

## Rh 家族 C 糖蛋白在食管鳞状细胞癌组织中的表达及其 临床意义

周紫如<sup>1</sup>, 孙梦菲<sup>2</sup>, 张华坤<sup>1</sup>, 孙淑妍<sup>1</sup>, 孙琦<sup>2</sup>, 李锋<sup>1,3</sup>, 陈云昭<sup>4</sup>, 禹洁<sup>4</sup>, 曹玉文<sup>1</sup>, 崔晓宾<sup>1,2</sup>  
(1. 石河子大学医学院病理学系, 新疆 石河子 832002; 2. 南京大学医学院附属鼓楼医院病理科, 江苏 南京 210008; 3. 首都医科大学附属北京朝阳医院病理科, 北京 100020; 4. 浙江省人民医院 杭州医学院附属人民医院病理科, 浙江 杭州 310014)

**[摘要]** **目的:** 探讨 Rh 家族 C 糖蛋白 (RHCG) 在食管鳞状细胞癌 (ESCC) 癌组织中的表达及其对 ESCC 细胞恶性生物学行为的影响, 阐明 RHCG 作为 ESCC 患者诊断和预后标志物的价值。**方法:** 收集 ESCC 组织样本 143 例, 癌旁正常组织样本 105 例。采用免疫组织化学染色法将 143 例 ESCC 样本分为 2 组, 免疫组织化学评分  $\leq 6$  分为 RHCG 低表达组, 免疫组织化学评分  $> 6$  分为 RHCG 高表达组。免疫组织化学染色法检测 143 例 ESCC 组织和 105 例正常组织中 RHCG 蛋白表达情况, 并分析其与 ESCC 患者临床病理特征的关系。采用受试者工作特征 (ROC) 曲线和 Kaplan-Meier 生存分析评估 RHCG 蛋白在 ESCC 患者诊断和预后判断中的价值, 单因素与多因素 COX 回归分析确定影响 ESCC 患者预后的独立危险因素。采用基因表达谱动态分析 (GEPIA) 2 数据库分析多种肿瘤组织中 RHCG mRNA 表达情况。培养 ESCC TE-1 细胞, 设置不同 Lipofectamine 2000 : RHCG 比例, 在 6 孔细胞培养板中转染 TE-1 细胞, RHCG 转染组质粒添加量分别为 2.0、2.5 和 3.0  $\mu\text{g}$ , 分别转染 24 和 48 h, 转染空载体的正常对照作为对照组, 采用 Western blotting 法检测不同浓度转染后各组 TE-1 细胞中 RHCG 蛋白表达量并验证最佳转染条件, 细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 实验检测 2 组 TE-1 细胞增殖活性, 平板克隆实验检测 2 组 TE-1 细胞克隆形成数, Transwell 小室实验检测 2 组 TE-1 细胞迁移细胞数。**结果:** 与癌旁正常组织比较, ESCC、多形性胶质母细胞瘤和头颈部鳞状细胞癌等多种癌组织中 RHCG mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.05$ )。RHCG 蛋白主要位于正常食管鳞状上皮细胞的胞膜上, ESCC 组织中 RHCG 蛋白表达强度低于癌旁正常食管组织 ( $\chi^2 = 109.373$ ,  $P < 0.001$ ), 且 RHCG 低表达组患者分化程度差于 RHCG 高表达组 ( $P = 0.041$ )。RHCG 诊断 ESCC 的 ROC 曲线下面积 (AUC) 值为 0.86, 灵敏度和特异度分别为 95.1% 及 75.0%; Kaplan-Meier 生存分析, 与 RHCG 高表达组比较, RHCG 低表达组患者生存期更短, 预后较差 [风险比 (HR) = 0.269, 95% 置信区间 (CI) = 0.113~0.639,  $P = 0.020$ ]; COX 回归分析, RHCG 低表达可作为影响 ESCC 预后的独立危险因素 (HR = 4.569, 95% CI = 1.315~15.877,  $P = 0.017$ )。Western blotting 法验证, 最佳转染条件为 RHCG 质粒 3.0  $\mu\text{g}$  转染 48 h, 此时 RHCG 过表达效果最佳, RHCG 蛋白表达量最高。CCK-8 实验, 与对照组比较, 接种细胞第 4 天时, 过表达 RHCG 组细胞增殖活性降低 ( $P < 0.001$ )。在 TE-1 细胞中, 过表达 RHCG 组 TE-1 细胞克隆形成数低于对照组 ( $t = 17.70$ ,  $P < 0.001$ )。Transwell 小室实验, 与对照组比较, 过表达 RHCG 组 TE-1 细胞迁移数减少 ( $t = 23.74$ ,  $P < 0.001$ )。**结论:** RHCG 在

[收稿日期] 2024-05-30

[录用日期] 2024-11-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82160542, 82273020); 南京大学医学院附属鼓楼医院临床研究专项资金项目 (2023-LCYJ-MS-17)

[作者简介] 周紫如 (1998—), 女, 安徽省宿州市人, 在读硕士研究生, 主要从事食管癌基础方面的研究。

[通信作者] 崔晓宾, 副教授, 博士研究生导师 (E-mail: cuixiaobin4363@foxmail.com);

曹玉文, 教授, 硕士研究生导师 (E-mail: cywwb2013@126.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

