

RKIP在胆囊癌中的表达及临床意义

谈 焱, 孟海萍, 吴斌全, 吴浩荣

■背景资料

原发性胆囊癌的发病率在消化系统肿瘤中占第5位, 死亡率占第9位, 其恶性程度高, 起病隐匿, 早期诊断不易, 且容易合并周围脏器侵犯和淋巴转移, 临床治疗效果差。近年来, 其发病率有上升的趋势。虽然临床诊断技术不断进步, 胆囊癌检出率逐年升高, 但是总体诊断率仍然低下。为此, 人们必须寻找更加精确、有效的分子标志物, 以期早期发现肿瘤。

谈焱, 吴浩荣, 苏州大学附属第二医院普外科 江苏省苏州市 215004

孟海萍, 吴斌全, 蚌埠医学院附属第一医院检验科 安徽省蚌埠市 233004

作者贡献分布: 此课题由谈焱与吴浩荣共同设计; 研究过程由谈焱, 孟海萍及吴斌全共同完成; 数据分析与论文写作由谈焱完成。

通讯作者: 吴浩荣, 教授, 215004, 江苏省苏州市, 苏州大学附属第二医院普外科。tmjtx2009@163.com

电话: 0512-67783303

收稿日期: 2009-06-29 修回日期: 2009-08-14

接受日期: 2009-08-17 在线出版日期: 2009-08-28

Expression of RKIP and its clinical significance in gallbladder carcinoma

Yi Tan, Hai-Ping Meng, Bin-Quan Wu, Hao-Rong Wu

Yi Tan, Hao-Rong Wu, Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 210029, Jiangsu Province, China

Hai-Ping, Meng, Bin-Quan Wu, Department of Clinical Laboratory, First Hospital Affiliated to Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui Province, China

Correspondence to: Hao-Rong Wu, Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China. tmjtx2009@163.com

Received: 2009-06-29 Revised: 2009-08-14

Accepted: 2009-08-17 Published online: 2009-08-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of Raf kinase inhibitory protein (RKIP) in gallbladder carcinoma and to explore its possible relationship with clinicopathological parameters and prognosis of gallbladder carcinoma.

METHODS: RKIP expression was examined by streptavidin peroxidase immunohistochemical method on paraffin-embedded tissue specimens from 50 patients with gallbladder cancer and 38 with chronic cholecystitis who underwent surgical treatment between January 2006 and June 2009 in Suzhou University. None of these patients received preoperative treatment, and detailed clinicopathological information was provided.

RESULTS: The positive expression rate of RKIP in gallbladder carcinoma was significantly high-

er than in chronic cholecystitis, with statistically significant difference (74.0% vs 0.8%, $P < 0.01$). In gallbladder carcinoma, the expression of RKIP had no correlation with age, gender, histologic type and gallbladder stone ($P > 0.05$), but overexpression of RKIP correlated significantly with lower histological grading (31.8% vs 92.3%, $P < 0.05$), lymph node or distant metastasis (75.0% vs 100.0%, $P < 0.05$), and shorter survival after operation (50.0% vs 93.8%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: RKIP is overexpressed in development of gallbladder carcinoma. RKIP may play an important role in tumor progression of human gallbladder carcinoma.

Key Words: Gallbladder carcinoma; Raf kinase inhibitory protein; Immunohistochemistry

Tan Y, Meng HP, Wu BQ, Wu HR. Expression of RKIP and its clinical significance in gallbladder carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2518-2521

摘要

目的: 探讨胆囊癌中Raf激酶抑制蛋白(RKIP)的表达状况及其与胆囊癌临床病理指标和预后的可能关系。

方法: 2006-01/2009-06苏州大学附属第二医院胆囊癌患者50例, 外科手术切除术后病理证实的存档组织蜡块。所有病例术前未进行放化疗, 有完整的临床病理资料。采用免疫组织化学Elivision Plus法, 对50例原发性胆囊癌与38例慢性胆囊炎组织中RKIP表达进行检测。

结果: 在胆囊癌组织中表达的阳性率明显高于慢性胆囊炎组织, 差异有统计学意义(74.0% vs 0.8%, $P < 0.01$)。RKIP表达水平与胆囊癌患者年龄、性别、组织学类型及是否伴有结石等因素均无明显关系($P > 0.05$), 但RKIP高表达与胆囊癌的低分级(31.8% vs 92.3%, $P < 0.05$)、淋巴结或远处转移(75.0% vs 100.0%, $P < 0.05$)以及术后生存时间减少(50.0% vs 93.8%, $P < 0.05$)有明显关系。

结论: RKIP在胆囊癌中高表达可能提示其在

■同行评议者

郭晓钟, 教授, 中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

胆囊癌的发生、发展中起重要作用。

关键词: 胆囊肿瘤; Raf激酶抑制蛋白; 免疫组织化学法

谈臻, 孟海萍, 吴斌全, 吴浩荣. RKIP在胆囊癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(24): 2518-2521

