

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.05.0385

论著

# Ras 相关区域家族 10 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及预后价值

张静怡<sup>1,2</sup>, 迟航<sup>3</sup>, 杨鑫<sup>1</sup>, 汪玉龙<sup>1</sup>, 赵伟鹏<sup>1</sup>

(1.天津医科大学肿瘤医院, 国家恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津市肿瘤防治重点实验室, 天津 300060; 2. 天津市中西医结合医院肿瘤内科, 天津 300102; 3. 天津市中西医结合医院呼吸内科, 天津 300102)

**摘要** 目的: 探讨 ras-相关结构域家族(ras-association domain family, RASSF)10 在非小细胞肺癌中的表达, 分析其与非小细胞肺癌临床病理特征和预后的关系。方法: 采用 qRT-PCR 和 Western 印迹检测 RASSF10 mRNA 和蛋白的表达; 甲基化特异性聚合酶链式反应(MSP)检测 RASSF10 启动子甲基化状态, 采用免疫组化和酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测石蜡组织和血液中 RASSF10 蛋白表达, Cox 回归模型进行生存分析。结果: 在非小细胞肺癌细胞株 SPCA-1 中 RASSF10 mRNA 及蛋白( $z=21.38$ 、 $33.14$ , 均  $P<0.05$ )、在 NCI-H157 中 RASSF10 mRNA 及蛋白( $z=56.73$ 、 $56.34$ , 均  $P<0.05$ ) 均低于非肿瘤细胞株。MSP 发现 RASSF10 在 SPCA-1 和 NCI-H157 细胞株启动子区甲基化, 用 5-氮杂-2'-脱氧胞苷处理后, RASSF10 在 SPCA-1 和 NCI-H157 细胞株中 mRNA 和蛋白( $t=18.14$ 、 $56.13$ , 均  $P<0.05$ ) 的表达增加。RASSF10 启动子甲基化状态与组织中和血清中 RASSF10 的低表达密切相关( $\chi^2=19.271$ 、 $4.831$ , 均  $P<0.05$ )。预后多因素分析石蜡组织中 RASSF10 表达( $HR=0.508$ ,  $P<0.05$ ) 和 N 分期( $HR=1.839$ ,  $P<0.001$ ) 为非小细胞肺癌患者预后独立因素, RASSF10 表达与肿瘤直径( $\chi^2=4.787$ ,  $P<0.05$ )、气道内播散( $\chi^2=15.618$ ,  $P<0.001$ ) 和 N 分期( $\chi^2=11.588$ ,  $P<0.01$ ) 密切相关。结论: RASSF10 在非小细胞肺癌中表达降低, 与非小细胞肺癌肿瘤进展密切相关, 是非小细胞肺癌早期诊断及预后有价值的肿瘤标志物。

**关键词** 非小细胞肺癌; RASSF10; 甲基化; 预后

中图分类号 R734.2

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)05-0385-06

## The expression and prognostic value of ras-association domain family 10 in non-small cell lung cancer

ZHANG Jingyi<sup>1,2</sup>, CHI Hang<sup>3</sup>, YANG Xin<sup>1</sup>, WANG Yulong<sup>1</sup>, ZHAO Weipeng<sup>1</sup>

