

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)06-0571-04

人结肠癌组织中 Raf-1 的表达及其临床意义

张宁宁, 刘文超*, 薛 研 (第四军医大学 西京医院 肿瘤科, 西安 710032)

[摘 要] 目的: 研究 Raf-1 在人结肠癌组织中的表达与肿瘤血管生成的关系, 并探讨它们的临床意义。方法: 应用组织芯片技术和免疫组化法检测来自西京医院病理科 2005 - 2006 年间的 87 例结肠癌病例癌区、癌旁区及切缘区组织标本中 Raf-1 的表达, 应用 CD34 标记的免疫组化法检测微血管密度(microvessel density, MVD); 并分析 Raf-1 表达和 MVD 与结肠癌体积、转移、分化等病理特征之间的相关性。结果: Raf-1 在癌组织、癌旁组织、切缘区组织的阳性率分别为 86.47%、37.34% 和 11.03%, 3 者比较有显著性差异($P < 0.01$)。癌组织、癌旁组织、切缘区组织中 MVD 值分别为(61.35 ± 11.60)、(28.34 ± 6.70)和(8.26 ± 3.70), 3 者有显著性差异($P < 0.01$)。Raf-1 表达和 MVD 与肿瘤大小、转移与否密切相关。结论: Raf-1 是调控人结肠癌组织血管生成的关键分子, 在癌组织中 Raf-1 的表达与 MVD 值成正相关, 两者与临床上肿瘤的大小、转移与否密切相关。

[关键词] Raf-1, 肿瘤血管生成, 组织芯片, 微血管密度, 结肠癌

[中图分类号] R735.3; R730.2

[文献标志码] A

Expression of Raf-1 in colon carcinoma tissue and its clinical significance

ZHANG Ning-ning, LIU Wen-chao*, XUE Yan (Department of Clinical Oncology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] Objective: To investigate the relationship between the expression of Raf-1 and tumor angiogenesis, and to discuss its clinical significance. **Methods:** Tissue microarray technique was used to detect the expression of Raf-1 in 87 specimens of human colon carcinoma, their corresponding adjacent tissues, and incision margins. The patients were from the Department of Pathology of Xijing Hospital between 2005 and 2006. Microvessel density (MVD) was detected using immunohistochemistry with CD34 labeling. The correlation between Raf-1 expression and MVD with the tumor size, metastasis, and differentiation was analyzed. **Results:** The positive rates of Raf-1 in colon carcinoma tissues, adjacent tissues and incision margins were 86.47%, 37.34% and 11.03%, respectively; there were significant difference among the 3 values ($P < 0.01$). The MVD in 3 regions were (61.35 ± 11.6), (28.34 ± 6.7), and (8.26 ± 3.7), respectively; and there was significant difference among the 3 values ($P < 0.01$). **Conclusion:** Raf-1 may play an important role in regulating the angiogenesis of human colon carcinoma. The expression of Raf-1 in the cancer tissues is positively correlated with MVD, and both of them are closely linked with tumor size and metastasis.

[Key words] Raf-1, tumor angiogenesis, tissue microarray, microvessel density, colon carcinoma

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(6): 571-574]

自 1971 年 Folkman^[1]首次提出肿瘤的生长、浸润、转移依赖于肿瘤内新生血管的形成这一观点后, 抗血管生成治疗便成为肿瘤研究领域中的一个热点。新生血管不仅为肿瘤组织提供足够的营养和氧, 还提供大量的生长因子, 促使肿瘤迅速生长。然而, 血管生成是一个复杂的过程, 有诸多分子共同参与。研究表明, Raf-1 可能是调控肿瘤血管生成的一个核心分子, 在内皮细胞生存和血管生成过程中发挥关键性的调节作用^[2]。

组织芯片(tissue microarray)是新近发展的可同时检测数百至上千个样本的高通量检测手段, 可用于 DNA、RNA 或蛋白表达水平的分析。本研究应用

组织芯片技术和免疫组化方法分析 87 例结肠癌及相应癌旁区、切缘区组织中 Raf-1 的表达和 CD34 标记的微血管密度(microvessel density, MVD), 以探讨 Raf-1 与血管生成的关系及其临床意义, 从而为

