论著

文章编号:1000-5404(2009)05-0416-04

肝癌组织中 Raf 激酶抑制蛋白的表达及其临床意义

吴晓慧[1],王顺祥[1],王士杰[2],杨永江[1],李建坤[1],彭 利[1],唐瑞峰[1],徐 卓[1] (河北医科大学第四医院:[1]肝胆外科,[2]肿瘤研究所,石家庄 050011)

摘 要:目的 探讨 Raf 激酶抑制蛋白(Raf kinase inhibitor protein,RKIP)在肝癌中的表达及其临床意义。**方法** 采用 RT-PCR 方法检测肝细胞癌、癌旁组织及正常肝组织中 RKIP mRNA 的表达;采用组织芯片的免疫组织化学方法检测 RKIP 蛋白和磷酸化的 RKIP 蛋白的表达,并分析 RKIP 蛋白和磷酸化的 RKIP 的表达与肝细胞癌临床病理学特征的关系。**结果** RKIP mRNA 在肝细胞癌组织、癌旁肝组织及正常肝组织的表达差异无统计学意义($P>0.05$)。肝细胞癌、癌旁肝组织及正常肝组织中 RKIP 蛋白表达的阳性率分别为 22.2%、86%、93.8%,磷酸化的 RKIP 蛋白表达的阳性率分别为 29.2%、84%、93.8%;肝癌组织中 RKIP 和磷酸化的 RKIP 蛋白表达均显著低于癌旁及正常肝组织($P<0.05$);RKIP 和磷酸化的 RKIP 蛋白表达与肿瘤大小、AFP 水平及有无门静脉或胆管癌栓无关($P>0.05$);RKIP 和磷酸化的 RKIP 蛋白表达与肝细胞癌分化程度及有无肝内或淋巴转移有关,中高分化组 RKIP 和磷酸化的 RKIP 蛋白表达高于低分化组,无肝内或淋巴转移组高于有肝内或淋巴转移组($P<0.05$)。**结论** RKIP 和磷酸化的 RKIP 蛋白表达的减少或缺失与肝癌的发生、发展、侵袭转移密切相关。

关键词: 癌,肝细胞;Raf 激酶抑制蛋白;转移

中图法分类号: R73-354; R730.23; R735.7 **文献标识码:** A

Expression and significance of Raf kinase inhibitor protein in hepatocellular carcinoma: report of 72 cases

WU Xiao-hui[1], WANG Shun-xiang[1], WANG Shi-jie[2], YANG Yong-jiang[1], LI Jian-kun[1], PENG Li[1], TANG Rui-feng[1], XU Zhuo[1] ([1]Department of Hepatobiliary Surgery, [2]Cancer Research Institute, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in hepatocellular carcinoma (HCC) and its correlation with invasion and metastasis of HCC. **Methods** Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemical staining were used to detect the expressions of RKIP mRNA and protein and phosphorylated RKIP (P-RKIP) protein in 72 cases of HCC, 50 samples of adjacent tissues and 16 specimen of normal liver tissues. Statistical analysis was used to determine the relationship between their expressions and clinicopathological parameters. **Results** There was no significant difference in RKIP mRNA expression levels among HCC, adjacent tissues and normal liver tissues ($P>0.05$). The expression levels of RKIP protein (22.2%) and P-RKIP protein (29.2%) in tumor tissues were significantly lower than those in adjacent tissues (86%, 84%) and normal liver tissues (93.8%, 93.8%) ($P<0.05$). The protein expressions of RKIP and P-RKIP were significantly lower in HCC with intrahepatic or lymphatic metastasis than that without respectively. In moderately and well differentiated HCC, both RKIP and P-RKIP positive rates were significantly higher than that in poorly differentiated HCC. **Conclusion** The down-regulation of RKIP and P-RKIP protein expressions may serve as a risk marker for HCC development and metastasis.