(1. Tianjin Medical University Cancer Institute & Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin Medical University (Ministry of Education), Tianjin 300060, China; 2. Department of Oncology, Tianjin Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Tianjin 300102, China; 3. Department of Respiratory, Tianjin Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Tianjin 300102, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the expression and methylation status of ras-association domain family (RASSF) 10 and its correlation with the clinicopathological characteristics and prognosis in non-small cell lung cancer. **Methods:** The expression of RASSF10 were detected by real-time quantitative reverse transcription PCR and Western blotting. Methylation-specific PCR (MSP) analysis was utilized to detect the methylation status of the RASSF10 promoter. RASSF10 was analyzed by immunohistochemistry and enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Overall survival was subjected to multivariate analysis by using Cox proportional hazard model. **Results:** The mRNA SPCA-1 ( $z=21.38$ ,  $P<0.05$ ), NCI-H157 ( $z=56.73$ ,  $P<0.05$ ) and protein expression levels SPCA-1 ( $z=33.14$ ,  $P<0.01$ ), NCI-H157 ( $z=56.34$ ,  $P<0.01$ ) of RASSF10 in non-small cell lung cancer cell lines (SPCA-1 和 NCI-H157) were lower than those in non-tumor cell line. RASSF10 was methylated in SPCA-1 and NCI-H157 cell lines, after treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine, RASSF10 expression was increased in the mRNA ( $t=18.14$ ,  $P<0.05$ ) and protein expression levels ( $t=56.13$ ,  $P<0.05$ ) cell lines by MSP. The methylation status of the RASSF10 promoter was intimately and significantly correlated with RASSF10 expression in tumor and blood ( $\chi^2=19.271$ ,  $4.831$ , both  $P<0.05$ ). The methylation status of the RASSF10 promoter and RASSF10 expression were associated with the survival of patients with non-small cell lung cancer. The RASSF10 expression ( $HR=0.508$ ,  $P<0.05$ ) and lymph node stage ( $HR=1.839$ ,  $P<0.001$ ) were identified as the an independent predictor of the overall survival. Size of tumor ( $\chi^2=4.787$ ,  $P<0.05$ ), intratracheal dissemination ( $\chi^2=15.618$ ,  $P<0.001$ ) and lymph node stage ( $\chi^2=11.588$ ,  $P<0.01$ ) were related with RASSF10 expression. **Conclusion:** The expression of RASSF10 is low in non-small cell lung cancer. RASSF10 in tissues may be a valuable biomarker for the

基金项目 国家自然科学基金(81472183); 天津市自然科学基金(18JCYBJC91600); 天津市医学重点学科(专科)建设项目(TJYXZDXK-010A)

作者简介 张静怡(1987-), 女, 主治医师, 硕士在读, 肿瘤学; 通信作者: 赵伟鹏, E-mail: zhaoweipeng@tjmuch.com。

assessment of non-small cell lung cancer prognosis.

**Key words** non-small cell lung cancer; RASSF10; methylation; prognosis

肺癌是我国常见的恶性肿瘤,其死亡率是各种恶性肿瘤的首位<sup>[1]</sup>。我国肺癌患者以中、晚期居多<sup>[2]</sup>,总体生存质量较差,因此早期诊断及治疗对于改善非小细胞肺癌的预后具有重要意义。目前常见的肺癌标志物(如癌胚抗原和细胞角蛋白19)预测肿瘤复发及生存敏感性和特异性均较差,不能完全满足临床需求<sup>[3]</sup>。因此,在非小细胞肺癌中寻找新的早期筛查及与预后相关的肿瘤标志物具有重要意义。Ras 基因突变在人类肿瘤的发生、发展中起重要作用<sup>[4]</sup>,研究发现能够编码 Ras 相关区域家族的基因,称为 Ras 相关区域家族(ras-association domain family, RASSF),RASSF 蛋白直接或间接作用于 Ras,调节其相关的信号转导通路与肿瘤细胞的生长。Ras 结合域蛋白 10 是 RASSF 家族的成员,位于染色体 11p15.2<sup>[5]</sup>。RASSF10 蛋白由 507 个氨基酸组成。由于启动子区甲基化,RASSF10 在多种肿瘤中呈低表达<sup>[6-7]</sup>。RASSF10 在细胞凋亡、黏附、细胞分裂、迁移和炎症持续时间中发挥着重要作用,进而影响肿瘤细胞的生长、侵袭和转移<sup>[8]</sup>。尽管研究发现 RASSF10 可调节多种分子通路影响肺癌肿瘤细胞生长<sup>[9]</sup>,然而 RASSF10 在非小细胞肺癌中与临床病理相关性、预后价值中的研究较少。本研究分析了非小细胞肺癌细胞株和肺癌组织中 RASSF10 的表达,进一步探讨 RASSF10 与临床病理因素及预后之间的相关性。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象与实验材料** 回顾性分析 2017 年 2 月—2019 年 12 月于天津市肿瘤医院就诊的肺癌患者。纳入标准:(1)接受根治性手术的经病理证实为非小细胞肺癌。(2)肿瘤组织和外周静脉血液样本立即冷冻在液氮中并在-80℃下储存直至使用。(3)诊断为 I a~III a 期的患者。(4)所有患者均有完整的随访记录。排除标准:(1)未行根治性手术患者。(2)无完整随访资料及失访患者。根据纳入和排除标准,本组共 115 例非小细胞肺癌患者符合研究条件。