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30572100, 30672391, 30770823); 陕西省自然科学基金项目(No. 2004C222)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30572100, 30672391, 30770823); the Natural Science Foundation of Shaanxi Province (No. 2004C222)

[作者简介] 张宁宁(1982 -), 女, 山西省晋城市人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤基因治疗方面的研究。

* Corresponding author. E-mail: xjccancer@fmmu.edu.cn

肿瘤抗血管生成基因治疗提供一定的实验依据。

1 材料与方 法

1.1 标本采集和实验试剂

收集第四军医大学西京医院病理科 2005-2006 年经病理学诊断确诊的 87 例结肠癌标本,以及相应的距肿瘤边缘 1 cm 区域的癌旁区组织标本和距肿瘤边缘 5 cm 区域的切缘区组织标本。87 例患者中男性 55 例,女性 32 例,年龄 31 ~ 75 岁,平均年龄为 (65 ± 0.8) 岁。参照临床及病理资料,分别依据肿瘤大小、转移情况及分化程度将病例分组。所有组织标本均用 10% 甲醛固定,石蜡包埋,固定和包埋试剂受西京医院病理科馈赠。

免疫组化所用基础试剂均来自第四军医大学生物化学实验室,Raf-1 单克隆抗体购自 Signal Antidody Technology(SAT) 公司,CD34 单克隆抗体购自 Cell Signaling 公司,生物素 Histostain™-Plus Kits 免疫组化染色试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 组织芯片的制备

复查苏木精伊红染色(H-E)切片,并在玻片及蜡块上标记相关区域,用组织芯片制作机在无组织的空白芯片蜡块上钻孔(直径 0.6 mm),借助玻片上的标记找准蜡块上的相应部位,钻孔采集组织芯。将组织芯转移到空白芯片蜡块的孔中,制成芯片蜡块。

1.3 Raf-1 及 CD34 免疫组织化学染色

石蜡切片常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱蜡至水,用 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)进行抗原热修复 20 ~ 30 min,3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶 10 min, Histostain™-Plus 试剂 A(山羊血清封闭液)室温孵育 10 ~ 15 min,加第一抗体 4 ℃ 孵育过夜; Histostain™-Plus 试剂 B(生物素化二抗)室温孵育 10 ~ 15 min, Histostain™-Plus 试剂 C(辣根过氧化物酶标记的三抗)室温孵育 10 ~ 15 min,以上各步骤间均以 PBS 冲洗 3 次,DAB 显色,苏木精复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。另用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定标准

Raf-1 染色的阳性信号为胞质内出现棕黄色颗粒。取表达最强的部位,按着色程度计分:无着色者为 0 分;浅黄色、略高于背景者为 1 分;棕黄色、明显高于背景者为 2 分;强染、着棕褐色者为 3 分。同时按染色阳性细胞的百分率计分:<5% 为 0 分;6% ~ 25% 为 1 分;26% ~ 50% 为 2 分;51% ~ 75% 为 3 分;>75% 为 4 分。两项计分相加后分为 4 个等级:0 ~ 1 分为阴性(-),2 分为阳性(+),3 ~ 4 分为中

等阳性(++),5 分以上为强阳性(+++)。

CD34 免疫组化染色阳性显示为新生微血管密度(microvessel density, MVD),其判定方法:CD34 染色的组织标本中观察到由内皮细胞或幼稚内皮细胞形成的管状、窄隙状、囊状和空泡状染为黄褐色的结构即判定为可计数的微血管,400 倍光镜下计数全部横切和纵切的微血管数作为 MVD 计数。

1.5 统计学方法

采用 SPSS11.0 软件,对 Raf-1 与 MVD 的结果之间的比较分别采用了 χ^2 检验、秩和检验、Pearson 积差相关系数检验、Spearman 相关检验以及 *t* 检验等方法。