ESCC组织中低表达且与ESCC患者预后不良相关,过表达RHCG可以抑制TE-1细胞的增殖和迁移,RHCG有望成为ESCC新的诊断和预后标志物及治疗靶点。

[关键词] Rh家族C糖蛋白;食管鳞状细胞癌;诊断;预后;受试者工作特征曲线

[中图分类号] R735.1 [文献标志码] A

## Expression of Rh family C glycoprotein in esophageal squamous carcinoma and its clinical significance

ZHOU Ziru<sup>1</sup>, SUN Mengfei<sup>2</sup>, ZHANG Huakun<sup>1</sup>, SUN Shuyan<sup>1</sup>, SUN Qi<sup>2</sup>, LI Feng<sup>1,3</sup>, CHEN Yunzhao<sup>4</sup>,  
YU Jie<sup>4</sup>, CAO Yuwen<sup>1</sup>, CUI Xiaobin<sup>1,2</sup>

(1. Department of Pathology, School of Medicinal Sciences, Shihezi University, Shihezi 832002, China;

2. Department of Pathology, Affiliated Drum Tower Hospital, School of Medical Sciences, Nanjing University, Nanjing 210008, China; 3. Department of Pathology, Affiliated Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China; 4. Department of Pathology, Zhejiang Provincial People's Hospital, Affiliated People's Hospital, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310014, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the expression of Rh family C glycoprotein (RHCG) in the esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) tissue and its effect on the malignant biological behavior of ESCC cells, and to clarify the value of RHCG as a diagnostic and prognostic marker for the ESCC patients.

**Methods:** A total of 143 ESCC tissue samples and 105 adjacent normal tissue samples were collected. Using immunohistochemical staining method, 141 ESCC samples were divided into two groups: RHCG low expression group (immunohistochemistry score  $\leq 6$ ) and RHCG high expression group (immunohistochemistry score  $> 6$ ). Immunohistochemical method was used to detect the RHCG protein expression in 143 ESCC tissues and 105 normal tissues, and the relationship between the clinicopathological characteristics of the ESCC patients was analyzed. Receiver operating characteristic (ROC) curve and Kaplan-Meier survival analysis were used to evaluate the value of RHCG in diagnosis and prognosis of the ESCC patients; univariate and multivariate COX regression analysis were used to determine the independent risk factors affecting the prognosis of the ESCC patients. Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA2) database was used to analyze the expression of RHCG mRNA in various tumor tissues. The ESCC TE-1 cells were cultured and transfected in to 6-well cell culture plates with different Lipofectamine2000:RHCG ratios; the cells in RHCG transfection group were transfected with weights of 2.0, 2.5, and 3.0  $\mu\text{g}$  for 24 and 48 h, respectively, and the cells in NC group transfected with empty vector as control. Western blotting method was used to detect the RHCG protein expression level in the TE-1 cells in various groups after transfection at different concentrations and verify the optimal transfection conditions; cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to detect the proliferation activities of the TE-1 cells; plate clone formation assay was used to detect the colony formation numbers of the TE-1 cells; Transwell chamber assay was used to detect the numbers of migrating TE-1 cells. **Results:** Compared with adjacent normal tissue, the RHCG gene expression level in various cancer tissues including ESCC, glioblastoma multiforme, and head and neck squamous cell carcinoma was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). RHCG protein was mainly located on the cell membrane of normal esophageal squamous epithelial cells; the RHCG protein expression intensity in ESCC tissues was lower than that in adjacent normal esophageal tissue ( $\chi^2 = 109.373$ ,  $P < 0.001$ ), and the patients in RHCG low expression group had poorer differentiation than those in RHCG high expression group ( $P = 0.041$ ). The area under the curve (AUC) value of RHCG for diagnosing ESCC was 0.86, with sensitivity and specificity of 95.1% and 75.0%,

respectively; the Kaplan-Meier survival analysis results showed that compared with high RHCG expression group, the patients in low RHCG expression group had shorter survival time and poorer prognosis [hazard ratio (HR)=0.269, 95% confidence interval (CI): 0.113–0.639,  $P=0.020$ ]; the COX regression analysis results showed that low RHCG expression could serve as an independent risk factor affecting the prognosis of ESCC [HR=4.569, 95%CI=1.315–15.877,  $P=0.017$ ]. The Western blotting results verified that the optimal transfection condition was 3.0  $\mu\text{g}$  RHCG plasmid for 48 h, at which time RHCG overexpression was optimal and RHCG protein expression level was highest. The CCK-8 assay results showed that compared with control group, the proliferation activity in RHCG overexpression group was decreased on the 4th day after cell seeding ( $P<0.001$ ). In the TE-1 cells, the colony formation number of the TE-1 cells in RHCG over-expression group was lower than that in control group ( $t=17.70$ ,  $P<0.001$ ). The Transwell chamber assay results showed that compared with control group, the number of migrating cells in RHCG over-expression group was decreased ( $t=23.74$ ,  $P<0.001$ ). **Conclusion:** RHCG expression is decreased in ESCC tissues and associated with poor prognosis in ESCC patients; overexpression of RHCG can inhibit the proliferation and migration of the TE-1 cells, providing a theoretical basis for RHCG as a novel diagnostic and prognostic marker and therapeutic target for ESCC.