实验中使用的细胞株、试剂和设备如下:SPCA-1、NCI-H157、A549 非小细胞肺癌细胞株、MRC-5 非肿瘤细胞株细胞(北京博乐生物科技有限公司);RPMI 1640 培养基(Gibco BRL, Rockville, MD, USA);10%胎牛血清(FBS; Gibco, Carlsbad, CA, USA);1%青霉素链霉素(GIBCO-BRL);PBS 缓冲液;逆转录

试剂盒,qPCR 试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA);RASSF10 ELISA 检测试剂盒(广州伟伯科技有限公司);10%山羊血清(中山生物技术);兔抗人 RASSF10 多克隆抗体(ab113105, Abcam);5-aza-dC(Sigma, Germany);化学发光底物显影液(GenStar);荧光显微镜、多功能酶标仪(ThermoFisher Scientific, USA);超净工作台(江苏通净净化设备有限公司)。

## 1.2 研究方法

**1.2.1 qRT-PCR** 用试剂盒从细胞系提取总 RNA,用反转录系统将 1 μL 总 RNA 反转录为 20 μL cDNA(引物序列如表 1),应用以下 PCR 循环条件:在 95℃下变性 35 个循环 3 min;在 94℃下退火 0.5 min;在 56℃下拉伸 0.5 min;并在 72℃下最终延伸 8 min。将 mRNA 表达的相对定量标准化为 GAPDH 值( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )。

表 1 PCR 引物序列  
Tab.1 PCR primer sequence

基因名称	引物序列(5'→3')	产物(bp)
RASSF10 F	AGGCTGAGGCTAGAAGAACTA	168
R	GTTCTAGCTGCCATCAGTCCTT	143
GAPDH F	AGAAGGCTGGGCTCATTTT	135
R	AGGGGCCATCCACAGCTCTTC	126

**1.2.2 Western 印迹法** 将细胞在 RIPA 裂解缓冲液中均匀化 30 min,在 4℃下离心(12 000 r/min),将裂解液清除 15 min,用 10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白提取物,电转移至 PVDF。用 5%脱脂牛奶阻断非特异性结合位点 60 min 后,在 4℃下与多克隆抗体 RASSF10 孵育隔夜。用 PBS-T 洗涤膜 3 min,用辣根过氧化物酶(HRP)耦联抗兔免疫球蛋白抗体在室温下孵育 60 min。然后用 PBS-T 对膜进行 3 次洗涤 10 min,用增强化学发光系统观察免疫复合物。

**1.2.3 甲基化特异性聚合酶链式反应(MSP)** RASSF10 启动子 PCR 扩增的甲基化特异性(M)和非甲基化特异性(U)(引物序列见表 2)。MSP 使用 Ampli Taq Gold 进行,PCR 反应体积为 25 μL,循环参数为 97℃初始变性 5 min,95℃变性 40 s,60℃退火 50 s,72℃延伸 50 s。总共 25 个循环,最终在 72℃下延伸 10 min。使用 2%琼脂糖凝胶检测 PCR 扩增。临床中根据 RASSF10 甲基化状态,将所有患者分为甲基化组及非甲基化组。

表 2 甲基化引物序列

Tab.2 Methylation primer sequence

甲基化状态	引物序列(5'→3')	产物(bp)
M-F	GGGGTATTTTGGGTAGAGTTAGC	132
M-R	AAA CAACTAAAAAACGACTACGAC	156
U-F	GGGGTATTTGGGTAGAG TTAGAGTG	135
U-R	AACAA ACTAAAAACACACTACAAC	128

1.2.4 5-氮杂-2'-脱氧胞苷处理 用 10  $\mu\text{m}$  的 5-aza-dC 处理发现的甲基化的细胞株。每天更换培养基并加入新鲜的 5-aza-dC 进行处理 3 d。使用未处理的细胞作为阴性对照(NC)。处理后,收获细胞株进行 qRT-PCR 和 Western 免疫检测相关 mRNA 和蛋白的表达。

1.2.5 免疫组化检测及评价 石蜡包埋切片 4  $\mu\text{m}$ , 载玻片进行免疫组化分析。切片用二甲苯去污,再经 100%、95%、90%、80%和 75%乙醇再水合。在 95℃下进行 20 min 的抗原回收处理,室温下用 3%过氧化氢阻断内源过氧化物酶 15 min。切片在 PBS 中洗涤,用 10%山羊血清封闭 30 min,然后在 4℃过夜,用兔抗人 RASSF10 多克隆抗体在加湿室中孵育。在使用 PBS 洗涤之后,将切片与 HRP 结合的二抗体在室温下孵育 1 h。最后,用 20%苏木素对所有玻片进行染色。滑块脱水并装在盖玻片上。对于阴性对照,用 PBS 代替一抗。根据显微镜下染色强度和阳性细胞百分率对每个切片进行评分。阳性细胞