Key words: hepatocellular carcinoma; Raf kinase inhibitor protein; metastasis

Raf 激酶抑制蛋白(Raf kinase inhibitor protein,RKIP)属于高度保守的磷脂酰乙醇胺结合蛋白(phosphatidylethanolamine binding protein,PEBP)家族,广泛存在于各种生物中[1]。RKIP 参与多条信号传导通路的调控,包括抑制 Raf-MEK1/2 -ERK1/2 和 NF-κB 信号转导途径,还通过抑制 G 蛋白偶联受体激酶-2(GPCR-2)来发挥受体信号调节器的作用。RKIP 在细胞生长、增殖、分化、凋亡等生理过程中发挥重要作用。最近研究表明 RKIP 与肿瘤转移密切相关。我们运用 RT-PCR 和组织芯片的免疫组织化学方法检测 RKIP

基金项目: 河北省自然科学基金(C2008000973)
Supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province(C2008000973)

作者简介: 吴晓慧,女,河北省承德市人,满族,博士研究生,主要从事肝癌侵袭转移及其机制方面的研究。电话:(0311)86095340,E-mail:wuxh175.student@sina.com

通信作者: 王顺祥,电话:(0311)86095680,E-mail:gdwangsx@163.com

收稿日期: 2008-06-22;**修回日期:** 2008-09-04

mRNA 以及 RKIP 和 P-RKIP 蛋白的表达,探讨 RKIP 与肝细胞癌发生、发展的关系。

1　材料与方法

1.1　一般资料

72 例肝癌和 50 例癌旁标本来自我院 2003 年 1 月至 2007 年 3 月手术切除并经病理证实的肝细胞肝癌患者,癌旁组织为距肿瘤 2 cm 处肝组织。另取手术治疗的良性疾病的正常肝组织 16 例作对照。标本切除离体后一份立即投入液氮中,置于 -70 ℃ 冰箱保存备用,另一份用 10% 的甲醛固定。肝癌组病例男性 59 例,女性 13 例;年龄 30 ~ 76 岁,平均 53.6 岁;病理学分级根据 Edmondson 分级法,其中Ⅰ、Ⅱ级 30 例,Ⅲ、Ⅳ级 42 例。

1.2　主要试剂

Trizol 试剂(美国 Gibco BRL 公司),DNTPs、AMV、TaqDNA 聚合酶由华美公司提供,内参照及随机引物由上海生工生物工程公司合成。山羊抗人 RKIP 多抗,兔抗人 P-RKIP 多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品。即用型两步法免疫组化试剂盒、通用型 S-P 试剂盒、浓缩型 DAB 试剂盒,均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3　总 RNA 提取

以 Trizol 试剂按说明书提取组织总 RNA,所得 RNA 溶于焦碳酸二乙酯(DEPC)水中。琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 完整性,紫外分光光度计检验纯度并定量,所得 RNA 的吸光度(A260/A280)均在 1.8 ~ 2.0 范围内。36 例肝癌及对应的癌旁组织、12 例正常肝组织成功提取总 RNA。

1.4　半定量 RT-PCR 检测 RKIP mRNA 表达

RKIP 引物序列上游为 5′-GAATAGACCCACCAGCAT-3′,下游为 5′- CGTAAAC CAGCCAGACAT-3′,其扩增片段长度为 236 bp。反应条件:37 ℃逆转录 60 min,95 ℃预变性 3 min,94 ℃变性 45 s,53 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 1 min,共 35 个循环,72 ℃充分延伸 5 min。以 GAPDH(342 bp)为内参照。基因扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,电泳结果用 DNA 凝胶成像扫描仪(美国 Fotodyne 公司)摄像,Gel-Pro Analysis 图像分析软件测定条带吸光度,以(条带灰度 × 面积)/(参照物的灰度 × 面积) 作为 RKIP mRNA 表达水平的参数,对 RKIP 产物相对定量。

1.5　组织芯片的制备

石蜡包埋的组织 5 μm 厚切片,常规 HE 染色,由有经验的病理医师诊断核实,标记取材部位;用直径 0.6 mm 的打孔针从供体蜡块的选定部位逐个取出组织芯,利用 ZM-1 组织芯片仪制成组织芯片蜡块。

