基础研究 文章编号:0253-3626(2011)08-0940-03

Raf-1激酶抑制蛋白在人胃肠道间质瘤中的表达及意义

尧登华[1],黄 华[2],王 芳[3]

(1. 解放军59医院消化内科,开远 661600;2. 昆明医学院附属第二医院消化内科;3. 昆明医学院病理教研室,昆明 650031)

【摘 要】目的:研究 Raf-1 激酶抑制蛋白(Raf-1 kinase inhibitor protein,RKIP)在胃肠道间质瘤(Gastrointestinal stromal tumor,GIST)中的表达及其与 GIST 生物学行为的关系,为预测该肿瘤的侵袭潜能提供理论依据和可能的预测指标。方法:收集 24 例手术和内镜黏膜下剥离术(Endoscopic submucosal dissection,ESD)切除的 GIST 标本,应用免疫组织化学法检测标本中 RKIP 蛋白的表达,结合病理形态学及生物学行为评价进行统计学分析。结果:24 例 GIST 中,RKIP 蛋白在极低度侵袭危险性(VLR)组、低度侵袭危险性(LR)组、中度侵袭危险性(IR)组、高度侵袭危险性(HR)组中的表达呈逐渐减低趋势,且 VLR 组分别与 IR 组和 HR 组比较,差异有统计学意义($P<0.008\ 3$);LR 组分别与 IR 组和 HR 组比较,差异有统计学意义($P<0.008\ 3$);而 VLR 组和 LR 组比较、IR 组和 HR 组比较,差异无统计学意义($P>0.008\ 3$)。结论:RKIP 蛋白表达与 GIST 的侵袭行为有关,检测 RKIP 表达可作为 GIST 侵袭潜能评价的有效指标之一。

【关键词】胃肠道间质瘤;Raf-1 激酶抑制蛋白;免疫组织化学

【中国图书分类法分类号】R735 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-02-18

The expression of RKIP in human gastrointestional stromal tumor

YAO Deng-hua[1], HUANG hua[2], WANG fang[3]

(1. Department of Gastroenterology, the 59th Hospital PLA; 2. Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical College; 3. Department of Pathology, Kunming Medical College)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of Raf-1 kinase inhibitor protein (RKIP) in human gastrointestinal stromal tumor (GIST), and discuss the relationship between their expression and clincopathological characteristics. *Methods*: Immunohistochemical staining was used to detect the expression of RKIP in 24 cases of GIST. Their relations with histomorphology and biological behavior were analyzed statistically. *Results*: In 24 cases of GIST, the expression of RKIP in the Fletcher degree VLR、LR、IR、HR groups were decreasing gradually, and the VLR、LR groups were inversely correlated with the Fletcher degree IR and HR groups ($P< 0.008\ 3$). *Conclusion*: These data showed the expression of RKIP were related to the oncogenesis and progression of GIST. RKIP may be one of the prognostic indicators in GIST.

【Key words】gastrointestinal stromal tumor; RKIP; immunohistochemistry

Ras/Raf/MEK/ERK 通路是众多 MAPK 通路中的一个,经过通路中的特异性级联磷酸化反应将信号由细胞外传入细胞核内,抑制细胞凋亡,直接或间接活化转录因子,促进细胞增殖。Raf-1 激酶抑制蛋白(Raf-1 kinase inhibitor protein,RKIP)可以与 Raf-1 结合,抑制 Raf-1/MEK/ERK 信号通路,因其主要调节细胞生长、分化、增殖和凋亡,故与肿瘤的发生、发展与转移有关,在恶性肿瘤的发展和预后中具有重要作用,与多种肿瘤的不良预后密切相关[1-4]。

胃肠道间质瘤(Gastrointestinal stromal tumor,GIST)是胃肠道中最常见的间叶源性肿瘤,由突变的 c-Kit 或血小板源生长因子受体(Platelet derived growth factor receptor,PDGFR)基因驱动,组织学上由梭形、上皮样、偶或多形性细胞排列成束状或弥漫状图像,位于胃肠道、网膜以及肠系膜上,多见于中老年人,男女间无明显差异,其临床生物学行为表现复杂,部分呈明显良性过程,部分呈肯定的恶性表现[5-7]。有关 RKIP 在 GIST 中的表达,国内外少见报道。因此,检测 GIST 中 RKIP 的表达,分析其与 GIST 临床病理特征的关系,对于了解RKIP 在 GIST 的发生、发展中有指导作用,可作为其预后的判断指标。