**KEYWORDS** Rh family C glycoprotein; Esophageal squamous cell carcinoma; Diagnosis; Prognosis; Receiver operating characteristic curve

中国新发食管癌病例数占全球的51%,死亡食管癌病例数占全球的55%<sup>[1]</sup>,呈高发病率和死亡率的趋势。食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)起病隐匿,早期症状不明显,多数患者出现症状时已是晚期,而晚期ESCC患者预后较差,术后5年生存率仅为6%<sup>[2]</sup>。如果能够早期干预,其5年生存率可超过95%<sup>[3]</sup>,因此迫切需要寻找更多的用于早期诊断和预后评估的分子标志物,实现早期诊断和早期治疗以提高患者生存率。Rh家族C糖蛋白(Rh type C glycoprotein, RHCG)属于Rhesus(Rh)家族成员之一,最初被鉴定为人类红细胞中的Rh血型抗原。Rh家族是跨膜蛋白,其特征是具有12个跨膜结构域和胞质内N-末端及C-末端<sup>[4]</sup>。根据功能可将Rh家族蛋白分为两大类:氨转运型Rh糖蛋白(RHAG、RHBG和RHCG)和非转运型Rh蛋白(RHD和RHCE)。RHBG和RHCG作为氨转运体,在肾脏<sup>[5]</sup>、肝脏<sup>[6]</sup>、大脑<sup>[7]</sup>和胃肠道等多种组织中广泛表达,在氨排泄和肾脏pH值调节过程中发挥重要作用<sup>[8-9]</sup>。虽然RHCG在食管和子宫颈组织中呈高表达<sup>[10]</sup>,但其在ESCC发生发展的作用尚不明确。本研究基于生物信息学方法初步预测RHCG在ESCC组织中的表达情况,利用免疫组织化学法验证并评估其在ESCC中的诊断和预后价值,同时从细胞学方面分析RHCG对ESCC细胞增殖和迁移的影响,为将RHCG作为ESCC的新

的诊断和预后标志物提供理论依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 细胞、质粒、主要试剂和仪器

ESCC TE-1细胞来源于中国科学院细胞库。pcDNA3.1 RHCG质粒购于上海吉玛制药技术有限公司。RHCG多克隆抗体购于美国Santa Cruz公司, GAPDH抗体购于美国Proteintech公司, DAB染色液试剂盒购自基因科技(上海)股份有限公司, Lipofectamine 2000转染试剂购于美国赛默飞世尔科技公司, 5×Loading Buffer购于上海碧云天生物技术有限公司, 细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8, CCK-8)、细胞增殖和毒性检测试剂盒及0.1%结晶紫溶液购于北京索莱宝科技有限公司, Western blotting电泳仪购自美国Bio-Rad公司。

### 1.2 组织样本收集

收集2000—2021年来自石河子大学第一附属医院的石蜡包埋组织样本共248例,其中ESCC组织143例,癌旁正常组织105例。所有收集的病例均经过患者知情同意和伦理委员会批准,并通过电话方式收集随访信息(随访时间截止至2021年9月)。

### 1.3 免疫组织化学染色检测各组织的免疫组织化学评分

石蜡组织切片经二甲苯和梯度酒精进行脱蜡和水化,采用乙二胺四乙酸溶液(ethylenediaminetetraacetic acid solution, EDTA)

溶液进行抗原修复,阻断内源性过氧化物酶后滴加一抗,采用DAB染色液试剂盒,滴加酶标羊抗鼠/兔IgG聚合物二抗,并依次进行DAB显色、苏木素复染、脱水、封片、阅片。切片结果由2名资深的病理医师遵循2019版世界卫生组织消化系统标准对染色结果进行判读。依据细胞染色强度和肿瘤细胞阳性百分比进行评分(染色强度:无着色=0分,黄色=1分,棕黄色=2分,棕色=3分;5%<阳性百分比为0分,5%≤阳性百分比<25%为1分,25%≤阳性百分比<50%为2分,50%≤阳性百分比<75%为3分,75%≤阳性百分比≤100%为4分),免疫组织化学评分等于上述2项分值的乘积,免疫组织化学评分≤6分为RHCG低表达组,免疫组织化学评分>6分为RHCG高表达组。

#### 1.4 生物信息学分析

采用基因表达谱动态分析(Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA) 2数据库(<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>)<sup>[11]</sup>进行泛癌分析。GEPIA2收集了来自癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)和基因型-组织表达(Genotype-Tissue Expression, GTEx)项目的9 736个肿瘤样本和8 587个正常样本的RNA-seq表达数据,采用“General Information”模块分析多种肿瘤组织中RHCG mRNA表达情况。

#### 1.5 细胞学实验

1.5.1 细胞培养 TE-1细胞培养于RPMI-1640完全培养基(含10%胎牛血清、1%青-链霉素)中,并置于37℃、5%CO<sub>2</sub>恒温培养箱中培养。当细胞密度达到80%~90%时进行换液及细胞传代,用于后续实验。

1.5.2 细胞转染 当细胞密度为70%~80%时采用胰酶消化计数,铺6孔细胞培养板时每孔为4×10<sup>5</sup>个细胞,待细胞贴壁后观察细胞状态并进行转染,EP管中各加入100 μL RPMI-1640培养基,再分别添加7.5 μL Lipofectamine 2000转染试剂和3.0 μg pcDNA3.1 RHCG质粒,分别混匀后静置5~10 min,6孔细胞培养板换液后将转染的混合液体分别均匀滴入每个孔中,继续培养24~48 h以供后续实验使用。按照说明书设置不同Lipofectamine 2000:RHCG比例,在6孔细胞培养板中转染TE-1细胞,RHCG转染质粒添加量分别为2.0、2.5和3.0 μg,分别转染24和48 h,转染空载体的正常对照作为对照组,经Western blotting法验证最佳转

染条件。

1.5.3 Western blotting法检测TE-1细胞中RHCG蛋白表达情况 转染48 h后的细胞采用磷酸盐缓冲液(phosphated buffer saline, PBS)洗涤3次,冰上裂解细胞进行蛋白提取,加入5×Loading Buffer后100℃金属浴10 min。根据说明书制备聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)凝胶,电泳后使用转膜液(湿转法)400 mA、30 min进行转膜,脱脂牛奶封闭1 h,一抗4℃孵育过夜(RHCG 1:1 000; GAPDH 1:50 000),1×含吐温-20的PBS(PBS with Tween-20, PBST)洗涤3次,每次10 min,适量二抗室温孵育2 h(羊抗鼠二抗1:10 000),再次使用1×PBST溶液洗涤3次,超敏发光液进行显色。