1.6　免疫组织化学法检测

将组织芯片蜡块 4 μm 厚切片,采用常规二甲苯脱蜡,梯度酒精水化;行柠檬酸高压锅内修复抗原 5 min;3% 甲醇过氧化氢灭活内源性过氧化物酶 15 min;山羊抗人 RKIP 多抗和兔抗人 P-RKIP 多克隆抗体(1∶100)分别行免疫组化二步法和 S-P 方法检测(具体操作按照说明书进行)。同时设阳性和阴性对照:阳性对照为试剂公司提供的强阳性标本切片,阴性对照采用磷酸盐缓冲溶液(PBS)代替一抗。

1.7　免疫组化结果判断

RKIP 和 P-RKIP 蛋白表达强度根据阳性物质的着色深浅及面积判断。评分标准按 Shimizu 方法,对每张切片阳性细胞的阳性强度按无着色、淡黄色、棕黄色和棕褐色分别记 0、1、2、3 分,着色阳性面积按无着色、着色 < 1/3、1/3 ~ 2/3、> 2/3 分别记 0、1、2、3 分,然后根据两项记分之和判断其结果:≥3 分为阳性。

1.8　统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。RKIP mRNA 表达数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用 t 检验;RKIP 和P-RKIP蛋白表达水平的组间显著性差异采用 χ^2 检验。

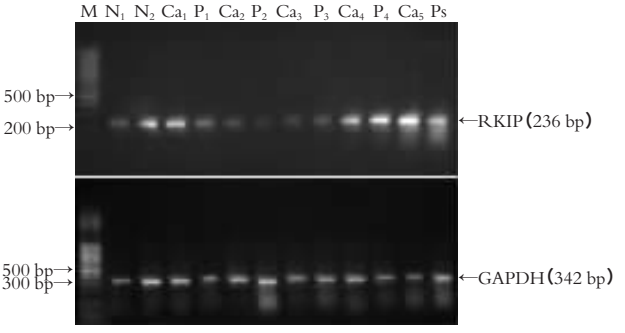
2　结果

2.1　RKIP mRNA 在不同组织中的表达

标本中能成功提取 mRNA 的 36 例肝细胞癌和对应的癌旁组织、12 例正常组织 RKIP mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1,图 1)。

表 1　不同肝组织中 RKIP mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

组织类型	例数	RKIP mRNA 表达量
肝癌组织	36	1.357 ± 0.569
癌旁肝组织	36	1.512 ± 0.623
正常肝组织	12	1.550 ± 0.426



M:标准;Ca:肝细胞癌组织;P:癌旁肝组织;N:正常肝组织

图 1　不同肝组织 RT-PCR 结果

2.2　不同肝组织 RKIP 和 P-RKIP 蛋白的表达

制作的组织芯片蜡块(图 2)。RKIP 阳性着色主要分布于细胞质,小部分胞膜中也有表达;P-RKIP 阳性着色主要定位在细胞质。RKIP 和 P-RKIP 在肝癌组织中的表达水平均低于癌旁及正常肝组织,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 2,图 3,4)。

表 2　不同肝组织中 RKIP 和 P-RKIP 蛋白的表达

组织类型	例数	RKIP 阳性表达(%)	P-RKIP 阳性表达(%)
肝癌组织	72	16(22.2)	21(29.2)
癌旁肝组织	50	43(86.0)[a]	42(84.0)[a]
正常肝组织	16	15(93.8)[a]	15(93.8)[a]