作者介绍:尧登华(1976-),男,主治医师,研究方向:消化内镜诊治。

通信作者:黄 华,女,教授,Email:hhtrq@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料来源

收集解放军 59 医院和昆明医学院附属第二医院 2004-2011 年手术及 ESD 切除的经 HE 及免疫组化 CD117、CD34 确诊的 GIST 肿瘤组织蜡块共 24 例，临床和病理资料完整；其中男 10 例，女 14 例，中位年龄 58.0 岁（37~76 岁）；病变部位分布：胃 10 例（28.6%），肠 12 例（21.8%），食管 2 例（8.3%）。肿瘤直径大于 5 cm 5 例（20.8%），小于 5 cm 19 例（79.2%）；按组织学分型：梭形细胞型 19 例（79.2%），上皮样细胞型 3 例（12.5%），混合细胞型 2 例（8.3%）。按 Fletcher 四级分级标准[8]：极低度侵袭危险性（VLR）肿瘤为直径小于 2 cm，核分裂小于 5 个/50 HPF；低度侵袭危险性（LR）肿瘤为直径 2~5 cm 之间，核分裂小于 5 个/50 HPF；中度侵袭危险性（IR）肿瘤为直径小于 5 cm，核分裂 6~10 个/ 50 HPF 或直径 5~10 cm 之间、核分裂小于 5 个/50 HPF；高度侵袭危险性（HR）肿瘤为直径大于 5 cm，核分裂大于 5 个/50 HPF 或肿瘤无论大小而核分裂大于 10 个/50 HPF，或肿瘤大于 10 cm，无论核分裂多少者。7 例（29.2%）为 VLR、4 例（16.7%）为 LR、7 例（29.2%）为 IR、6 例（25%）为 HR。所有组织标本均经 10%中性福尔马林固定、石蜡包埋、制成 4 μm 厚连续切片 3 张，RKIP 免疫组织化学染色 3 张。

1.2 免疫组化试剂来源及染色方法

鼠抗人 RKIP 单克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。即用型非生物素免疫组化 ElivisionTM plus 检测试剂盒、即用型 UltrasensitiveTM S-P 超敏检测试剂盒、DAB 酶底物显色试剂盒、PBS 粉剂、浓缩型柠檬酸组织抗原修复液（pH 6.0）、多聚-L-赖氨酸购自北京博奥森生物技术有限公司。采用 SP 法进行免疫组化染色，用已知阳性片和磷酸盐缓冲液（Phosphate buffer saline，PBS）代替一抗分别作为阳性和阴性对照。RKIP 免疫组化实验均需热修复，免疫组化实验一抗浓度 1:250。

1.3 结果判定标准

RKIP 蛋白在 GIST 的表达主要定位于肿瘤细胞的细胞浆，为淡黄色~棕黄色颗粒。记分参照 Remmele and Stegnerde 的 IRS（Immuno-reactive score）法[9]，即 3 个参数半定量计数方法：根据染色强度、阳性细胞数和两者计分的乘积进行判断，分为阴性“-”、弱阳性“+”、中强阳性“+ +”、强阳性“+++”。每张切片随机选取 10 个高倍镜视野，计数阳性细胞数：阳性细胞数≤5%为 0 分；阳性细胞数 6%~25%为 1 分；阳性细胞数 26%~50%为 2 分；阳性细胞数 51%~75%为 3 分；阳性细胞数≥75%为 4 分。阳性细胞的着色强度：淡黄色为 1 分，黄色为 2 分，棕黄色为 3 分。两积分相乘，0 分为阴性（-），1~4 分为弱阳性（+），5~8 分为中度阳性（++），9~12 分为强阳性（+++）（见图 1、2、3、4）。

