

## RKIP 和 E-cadherin 在前列腺癌组织中的表达

陆身修, 钟狂飏, 朱利勇, 何乐业

(中南大学湘雅三医院泌尿外科, 长沙 410013)

**[摘要]** 目的:联检 Raf 激酶抑制蛋白(Raf kinase inhibitor protein, RKIP)、上皮型钙黏蛋白(E-cadherin, E-cad)在人前列腺癌(prostate cancer, PCa)组织中的表达并分析两者之间的相关性。方法:运用免疫荧光组织化学的方法,检测 26 例前列腺癌组织和 14 例良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)组织中 RKIP 和 E-cad 的表达情况,并探讨其与前列腺癌病理分级、临床分期的关系,分析两者之间的相关性。结果:RKIP 和 E-cad 在前列腺癌组织中的表达均较前列腺增生组织显著下降;在前列腺癌组织分化不良组(Gleason 8~10 分)中的表达均较分化良好组(Gleason 5~7 分)明显下降( $P < 0.05$ );在前列腺癌组织无转移组(T2N0M0 期以内)中的表达均较侵袭转移组明显下降( $P < 0.05$ );二者在前列腺癌组织中的表达呈正相关( $r = 0.491$ ,  $P = 0.011$ )。结论:RKIP 和 E-cad 均是肿瘤转移抑制因子,其表达的下降低能促进前列腺癌的转移,抑制前列腺癌的分化,RKIP 可通过增加 E-cad 的表达而抑制前列腺癌的转移。

**[关键词]** 前列腺癌; Raf 激酶抑制蛋白; 上皮型钙黏蛋白; 转移; Gleason 评分

**[中图分类号]** R737.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2009)09-0892-06

## Expression of Raf kinase inhibitor protein and E-cadherin in prostate cancer tissues

LIU Shenxiu, ZHONG Kuangbiao, ZHU Liyong, HE Leye

(Department of Urology, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

**Abstract:** **Objective** To detect the expression of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) and epithelial cadherin (E-cadherin) in human prostate cancer tissues, and their correlation. **Methods** We discussed the relationship between RKIP and E-cadherin and the clinical stage and pathological classification of prostate cancer by immunofluorescence histochemistry staining in the test of expression of RKIP in 26 prostate cancer tissues and 14 BPH tissues, and analyzed the correlation between them. **Results** The expression of RKIP and E-cadherin in prostate cancer tissues was obviously lower than that in the benign prostatic hypertrophy tissues. The expression of RKIP and E-cadherin in the dys-good differentiation group (Gleason 8~10) was significantly lower than that in the good differentiation group (Gleason  $\leq 7$ ). The expression of RKIP and E-cadherin in the non-metastasis group (within T2N0M0) was significantly lower than that in the invasion-metastasis group. The expressions of both RKIP and E-cadherin in human prostate cancer tissues were positively correlated. **Conclusion** RKIP and E-cadherin are metastasis suppressor factors, whose decreased expression can

收稿日期(Date of reception) 2008-09-11

作者简介(Biography) 陆身修, 硕士, 经治医生, 主要从事前列腺的基础和临床的研究。

通讯作者(Corresponding author) 钟狂飏, E-mail: zkbm@126.com

基金项目(Foundation item) 湖南省自然科学基金(05JJ30170)。 This work was supported by Natural Science Foundation of Hunan Province, P. R. China (05JJ30170).

increase the invasive capability of prostate cancer and suppress its differentiation. RKIP can suppress the metastasis of prostate cancer by increasing the E-cadherin expression in prostate cancer.

**Key words:** prostate cancer; Raf kinase inhibitor protein; E-cadherin; metastasis; Gleason score

[ *J Cent South Univ ( Med Sci )*, 2009, 34(9):0892-00 ]