a:$P < 0.01$,与肝癌组织比较

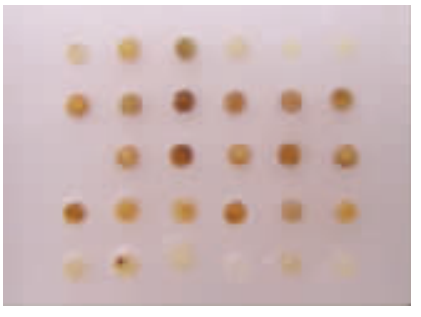
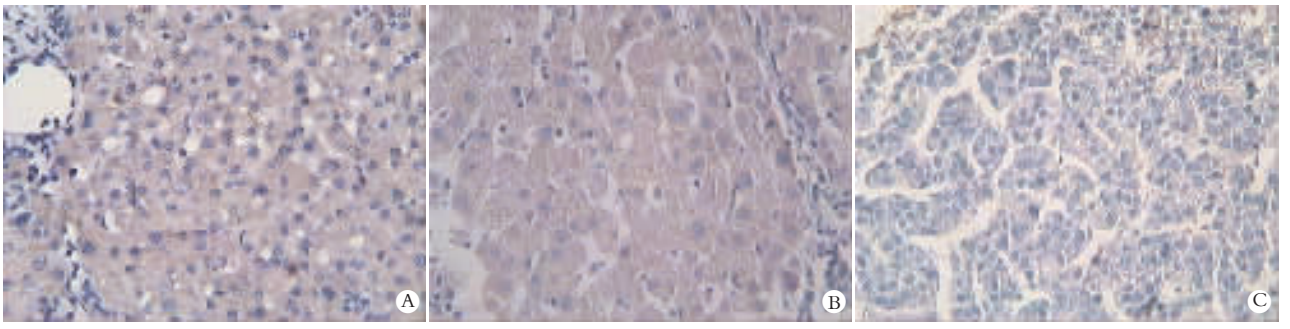
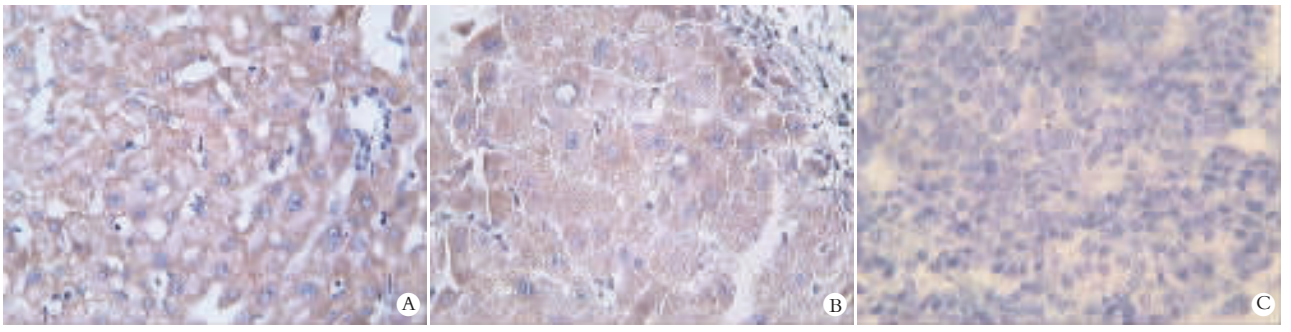


图 2　组织芯片蜡块



A:正常肝组织阳性染色;B:癌旁肝组织阳性染色;C:肝细胞癌组织阴性染色

图3 肝细胞癌、癌旁及正常肝组织中 RKIP 的免疫组织化学染色 (两步法×400)



A:正常肝组织阳性染色;B:癌旁肝组织阳性染色;C:肝细胞癌组织阴性染色

图4 肝细胞癌、癌旁及正常肝组织中 P-RKIP 的免疫组织化学染色 (S-P×400)

2.3 RKIP 和 P-RKIP 之间及其与肝癌临床病理特征的关系

RKIP 和 P-RKIP 蛋白表达水平与肿瘤大小、AFP 水平及有无门静脉或胆管癌栓无关($P>0.05$)。RKIP 和 P-RKIP 蛋白表达在中高分化肝癌组高于低分化组,无肝内或淋巴转移组高于有肝内或淋巴转移组 ($P<0.05$,表3)。