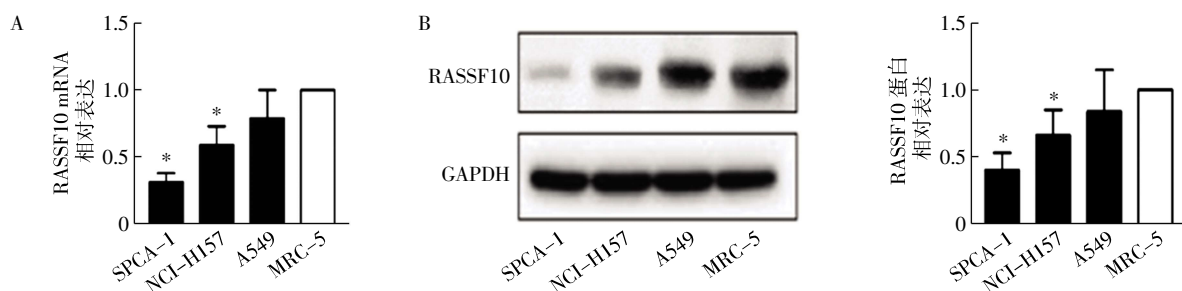
百分率和染色强度乘为评分。染色强度如下:0(无染色),1(浅黄色),2(黄棕色)和 3(棕色)。阳性细胞按阳性细胞百分比分级:0(无阳性肿瘤细胞)、1(<10%阳性肿瘤细胞)、2(11%~50%阳性肿瘤细胞)、3(51%~80%阳性肿瘤细胞)和 4(>80%阳性肿瘤细胞)<sup>[10]</sup>。根据石蜡组织中 RASSF10 的表达,将所有患者分为 RASSF10 表达阳性(1~12)和表达阴性。

1.2.6 酶联免疫吸附测定法(ELISA) 取血浆标本,按说明书进行蛋白测定。每个样品做复孔,取平均值。受试者工作特征(ROC)曲线判断 RASSF10 表达水平,将所有患者分为高水平组和低水平组。

1.3 统计学处理 组间差异采用秩和检验;相关性分析采用卡方检验,预后生存分析采用 Kaplan-Meier 进行单因素分析,Log-rank 比较组间差异;Cox 多因素分析确定预后独立因素, $P<0.05$  为有统计学意义,SPSS25.0 统计软件包进行分析。

## 2 结果

2.1 RASSF10 在细胞系中的表达 非小细胞肺癌细胞株 SPCA-1( $z=21.38, P<0.05$ )、NCI-H157( $z=56.73, P<0.05$ )和 A549( $z=72.09, P>0.05$ )中 RASSF10 的 mRNA 表达水平低于非肿瘤细胞株 MRC-5。非小细胞肺癌细胞株 SPCA-1( $z=33.14, P<0.01$ )、NCI-H157( $z=56.34, P<0.01$ )和 A549( $z=52.37, P>0.05$ )中 RASSF10 的蛋白表达水平低于非肿瘤细胞株 MRC-5(图 1)。



注:A:qPCR 检测 RASSF10 在细胞株中 mRNA 的相对表达;B:Western 印迹检测 RASSF10 在细胞株中蛋白的相对表达;与 MRC-5 相比, \* $P<0.05$

图 1 RASSF10 在肺癌细胞株及正常细胞株中的表达

Fig.1 Expression of RASSF10 in lung cancer cell lines and normal cell lines

2.2 MSP 和 5-氮杂-2'-脱氧胞苷处理后 RASSF10 甲基化水平 MSP 检测不同非小细胞肺癌细胞株 (SPCA-1、NCI-H157、A549 和 MRC-5) 中 RASSF10 启动子的甲基化状态(甲基化和非甲基化),细胞株 SPCA-1 和 NCI-H157 中存在 RASSF10 启动子甲基化,而在 A549 和非肿瘤细胞系 MRC-5 中并未发现 RASSF10 启动子甲基化。5-氮杂-2'-脱氧胞苷处理存在甲基化的非小细胞肺癌细胞株 (SPCA-1 和

