白免疫印迹结果

Fig 3 The transfection efficiency after overexpression of RhoE in SCC-4 and CAL-27



左: CAL-27 细胞; 右: SCC-4 细胞。从上到下依次为 0、24、48 h; A、B、C 分别代表空白对照组、阴性对照组、过表达实验组。

图 4 划痕实验结果图

Fig 4 Results of scratch test

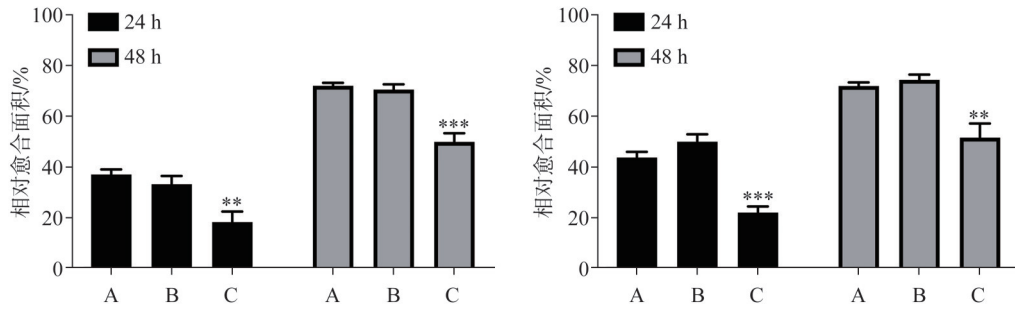
表达实验组在 24、48 h 时的划痕相对愈合面积显著低于各自空白对照组以及阴性对照组 (P<0.05, 图 4、5), 由此说明, RhoE 过表达可抑制 TSCC 细胞的迁移能力。

### 2.4 Transwell 侵袭实验结果

SCC-4 过表达实验组、CAL-27 过表达实验组细胞通过 Matrigel 胶迁移到小室膜下的数量显著低于各自阴性对照组和空白对照组, 细胞的侵袭能力降低 (P<0.05, 图 6、7), 由此说明 RhoE 的表达上调可以抑制 TSCC 细胞的侵袭能力。

### 2.5 TSCC 细胞中 RhoE 过表达后相关蛋白的表达情况

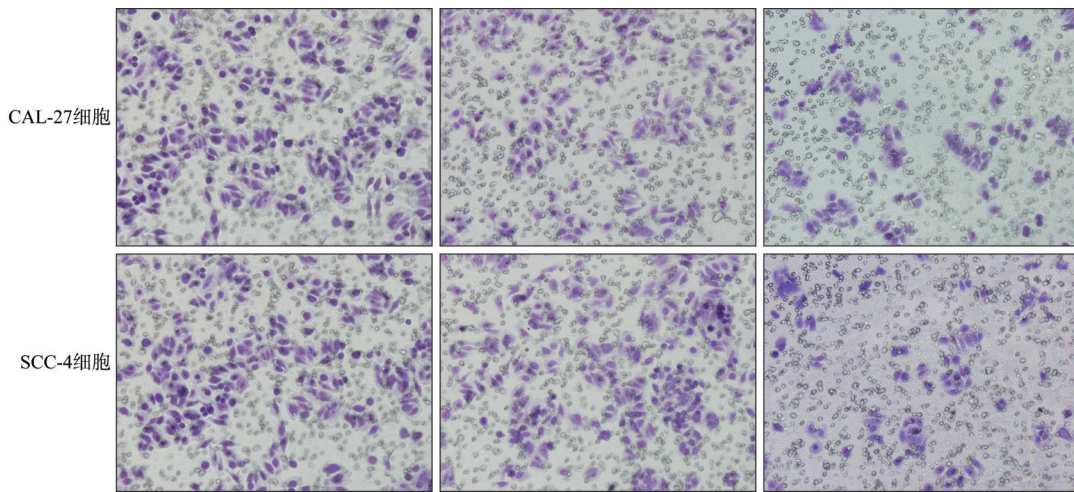
CAL-27、SCC-4 细胞系过表达实验组细胞与各自阴性对照组和空白对照组相比, ROCK1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平均显著降低 (P<0.05, 图 8), 由此推测, RhoE 负性调控 TSCC 细胞 RhoE/ROCK1 信号通路, 降低侵袭相关蛋白 MMP-2、MMP-9 的表达。