表3 肝癌组织中 RKIP 和 P-RKIP 蛋白的表达及其与肝癌临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	RKIP 阳性(%)	*P* 值	P-RKIP 阳性(%)	*P* 值
性别					
男	59	13(22.0)	1.000	17(28.8)	1.000
女	13	3(23.1)		4(30.8)	
年龄					
≤50 岁	27	5(18.5)	0.558	7(25.9)	0.639
>50 岁	45	11(24.4)		14(31.1)	
肿瘤大小					
≤5 cm	21	7(33.3)	0.253	9(42.9)	0.101
>5 cm	51	9(17.6)		12(23.5)	
肝内或淋巴转移					
无	48	14(29.2)	0.045	18(37.5)	0.028
有	24	2(8.3)		3(12.5)	
门脉或胆管瘤栓					
无	35	10(28.6)	0.208	13(37.1)	0.148
有	37	6(16.2)		8(21.6)	
AFP					
≤200 ng/ml	28	7(25.0)	0.651	8(28.6)	0.929
>200 ng/ml	44	9(20.5)		13(29.5)	
分化程度					
Ⅰ+Ⅱ	30	11(36.7)	0.013	14(46.7)	0.006
Ⅲ+Ⅳ	42	5(11.9)		7(16.7)	

3 讨论

肝细胞癌是我国常见的恶性肿瘤之一,易复发、转移且预后差,控制肝癌侵袭转移已经成为肝癌治疗的难点。肝癌的侵袭转移是多步骤、多因素参与的复杂的过程,其中 MAPK、NF-κB 以及 Wnt 等信号通路均与肝癌的侵袭转移有关[2-4]。

最近研究表明 RKIP 能抑制前列腺癌[5]、乳腺癌[6]、胰岛素瘤[7]、肝癌[8]等多种恶性肿瘤转移,其具体机制可能通过抑制 Raf-MEK1/2 -ERK1/2 和/或 NF-κB 信号转导途径有关。Keller 等[9]研究发现在前列腺转移癌细胞系中,RKIP 的 mRNA 和蛋白水平均低于非转移的前列腺癌细胞,而随着 Gleason score 的增加,肿瘤组织中 RKIP 表达水平逐渐减低,在前列腺转移癌组织中 RKIP 缺失。在乳腺癌和黑色素瘤中 RKIP 功能的丧失能增加转化细胞的浸润能力,从而促进转移的发生[6,10]。最近 Fu 等[11]研究表明血中 RKIP 的表达水平可作为评估前列腺癌预后的指标。Lee 等[8]研究表明癌旁组织 RKIP 蛋白表达显著高于肝癌组织,且高侵袭性肝癌细胞株转染 RKIP 基因后,其侵袭转移能力下降。我们的研究结果显示肝细胞癌、癌旁肝组织及正常肝组织中 RKIP 蛋白表达的阳性率分别为 22.2%、86%、93.8%,肝癌组织中 RKIP 蛋白表达显著低于癌旁及正常肝组织,说明 RKIP 表

达的减少或缺失与肝癌的发生密切相关。肝癌的分化程度、有无肝内或淋巴转移以及是否存在门静脉或胆管癌栓反应肝癌的侵袭转移等生物学行为。我们的研究结果显示 RKIP 阳性率在无肝内或淋巴转移组占 29.2%,显著高于有肝内或淋巴转移组的 8.3%,RKIP 蛋白表达在中高分化肝癌组显著高于低分化组,但 RKIP 蛋白表达与肝癌有无门静脉或胆管癌栓无关,说明 RKIP 在抑制肝癌侵袭转移过程中可能发挥重要作用,同时存在其他信号途径介导肝癌侵袭转移。但 Hagan 等[6]研究认为 RKIP 的表达与抑制乳腺癌转移有关,但与乳腺癌分化程度无关,研究结果的差异可能与组织类型不同有关。

研究表明蛋白激酶 C 激活后,使 RKIP 磷酸化并从 Raf-1 上解离,从而提高 ERK 通路的活性;同时磷酸化的 RKIP 与 G 蛋白偶联受体激酶-2 结合,活化 G 蛋白信号通路,RKIP 介导的这种全新的交叉调节机制,有助于维持 Raf1 的促进生长信号和 GRK-2 抑制生长信号的动态平衡[12]。研究表明 P-RKIP 定位于染色体的中心体和有丝分裂的着丝点部位,对细胞周期检测点蛋白和细胞周期具有调节作用[13]。以上说明 RKIP 的磷酸化活性将 Raf-1/MEK/ERK 和 G 蛋白偶联受体两条重要的细胞信号调节通路连接在一起,并且在细胞周期进程中发挥重要作用。但 RKIP 的磷酸化水平与恶性肿瘤之间的关系少见报道。我们的研究结果显示磷酸化的 RKIP 在肝癌组织中表达明显低于癌旁及正常肝组织,且 P-RKIP 蛋白表达水平与 HCC 组织分化程度、有无肝内或淋巴转移有关($P<0.05$),说明 P-RKIP 蛋白表达水平的减少或缺失在肝细胞癌发生、发展过程中起重要作用。