NCI-H157), 与对照组相比, 处理后的细胞株中 RASSF10 mRNA 和蛋白质表达水平升高( $t=18.14$ 、 $56.13$ , 均  $P<0.05$ ), 见图 2。

2.3 非小细胞肺癌患者 RASSF10 表达和甲基化状态的表达 免疫组化显示 RASSF10 在细胞质内表达(图 3), 74 例 RASSF10 阳性表达, 41 例 RASSF10 阴性表达。

ELISA 法检测血清中 RASSF10 的平均表达水

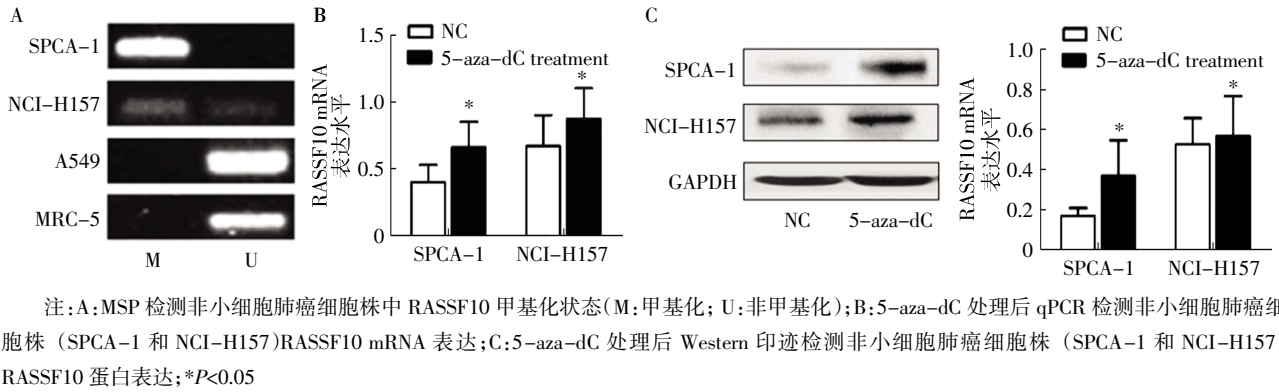
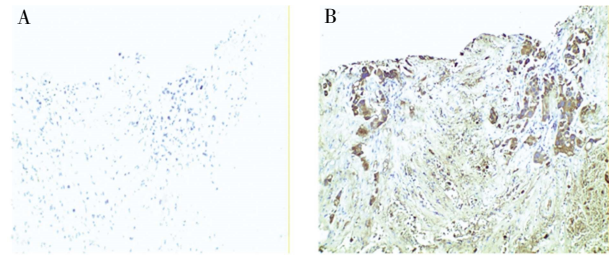


图 2 qPCR 和 Western 印迹检测 RASSF10 甲基化表达  
Fig.2 Detection of RASSF10 methylation status by qPCR and Western blotting

平,82 例患者为高表达,33 例患者为低表达。MSP 检测了患者 RASSF10 启动子的甲基化状态,76 例患者存在 RASSF10 启动子甲基化,其余 39 例患者并未发现 RASSF10 启动子甲基化。



注:A:RASSF10 阴性表达(10×);B:RASSF10 阳性表达(40×)

图 3 免疫组化检测 RASSF10 在肺癌组织中的表达  
Fig.3 Expression of RASSF10 in lung cancer tissue by immunohistochemical

免疫组化检测石蜡标本中 RASSF10 的表达与 ELISA 检测血清标本中 RASSF10 的表达显著相关( $\chi^2=15.798, P<0.001$ );免疫组化检测石蜡标本中 RASSF10 的表达与 MSP 检测甲基化状态密切相关( $\chi^2=19.271, P<0.001$ );ELISA 检测血清标本中 RASSF10 的表达与 MSP 检测甲基化状态密切相关( $\chi^2=4.831, P<0.05$ )。

2.4 生存分析 单因素预后分析显示肿瘤直径( $\chi^2=6.060, P<0.05$ )、T 分期( $\chi^2=6.163, P<0.05$ )和 N 分期( $\chi^2=39.376, P<0.001$ )、RASSF10 启动子甲基化状态( $\chi^2=13, 426, P<0.001$ )、RASSF10 表达( $\chi^2=21.708, P<0.01$ )和血清 RASSF10 水平( $\chi^2=7.079, P<0.01$ )与非小细胞肺癌患者的生存率显著相关。Cox 多因素预后分析显示 RASSF10 表达( $HR=0.508, P<0.05$ )和 N 分期( $HR=1.839, P<0.001$ )为非小细胞肺癌患者预后的独立因素(表 3)。RASSF10 阳性表达预后较 RASSF10 阴性预后差( $\chi^2=21, 137, P<0.001$ )(图 4)。