左: CAL-27细胞; 右: SCC-4细胞。A、B、C分别代表空白对照组、阴性对照组、过表达实验组; \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001。

图 5 相对愈合面积统计结果

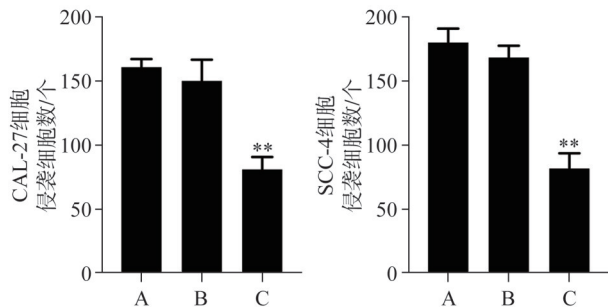
Fig 5 Statistical chart of relative healing area



上: CAL-27细胞; 下: SCC-4细胞。左、中、右分别代表空白对照组、阴性对照组、过表达实验组。

图 6 Transwell侵袭实验结果图

Fig 6 Results of Transwell invasion experiment



左: CAL-27细胞; 右: SCC-4细胞。A、B、C分别代表空白对照组、阴性对照组、过表达实验组; \*\*P<0.01。

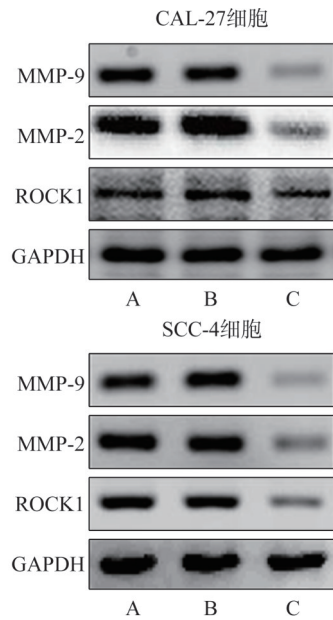
图 7 侵袭细胞个数统计结果

Fig 7 Statistical chart of the number of invasive cells

### 3 讨论

RhoE是Rho家族的一员,于1996年被Foster等<sup>[10]</sup>发现。目前多项研究<sup>[6]</sup>发现,RhoE在人各类细胞中均有表达,多定位于细胞膜和细胞浆中,不同类型细胞中RhoE表达量有相当大差异。Her-

nández-Sánchez等<sup>[11]</sup>通过小鼠动物实验研究发现,RhoE正常表达对于细胞不可或缺,表达量下调将导致细胞接触抑制消失、对外界致癌物易感、癌症转移潜能增加,一定程度上与癌基因起协同作用。在多种肿瘤中,RhoE表达失调,目前在RhoE在肿瘤生物学中的作用主要有两种观点,一方面认为其低表达促进癌症的进展,并在相当一部分癌症如肝癌、前列腺癌、食管鳞状细胞癌中得到了证实;另一方面认为,RhoE在肿瘤组织中高表达与肿瘤进展正相关,如非小细胞肺癌、胰腺癌等,至今研究结论仍存在一定争议<sup>[12-16]</sup>。有学者<sup>[7-8]</sup>提出,这可能与肿瘤微环境相关。本研究采用免疫组织化学法检测TSCC组织及癌旁组织标本中RhoE蛋白的表达情况,组织切片染色后,RhoE蛋白呈棕褐色,TSCC中RhoE表达阳性率显著低于癌旁组织中RhoE表达阳性率(P<0.05);对组织标本采用qRT-PCR以及蛋白印迹实验染色检测mRNA及蛋白质表达水平,进一步证实与TSCC癌旁组织相比,TSCC中RhoE低表达。