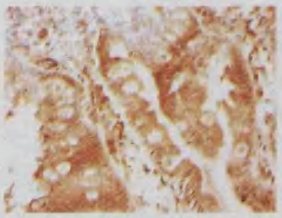


图 1 正常肠黏膜上皮细胞 RKIP 呈强阳性（×400）



图 2 GIST 中 RKIP 呈强阳性（×400）



图 3 GIST 中 RKIP 呈阳性（×400）



图 4 GIST 中 RKIP 呈弱阳性（×400）

1.4 统计学分析

免疫组化结果采用 SPSS 17.0 统计学软件中的秩和检验进行数据处理，首先进行多个独立样本的秩和检验（*Kruskal Wallis Test* 检验，检验水准 $\alpha=0.05$），然后进行样本间两两比较（*Kruskal Wallis Test* 检验，经校正的检验水准 $\alpha'=\alpha/\frac{n(n-1)}{2}=0.008\ 3$）。

2 结 果

RKIP在 24 例 GIST 中的表达有按 Fletcher 分级在VLR 组、LR 组、IR 组、HR 组中的表达呈逐渐减低趋势；且 VLR 组与 IR 组比较，差异有统计学意义（$P<0.008\ 3$），其阴性、弱阳性、阳性、强阳性率分别为 VLR 组 0%、0%、0%、42.9%、52.1%和 IR 组 57.1%、28.6%、14.3%、0%；VLR 组与 HR 组比较差异有统计学意义（$P<0.008\ 3$），其阴性、弱阳性、阳性、强阳性率分别为 VLR 组 0%、0%、42.9%、57.1%和 HR 组 60%、40%、0%、0%；LR组与IR组比较，差异有统计学意义（$P<0.008\ 3$），其阴性、弱阳性、阳性、强阳性率分别为 LR 组 0%、0%、25%、75%和 IR 组 57.1%、28.6%、14.3%、0%；LR 组与 HR 组比较差异有统计学意义（$P<0.008\ 3$），其阴性、弱阳性、阳性、强阳性率分别为 LR 组 0%、0%、25%、75% HR 组60%、40%、0%、0%；VLR、LR 组比较差异无统计学意义（$P>0.008\ 3$）；IR、HR 组比较差异无统计学意义（$P>0.008\ 3$）（见表 1、2）。

表 1 GIST Fletcher 四级分级中 RKIP 蛋白的表达

	-	+	++	+++
VLR	0	0	3	4
LR	0	0	1	3
IR	4	2	1	0
HR	4	2	0	0

注：- 表示阴性，+ 表示弱阳性，++ 表示阳性，+++ 表示强阳性

表 2 样本间两两比较秩和检验（*Kruskal Wallis Test* 检验）

对比样本名 a 与 b	样本例数		两样本平均秩和之差	χ^2 值	自由度	P
	na	nb				
VLR与 LR	7	4	0.99	0.319	1	0.572
VLR与 IR	7	7	6.58	9.268	1	0.002
VLR与 HR	7	6	6.50	9.664	1	0.002
LR 与 IR	4	7	5.31	7.019	1	0.008
LR 与 HR	4	6	5.00	7.200	1	0.007
IR 与 HR	7	6	0.93	0.248	1	0.619

注：检验水准（经校正）α=0.008 3（P<0.008 3 表示差异有统计学意义）

3 讨 论

促有丝分裂原活化蛋白激酶（Mitogen-activated protein kinases，MAPK）信号传导通路是迄今为止研究最为广泛的信号通路之一，主要调节细胞生长、分化、增殖和凋亡，在肿瘤的发生、发展与转移中起着重要的作用，该通路的核心是由 MAPKKK（MAPK kinase kinase）/MAPKK（MAPK kinase）/MAPK 3 种蛋白激酶构成的蛋白激酶反应[10]。Ras/Raf/MEK/ERK 通路是众多 MAPK 通路中的 1 个，几乎所有真核细胞中均存在这一传导通路，通过通路中的特异性级联磷酸化将信号由细胞外传入细胞核内。Raf 激酶是 Ras/Raf/MEK/ERK 通路中的一个关键激酶，由原癌基因 raf 编码生成，可通过依赖或不依赖 Ras 的方式发挥其信号传导调节作用：Raf 可激活下游底物 MEK 从而磷酸化 ERK，调节各种细胞功能，一旦该通路发生过度激活，则引起细胞增殖加速与细胞生存期延长，从而导致肿瘤的生成[11]。磷脂酰乙醇胺结合蛋白（Phosphatidylethanolamine-binding protein，PEBP）是 MAPK 信号传导通路的生理性抑制蛋白，它可与 Raf-1 结合，抑制 Raf-1 激活 MEK，因此，PEBP 被称为 Raf-1 激酶抑制蛋白（Raf-1 kinase inhibitory protein，RKIP）[12]。PEBP 的晶体研究表明，其蛋白质由 9 个折叠和 2 个 α-螺旋构成，形成一个较为紧凑的结构，蛋白质表面有一个狭窄空穴，是一个配体结合位点，可容纳 1 个阴离子，推测磷脂酰乙醇胺的磷酸基团是配体结合位点的天然配体。PEBP 分布较为广泛，用 Western blot 方法可在大鼠的所有组织检测到 PEBP，在脑、心、肝、肾上腺、肾、小肠、附睾和睾丸组织表达量比较高[13]。研究表明，RKIP 具有抑制恶性黑色素瘤[14]、乳腺癌[2]、结肠直肠癌[15]、肝癌[16]、前列腺癌[17]等多种恶性肿瘤转移的作用，被认为是肿瘤转移抑制基因。RKIP 还是蛋白激酶 C（PKC）的底物蛋白，PKC 可磷酸化 RKIP，磷酸化的 RKIP 与 Raf-1 解离，解除其对 Raf-1 的抑制从而激活 MAPK 信号系统，这种两条信号系统交互作用的生理意义是更加精细的调节细胞对各种信号的反应[18]。