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2518.asp>

0 引言

Raf激酶抑制蛋白(raf kinase inhibitor protein, RKIP)广泛存在于各种不同的生物中, 1999年Yeung *et al*^[1]发现其可以与Raf-1结合, 从而抑制Raf-1/MEK/ERK信号通路, 将其命名为RKIP, 进一步研究发现RKIP还参与了对核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路和G蛋白偶联受体信号通路的调控. 2003年Fu *et al*^[2]发现RKIP可以抑制肿瘤细胞转移, 使其成为抗肿瘤领域一个新的热点. 我们采用免疫组织化学法分析了胆囊癌组织中RKIP的表达及其与临床病理指标和预后的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 2006-01/2009-06苏州大学附属第二医院胆囊癌患者50例, 男20例, 女30例; 年龄30-76岁, 其中>60岁32例, <60岁18例. 外科手术切除术后病理证实的存档组织蜡块. 所有病例术前未进行放化疗, 有完整的临床病理资料. 组织学类型: 腺癌43例, 腺鳞癌3例, 鳞癌4例. 病理分级: 高分化(I级)11例, 中分化(II级)23例, 低分化(III级)16例. 按Nevin临床分期: I期1例, II期7例, III期12例, IV期11例, V期19例. 根据术中探查及病理报告结果: 有淋巴结或远处转移30例, 无转移20例. 合并有胆囊结石25例, 无结石25例. 另外选取38例慢性胆囊炎组织标本作为对照组; 即用型兔抗人RKIP多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司; 广谱型Elivision Plus试剂盒、DAB显色剂(均购自福州迈新生物技术有限公司).

1.2 方法

1.2.1 随访患者: 通过电话调查、信件随访及入户调查的方式了解50例胆囊癌患者从手术之日起1年内是否存活、存活时间及其死亡原因。

1.2.2 免疫组织化学染色: 将每例石蜡块用组织切片机做成4 μ m厚的连续组织切片4张, 1张作苏木精-伊红(HE)染色, 余作免疫组织化学染色. 以已知正常乳腺组织阳性切片作阳性对照, 以

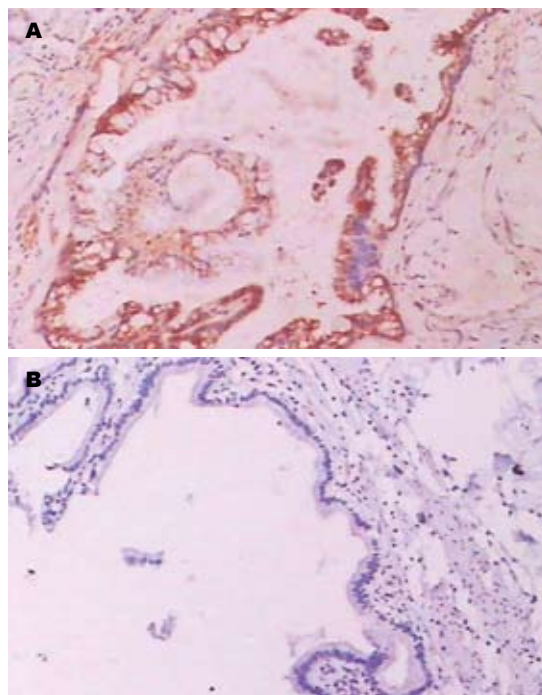


图1 组织中RKIP表达(magnification $\times 100$). A: 胆囊癌组织中强阳性; B: 胆囊炎组织中阴性.

PBS代替一抗作为阴性对照. RKIP采用柠檬酸微波抗原修复方法, 免疫组织化学染色具体步骤按Elivision Plus试剂盒说明书进行操作, 以胞质或胞膜出现棕黄色颗粒视为阳性细胞, 结果判断根据Hao *et al*^[3]的方法.

统计学处理 应用SPASS13.0统计软件进行分析. χ^2 检验分析 $P < 0.05$ 表明有显著性差异.

2 结果

2.1 随访患者 50例中有25例获得完整随访资料, 结果存活1年以上的有8例, 1年内死于肿瘤者16例, 1年生存率为32.0%.

2.2 胆囊良恶性病变组织中RKIP的表达 RKIP阳性染色主要位于胞质. 慢性胆囊炎和胆囊癌患者组织中RKIP阳性表达与表达率分别为37/50和3/38与0.8%和74.0%, 胆囊癌组与慢性胆囊炎组差异有统计学意义($\chi^2 = 38.05$, $P < 0.01$). RKIP主要位于胞质(图1).

