

· 基础研究 ·

# Raf-1 激酶抑制蛋白在喉鳞癌中的表达及意义

赫 莉<sup>1</sup>, 李芳芳<sup>2</sup>, 李晓明<sup>1</sup>, 路秀英<sup>1</sup>, 张慧平<sup>1</sup>

(1. 白求恩国际和平医院 耳鼻咽喉科, 河北 石家庄 050082; 2. 河北医科大学 生物化学和分子生物学教研室, 河北 石家庄 050017)

**摘要:** 目的 探讨 Raf-1 激酶抑制蛋白 (Raf-1 kinase inhibitor protein, RKIP) 在喉鳞癌以及正常喉黏膜中的表达及意义。方法 采用免疫组化方法检测 41 例喉鳞癌及 8 例正常喉黏膜组织中 RKIP、磷酸化的细胞外信号调节激酶 (Phospho-extracellular signal-regulated kinase, P-ERK) 的表达情况。结果 喉鳞癌中 RKIP 表达比正常喉黏膜组织明显降低, 差异有统计学意义 ( $P = 0.012$ )。RKIP 在有淋巴结转移的喉癌中阳性率低于无转移的喉癌, 差异有统计学意义 ( $P = 0.016$ )。有淋巴结转移的喉癌原发灶与其本身淋巴结转移灶间 RKIP 表达无显著差异。41 例喉癌患者的原发灶标本中, RKIP 与 P-ERK 的表达呈正相关性 ( $P = 0.003$ ,  $r = 0.456$ )。结论 RKIP 低表达的喉癌更容易发生转移。丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路受许多复杂的上游信号活化, 喉癌中 RKIP 不能完全抑制该通路的活性。

**关键词:** Raf-1 激酶抑制蛋白; 免疫组化; 喉肿瘤, 鳞状细胞癌; 转移

中图分类号: R739.65 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2010)01-0007-06

## Expression of RKIP in laryngeal squamous cell carcinoma and its significance

HE Li, LI Fang-fang, LI Xiao-ming, et al.

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression and its clinical significance of raf-1 kinase inhibitor protein (RKIP) in laryngeal squamous cell carcinoma and normal laryngeal squamous epithelium. **Methods** Immunohistochemistry was used for detecting the expression of RKIP and phospho-extracellular signal-regulated kinase (P-ERK) in 41 specimens of laryngeal squamous cell carcinoma and 8 of normal laryngeal squamous epithelium. **Results** The expression of RKIP in specimens of laryngeal squamous cell carcinoma was lower than that in normal laryngeal squamous epithelium with significant difference ( $P < 0.05$ ). In specimens of laryngeal squamous cell carcinoma, RKIP positive staining rate in node-positive tumors was lower than that in node-negative ones, and the difference was significant ( $P < 0.05$ ). In specimens of laryngeal squamous cell carcinoma with lymphatic metastasis, the difference in RKIP expression between primary foci and metastatic lymph nodes was statistically insignificant. In specimens of primary foci, the expression of RKIP was positively correlated with that of P-ERK ( $P = 0.003$ ,  $r = 0.456$ ). **Conclusion** The primary laryngeal squamous cell carcinoma with reduced expression of RKIP tends toward metastasis. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway might be activated by multiple upstream signals, and RKIP can not suppress the activation of this pathway completely in laryngeal squamous cell carcinoma.

**Key words:** Raf-1 kinase inhibitor protein; Immunohistochemistry; Laryngeal neoplasm; Squamous cell carcinoma; Metastasis

Raf-1 激酶抑制蛋白 (Raf -1 kinase inhibitor protein, RKIP) 是一种高度保守的多功能蛋白, 广泛存在于人体的各个组织中<sup>[1]</sup>。RKIP 能与 Raf-1 相互作用抑制调节丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路的活性。MAPK 信号通路参与调节细胞的许多主要功能, 如增殖、分化及凋亡。在 30% 的肿瘤中该通路发生改变, 并在侵袭和转移中发挥重要作用。通路中细胞外信号调节激酶 (Extracellular signal-regulated kinase, ERK) 通过磷酸化发挥作用, 所以磷酸化的细胞外信号调节激酶 (Phospho-extracellular signal-regulated kinase, P-ERK) 的量可以反映该通路的活性<sup>[2]</sup>。最近, 在对前列腺癌、直肠癌、乳腺癌、恶性黑色素瘤等的研究中发现 RKIP 具有抑制肿瘤细胞的转移功能, 证实 RKIP 是一种肿瘤转移抑制基因, 在恶性肿瘤的发展和预后中具有重要的作用。喉癌是来源于喉黏膜鳞状上皮组织的恶性肿瘤, 转移是其发展的最终阶段, 也是引起患者死亡、治疗失败的主要原因。本研究的主要目的是检测 RKIP 在正常喉黏膜、喉癌组织中的表达, 以及 MAPK 信号通路的活性, 探讨 RKIP 在喉癌转移中的作用, 检验 RKIP 是否通过调节 MAPK 信号通路的活性而影响喉癌的转移。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床资料