我们的研究结果显示，RKIP 在 VLR 组、LR 组、IR 组和 HR 组 GIST 中随着侵袭危险性的增加其表达呈逐渐减低趋势，且在VLR组GIST和LR组GIST的表达明显高于IR组 GIST 和 HR 组 GIST 的表达，其差异有统计学意义（P<0.008 3）。此结果表明，伴随GIST Fletcher分级升高，RKIP表达减少，RKIP 失去抑制 Raf-1 的作用，Ras/Raf/MEK/ERK 通路持续激活，GIST 细胞获得增殖、转化，细胞凋亡受到抑制，促进 GIST 的增殖和恶性转化。GIST 临床生物学行为表现复杂，临床难以判断其良恶性及预后，RKIP 是Raf-1 的抑制因子，而Raf-1 是 Ras/Raf/MEK/ERK 通路中的一个关键激酶，可调节细胞的生长、分化、增殖和凋亡，其表达对 GIST 生物学行为应该有重要的判断意义，我们的研究结果证实了这一结论。因此，检测 RKIP 可作为 GIST 侵袭行为评价的有效指标之一，并且作为 GIST 术后的随访指标也具有一定的临床价值。

参 考 文 献

[1] Fu Z，Smith P C，Zhang L，et al.Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis[J].Natl Cancer Inst，2003，95(12)：87-889.

[2] 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.

[3] Al-Mulla F，Hagan S，Al-Ali W，et al.Raf kinase inhibitor protein：mechanism of loss of expression and association with genomic instability[J].Clin Pathol，2008，61(4)：524-529.

[4] Zhu S，Mc Henry K T，Isne W S，et al.A chemical inhibitor reveals the role of Raf kinase inhibitor protein in cell migration[J].Chem Biol，2005，12 (9)：981-991.

[5] Miettinen M，Lasota J.Gastrointestinal stromal tumors (GISTs)：definition，occurrence，pathology，differential diagnosis and molecular genetics[J].Pathol，2003，54(1)：3-24.

[6] DeMatteo R P，Lewis J J，Leung D，et al.Two hundred gastrointestinal stromal tumors：recurrence patterns and prognostic factors for survival[J].Ann Surg，2000，231(1)：51-58.

[7] 中国胃肠道间质瘤病理专家组.中国胃肠道间质瘤病理共识意见[J].中华病理学杂志，2007，36 (10)：704-707.

[8] Fletcher C D，Berman J J，Corless C，et al.Diagnosis of gastro intestinal stromal tumors：a consensus app roach[J].Hum Pathol，2002，33 (5)：459-465.

[9] Kohlberger P D，Breitenecker F，Kaider A，et al.Modified true-color computer-assisted image analysis versus subjective scoring of estrogen receptor expression in breast cancer：a comparison[J].Anticancer Res，1999，19(3B)：2189-2193.

[10] Baccarini M.Second Nature：Biological Function of Raf-1"kinases"[J].FEBS Lett，2005，579 (15)：3271-3277.