1.5.4 CCK-8和平板克隆实验检测2组TE-1细胞增殖活性及克隆形成数 取对数生长期的转染后TE-1细胞,在96孔细胞培养板中每孔接种约5×10<sup>3</sup>个细胞,每组设置3个复孔,并且设置无细胞孔作为调零孔,96孔细胞培养板周围一圈加入无菌PBS缓冲液防止蒸发效应影响实验结果,分别在1、2、3和4 d时加入CCK-8试剂,2 h后采用酶标仪检测450 nm处各孔的吸光度(A)值。平板克隆是在6孔细胞培养板中每孔接种500个转染的细胞,培养7~8 d显示肉眼可见的集落后终止培养,采用PBS缓冲液洗涤3次后4%多聚甲醛固定30 min,洗涤2次去除多余的固定液,0.1%结晶紫4℃染色,30 min后用PBS缓冲液再次洗涤2次,晾干后观察并计算每组细胞克隆形成数。

1.5.5 Transwell小室实验检测2组TE-1细胞中迁移细胞数 将转染48 h后细胞采用无血清培养基重悬,将约2×10<sup>5</sup>个细胞加入Transwell小室的上室,上室总体积为300 μL,下室加入800 μL含20%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的完全培养基,将含小室的24孔细胞培养板置于培养箱中培养24 h后进行固定染色,弃去上室培养基,采用4%多聚甲醛浸泡30 min固定细胞,然后采用0.1%结晶紫染色30 min,最后使用双蒸水清洗至背景清晰。使用Image J软件进行细胞计数,首先导入待分析的图片,将其转换为黑白图像,然后使用“Analyze”→“Analyze Particles”功能,得到的结果中“Count”即为迁移的细胞数。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 9.5.0 统计软件进行统计学分析。正常食管鳞状上皮组织中 RHCG 蛋白表达情况和不同临床病理特征患者 RHCG 蛋白表达情况比较采用  $\chi^2$  检验,采用受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线分析 RHCG 的诊断价值并计算 ROC 曲线下面积 (area under curve, AUC), Kaplan-Meier 生存曲线分析比较 RHCG 高表达与 RHCG 低表达患者总体生存时间的差异 (0 为存活, 1 为死亡), 单因素和多因素 COX 分析各因素与 ESCC 患者预后的关系。各组细胞增殖活性、迁移细胞数和克隆形成

数均符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 多种癌组织中 RHCG mRNA 表达水平 GEPIA2 在线数据库分析结果显示: 与癌旁正常组织比较, ESCC、多形性胶质母细胞瘤、头颈部鳞状细胞癌和肾透明细胞癌等多种癌组织中 RHCG mRNA 表达水平升高 ( $P < 0.05$ ), 表明 RHCG 的失活参与了肿瘤的发生发展, 其可能成为潜在的肿瘤治疗靶点。见图 1。

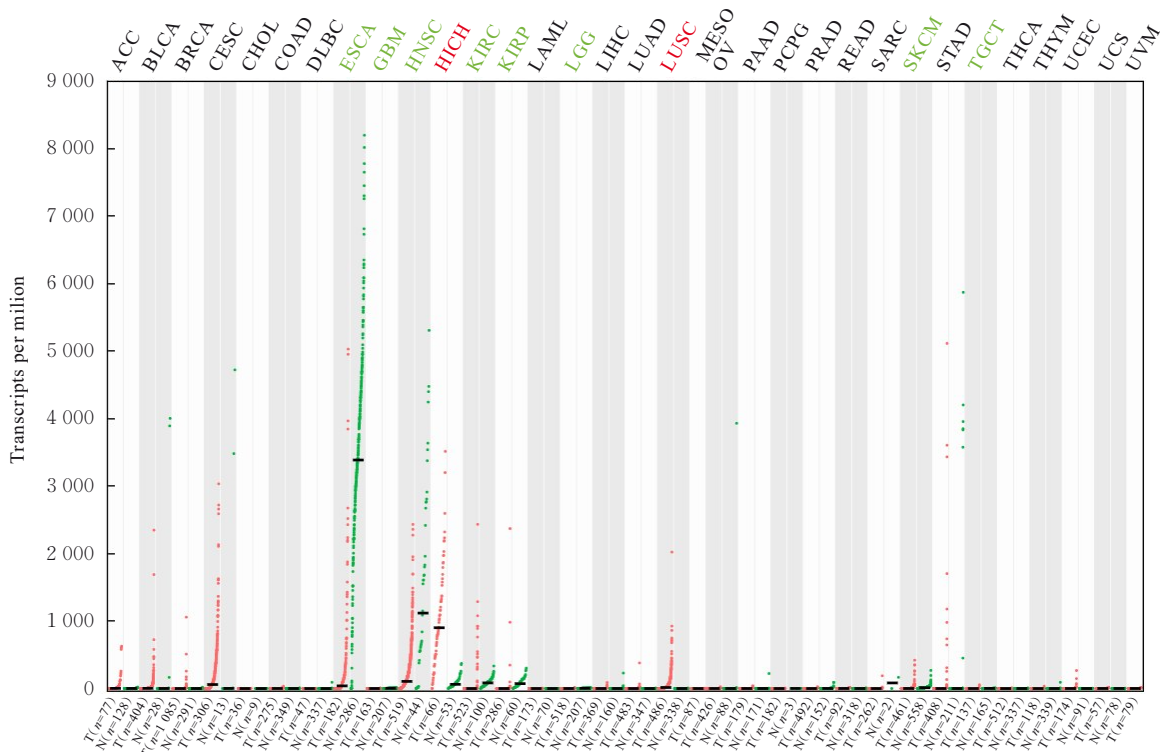
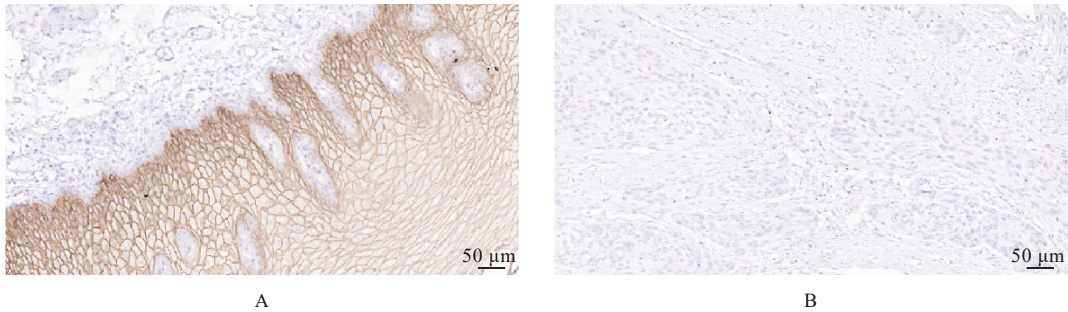