Raf 激酶抑制蛋白 ( Raf kinase inhibitor protein, RKIP) 是磷脂酰乙醇胺结合蛋白家族的成员, 研究表明 RKIP 在 Raf-1/MEK/ERK, G 蛋白偶联受体和 NF- $\kappa$ B 信号通路<sup>[1]</sup> 中发挥重要的调控作用, 而这些信号通路与细胞生长、增殖、分化和肿瘤发生等多个过程关系密切。近年来众多资料显示, RKIP 在多种恶性肿瘤 ( 如乳腺癌、黑色素细胞瘤、胰岛细胞瘤<sup>[2]</sup> 和肺细胞瘤<sup>[3]</sup> 等) 中表达减弱或丢失, Fu 等<sup>[4]</sup> 对人 C4-2B 转移性前列腺癌细胞系及其母系非转移性 LNCaP 前列腺癌细胞系的 RKIP 表达水平进行比较, 发现前者的表达水平明显低于后者, 提示 RKIP 是一种新型的前列腺癌转移抑制基因。上皮型钙黏蛋白 ( E-cadherin, E-cad) 是一经典的转移抑制因子, 是钙黏附蛋白分子家族中跨膜蛋白亚型的一种, 主要存在于人和动物的上皮细胞并集中表达于黏着斑上, 其对维护上皮细胞的形态和结构的完整性起重要作用, 并且主要介导同型细胞间的黏附。上皮型钙黏蛋白低表达或缺失可使肿瘤细胞丧失接触抑制, 导致细胞无限制增殖, 失去分化; 上皮型钙黏蛋白表达低下, 使其不能与细胞浆内的连环蛋白形成完整的复合物, 从而不能与细胞骨架肌动蛋白相连, 导致细胞间连接松解, 易于从原发灶脱落移动到邻近组织及血管淋巴管, 极易发生浸润和转移。甲状腺癌、肺癌、胃癌等恶性肿瘤的研究中均显示 E-cad 表达下调的肿瘤其淋巴结转移率显著高于表达正常的肿瘤<sup>[5]</sup>。本实验运用荧光免疫组织化学的方法联检人前列腺癌组织标本中 RKIP 和 E-cad 的表达并分析两者的相关性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 标本

本研究所用标本为 2003 年 1 月至 2008 年 10 月中南大学湘雅三医院泌尿外科的手术标本, 其中前列腺癌 26 例, 前列腺增生 14 例, 前

列腺癌患者年龄 57 ~ 89 岁, 平均 72.0 岁, 前列腺增生患者年龄 64 ~ 81 岁, 平均 72.0 岁。两组年龄无统计学差异。

### 1.2 主要试剂

RKIP 山羊抗人多克隆 IgG 抗体和 E-cad 兔抗人多克隆 IgG 抗体 ( 以下称为一抗) 为 Santa-cruz 公司产品, 荧光二抗分别为北京中杉生物技术有限公司提供的异硫氰酸荧光素 ( FITC) 标记兔抗山羊 IgG 和四乙基罗丹明异硫氰酸盐 ( TRITC) 标记山羊抗兔 IgG。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 免疫病理学方法

上述标本均经 10% 甲醛固定 24 h 以上, 常规取材, 石蜡包埋, 4  $\mu$ m 厚连续切片, 每例切取 5 张, 取一张行 HE 染色, 不加 RKIP 或 E-cad 相应一抗的阴性对照各一张, 余下的二张经过抗原热修复, 5% 牛血清白蛋白 ( BSA) 封闭, 滴加相应一抗、荧光二抗后, 行 Hoechst 复染显示细胞核, 甘油封片, 荧光显微镜下观察, 拍照。

#### 1.3.2 组织病理学方法及分组

由我院病理科 1 位高级职称病理医生在光学显微镜下对所有标本的 HE 切片进行观察, 根据 2004 年 WHO 前列腺癌分类、分级诊断标准对肿瘤进行诊断复查和 Gleason 评分。其中  $\leq 7$  分为分化良好组, 8 ~ 10 分为分化不良组。依临床病例资料及病检报告, 按照美国癌期划分联合委员会 ( 2002 年) 前列腺癌 TNM 分期标准, 对前列腺癌病例进行临床 TNM 分期。标本分为: 侵袭转移组和无转移组, 其中无转移组定义为: T2N0M0 以内, 即 T2 期以内 ( 含 T2 期), 无淋巴, 无远处转移者; 其他为侵袭转移组。

### 1.4 结果判定

使用专业测量图像软件 Image-Pro Plus 6.0 依次对所采集的荧光照片进行分析, 测量。从统计视图窗口中读取阳性荧光区域 ( IOD SUM) 及总区域 ( area sum) 的数据, 算得照片上阳性荧光区域的平均荧光强度值 [ mean density = ( IOD

SUM)/(area sum)]。每张图片的测量均在相同的软件设置和参数条件下进行。

### 1.5 统计学处理

所有运算在 SPSS 12.0 统计软件包上进行,数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较采用两独立样本的  $t$  检验,两变量间的相关性研究采用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

26 例前列腺癌患者, Gleason 评分均  $\geq 5$  分,分化良好组病例共计 12 例,分化不良组 14 例,无转移组病例 13 例,侵袭转移组病例 13 例。