2 结 果

2.1 人结肠癌组织中 Raf-1 的表达

Raf-1 阳性染色位于胞质内,多为弥漫阳性,癌区的染色强度明显高于癌旁区,切缘区表达强度最低(图 1A、B、C)。Raf-1 在癌组织中表达阳性率为 86.21%,癌旁组织中为 33.33%,切缘区组织中为 11.03%,癌区、癌旁区及切缘区之间的差异有显著统计学意义(*P* < 0.01)。结肠癌组织及相应癌旁区、切缘区组织中 Raf-1 的表达和比较见表 1。

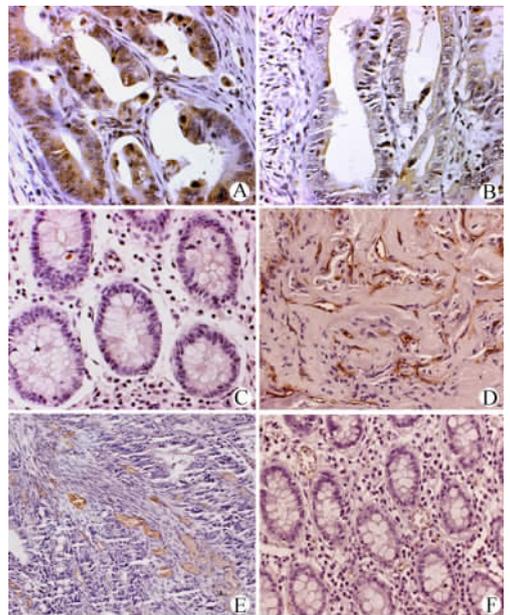


图 1 人结肠癌组织中 Raf-1 的表达及 MVD(×400)

Fig. 1 Expression of Raf-1 and microvessel density in colon carcinoma tissues(×400)

A: Expression of Raf-1 of colon carcinoma tissues; B: Expression of Raf-1 of adjacent tissues to carcinoma; C: Expression of Raf-1 of incision margin tissues; D: MVD of colon carcinoma tissues; E: MVD of adjacent tissues to carcinoma; F: MVD of incision margin tissues

表 1 人结肠癌组织中 Raf-1 的表达

Tab. 1 Expression of Raf-1 in colon carcinoma, adjacent tissues of colon carcinoma and incision margin tissues

Group	Raf-1(n)				P
	-	+	++	+++	
Colon carcinoma	12	21	28	26	
Adjacent tissues	58	13	07	09	<0.01
Incision margin	77	08	02	00	

$P < 0.01$ is for comparison of Raf-1 among colon carcinoma, adjacent tissues and incision margin

2.2 人结肠癌组织中新生血管形成情况

CD34 为内皮细胞表面的特异性分子,因此 CD34 染色位于内皮细胞表面,为弥漫阳性。癌区阳性染色表现为杂乱无章的不规则的微血管网,数目较多;癌旁区较癌区血管形态稍好,数目略少于癌区;切缘区组织血管形态规则,数目明显少于前两者(图 1D、E、F)。结肠癌组织、癌旁组织及切缘区的 MVD 值分别为(61.35 ± 11.6)、(28.34 ± 6.7)、(8.26 ± 3.7),经 t 检验 3 者间差异有统计学意义

($P < 0.01$)。

2.3 结肠癌组织中 Raf-1 的表达与 MVD 的关系

Raf-1 表达阳性率高的结肠癌组织 MVD 值亦较高,Raf-1 表达阴性的结肠癌组织 MVD 值明显较小。在 87 例结肠癌标本中 Raf-1 表达阳性的为 75 例, MVD 平均值为(59.7 ± 8.6);Raf-1 表达阴性的为 12 例, MVD 平均值为(53.8 ± 9.5),经 Pearson 积差相关及 t 检验,Raf-1 表达和 MVD 值呈显著性正相关($P < 0.01$)。