图 1 GEPIA2 数据库中多种癌组织中 RHCG mRNA 表达水平  
Fig. 1 Expression levels of RHCG mRNA in different kinds of tumor tissues in GEPIA 2 database

2.2 ESCC 患者癌组织和癌旁正常组织中 RHCG 蛋白表达 RHCG 蛋白主要表达于正常食管鳞状上皮细胞的胞膜 (图 2)。143 例 ESCC 组织中, 120 例呈 RHCG 蛋白低表达 (120/143, 83.9%), 23 例呈 RHCG 蛋白高表达 (23/143, 16.1%); 105 例正常食管上皮组织中, 18 例呈 RHCG 蛋白低表达 (18/105, 17.1%), 87 例呈 RHCG 蛋白高表达 (87/105, 82.9%), ESCC 患者癌组织中 RHCG 蛋白表达低于正常食管上皮组织 ( $\chi^2 = 109.373, P <$

0.001)。  
2.3 不同临床病理特征 ESCC 患者癌组织中 RHCG 蛋白表达 RHCG 蛋白低表达组患者分化程度差于 RHCG 蛋白高表达组 ( $\chi^2 = 4.194, P = 0.041$ )。RHCG 蛋白表达与患者的性别 ( $P = 0.083$ )、年龄 ( $P = 0.777$ )、肿瘤部位 ( $P = 0.859$ )、浸润深度 ( $P = 0.603$ )、有无远处转移 ( $P = 0.372$ )、有无淋巴结转移 ( $P = 0.760$ ) 和 TNM 分期 ( $P = 0.392$ ) 无关联。见表 1。



A: High expression of RHCG in normal tissue; B: Low expression of RHCG in ESCC tissue.

图 2 免疫组织化学染色检测 ESCC 组织和癌旁正常组织样本中 RHCG 蛋白的表达情况

Fig. 2 Expression of RHCG protein in ESCC tissue and normal tissue samples detected by immunohistochemistry staining

表 1 不同临床病理特征 ESCC 患者癌组织中 RHCG 蛋白表达

Tab. 1 Expression of RHCG protein in cancer tissue of ESCC patients with different clinicopathologic characteristics

| Clinicopathological characteristic | n   | RHCG           |                 | $\chi^2$ | P     |
|------------------------------------|-----|----------------|-----------------|----------|-------|
|                                    |     | Low expression | High expression |          |       |
| Gender                             |     |                |                 | 0.063    | 0.803 |
| Male                               | 93  | 79 (84.9)      | 14 (15.1)       |          |       |
| Female                             | 48  | 40 (83.3)      | 8 (16.7)        |          |       |
| Age(year)                          |     |                |                 | 0.080    | 0.777 |
| <60                                | 73  | 61 (83.6)      | 12 (16.4)       |          |       |
| ≥60                                | 68  | 58 (85.3)      | 10 (14.7)       |          |       |
| Tumor location                     |     |                |                 | 0.031    | 0.859 |
| Upper/middle                       | 112 | 93 (83.0)      | 19 (17.0)       |          |       |
| Lower                              | 16  | 13 (81.2)      | 3 (18.8)        |          |       |
| Differentiation                    |     |                |                 | 4.194    | 0.041 |
| Well/moderate                      | 107 | 86 (80.4)      | 21 (19.6)       |          |       |
| Poor                               | 28  | 27 (96.4)      | 1 (3.6)         |          |       |
| T stage                            |     |                |                 | 0.271    | 0.603 |
| T1+T2                              | 49  | 40 (81.6)      | 9 (18.4)        |          |       |
| T3+T4                              | 87  | 74 (85.1)      | 13 (14.9)       |          |       |
| M stage                            |     |                |                 | 0.795    | 0.372 |
| No                                 | 132 | 110 (83.3)     | 22 (16.7)       |          |       |
| Yes                                | 4   | 4 (100.0)      | 0 (0)           |          |       |
| Lymphnode metastasis               |     |                |                 | 0.093    | 0.760 |
| No                                 | 108 | 90 (83.3)      | 18 (16.7)       |          |       |
| Yes                                | 28  | 24 (85.7)      | 4 (14.3)        |          |       |
| TNM stage                          |     |                |                 | 0.733    | 0.392 |
| I+II                               | 67  | 58 (86.6)      | 9 (13.4)        |          |       |
| III+IV                             | 69  | 56 (81.2)      | 13 (18.8)       |          |       |