### 2.1 RKIP 和 E-cad 在 PCa 组和 BPH 组间的比较

在 BPH 组的前列腺增生组织中, RKIP 呈强表

达,可见明亮耀眼的绿色荧光(图 1A),行 Hoechst 复染显示细胞核后,可见腺腔的上皮细胞胞浆和胞膜都有强表达,而间质组织中表达较少(图 2A);而在前列腺癌组织中, RKIP 的表达微弱(图 1B),复染细胞核后见微弱的绿色荧光散在分布在细胞核间(图 2B)。E-cad 在对照组的前列腺增生组织中强表达,红色荧光明亮耀眼(图 3A),行 Hoechst 复染显示细胞核后,可见 E-cad 的阳性红染区位于核周围的胞浆和胞膜,但周边的胞膜染色相对较深(图 4A);而在前列腺癌组织中, E-cad 呈弱表达(图 3B),复染显示胞核后见胞核间零星分布的淡红色的微热荧光(图 4B)。两组之间 RKIP 和 E-cad 阳性表达均有统计学差异 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

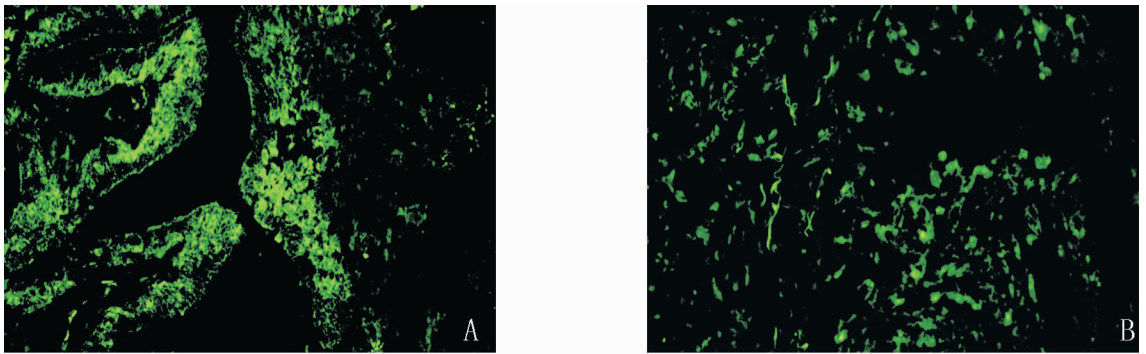


图 1 RKIP 的表达 ( $\times 100$ )。A: BPH 组; B: PCa 组。

Fig. 1 The expression of RKIP ( $\times 100$ ). A: BPH group; B: PCa group.

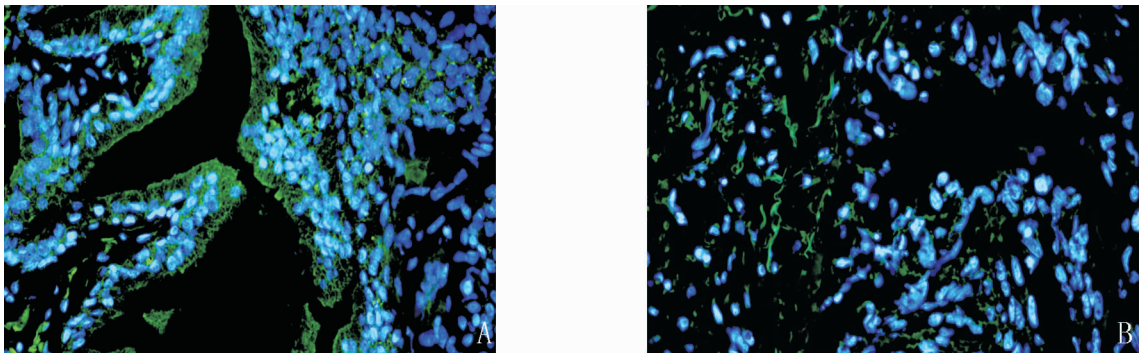


图 2 Hoechst 复染 ( $\times 100$ )。A: BPH 组; B: PCa 组。

Fig. 2 The findings of the Fig. 1 by Hoechst afterstaining to display the cell nuclear ( $\times 100$ ). A: BPH group; B: PCa group.