RT-PCR 结果显示肝癌组织、癌旁组织及正常肝组织 RKIP mRNA 表达差异无统计学意义。Lee 等[8]采用 PCR 方法检测 7 例肝癌和对应的癌旁组织 RKIP mRNA 的表达,结果表明两者差异无统计学意义。Schuierer 等[10]对 9 种黑色素细胞瘤细胞株行 RT-PCR 检测,结果显示所有细胞株 RKIP mRNA 无任何缺失或突变性插入,PCR 产物经测序分析证实 RKIP 基因位点编码区无任何异常。以上说明 RKIP 的表达可能是在转录后水平受到调节。

总之,肝细胞癌侵袭转移与 RKIP 和 P-RKIP 蛋白表达的减少或缺失有关,RKIP 和 P-RKIP 抑制肝癌侵袭转移的机制以及 RKIP 蛋白表达的调节机制有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Schoentgen F, Jolles P. From structure to function: possible biological roles of a new widespread protein family binding hydrophobic ligands and displaying a nucleotide binding site[J]. FEBS Lett, 1995, 369(1): 22-26.

[2] Schmitz K J, Wohlschlaeger J, Lang H, *et al*. Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection[J]. J Hepatol, 2008, 48(1):83-90.

[3] Hsiang C Y, Wu S L, Chen J C, *et al*. Acetaldehyde induces matrix metalloproteinase-9 gene expression *via* nuclear factor-kappaB and activator protein 1 signaling pathways in human hepatocellular carcinoma cells: Association with the invasive potential[J]. Toxicol Lett, 2007, 171(1-2):78-86.

[4] Kim M, Lee H C, Tsedensodnom O, *et al*. Functional interaction between Wnt3 and Frizzled-7 leads to activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells[J]. J Hepatol, 2008, 48(5):780-791.

[5] Fu Z, Smith P C, Zhang L, *et al*. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis[J]. J Natl Cancer Inst, 2003, 95(12):878-889.

[6] Hagan S, Al-Mulla F, Mallon E, *et al*. Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(20): 7392-7397.

[7] Zhang L, Fu Z, Binkley C, *et al*. Raf kinase inhibitory protein inhibits beta-cell proliferation[J]. Surgery, 2004, 136 (3): 708-715.

[8] Lee H C, Tian B, Sedivy J M, *et al*. Loss of Raf kinase inhibitor protein promotes cell proliferation and migration of human hepatoma cells [J]. Gastroenterology, 2006, 131(4): 1208-1217.

[9] Keller E T, Fu Z, Brennan M. The biology of a prostate cancer metastasis suppressor protein: Raf kinase inhibitor protein[J]. J Cell Biochem, 2005, 94(2):273-278.

[10] Schuierer M M, Bataille F, Hagan S, *et al*. Reduction in Raf kinase inhibitor protein expression is associated with increased Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling in melanoma cell lines[J]. Cancer Res, 2004, 64(15): 5186-5192.

[11] Fu Z, Kitagawa Y, Shen R, *et al*. Metastasis suppressor gene Raf kinase inhibitor protein (RKIP) is a novel prognostic marker in prostate cancer[J]. Prostate, 2006, 66(3): 248-256.

[12] Lorenz K, Lohse M J, Quitterer U. Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2 [J]. Nature, 2003, 426 (6966): 574-579.

[13] Corbit K C, Trakul N, Eves E M, *et al*. Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein[J]. J Biol Chem, 2003, 278 (15):13061-13068.

[14] 杨　波,脱朝伟,张　宁,等. 靶向端粒酶催化亚单位基因 hEST2 反义寡核苷酸对人肝癌细胞生长的抑制作用[J]. 中华消化外科杂志, 2007, 6(5):369-372

(编辑　邓强庭)