2.4 RHCG 蛋白表达水平对 ESCC 的诊断价值  
RHCG 的蛋白表达水平对 ESCC 具有较好的诊断

价值，AUC=0.86，灵敏度为 95.1%，特异度为 75.0%， $P<0.001$ 。见图 3。

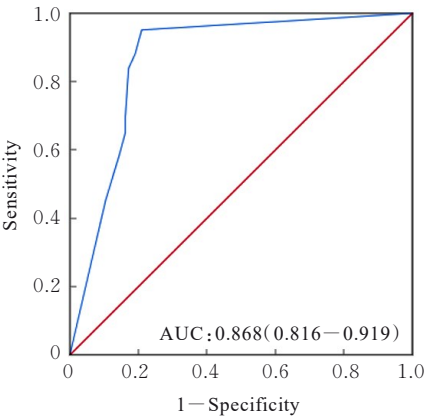


图 3 RHCG 蛋白水平诊断 ESCC 患者的 ROC 曲线

Fig. 3 ROC curves of RHCG protein level for diagnosis of ESCC patients

2.5 RHCG 蛋白表达与 ESCC 患者预后的关系

在 143 例 ESCC 患者中，通过电话随访和医院记录获得了 60 例患者完整的随访信息。通过 Kaplan-Meier 生存曲线分析 RHCG 蛋白表达水平与患者生存时间及生存情况的关系，结果显示：与 RHCG 蛋白高表达组比较，RHCG 蛋白低表达组患者生存时间更短，预后较差[风险比(hazard ratio, HR): 0.269, 95% 置信区间(confidence interval, CI): 0.113~0.639,  $P=0.020$ ]。见图 4。

单因素 COX 回归分析结果显示：浸润深度( $P=0.004$ )、淋巴结转移( $P=0.008$ )、TNM 分期( $P<0.001$ )和 RHCG 表达( $P=0.031$ )与 ESCC 患者预后显著相关。多因素 COX 回归分析结果显示：RHCG 是 ESCC 发生的独立危险因素(HR: 4.569, 95%CI: 1.315~15.877,  $P=0.017$ )。见表 2。

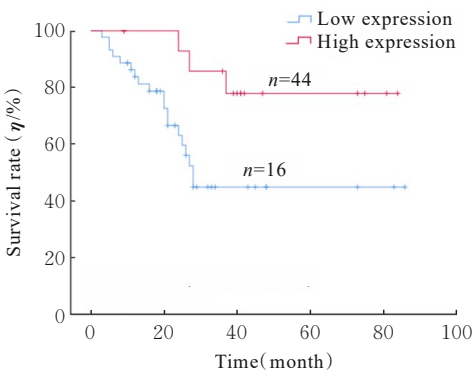


图4 RHCG 蛋白表达与 ESCC 患者生存关系的 Kaplan-Meier 曲线

Fig. 4 Kaplan-Meier curves of correlation between RHCG protein expression and survival of ESCC patients

**2.6 不同浓度转染后 TE-1 细胞中 RHCG 蛋白表达量** 经 Western blotting 验证最佳转染条件为 RHCG 质粒 3.0  $\mu\text{g}$  转染 48 h, 此时 RHCG 蛋白过表达效果最佳, RHCG 蛋白表达量最高 (图5)。

**2.7 对照组和过表达 RHCG 组 TE-1 细胞增殖活性** 与对照组比较, 接种细胞第 4 天时, 过表达 RHCG 组的 TE-1 细胞增殖活性降低 ( $P<0.001$ )。见图 6。

**2.8 对照组和过表达 RHCG 组 TE-1 细胞克隆形成数** 过表达 RHCG 组 TE-1 细胞克隆形成数 (302.30 个 $\pm$ 19.04 个) 低于对照组 (513.70 个 $\pm$ 8.08 个) ( $t=17.70$ ,  $P<0.001$ )。见图 7。

**2.9 对照组和过表达 RHCG 组 TE-1 细胞的迁移细胞数** 与对照组 (1 234.00 个 $\pm$ 43.21 个) 比较, 过表达 RHCG 组细胞迁移数 (326.70 个 $\pm$ 50.16 个)

减少 ( $t=23.74$ ,  $P<0.001$ )。见图 8。

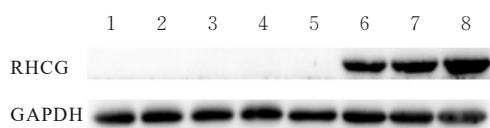
3 讨论

ESCC 是一种侵袭性较强的恶性肿瘤, 早期常无症状, 确诊时多为中晚期, 恶性程度高、预后差。尽管近年来食管癌分子靶向治疗已取得重大进展<sup>[12]</sup>, 但由于缺乏早期诊断和预后评估的分子标志物, ESCC 患者 5 年生存率不足 10%, 而早期诊断和早期治疗后 ESCC 患者生存率超过 95%<sup>[3]</sup>。因此寻找新的 ESCC 诊断标志物和治疗靶点对于提高 ESCC 患者生存率至关重要。