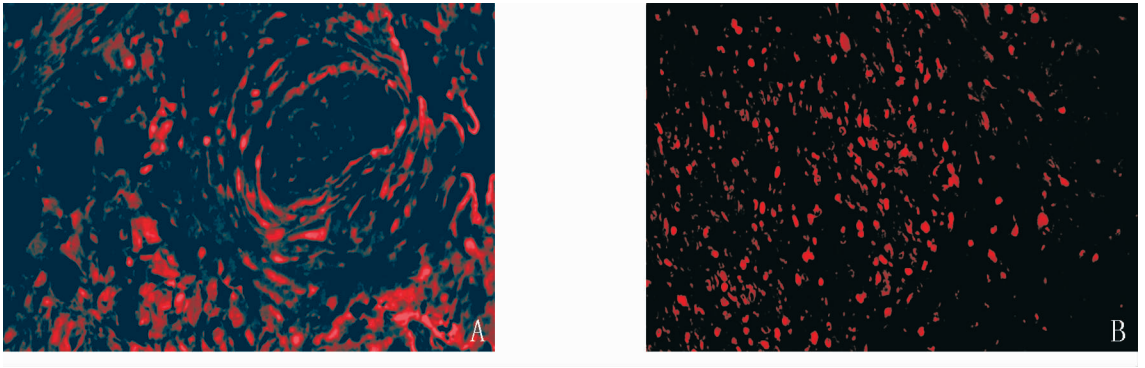


图3 E-cad 的表达 (×100)。A: BPH 组; B: PCa 组。

Fig. 3 The expression of E-cad (×100). A: BPH group; B: PCa group.

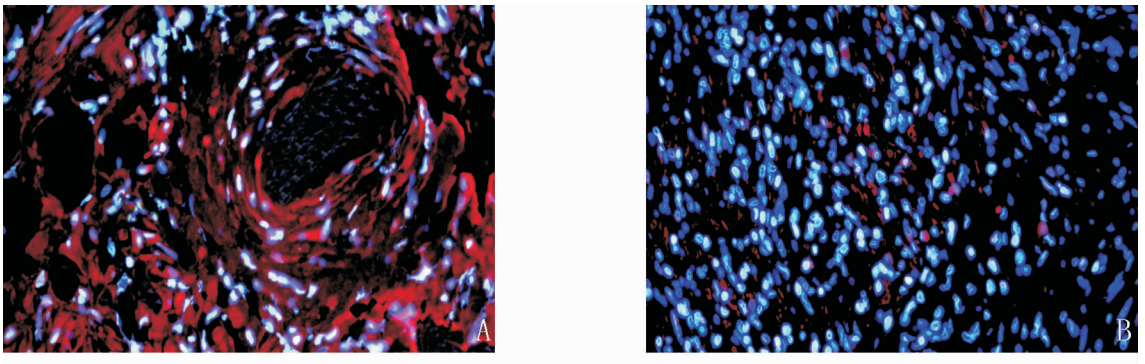


图4 Hoechst 复染 (×100)。A: BPH 组; B: PCa 组。

Fig. 4 The findings of the Fig. 3 by Hoechst afterstaining to display the cell nuclear (×100). A: BPH group; B: PCa group.

表1 各组 RKIP 和 E-cad 荧光强度值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Comparing of density of RKIP and E-cad in groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	荧光强度值	
		RKIP	E-cad
疾病种类			
BPH 组	14	0.07655 ± 0.010970	0.05917 ± 0.009554
PCa 组	26	0.06515 ± 0.012597 **	0.04977 ± 0.012346 *
GS 评分			
分化不良组	14	0.05921 ± 0.008577	0.04471 ± 0.008835
分化良好组	12	0.07208 ± 0.013283 $\Delta$	0.05567 ± 0.013553 $\Delta$
TMN 分期			
无转移组	13	0.07031 ± 0.012658	0.05500 ± 0.012767
侵袭转移组	13	0.06000 ± 0.010662 #	0.04454 ± 0.009761 #

与 BPH 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与分化组比较,  $\Delta P < 0.05$ ; 与无转移组比较, # $P < 0.05$ 。

在分化良好的癌组织中,腺体结构清楚, RKIP 和 E-cad 的表达均较强;在分化不良的癌组织中,腺体结构紊乱, RKIP 和 E-cad 表达较弱。分化良好组与分化不良组之间 RKIP 和 E-cad 的阳性表达差异均有明显的统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

在无转移的前列腺癌组织中, RKIP 和 E-cad 的荧光明亮,而在侵袭转移组中二者的荧光强度明显降低。无转移组与侵袭转移组之间 RKIP 和 E-cad 的阳性表达差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