2.4 Raf-1 表达和 MVD 值与结肠癌临床病理特征的关系

比较 Raf-1 的表达与临床病理特征之间的关系发现,Raf-1 的表达与肿瘤大小、转移有关($P < 0.01$),而与分化程度无关。免疫组化检测结肠癌组织中 MVD 水平发现,瘤体 < 3 mm 与 ≥ 3 mm 的组织中 MVD 值分别为(57.5 ± 11.2)和(63.5 ± 12.1), t 检验结果显示两者间差异有统计学意义($P < 0.01$);发生了转移的结肠癌 MVD 值为(60.8 ± 11.3),而未转移的为(55.2 ± 9.6),经 t 检验两者差异有统计学意义($P < 0.05$)。而 MVD 与肿瘤的分化程度也没有关系(表 2)。

表 2 人结肠癌组织中 Raf-1 的表达和 MVD 值与临床病理特征的关系

Tab. 2 Relationship between Raf-1 expression and MVD to clinicopathologic features of colon carcinoma

Index	Case	Raf-1				MVD	P	
		-	+	++	+++			
Tumor size								
≥ 3 mm	26	4	5	8	9	<0.01	62.1 ± 12.1	<0.01
< 3 mm	61	8	16	20	17		57.5 ± 11.2	
Metastasis								
+	24	3	6	7	8	<0.01	61.8 ± 11.3	<0.01
-	63	9	15	21	18		57.7 ± 9.6	
Differentiation								
Well	24	2	8	9	5		58.3 ± 12.5	
Moderate	53	8	20	12	13	>0.05	59.6 ± 9.7	>0.05
Poor	10	1	6	1	2		56.5 ± 10.7	

3 讨论

结直肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一,发病率和病死率均较高。目前已知肿瘤血管生成是肿瘤生态系统中的一个重要因素,参与和影响肿瘤的生物

学行为^[3]。在肿瘤血管形成过程中,有诸多促血管生成因子参与了此过程,其中癌基因 Raf-1 可能是调节肿瘤血管生成的一个关键分子^[4]。如果控制了这诸多分子信号转导过程中的某个关键环节,那么这些分子的促血管生成作用就被阻断了。

Raf-1 是一种丝/苏氨酸激酶,参与促进有丝分裂信号从细胞膜到核的转导,功能活跃。它不但在细胞增殖信号途径中扮演着重要角色,在其他多种细胞信号转导途径的相互作用中亦起着交联点的作用^[5-6],参与肿瘤发生、多药耐药、细胞周期调控及凋亡,同时刺激血管内皮细胞增殖及抗凋亡,在肿瘤新生血管中发挥重要作用。一方面,Raf-1 通过调节血管生成相关分子的表达水平,最终刺激血管生成^[7];另一方面,在 VEGF 和 bFGF 诱导的血管内皮细胞抗凋亡信号传递中,Raf-1 也是一个重要的节点分子,Raf-1 功能丧失可直接诱导血管内皮细胞抗凋亡信号转导^[8]。Mukhopadhyay 等^[9]在缺氧诱导血管生成的研究中,发现负显性的 Raf-1 可明显抑制缺氧诱导的 VEGF 的表达。此外,国外还有研究^[10-11]表明:一种名为 BAY 43-9006 的 Raf 激酶抑制剂可以拮抗多种酪氨酸激酶的受体,如 VEGFR-2、VEGFR-3、PDGFR- β 、Flt-3、c-Kit、p38 α 。这些均说明 Raf-1 是调控肿瘤血管生成的一个关键分子。目前已有研究证明,将 Raf-1 siRNA 转入内皮细胞后可明显抑制内皮细胞的增殖生长^[13]。本研究显示,结肠癌组织中 Raf-1 的表达与 MVD 的表达水平呈显著正相关。提示结肠癌组织中 Raf-1 的高水平表达促进了肿瘤血管的形成。Raf-1 可能是调节肿瘤血管生成过程中的一个关键的节点分子,是 MVD 高水平表达的上游因素。从而为抗肿瘤血管生成基因治疗开辟了一条新途径^[14]。