[11] Schulze A，Lehmann K，Jefferies H B，et al .Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells [J].Genes Dev，2001，15(8)：981-994.

[12] Frayne J，Ingram C，Love S，et al.Localisation of phosphatidylethanolamine-binding protein in the brain and other tissues of the rat[J].

基础研究 文章编号：0253-3626（2011）08-0943-04

参附注射液预处理对新生大鼠缺氧缺血后脑保护作用

杨丽娟[1]，王 军[2]

（1. 南京医科大学附属医院江苏淮安市第一人民医院新生儿科，南京 100202；
2. 徐州医学院附属医院新生儿科，徐州 221000）

【摘 要】目的：研究参附注射液（Shenfu injection，SF）预处理对新生大鼠脑保护作用。方法：建立新生大鼠缺氧缺血性脑病（Hypoxic-ischemic encephalopathy，HIE）模型，并随机分为 3 组：假手术组（S），生理盐水对照组（C），参附预处理组（SF）。把实验分成 2 部分：①检测新生大鼠缺氧缺血后 24 h 热休克蛋白 HSP70 和 HSP90 表达；②免疫组化方法检测缺氧缺血后 24 h 新生大鼠海马 CA1 区神经元 Bax、Bcl-2 蛋白的表达。结果：缺氧缺血后 24 h，S 组 HSP70 表达较少（0.15±0.02），C 组可见到较多的 HSP70 免疫阳性细胞（0.84±0.14），明显高于 S 组（$P<0.01$）；SF 组 HSP70（1.56±0.16）免疫阳性细胞分布较 C 组广泛，数量明显增多（$P<0.05$）而 SF 组 HSP90 的表达与 C 组相仿；SF 组海马神经元 Bax 表达较生理盐水明显下调（16.5±2.3；23.2±3.4）（$P<0.05$），而 Bcl-2 表达显著增多（36.9±4.1；23.4±3.5）（$P<0.05$）。结论：SF 预处理可通过增加 HSP70 表达，增强新生大鼠对缺氧缺血的耐受能力，通过上调海马 CA1 区椎体细胞 Bcl-2 蛋白的表达，下调 Bax 的蛋白表达，减少神经元凋亡的发生，从而达到对新生大鼠缺氧缺血后脑保护作用。

【关键词】参附注射液；缺氧缺性脑病；凋亡；Bcl-2；Bax；热休克蛋白
【中国图书分类法分类号】R722.12 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-02-24

Effects of Shenfu injection pretreatment on neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy

YANG Li-Juan[1], *WANG Jun*[2]

(*1. Department of Neonatal, Huai'an First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University; 2. Department of Neonatal, the Affliated Hospital of Xuzhou Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To study the protective effect of Shenfu injection pretreatment on neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy(HIE). *Methods*: HIE model rats were randomly divided into three groups: sham operation group(S), saline control group(C), and Shenfu injection pretreatment group (SF). The experiment included two parts: one was to detect the heat shock protein HSP70 and HSP90 expression 24 h after hypoxia-ischemia (HI); the second was to measure the expression of Bcl-2 and Bax of neurons in left hippocampal CAI region. *Results*: There was less expression of HSP70 and HSP90 in S group 24 h after HI; the increase of HSP70 positive cells in group C (0.84±0.14)was significantly higher than that of group S (0.15±0.02)($P<0.01$), and HSP70 immunoreactive neurons were much more widely distributed in

作者介绍：杨丽娟（1975-），女，主治医师，硕士，研究方向：新生儿缺氧缺血性脑病。

Cell Tissue Res, 1999, 298(3): 415-423.

[13] Yeung K, Seitz T, Li S, et al. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP[J]. Nature, 1999, 401(6749): 173-177.

[14] Park S, Yeung M L, Beach S, et al. RKIP down regulates B-Raf kinase activity in melanoma cancer cells[J]. Oncogene, 2005, 24(21): 3535-3540.

[15] Minoo P, Zlobec I, Baker K, et al. Loss of raf-1 kinase inhibitor protein expression is associated with tumor progression and metastasis in colorectal cancer[J]. Am J Clin Pathol, 2007, 127(5): 820-827.

[16] 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.

[17] 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.

[18] 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]. Biol Chem, 2003, 278(15): 13061-13068.

（责任编辑：张学颖）