### 2.2 RKIP 和 E-cad 在 PCA 组中的相关性分析

通过对 26 例前列腺癌组织中 RKIP 和 E-cad 表达的相关分析发现: RKIP 与 E-cad 在前列腺癌组织中的表达呈中度正相关 ( $r = 0.491, P = 0.011$ )。

### 3 讨 论

美国密西根州的 Fu 等<sup>[6]</sup>对人 C4-2B 转移性前列腺癌细胞系及其母系非转移性 LNCaP 前列腺癌细胞系的 RKIP 表达水平进行比较,发现前者的表达水平明显低于后者。最近,Fu 等<sup>[4]</sup>又应用包括有非癌性前列腺和原发性与转移性前列腺癌的组织芯片进行 RKIP 免疫组织化学染色,发现 RKIP 在非癌性前列腺组织、原发性和转移性前列腺癌的表达分别下降 5%、48% 和 89%。本实验运用免疫荧光组织化学的方法发现,前列腺癌组织中 RKIP 的表达较前列腺增生组织下降;侵袭转移组中 RKIP 的表达较非侵袭转移组下降,与 Fu 等的结论基本吻合。Keller 等<sup>[7]</sup>研究表明,在转移的前列腺癌细胞系中,RKIP 的 mRNA 水平和蛋白水平均低于非转移的前列腺癌细胞,特别是在良性组织中 RKIP 表达水平最高,而随着 Gleason 评分的增加,肿瘤组织中 RKIP 表达水平逐渐减低。以 Gleason 7 分为界,本次实验发现分化不良组中 RKIP 的表达较分化良好组下降,支持上述观点。

多项研究表明 E-cad 蛋白的异常表达与前列腺癌分化、肿瘤转移和预后相关<sup>[8]</sup>。罗勇等<sup>[9]</sup>研究发现 E-cad 在前列腺癌低转移细胞株 LNCaP 细胞中高度表达,而在高转移细胞株 IA8 中表达缺失。Enmon 等<sup>[10]</sup>在对前列腺癌凝聚物的检测中发现高分化 LNCaP 细胞抗脱离的黏附性强,低分化 PC3 细胞抗脱离的黏附性差,PC3 中 E-cad 表达率低于 30%。谷化平等<sup>[11]</sup>在对前列腺癌组织的检测中发现 E-cad 正常表达率为 48.9%,高分化前列腺癌 E-cad 正常表达率为 85%,低分化前列腺癌 E-cad 正常表达率为 20%,E-cad 的表达与肿瘤的分化程度具有相关性。Kallakury 等<sup>[12]</sup>在前列腺癌的研究中发现,在高级别前列腺癌中 E-cad 正常表达为 25%,认为 E-cad 异常表达与 Gleason 分级、病理分期呈正相关。本实验发现前列腺癌组织中 E-cad 的表达较前列腺增生明显降低;转移组中 E-cad 的表达较非转移组下降;以 Gleason 7 分为界,分化良好组中 E-cad 的表达较分化不良组下降,与上述结论基本一致。