在比较 Raf-1 的表达与结肠癌临床病理特征的关系中可以发现,Raf-1 的表达与肿瘤大小、转移有关,而与肿瘤的分化无关。Raf-1 可通过调节 VEGF 等促血管生成因子的表达,刺激内皮细胞增殖,并增加血管的通透性,从而有利于肿瘤细胞脱落后进入血管或向邻近纤维结缔组织扩散,为肿瘤的浸润、转移创造条件。因此 Raf-1 的过表达与肿瘤的侵袭和转移有密切关系。

用 CD34 免疫组化法检测结肠癌组织中 MVD 的情况,可以观察到新生微血管呈弥散性分布,而且癌组织的 MVD 值明显比癌旁组织高。此外,对 MVD 与结肠癌临床病理特征关系的分析中,也发现 MVD 与肿瘤的大小及转移有关;而与肿瘤的分化程度无关。提示 MVD 的检测可用于肿瘤患者的预后估计。在临床工作中,此技术已用于判断乳腺癌、结肠直肠癌、卵巢癌、肝癌、前列腺癌和膀胱癌等肿瘤的

预后,如结合计算机图像处理计算微血管的面积,对预测肿瘤的预后更有客观性^[12]。

[参 考 文 献]

- [1] 何小平,朱人敏. 肿瘤血管生成与抗血管生成基因治疗的进展 [J]. 医学研究生学报, 2005, 18(6): 559-563.
- [2] Sridhar SS, Hedley D, Siu LL. Raf kinase as a target for anticancer therapeutics [J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(4): 677-685.
- [3] Eccles SA. Parallels in invasion and angiogenesis provide pivotal points for therapeution [J]. Int J Dev Biol, 2004, 48(5-6): 583-598.
- [4] 薛 妍,毕 锋,刘文超,等. 缺氧状况下 Rho GTPases 的表达和活性变化及其与肿瘤血管生成关系的研究 [J]. 中华肿瘤杂志, 2004, 26(9): 517-520.
- [5] Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, et al. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis [J]. Leukemia, 2004, 18(2): 189-218.
- [6] Eisenmann KM, VanBrocklin MW, Staffend NA, et al. Mitogen-activated protein kinase pathway-dependent tumor-specific survival signaling in melanoma cells through inactivation of the proapoptotic protein bad [J]. Cancer Res, 2003, 63(23): 8330-8337.
- [7] Bokemeyer D, Sorokin A, Dunn MJ. Multiple intracellular MAP kinase signaling cascades [J]. Kidney Int, 1996, 49(5): 1187-1198.
- [8] Alavi A, Hood JD, Frausto R, et al. Role of Raf in vascular protection from distinct apoptotic stimuli [J]. Science, 2003, 301(5629): 94-96.
- [9] Adrian LH. Hypoxia—a key regulatory factor in tumor growth [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(1): 38-47.
- [10] Wilhelm SM, Carter C, Tang L, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis [J]. Cancer Res, 2004, 64(19): 7009-7109.
- [11] Ahmad T, Eisen T. Kinase inhibition with BAY 43-9006 in renal cell carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(18 pt 2): 6388S-6392S.
- [12] Sugawara Y, Makuuchi M, Harihara Y, et al. Tumor angiogenesis in gallbladder carcinoma [J]. Hepatogastroenterology, 1999, 46(27): 1682-1686.
- [13] Culmsee C, Gasser E, Hansen S, et al. Effects of Raf-1 siRNA on human cerebral microvascular endothelial cell: a potential therapeutia strategy for inhibition of tumor angiogenesis [J]. Brain Res, 2006, 1125(1): 147-154.
- [14] Nesbit M. Abrogation of tumor vasculature using gene therapy [J]. Cancer Metastasis Rev, 2000, 19(1-2): 45-49.

[收稿日期] 2007 - 09 - 06

[修回日期] 2007 - 11 - 04

[本文编辑] 郁晓路