上：CAL-27细胞；下：SCC-4细胞。A、B、C分别代表空白对照组、阴性对照组、过表达实验组。

图 8 MMP-9、MMP-2、ROCK1 蛋白电泳图

Fig 8 Electrophoretogram of MMP-9, MMP-2 and ROCK1

肿瘤的局部侵袭和转移是影响预后的主要因素，RhoE在癌症细胞的侵袭、转移中起一定作用<sup>[6]</sup>。Belgiovine等<sup>[17]</sup>进行动物实验发现，RhoE过表达降低了肿瘤细胞的侵袭性和转移潜能。目前，RhoE在TSCC中作用的研究较少。本实验中，阴性对照组与空白对照组TSCC细胞侵袭、转移能力无显著改变，在RhoE过表达实验组中，SCC-4、CAL-27细胞的侵袭能力均降低，推测RhoE上调可能会抑制TSCC细胞的侵袭、转移能力。有研究<sup>[18-20]</sup>证实，癌症细胞中RhoA、ROCK1高表达会促进侵袭转移，增加恶性程度。本实验中，RhoE过表达实验组中TSCC细胞的ROCK1蛋白表达下降，提示RhoE可能通过调控ROCK1进一步影响TSCC细胞的侵袭、转移。ROCK1参与了肌动蛋白细胞骨架重排，肌动蛋白是细胞蛋白骨架中最薄的部分，激活Rho GTP酶以及影响ROCK1信号转导通路，调节了肌动蛋白的形成，进而直接影响了细胞的运动及功能<sup>[21]</sup>。在TSCC中，RhoE对ROCK1的影响可能是通过拮抗RhoA来实现的。RhoE是RhoA的拮抗蛋白，RhoE与ROCK1竞争性结合后，抑制了RhoA-ROCK1诱导的肌动蛋白的应力纤维，进而影响癌症细胞的侵袭和转移<sup>[22-23]</sup>。

癌症细胞转移可以概括为细胞从原发灶脱落并侵入细胞外基质，穿透细胞外基质进入血管及淋巴管，最终免疫逃逸并远端定植。MMP家族能够降解细胞外基质，其中明胶酶是细胞外基质和

基底膜中IV型胶原的唯一降解酶，主要分为MMP-2和MMP-9亚型<sup>[24]</sup>。在复发性流产的胎盘滋养层细胞中，敲低RhoE基因，MMP-2及MMP-9的表达均升高，细胞迁移能力增强，过表达RhoE则得到相反结果<sup>[25]</sup>。在胃癌细胞中过表达RhoE蛋白，同样观察到MMP-2、MMP-9降低<sup>[26]</sup>。本实验通过检测RhoE过表达实验组CAL-27、SCC-4细胞MMP-2、MMP-9的相对表达量发现，与各自细胞的空白对照组及阴性对照组相比，RhoE过表达细胞MMP-2、MMP-9的表达受到了抑制，并且迁移能力下降，由此可见，舌癌细胞中，RhoE可能通过调控MMP-2、MMP-9进而影响癌症细胞的转移。MMP-2、MMP-9具有降解细胞外基质、促进内皮细胞增殖及生成新的毛细血管等功能，已证实TSCC中MMP-2及MMP-9高表达与肿瘤恶性程度正相关，是肿瘤不良预后的标志物。本课题组前期研究发现，RhoA下调抑制MMP-2及MMP-9表达，考虑到RhoE对RhoA的拮抗作用，推测RhoE对MMP-2及MMP-9的调节部分依赖于RhoA介导的肌动蛋白应力纤维形成。然而RhoE介导的癌症细胞转移是一个复杂的生物学行为，仍可能存在其他调节途径，有待于进一步研究。

本研究初步研究了RhoE在TSCC细胞中的表达以及对下游MMP-2、MMP-9及ROCK1通路的调控。相对于癌旁组织来说，RhoE在TSCC中表达下调，上调RhoE表达会抑制ROCK1、MMP-2、MMP-9的表达并导致TSCC细胞迁移、侵袭能力的下降。本实验通过对RhoE表达对TSCC细胞的侵袭、迁移作用的研究，为相关靶向药物的研究提供了新的思路。

利益冲突声明：作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

[1] Feng Z, Xu QS, Qin LZ, et al. Predicting radiotherapy necessity in tongue cancer using lymph node yield[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2017, 75(5): 1062-1070.  
 [2] 孙小雅, 严汉兴, 贺莎, 等. 舌癌多种治疗方式的临床疗效比较[J]. 中南医学科学杂志, 2018, 46(1): 16-19.  
 Sun XY, Yan HX, He S, et al. The comparison of the clinical curative effect of various treatments for tongue carcinoma[J]. Med Sci J Central South Chin, 2018, 46(1): 16-19.  
 [3] Wherlock M, Mellor H. The Rho GTPase family: a Rac to Wrchs story[J]. J Cell Sci, 2002, 115(Pt 2): 239-240.