Zhu 等<sup>[13]</sup>通过对体外培养的 MDCK (马-达二氏犬肾细胞系)上皮细胞的研究发现,RKIP 能正

性调节细胞与培养基间的黏附,负性调节细胞与细胞间的黏附。但在本研究中发现,在前列腺癌病例中,RKIP 的表达与 E-cad 的表达正相关,提示前列腺癌组织中的 RKIP 表达下降,相应的 E-cad 表达下降,导致细胞间的黏附作用减弱,肿瘤细胞容易脱落,从而增强前列腺癌细胞的侵袭转移能力。而造成 E-cad 表达减少的机制可能有以下几种:(1) 基因突变;(2) 启动子甲基化;(3) 转译后的阻断;(4) 转录抑制。目前已证实 E-cad 存在的转录抑制子包括 Snail, E12/E17, ZEB-1 及 SP-1。其中锌指因子 Snail 可以与 E-cad 近端启动子上的 E-box 结合,抑制其表达。Herfs 等<sup>[14]</sup>通过对化生的宫颈上皮组织的研究发现,TGF- $\beta$  可以通过增强转录抑制因子 slug 和 Snail 的活性来减少角质化细胞中 E-cad 的表达。Lan 等<sup>[15]</sup>把有转录活性的 *Raf-1* 基因转染入永生的小鼠肝癌细胞株,发现其 E-cad 蛋白和 mRNA 的表达均显著下调,进一步使用 MAPK, p38 MAPK 和 c-Src 酪氨酸激酶的抑制剂处理上述细胞株后,检测到细胞黏附和紧密连接蛋白的表达增加,表明在永生的小鼠肝癌细胞株中 *Raf-1* 可通过影响 MAPK, p38 MAPK 和 c-Src 酪氨酸激酶所介导的多种信号通路参与 E-cad 表达调节。Janda 等<sup>[16]</sup>使用 TGF- $\beta$  加 4-羟泰米芬 (4-hydroxytamoxifen, 一种 Raf 受体激动剂) 协同刺激乳腺上皮细胞,发现细胞溶胞产物中的 E-cad 下调,其作用机制可能是增强细胞对 E-cad 的内吞作用和细胞溶酶体对 E-cad 的降解,提出 Raf 和 TGF- $\beta$  信号通路的协同作用,导致 E-cad 表达下调。上述实验表明,Raf 和 TGF- $\beta$  参与了对 E-cad 表达的调控,推测 RKIP 可能通过抑制 Raf,影响 TGF- $\beta$  等信号通路而对 E-cad 表达起作用,但其确切调控机制仍有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] Zhang L, Fu Z, Binkley C, et al. Raf kinase inhibitory protein inhibits beta-cell proliferation [J]. *Surgery*, 2004, 136 (3): 708-715.
- [3] 韩海勃, 张志谦, 赵威. RKIP 蛋白在多个人肺癌细胞系中的表达下调 [J]. *基础医学与临床*, 2007, 27 (8): 849-852.

- HAN Haibo, ZHANG Zhiqian, ZHAO Wei. Downregulation of Raf kinase inhibitory protein in human lung cancer cell lines [J]. *Basic Clinical Medicine*, 2007, 27(8):849-852.
- [4] 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.
- [5] Naito A, Iwase H, Kuzushima T, et al. Clinical significance of E-cadherin expression in thyroid neoplasms [J]. *Surg Oncol*, 2001, 76(3):176-180.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Chunthapong J, Seftor E A, Khalkhali-Ellis Z, et al. Dual roles of E-cadherin in prostate cancer invasion [J]. *J Cell Biochem*, 2004;91:649-661.
- [9] 罗勇, 贺大林, 宁亮, 等. 前列腺癌细胞株 LNCaP 和 IA8 中转移性管蛋白的差异表达及意义 [J]. *中华男科学*, 2006, 12(3):230-233.
- LUO Yong, HE Dalin, NING Liang, et al. Expression and significance of metastasis-associated proteins in prostate cancer cell lines with different metastatic potential [J]. *National Journal of Andrology*, 2006, 12(3):230-233.
- [10] Enmon R M, Connor K C, Song H, et al. Aggregation kinetics of well and poorly differentiated human prostate cancer cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 80(5):580-588.
- [11] 谷化平, 尚培中, 周翠铃. CD44v6 和 E-上皮钙黏附素在前列腺癌组织中的表达与癌转移的关系 [J]. *中华男科学*, 2004, 10(1):32-34, 38.
- GU Huaping, SHANG Peizhong, ZHOU Cuiling. Expression of CD44v6 and E-cadherin in prostate carcinoma and metastasis of prostate carcinoma [J]. *National Journal of Andrology*, 2004, 10(1):32-34, 38.
- [12] Kallaakury B V, Sheehan C E, Winn-Deen E, et al. Decreased expression of catenins (alpha and beta), p120 CTN, and E-cadherin in cell adhesion proteins and E-cadherin gene promoter methylation in prostatic adenocarcinomas [J]. *Cancer*, 2001, 92(11):2786-2795.
- [13] Zhu S, McHenry K T, Lane W S, et al. Raf kinase inhibitor protein positively regulates cell-substratum adhesion while negatively regulating cell-cell adhesion [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 103(3):972-985.
- [14] Herfs M, Hubert P, Kholod N, et al. Transforming growth factor-beta1-mediated Slug and Snail transcription factor up-regulation reduces the density of Langerhans cells in epithelial metaplasia by affecting E-cadherin expression [J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(5):1391-1402.
- [15] Lan M, Kojima T, Osanai M, et al. Oncogenic Raf-1 regulates epithelial to mesenchymal transition via distinct signal transduction pathways in an immortalized mouse hepatic cell line [J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(12):2385-2395.
- [16] Janda E, Nevolo M, Lehmann K, et al. Raf plus TGFbeta-dependent EMT is initiated by endocytosis and lysosomal degradation of E-cadherin [J]. *Oncogene*, 2006, 25(54):7117-7130.

(本文编辑 彭敏宁)