2.3 RKIP表达与胆囊癌临床病理参数 RKIP表达随着癌组织病理分级的增高, 阳性表达率逐渐增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 有淋巴结或远处转移组的阳性表达率明显高于无转移组($P < 0.05$); 术后1年内死亡组的阳性率亦高于术后生存期超过1年组($P < 0.05$). 但RKIP表达与胆囊癌患者年龄、性别、组织学类型以及是否伴有结石等因素无明显相关性(表1).

■ 研发前沿

RKIP可以抑制肿瘤细胞转移, 使其成为抗肿瘤领域一个新的热点. 本研究采用免疫组织化学法分析了胆囊癌组织中RKIP的表达及其与临床病理指标和预后的关系.

■ 相关报道

多数的研究发现, RKIP的表达在正常组织中高于肿瘤组织中, 在肿瘤组织中原发灶高于转移灶, RKIP的低表达或缺失的肿瘤转移性、侵袭性强, 预后差. 故认为RKIP是肿瘤转移抑制基因.

■创新盘点

本研究首次发现胆囊癌组织中RKIP的表达明显高于胆囊良性组织。RKIP高表达与胆囊癌的低分级、淋巴结或远处转移以及术后生存时间减少有明显关系,表明RKIP具有潜在致癌活性。RKIP有可能是胆囊癌的一个新的治疗靶点。

表 1 胆囊癌临床病理参数与RKIP表达的关系

临床病理参数	PEBP1阳性表达(%)	χ^2 值	P值
性别			
男	16/18(88.9)	0.09	>0.05
女	29/32(90.6)		
年龄(岁)			
<60	18/20(90.0)	0.23	>0.05
≥60	27/30(90.0)		
组织学类型			
腺癌	39/43 (90.7)	0.01	>0.05
非腺癌	5/7(71.4)		
是否伴有结石			
有结石	21/25(84.0)	0.89	>0.05
无结石	24/25(96.0)		
病理分级			
I 级	4/11(31.8)		<0.05
II - III 级	36/39(92.3)		
Nevin临床分期			
I - II 期	4/7(57.1)		0.048 ¹
III - V 期	39/43(95.3)		
淋巴结或远处转移			
有转移	30/30(100.0)	5.79	<0.05
无转移	15/20(75.0)		
术后生存时间(年)			
<1	15/16(93.8)		0.028 ¹
≥1	4/8(50.0)		

¹: 使用确切概率法。

3 讨论

原发性胆囊癌的发病率在消化系肿瘤中占第5位,死亡率占第9位,其恶性程度高,起病隐匿,早期诊断不易,且容易合并周围脏器侵犯和淋巴转移,临床治疗效果差^[4]。近年来,其发病率有上升的趋势。虽然临床诊断技术不断进步,胆囊癌检出率逐年升高,但是总体诊断率仍然低下。为此,我们必须寻找更加精确、有效的分子标志物,以期早期发现肿瘤。

最近研究发现RKIP能抑制前列腺癌^[2]、肺癌^[5]、肝癌^[6]等多种恶性肿瘤转移,其具体机制可能与抑制Raf-1/MEK/ERK或NF- κ B信号转导途径有关。Fu *et al*^[2]用免疫组织化学方法检测发现前列腺癌患者原发病灶的病理标本中有RKIP的表达,但在转移前列腺的病理标本无RKIP的表达;进一步对转染了含RKIP cDNA的质粒的LNCaP和C4-2B细胞进行研究,发现在体外RKIP的表达与前列腺癌细胞的浸润呈负相关:在转移的肿瘤细胞中增加RKIP的表达,能减弱体外浸润能力,而在非转移的癌细胞中减少RKIP表

达能增强他们的体外浸润。Hagan *et al*^[5]检测了103例乳腺癌患者的病理标本中的RKIP,发现在乳腺癌的原发病灶中有一定表达, RKIP的表达与乳腺癌的类型、分化程度、肿瘤大小、ER的表达无关,但在转移淋巴结中低表达或无表达。Lee *et al*^[6]发现RKIP在肝癌中的表达明显低于邻近的正常肝组织,增加RKIP的表达可以减少肝癌细胞的增殖和迁移。相似的结果亦见于肺癌及黑色素瘤的研究^[7-8]。目前,多数的研究发现^[9-10]: RKIP的表达在正常组织中高于肿瘤组织中,在肿瘤组织中原发灶高于转移灶, RKIP的低表达或缺失的肿瘤转移性、侵袭性强,预后差。故认为RKIP是肿瘤转移抑制基因。但亦有相反的研究结果, Zhu *et al*^[11]发现RKIP具有促进细胞迁移的作用。他们在对狗肾传代细胞(madin-darby canine kidney, MDCK)上皮细胞进行研究时发现, RKIP是细胞迁移抑制因子locostatin的底物。迄今发现locostatin是唯一的RKIP抑制因子,他可以破坏RKIP结合并抑制Raf-1激酶的能力。siRNA介导的RKIP表达沉默可减弱细胞迁移率,而过表达RKIP则导致细胞呈现高迁移的表型,并降低了对locostatin的敏感性,在MDCK上皮细胞中过表达RKIP能促进细胞迁移。Zhang *et al*^[12]报道RKIP能抑制胰小岛 β 细胞的增殖,抑制细胞周期的进程。RKIP还能促进肿瘤细胞凋亡^[13]。这些不同的实验结果表明RKIP可能在调控细胞迁移中存在不同作用方式,可能是依赖不同的上下游因子,从而导致了RKIP在不同的肿瘤类型中通过不同的方式促进或者抑制肿瘤的浸润和转移。