- [4] Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 167-179.
- [5] Garavini H, Riento K, Phelan JP, et al. Crystal structure of the core domain of RhoE/Rnd3: a constitutively activated small G protein[J]. *Biochemistry*, 2002, 41(20): 6303-6310.
- [6] Basbous S, Azzarelli R, Pacary E, et al. Pathophysiological functions of Rnd proteins[J]. *Small GTPases*, 2020: 1-22.
- [7] Paysan L, Piquet L, Saltel F, et al. Rnd3 in cancer: a review of the evidence for tumor promoter or suppressor [J]. *Mol Cancer Res*, 2016, 14(11): 1033-1044.
- [8] Riou P, Villalonga P, Ridley AJ. Rnd proteins: multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression[J]. *Bioessays*, 2010, 32(11): 986-992.
- [9] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准 [J]. *中国癌症杂志*, 1996, 6(4): 229-231.  
Xu LZ, Yang WT. Criteria for judging the results of immunohistochemistry reaction[J]. *Chin Oncol*, 1996, 6(4): 229-231.
- [10] Foster R, Hu KQ, Lu Y, et al. Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and *in vivo* farnesylation[J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(6): 2689-2699.
- [11] Hernández-Sánchez M, Poch E, Guasch RM, et al. RhoE is required for contact inhibition and negatively regulates tumor initiation and progression[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(19): 17479-17490.
- [12] Bektic J, Pfeil K, Berger AP, et al. Small G-protein RhoE is underexpressed in prostate cancer and induces cell cycle arrest and apoptosis[J]. *Prostate*, 2005, 64(4): 332-340.
- [13] Raz DJ, Ray MR, Kim JY, et al. A multigene assay is prognostic of survival in patients with early-stage lung adenocarcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(17): 5565-5570.
- [14] Zhao H, Yang J, Fan T, et al. RhoE functions as a tumor suppressor in esophageal squamous cell carcinoma and modulates the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(5): 1363-1374.
- [15] Ma W, Wong CC, Tung EK, et al. RhoE is frequently down-regulated in hepatocellular carcinoma (HCC) and suppresses HCC invasion through antagonizing the Rho/Rho-kinase/myosin phosphatase target pathway[J]. *Hepatology*, 2013, 57(1): 152-161.
- [16] Feng B, Li K, Zhong H, et al. RhoE promotes metastasis in gastric cancer through a mechanism dependent on enhanced expression of CXCR4[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e81709.
- [17] Belgiovine C, Frapolli R, Bonezzi K, et al. Reduced expression of the ROCK inhibitor Rnd3 is associated with increased invasiveness and metastatic potential in mesenchymal tumor cells[J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e14154.
- [18] Nishizawa T, Nakano K, Harada A, et al. DGC-specific RHOA mutations maintained cancer cell survival and promoted cell migration via ROCK inactivation[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(33): 23198-23207.
- [19] Shao Y, Tong Z, Wei J, et al. LncRNA-zinc finger protein 281 downregulates rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1 by upregulating miR-144 in osteosarcoma[J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(4): 79.
- [20] Jiang Y, Hong D, Lou Z, et al. Lupeol inhibits migration and invasion of colorectal cancer cells by suppressing RhoA-ROCK1 signaling pathway[J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2020, 393(11): 2185-2196.
- [21] Piquet L, Robbe T, Neaud V, et al. Rnd3/RhoE expression is regulated by G-actin through MKL1-SRF signaling pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 370(2): 227-236.
- [22] Riento K, Ridley AJ. Inhibition of ROCK by RhoE[J]. *Methods Enzymol*, 2006, 406: 533-541.
- [23] Nishizuka M, Komada R, Imagawa M. Knockdown of RhoE expression enhances TGF- $\beta$ -induced EMT (epithelial-to-mesenchymal transition) in cervical cancer HeLa cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19): 4697.
- [24] 柳海, 李秀, 吴强, 等. 口腔鳞状细胞癌中 MMP9、CD-44v6 表达及其意义[J]. *中国肿瘤*, 2005, 14(11): 747-750.  
Liu H, Li X, Wu Q, et al. The expression of matrix metalloproteinase-9 and CD44 splice variant 6 in oral squamous cell carcinoma and its significance[J]. *Chin Cancer*, 2005, 14(11): 747-750.
- [25] Ma XL, Li X, Tian FJ, et al. Upregulation of RND3 affects trophoblast proliferation, apoptosis, and migration at the maternal-fetal interface[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 153.
- [26] Zhou J, Li K, Gu Y, et al. Transcriptional up-regulation of RhoE by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes epithelial to mesenchymal transition of gastric cancer cells during hypoxia[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 415(2): 348-354.

(本文编辑 张玉楠)