表 3 非小细胞肺癌患者预后生存分析

Tab.3 Survival analysis of patients with non-small cell lung cancer

因素	5 年生存率(%)	单因素分析		多因素分析	
		$\chi^2$	P	HR	P
性别		0.406	0.524		
男	43.6				
女	46.1				
年龄(岁)		0.255	0.614		
≤60	40.9				
>60	48.8				
吸烟状态		2.917	0.088		
是	33.8				
否	50.5				
病理类型		2.637	0.268		
鳞癌	49.5				
腺癌	44.0				
其他	33.3				
气道内播散		11.532	0.001	0.917	0.383
是	54.9				
否	19.1				
肿瘤直径(cm)		6.060	0.014	1.061	0.863
≤3	53.1				
>3	39.8				
T 分期		6.163	0.046	1.392	0.126
T1	49.3				
T2	44.4				
T3	31.2				
N 分期		39.376	<0.001	1.839	<0.001
N0	77.1				
N1	64.2				
N2	15.8				
RASSF10 表达(免疫组化)		21.708	<0.001	0.508	0.043
阴性	29.4				
阳性	71.3				
血液 RASSF10 水平		7.079	0.008	0.917	0.777
高表达	60.3				
低表达	38.2				
RASSF10 甲基化状态		13.426	<0.001	0.584	0.073
甲基化	32.1				
非甲基化	68.5				

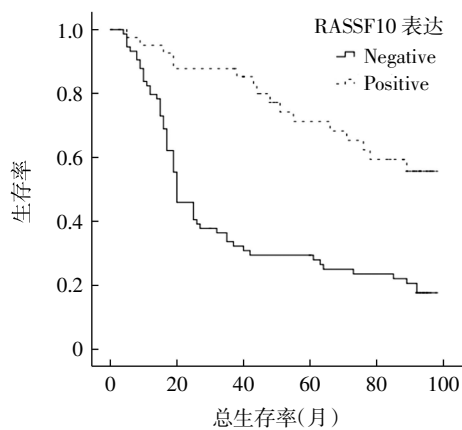


图4 RASSF10 表达(阴性/阳性)患者预后生存曲线

Fig.4 Survival curve of patients with non-small cell lung cancer according to RASSF10 expression(negative or positive)

2.5 RASSF10 表达与临床病理因素之间的相关性  
免疫组化分析不同 RASSF10 表达与临床病理因素(如性别、年龄、吸烟状况、组织学亚型、肿瘤大小、T分期和 N 分期)之间的相关性。结果发现,肿瘤直径( $\chi^2=4.787, P<0.05$ )、气道内播散( $\chi^2=15.618, P<0.001$ )和 N 分期( $\chi^2=11.588, P<0.01$ )与 RASSF10 的表达密切相关(表 4)。

表 4 RASSF10 表达与临床病理因素相关性分析

Tab.4 Relationships between RASSF10 expression and clinicopathological characteristics

因素	RASSF10 表达		$\chi^2$	P
	阴性(n)	阳性(n)		
性别			0.789	0.374
男	46	22		
女	28	19		
年龄(岁)			1.978	0.160
$\leq 60$	35	25		
$>60$	39	16		
吸烟状态			2.162	0.141
是	30	11		
否	44	30		
病理类型			1.270	0.530
鳞癌	18	14		
腺癌	50	24		
其他	6	3		
气道内播散			15.618	$<0.001$
是	34	4		
否	40	37		
肿瘤直径(cm)			4.787	0.029
$\leq 3$	21	20		
$>3$	53	21		
T 分期			4.258	0.119
T1	22	20		
T2	37	14		
T3	15	7		
N 分期			11.588	0.003
N0	29	22		
N1	5	9		
N2	40	10		