41 例病例资料来源于白求恩国际和平医院 2007 年 1 月~2009 年 2 月喉癌住院手术患者, 其中男 37 例, 女 4 例; 年龄 43~86 岁, 平均 62 岁。有淋巴结转移 10 例, 无淋巴结转移 31 例。高分化癌 15 例, 中分化癌 19 例, 低分化癌 7 例。声门上型 16 例, 声门型 25 例, 按国际抗癌协会 (UICC) TNM 分类标准 (2002) 修订的方案, 分级按术后病理结果划分, 各组均无远处器官转移。在不知任何患者临床资料和肿瘤生物学特点的情况下, 全部病例组织学分类均由 3 名资深病理学医师阅片, 确诊为鳞状细胞癌并分级。所有病例资料完整, 全组病例均行手术治疗, 术前未接受放射治疗

及化学治疗。有淋巴结转移的 10 例患者的喉鳞癌原发灶及淋巴结转移灶同时进行检测。淋巴结转移灶取自颈清扫切除组织, 并且术后病理证实淋巴结中确有转移肿瘤组织。8 例正常喉黏膜组织取自行全喉切除的喉癌患者, 声门型喉癌在距原发灶边缘 0.5 cm 以外的范围采集; 声门上型喉癌在距原发灶边缘 1.0 cm 以外处采集, 术后病理检测均为分化良好且无肿瘤组织浸润的鳞状上皮。所有标本均经 10% 中性甲醛固定, 石蜡包埋, 4  $\mu$ m 连续切片。

### 1.2 材料

山羊抗人 RKIP 多克隆抗体、鼠抗人 P-ERK 单克隆抗体, 为美国 Santa Cruz 公司产品。即用型二步法免疫组织化学试剂盒, 光谱超敏 SP 法试剂盒和浓缩型 DAB 试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.3 免疫组织化学染色过程

常规脱蜡水化, PBS 冲洗; 切片置入加热沸腾的柠檬酸缓冲液 (0.01 mol/L, pH = 6.0) 中进行抗原修复, 冷却至室温, PBS 洗; 滴加过氧化酶阻断液, 10 min, PBS 洗; 滴加非免疫性阻断血清, 10 min; 滴加一抗, 浓度均为 1:50, 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗; 按试剂盒中要求滴加二抗, PBS 洗; 滴加 DAB 显色液, 3~5 min, 水洗; 苏木素复染, 3 min, 水洗; 中性树胶封片。选取喉鳞癌组织 (RKIP、P-ERK) 做阳性对照, 以 PBS 代替一抗作阴性对照。

### 1.4 结果判定标准

染色细胞内有棕色颗粒的为阳性表达。RKIP 染色阳性表达主要定位于细胞胞浆, 所有标本中有 1 例表达于胞核。P-ERK 阳性表达均定位于细胞胞浆中。所有病理切片均由 3 位资深病理医师在不知病例资料和肿瘤生物学特点的前提下阅片。对每张病理切片在高倍 ( $\times 400$ ) 镜下至少观察 10 个不重复的视野, 判断细胞着色率和着色强度。结合文献报道采用半定量评分法判定结果<sup>[3]</sup>。阳性细胞的百分比: 0 分, 无阳性细胞; 1 分, 阳性细胞百分比 < 10%; 2 分, 阳性细胞百分比  $\geq 10\% \sim 50\%$ ; 3 分, 阳性细胞百分比  $\geq 50\% \sim 80\%$ ; 4 分, 阳性细胞百分比  $\geq 80\%$ 。染色强度按

阴性、弱、中、强染色分别评为 0~3 分。最终的评分是两个指标的乘积。0~3 分为阴性(-), 4~8 分为弱阳性(+), 9~12 分为强阳性(++).