本研究通过 GEPIA2 数据库进行泛癌分析结果显示: RHCG 基因在 ESCC、多形性胶质母细胞瘤、头颈部鳞状细胞癌和肾透明细胞癌等多种肿瘤低表达, 与先前报道<sup>[13-15]</sup>一致。研究<sup>[16]</sup>显示: RHCG 蛋白在正常组织中高表达, 表达率为 72.5%, ESCC 组织中不表达 RHCG 蛋白。本研究中免疫组织化学染色结果显示: RHCG 蛋白在 ESCC 组织中低表达, 其中正常食管上皮组织中 RHCG 表达率为 82.9%, ESCC 组织中 RHCG 表达率为 16.1%。研究<sup>[17]</sup>显示: RHCG 可作为喉鳞状细胞癌的诊断标志物, 与 hsa\_circ\_0036722 联合诊断的 AUC 可达到 0.859, 但目前关于 RHCG 在诊断 ESCC 的作用方面尚未明确。本研究通过 ROC 曲线分析 RHCG 对 ESCC 的诊断能力, 结果显示: RHCG 具有良好的诊断效能 (AUC 值为 0.868) 及较高的灵敏度 (95.1%) 和特异度 (75.0%)。由 RHCG 构建的新型预后模型能够准确预测膀胱癌患者生存率, 指导个性化治疗<sup>[18]</sup>。本研究结果显示: RHCG 蛋白低表达组患者的生存率更低, 且 RHCG 蛋白低表

表2 单因素与多因素 COX 回归分析  
Tab. 2 Univariate and multivariate COX regression analysis

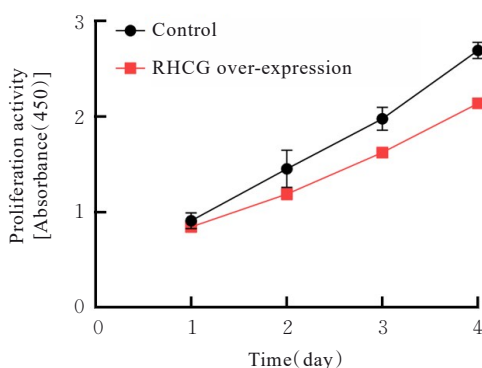
| Clinicopathological characteristic | Univariate analysis |              |        | Multivariate analysis |              |       |
|------------------------------------|---------------------|--------------|--------|-----------------------|--------------|-------|
|                                    | HR                  | 95%CI        | P      | HR                    | 95%CI        | P     |
| Gender(female vs male)             | 0.923               | 0.562—1.514  | 0.750  |                       |              |       |
| Age(>60)                           | 0.849               | 0.524—1.375  | 0.505  |                       |              |       |
| Tumor location(lower)              | 0.767               | 0.379—1.553  | 0.461  |                       |              |       |
| Differentiation(poor)              | 1.407               | 0.791—2.501  | 0.245  |                       |              |       |
| T stage(T3+T4)                     | 2.121               | 1.274—3.531  | 0.004  | 2.293                 | 0.733—7.169  | 0.154 |
| M stage(M1)                        | 0.977               | 0.238—4.004  | 0.974  |                       |              |       |
| Lymphnode metastasis (Yes)         | 2.144               | 1.221—3.764  | 0.008  | 1.099                 | 0.333—3.628  | 0.877 |
| TNM stage(Ⅲ+Ⅳ)                     | 2.453               | 1.501—4.008  | <0.001 | 1.809                 | 0.582—5.619  | 0.305 |
| RHCG expression(low)               | 3.863               | 1.129—13.219 | 0.031  | 4.569                 | 1.315—15.877 | 0.017 |



Lane 1—4: 24 h; Lane 5—8: 48 h; Lane 1, 5: Control group; Lane 2, 6: 2.0  $\mu\text{g}$ ; Lane 3, 7: 2.5  $\mu\text{g}$ ; Lane 4, 8: 3.5  $\mu\text{g}$ .

图5 Western blotting法检测不同转染条件转染后TE-1细胞中RHCG蛋白表达电泳图

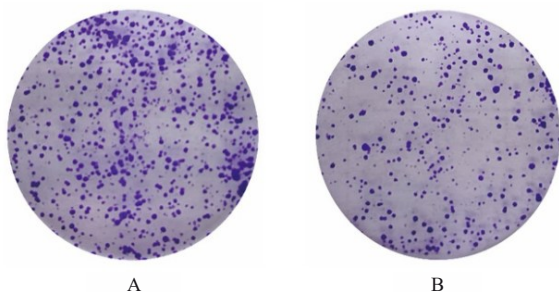
Fig. 5 Electrophoregram of expression of RHCG protein in TE-1 cells after transfection with different transfection conditions detected by Western blotting method



\* $P < 0.001$  compared with control group.

图6 CCK-8实验检测不同时间2组TE-1细胞增殖活性

Fig. 6 Proliferation activities of TE-1 cells at different times detected by CCK-8 assay



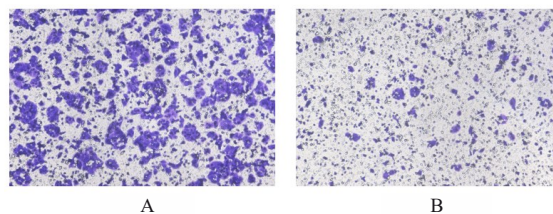
A: Control group; B: RHCG over-expression group.

图7 平板克隆实验检测2组TE-1细胞克隆形成情况(结晶紫)

Fig. 7 Colon formation of TE-1 cells in two groups detected by Colony formation assay(Crystal violet)

达为ESCC发生的独立危险因素,进一步证实RHCG蛋白低表达与ESCC患者的不良预后相关。

研究<sup>[10]</sup>显示:敲低RHCG可导致宫颈癌细胞的增殖和迁移。为了进一步研究RHCG对ESCC细胞的生物学行为的影响,本课题组采用RHCG



A: Control group; B: RHCG over-expression group.