### 3 讨论

表观遗传机制与肿瘤的发生、发展密切相关, DNA 甲基化是常见的表观遗传学<sup>[10]</sup>。DNA 甲基化是指位于基因启动子中的富含 CpG 的区域,在正常条件下 CpG 岛表现出非甲基化模式,启动子甲基化使肿瘤抑制基因失活,甲基化是肿瘤启动和进展的重要机制<sup>[11]</sup>。启动子区 CpG 岛的甲基化可改变肿瘤相关基因的表达水平,从而参与调节肿瘤细胞增殖、凋亡和转移<sup>[12]</sup>。RASSF10 含有一个 2 254 bp 的 CpG 岛,在启动子中有 209 个 CpG 位点,前期研究中发现 RASSF10 在多种肿瘤中启动子区域存在甲基化, RASSF10 表达降低。Wang 等<sup>[13]</sup>发现,与正常肝组织相比,在肝癌组织中 RASSF10 mRNA 和蛋白质水平均下调,且低 RASSF10 表达与启动子超甲基化有关。Guo 等<sup>[14]</sup>同样发现在结直肠癌中, RASSF10 表达的降低与 RASSF10 启动子区甲基化显著相关。然而,关于 RASSF10 在非小细胞肺癌中表达的研究较少。本研究发现,非小细胞肺癌细胞株中的 RASSF10 mRNA 和蛋白质表达水平均低于非肿瘤细胞系。进一步通过 MSP 检测到 RASSF10 在 SPCA-1 和 NCI-H157 细胞系中甲基化,而正常细胞系中 RASSF10 启动子区并未发现甲基化状态。用 DNA 甲基化抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷处理后, SPCA-1 和 NCI-H157 中 RASSF10 mRNA 和蛋白表达较前升高。表明 RASSF10 启动子中 CpG 岛的甲基化可能导致 RASSF10 在非小细胞中低表达,并且此种抑制作用是可逆的, RASSF10 可作为非小细胞肺癌治疗的新靶点。

对于抑制基因,蛋白表达和启动子甲基化状态已被认为是肿瘤的潜在预后标志物<sup>[15]</sup>。在 RASSF10 表达及启动子甲基化的预后价值方面,有学者报道, RASSF10 低表达与患者低生存率相关, RASSF10 可能是肿瘤预后的潜在生物标志物<sup>[16]</sup>。Deng 等<sup>[17]</sup>证明 MSP 甲基化 RASSF10 启动子是胃癌患者生存的独立预测因子, RASSF10 启动子甲基化是最有效的潜在预测因子。本研究发现 RASSF10 启动子的甲基化状态和 RASSF10 的蛋白表达都与非小细胞肺癌患者的生存相关。单因素分析发现 RASSF10 启动子的甲基化状态与患者预后密切相关,但多因素分析发现 RASSF10 启动子的甲基化状态并非非小细胞肺癌预后的独立因素。然而,目前大多数研究主要集中在组织石蜡标本中 RASSF10 表达。对于肺癌患者,组织标本的采集可能会增加并发症的风险<sup>[18]</sup>。血液和血清样本是一种方便、微创、廉价的方法,适用于人群筛查<sup>[9]</sup>。为了证实 RASSF10 在血液或血清中

的表达是否可以取代组织中的表达来预测预后,在本研究中选择了同时有血清和肿瘤样本的患者,结果显示血清中的 RASSF10 水平与组织中的 RASSF10 表达一致。单因素预后分析显示血清 RASSF10 水平,免疫组化 RASSF10 表达与非小细胞肺癌患者的生存率显著相关。然而,在采用 *Cox* 多因素回归分析后,免疫组化 RASSF10 表达为患者预后独立因素,尽管 ELISA 检测血清样本中的 RASSF10 与预后相关,但预测效果不如免疫组化效果好。本研究结果表明免疫组化 RASSF10 的蛋白表达是临床预测非小细胞肺癌预后的最佳生物标志物。

RASSF10 与肿瘤细胞增殖、细胞凋亡、黏附、细胞分裂、迁移和细胞的分化相关<sup>[19]</sup>。为了进一步探讨 RASSF10 在非小细胞肺癌中与临床病理的相关性,将不同 RASSF10 表达与临床病理因素进行分析,结果发现 RASSF10 的表达与非小细胞肺癌的淋巴结转移和肿瘤大小相关。RASSF10 低表达与原发肿瘤体积较大和淋巴结转移较多显著相关,提示 RASSF10 可能与肿瘤的侵袭和转移相关。笔者认为其可能机制是 RASSF10 通过阻断  $\beta$ -连环蛋白及其下游靶点的激活或通过激活 p53 信号通路转导来抑制肿瘤生长<sup>[7]</sup>。