本研究首次应用免疫组织化学方法发现胆囊癌组织中RKIP的表达明显高于胆囊良性组织。RKIP高表达与胆囊癌的低分级、淋巴结或远处转移以及术后生存时间减少有明显关系($P<0.05$),表明RKIP具有潜在致癌活性。RKIP有可能是胆囊癌的一个新的治疗靶点。鉴于RKIP广泛的生物学效应及在肿瘤生长及转移中的重要作用,我们正在对其在胆囊癌中的作用机制进行进一步的研究。

4 参考文献

- 1 Yeung K, Seitz T, Li S, Janosch P, McFerran B, Kaiser C, Fee F, Katsanakis KD, Rose DW, Mischak H, Sedivy JM, Kolch W. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* 1999; 401: 173-177
- 2 Fu Z, Smith PC, Zhang L, Rubin MA, Dunn RL, Yao Z, Keller ET. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer

- metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 878-889
- 3 Hao XP, Willis JE, Pretlow TG, Rao JS, MacLennan GT, Talbot IC, Pretlow TP. Loss of fragile histidine triad expression in colorectal carcinomas and premalignant lesions. *Cancer Res* 2000; 60: 18-21
 - 4 Kumar S, Masood N, Shaikh AJ, Valimhammad AT, Haider G, Lal A, Niamatullah N. Clinical presentation and outcomes of patients with biliary malignancies: the Aga Khan University experience. *Asian Pac J Cancer Prev* 2009; 10: 463-466
 - 5 Hagan S, Al-Mulla F, Mallon E, Oien K, Ferrier R, Gusterson B, García JJ, Kolch W. Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7392-7397
 - 6 Lee HC, Tian B, Sedivy JM, Wands JR, Kim M. Loss of Raf kinase inhibitor protein promotes cell proliferation and migration of human hepatoma cells. *Gastroenterology* 2006; 131: 1208-1217
 - 7 韩海勃, 张志谦, 赵威. RKIP蛋白在多个肺癌细胞系中的表达下调. *基础医学与临床* 2007; 27: 849-852
 - 8 Houben R, Vetter-Kauczok CS, Ortmann S, Rapp UR, Broecker EB, Becker JC. Phospho-ERK staining is a poor indicator of the mutational status of BRAF and NRAS in human melanoma. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 2003-2012
 - 9 Zeng L, Imamoto A, Rosner MR. Raf kinase inhibitory protein (RKIP): a physiological regulator and future therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* 2008; 12: 1275-1287
 - 10 Dangi-Garimella S, Yun J, Eves EM, Newman M, Erkeland SJ, Hammond SM, Minn AJ, Rosner MR. Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7. *EMBO J* 2009; 28: 347-358
 - 11 Zhu S, Mc Henry KT, Lane WS, Fenteany G. A chemical inhibitor reveals the role of Raf kinase inhibitor protein in cell migration. *Chem Biol* 2005; 12: 981-991
 - 12 Zhang L, Fu Z, Binkley C, Giordano T, Burant CF, Logsdon CD, Simeone DM. Raf kinase inhibitory protein inhibits beta-cell proliferation. *Surgery* 2004; 136: 708-715
 - 13 Chatterjee D, Bai Y, Wang Z, Beach S, Mott S, Roy R, Braastad C, Sun Y, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB, Darnowski J, Pantazis P, Wyche J, Fu Z, Kitagawa Y, Keller ET, Sedivy JM, Yeung KC. RKIP sensitizes prostate and breast cancer cells to drug-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279: 17515-17523

■同行评价

本研究选题尚可, 对临床医师有一定的参考价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》计量单位标准

本刊讯 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M 大写斜体, r 小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A 大写斜体, r 小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是 u (小写正体). 计量单位在+、-、 \pm 及-后列出. 如 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$, 45.6 ± 24 岁, 56.4 ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为 3.56 ± 0.27 ng/L, 131.6 ± 0.4 mmol/L, $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 $\mu\text{mol/L}$ 表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm \times 6 cm \times 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、 CO_2 结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 μg , hr改成h, 重量 γ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg \cdot d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO_2 , 50 mL/L CO_2 ; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示. (科学编辑: 李军亮 2009-08-28)