### 1.5 统计学处理

实验数据的比较采用  $\chi^2$  检验, 10 例有转移的喉鳞癌和其本身淋巴结转移灶中 RKIP 的表达的比较采用 Wilcoxon 检验。RKIP 与 P-ERK 的相关性比较采用 Spearman 秩相关分析, 统计软件采用 SPSS 13.0。

## 2 结果

### 2.1 RKIP 的表达

在正常喉黏膜的鳞状上皮中, RKIP 主要分布于棘细胞及颗粒细胞层, 而在基底层中表达阴性。在高分化喉癌组织中, RKIP 主要分布于棘细胞样及颗粒细胞样的肿瘤细胞中, 而在基底层样细胞中表达阴性。在低分化喉癌及淋巴转移灶中, 表达多为阴性(图 1~3)。

在 8 例正常喉黏膜组织中, RKIP 表达强阳性 7 例, 弱阳性 1 例。在 41 例喉鳞癌原发灶中, 强阳性 13 例, 弱阳性 13 例, 阴性 15 例。与正常喉黏膜组织相比, 喉鳞癌组织中 RKIP 阳性表达明显降低, 差异有统计学意义( $P=0.012$ )。

41 例喉鳞癌原发灶中, 无淋巴结转移的 31 例, RKIP 表达强阳性 10 例, 弱阳性 13 例, 阴性 8 例。有淋巴结转移的 10 例, 其中喉癌原发灶 RKIP 表达强阳性 3 例, 弱阳性 0 例, 阴性 7 例; 淋巴结转移灶 RKIP 表达阳性 3 例, 弱阳性 1 例, 阴性 6 例。无淋巴结转移喉癌与有淋巴结转移喉癌原发灶相比, RKIP 表达存在显著差异( $P=0.016$ ), 有淋巴结转移的喉癌中表达阳性率低于无淋巴结转移的喉癌。有淋巴结转移的 10 例中, 原发灶与转移灶相比, RKIP 表达无显著差异。

RKIP 的表达在不同性别、年龄、肿瘤发病部位、T 分期、临床分期和肿瘤分化程度等组间的差异均无显著性(表 1)。

### 2.2 P-ERK 的表达

部分正常喉黏膜组织中, P-ERK 集中分

布于基底层和靠近基底层的棘细胞层中。在喉癌中多呈阳性或强阳性表达(图 4~6)。8 例正常喉鳞状上皮中, P-ERK 表达强阳性 0 例, 弱阳性 6 例, 阴性 2 例。41 例喉鳞癌原发灶中, P-ERK 表达强阳性 21 例, 弱阳性 13 例, 阴性 7 例。无淋巴结转移的 31 例喉癌组织中, P-ERK 表达强阳性 16 例, 弱阳性 9 例, 阴性 6 例。有淋巴结转移的喉癌组织中 10 例, 其中喉癌原发灶 P-ERK 表达强阳性 5 例, 弱阳性 4 例, 阴性 1 例; 淋巴结转移灶 P-ERK 表达强阳性 5 例, 弱阳性 4 例, 阴性 1 例。

表 1 RKIP 在肿瘤中的表达与喉鳞癌患者临床病理参数的关系

临床特征	n	RKIP 各表达例数			P
		-	+	++	
性别					
男	37	13	13	11	0.351
女	4	2	0	2	
年龄					
≥60 岁	24	9	9	6	0.485
<60 岁	17	6	4	7	
发病部位					
声门上型	16	9	4	3	0.104
声门型	25	6	9	10	
T 分期					
T1	10	2	4	4	0.734
T2	10	3	3	4	
T3	8	4	3	1	
T4	13	6	3	4	
临床分期					
I	9	2	4	3	0.618
II	9	2	3	4	
III	8	4	3	1	
IV	15	7	3	5	
肿瘤分化					
高分化	15	3	7	5	0.402
中分化	19	8	5	6	
低分化	7	4	1	2	
淋巴结转移					
有转移	10	7	0	3	0.016
无转移	31	8	13	10	

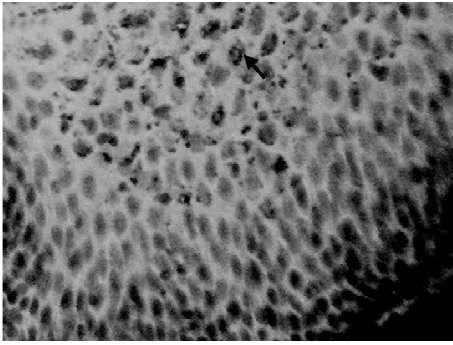


图 1 RKIP 在正常喉鳞状上皮中表达。黑色箭头所指为表达阳性的正常细胞(免疫组化 PV 法,  $\times 400$ )