本研究表明在非小细胞肺癌中 RASSF10 启动子甲基化导致 RASSF10 低表达,RASSF10 表达与非小细胞肺癌肿瘤进展密切相关,免疫组化 RASSF10 表达在预测非小细胞肺癌预后中具有价值。

#### 参考文献:

- [1] LEE J H, SAXENA A, GIACCONE G. Advancements in small cell lung cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2023, 93(8): 123-128.
- [2] PIRKER R. Treatment of advanced non-small-cell lung cancer: from chemotherapy to chemimmunotherapy[J]. *J Oncol Pract*, 2018, 14(9): 537-538.
- [3] CYRIAC G, GANDHI L. Emerging biomarkers for immune checkpoint inhibition in lung cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 52(2): 269-277.
- [4] AROOQI A A, KAPANOVA G, KUSSAINOV A Z, et al. Regulation of RASSF by non-coding RNAs in different cancers: RASSFs as masterminds of their own destiny as tumor suppressors and oncogenes[J]. *Noncoding RNA Res*, 2022, 7(2): 123-131.
- [5] LU D, MA J, ZHAN Q, et al. Epigenetic silencing of RASSF10 promotes tumor growth in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Dis-cov Med*, 2014, 17(94): 169-178.
- [6] DANSRANJAVIN T, WAGENLEHNER F, GATTENLOEHNER S, et al. Epigenetic down regulation of RASSF10 and its possible clinical implication in prostate carcinoma[J]. *Prostate*, 2012, 72(14): 1550-1558.
- [7] FAN C, WANG W, JIN J, et al. RASSF10 is epigenetically inactivated and suppresses cell proliferation and induces cell apoptosis by activating the p53 signalling pathway in papillary thyroid carcinoma cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(3): 1229-1239.
- [8] JIN Y, CAO B, ZHANG M, et al. RASSF10 suppresses hepatocellular carcinoma growth by activating P53 signaling and methylation of RASSF10 is a docetaxel resistant marker[J]. *Genes Cancer*, 2015, 6(5-6): 231-240.
- [9] HAN X, DONG Q, WU J, et al. RASSF10 suppresses lung cancer proliferation and invasion by decreasing the level of phosphorylated LRP6[J]. *Mol Carcinog*, 2019, 58(7): 1168-1180.
- [10] PAN Y, LIU G, ZHOU F, et al. DNA methylation profiles in cancer diagnosis and therapeutics[J]. *Clin Exp Med*, 2018, 18(1): 1-14.
- [11] SAGHAFINIA S, MINA M, RIGGI N, et al. Pan-cancer landscape of aberrant DNA methylation across human tumors[J]. *Cell Rep*, 2018, 25(4): 1066-1080.
- [12] SEOIGHE C, TOSH N J, GREALLY J M. DNA methylation haplotypes as cancer markers[J]. *Nat Genet*, 2018, 50(8): 1062-1063.
- [13] WANG F, FENG Y, LI P, et al. RASSF10 is an epigenetically inactivated tumor suppressor and independent prognostic factor in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(4): 4279-4297.
- [14] GUO J, YANG Y, YANG Y, et al. RASSF10 suppresses colorectal cancer growth by activating P53 signaling and sensitizes colorectal cancer cell to docetaxel[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(6): 4202-4213.
- [15] JIANG C, KONG Z, LIU S, et al. Fusion radiomics features from conventional MRI predict MGMT promoter methylation status in lower grade gliomas[J]. *Eur J Radiol*, 2019, 121: 108714.
- [16] WANG F, LI P, FENG Y, et al. Low expression of RASSF10 is associated with poor survival in patients with colorectal cancer[J]. *Hum Pathol*, 2017, 62: 108-114.
- [17] DENG J, LIANG H, YING G, et al. Methylation of ras association domain protein 10 (RASSF10) promoter negative association with the survival of gastric cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2014, 4(6): 916-923.
- [18] HU Y, MA P, FENG Y, et al. Predictive value of the serum RASSF10 promoter methylation status in gastric cancer[J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(7): 2890-2900.
- [19] LIU Y, ZHU X, ZHANG W, et al. RASSF10 exhibits tumor suppressing potential involving tumor proliferation, metastasis and epithelial mesenchymal transition in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2022, 47(4): 80.

(2024-03-28 收稿)