图8 Transwell小室实验检测2组TE-1细胞迁移情况(结晶紫,  $\times 200$ )

Fig. 8 Migration of TE-1 cells in two groups detected by Transwell chamber assay(Crystal violet,  $\times 200$ )

质粒转染TE-1细胞,通过CCK-8实验、克隆形成实验和Transwell小室实验结果证明了过表达RHCG蛋白可明显降低TE-1细胞增殖和迁移能力。研究<sup>[16]</sup>显示:敲低RHCG蛋白可以增加核因子 $\kappa\text{B}$  (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa\text{B}$ ) 信号通路的抑制蛋白I $\kappa\text{B}$  (inhibitor of NF- $\kappa\text{B}$ , I $\kappa\text{B}$ ) 的磷酸化,使其被蛋白酶体降解,促进NF- $\kappa\text{B}$  p65活化和核转位。NF- $\kappa\text{B}$  p65移位至细胞核后会促进ESCC的侵袭和转移。在非小细胞肺癌中,过表达RHCG蛋白可降低A549细胞中相关信号通路表达水平<sup>[19]</sup>,证明RHCG可通过调控相关信号通路的活化抑制肺癌细胞的增殖。RHCG在胃癌中高表达,并通过保持细胞内碱性促进胃癌细胞增殖、迁移和侵袭<sup>[20]</sup>。上述研究表明:RHCG参与肿瘤发生发展。在ESCC患者中,可通过RHCG表达上调增加其放疗敏感性<sup>[21]</sup>,为RHCG作为治疗靶点提供了证据支持。

综上所述,RHCG蛋白在ESCC患者中低表达且与患者不良预后相关,是ESCC的独立预后指标。过表达RHCG蛋白可以抑制ESCC TE-1细胞的增殖和迁移能力,RHCG有望成为ESCC有效的诊断和预后标志物及治疗靶点。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

周紫如参与实验设计和论文撰写,孙梦菲、张华坤、孙淑妍和孙琦参与数据收集,李锋参与数据整理和分析,陈云昭和禹洁参与论文撰写,曹玉文和崔晓宾参与论文审阅。

#### [参考文献]

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global

- cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] SADDOUGHIS A, REINERSMAN J M, ZHUKOV Y O, et al. Survival after surgical resection of stage IV esophageal cancer[J]. *Ann Thorac Surg*, 2017, 103(1): 261-266.
- [3] CIOCIRLAN M, LAPALUS M G, HERVIEU V, et al. Endoscopic mucosal resection for squamous premalignant and early malignant lesions of the esophagus[J]. *Endoscopy*, 2007, 39(1): 24-29.
- [4] HUANG C H, PENG J B. Evolutionary conservation and diversification of Rh family genes and proteins[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(43): 15512-15517.
- [5] ELADARI D, CHEVAL L, QUENTIN F, et al. Expression of RhCG, a new putative NH (3)/NH (4) (+) transporter, along the rat nephron[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(8): 1999-2008.
- [6] GEYER R R, PARKER M D, TOYE A M, et al. Relative CO<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub> permeabilities of human RhAG, RhBG and RhCG[J]. *J Membr Biol*, 2013, 246(12): 915-926.
- [7] HILLMANN P, KÖSE M, SÖHL K, et al. Ammonium-induced calcium mobilization in 1321N1 astrocytoma cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 227(1): 36-47.
- [8] BIVER S, BELGE H, BOURGEOIS S, et al. A role for Rhesus factor Rhcg in renal ammonium excretion and male fertility[J]. *Nature*, 2008, 456(7220): 339-343.
- [9] GRUSWITZ F, CHAUDHARY S, HO J D, et al. Function of human Rh based on structure of RhCG at 2.1 Å[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(21): 9638-9643.
- [10] WANG D G, LI T M, LIU X. RHCG suppresses cervical cancer progression through inhibiting migration and inducing apoptosis regulated by TGF-β1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(1): 86-93.
- [11] LI C W, TANG Z F, ZHANG W J, et al. GEPIA2021: integrating multiple deconvolution-based analysis into GEPIA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(W1): W242-W246.
- [12] FATEHI HASSANABAD A, CHEHADE R, BREADNER D, et al. Esophageal carcinoma: towards targeted therapies[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2020, 43(2): 195-209.
- [13] XU W G, ZOU H H, WEI Z, et al. Rh type C-glycoprotein functions as a novel tumor suppressor gene by inhibiting tumorigenicity and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(11): 3601-3623.
- [14] HAN K H, CROKER B P, CLAPP W L, et al. Expression of the ammonia transporter, rhC glycoprotein, in normal and neoplastic human kidney[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(10): 2670-2679.
- [15] YE H, YU T W, TEMAM S, et al. Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 69.
- [16] MING X Y, ZHANG X, CAO T T, et al. RHCG suppresses tumorigenicity and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma *via* inhibiting NF-κB signaling and MMP1 expression[J]. *Theranostics*, 2018, 8(1): 185-198.
- [17] GUO Y, HUANG Q, ZHENG J, et al. Diagnostic role of dysregulated circular RNA hsa\_circ\_0036722 in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 5709-5719.
- [18] SHEN C, CHAI W, HAN J W, et al. Identification and validation of a dysregulated TME-related gene signature for predicting prognosis, and immunological properties in bladder cancer[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1213947.
- [19] 张玉辉, 高亚坤, 肖连波, 等. RHCG基因在非小细胞肺癌中的表达及对细胞增殖的影响[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(1): 278-282.
- [20] CHEN P, LIU C, LI P, et al. High RhCG expression predicts poor survival and promotes migration and proliferation of gastric cancer *via* keeping intracellular alkaline[J]. *Exp Cell Res*, 2020, 386(2): 111740.
- [21] ZHANG K, FAN R T, ZHAO D Y, et al. CircATIC inhibits esophageal carcinoma progression and promotes radiosensitivity by elevating RHCG through sponging miR-10-3p[J]. *Thorac Cancer*, 2022, 13(7): 934-946.