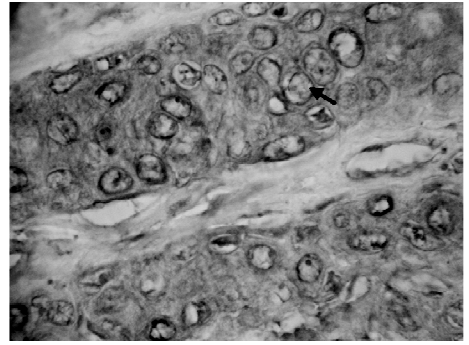


图 2 RKIP 在喉鳞癌中的阳性表达。黑色箭头所指为表达阳性的肿瘤细胞(免疫组化 PV 法,  $\times 400$ )

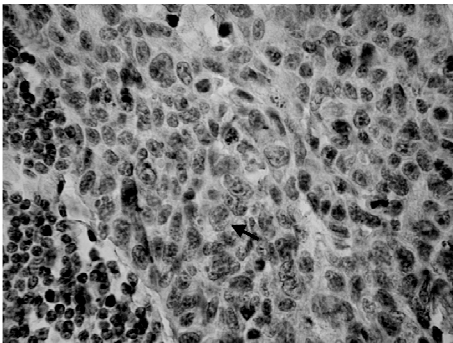


图 3 RKIP 在淋巴结转移灶中的阴性表达。黑色箭头所指为表达阴性的肿瘤细胞(免疫组化 PV 法,  $\times 400$ )

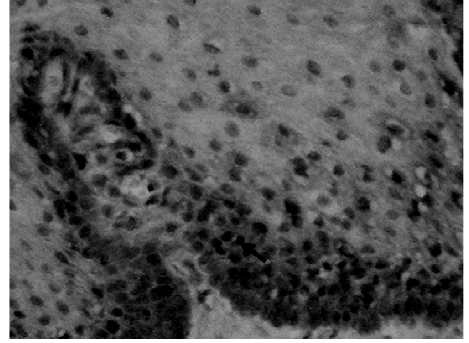


图 4 P-ERK 在正常喉鳞状上皮中的表达。黑色箭头所指为表达阳性的正常细胞(免疫组化 SP 法,  $\times 400$ )

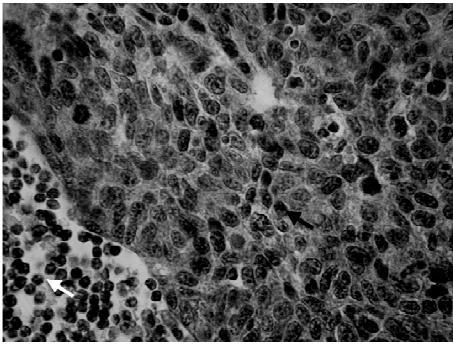


图 5 P-ERK 在淋巴结转移灶中的强阳性表达。黑色箭头所指为表达阳性的肿瘤细胞,白色箭头所指为淋巴细胞(免疫组化 SP 法,  $\times 400$ )

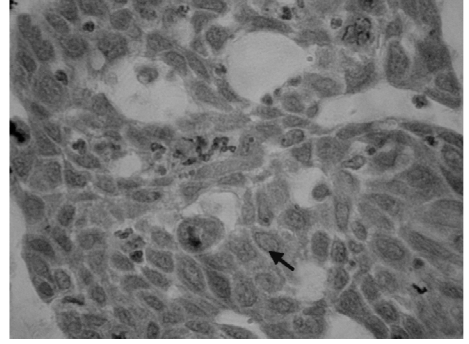


图 6 P-ERK 在喉癌原发灶中的强阳性表达。黑色箭头所指为表达阳性的肿瘤细胞(免疫组化 SP 法,  $\times 400$ )

### 2.3 RKIP 的表达与 P-ERK 相关性分析

RKIP 与 P-ERK 在 41 例喉癌原发灶标本中的表达情况作 Spearman 秩相关分析, 结果  $P = 0.003$ ,  $r = 0.456$ , 有统计学意义, 可以认为两者呈正相关性。

### 3 讨论

喉癌是来源于喉黏膜鳞状上皮组织的

(下转第 15 页)