

网络出版时间: 2016-6-22 14:44:58 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160622.1444.046.html>

受体相互作用蛋白激酶 1 在食管鳞状细胞癌中的表达及临床意义

崔凯¹, 耿慧武², 姬强², 朱克超¹, 卢晨¹, 夏杰³, 刘晓颖², 于在诚¹

摘要 目的 探讨受体相互作用蛋白激酶 1 (RIP1) 蛋白在食管鳞癌中的表达情况及临床意义。方法 应用 Western blot 法和免疫组织化学法检测并且分析 100 例食管鳞癌患者的癌组织、相应癌旁组织和对应正常黏膜组织中 RIP1 的表达情况。结果 71% 食管鳞癌组织中 RIP1 蛋白的表达水平高于对应癌旁组织和正常黏膜组织, 20% 食管鳞癌癌旁组织 RIP1 蛋白的表达水平高于对应癌组织和正常食管黏膜组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。食管鳞癌组织中高表达的 RIP1 蛋白水平与其 TNM 分期、病理分级、有无淋巴结转移有关 ($P < 0.05$), 与性别、年龄无关。癌旁组织中高表达的 RIP1 蛋白水平与肿瘤浸润深度、TNM 分期有关 ($P < 0.05$), 与性别、年龄、有无淋巴结转移及病理分级无关。结论 RIP1 蛋白在食管鳞癌中的高表达可能与肿瘤的病理分

级、TNM 分期及预后有关, 对于食管鳞癌的发生发展有一定的预测作用。

关键词 食管肿瘤; 鳞状细胞; 免疫组织化学; 受体相互作用蛋白激酶 1

中图分类号 R 735.1; R 341

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)08-1175-05

食管癌是人类常见的恶性肿瘤之一, 其发病率居我国恶性肿瘤的第四位, 食管癌绝大部分是鳞状细胞癌, 原发腺癌较少见。其早期无明显典型症状, 偶有下咽异物感、胸骨后疼痛等。手术是治疗食管癌的首选方法, 但手术切除率仅为 58% ~ 92%, 且术后 5 年生存率仍不到 40%^[1], 食管恶性肿瘤的早期发现与治疗能够大大提高患者的手术切除率和 5 年生存率。受体相互作用蛋白 1 (receptor interacting protein kinase 1) 是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 其可以通过激活 NF- κ B、活化 Caspase-8、参与活性氧的产生等方式, 在细胞凋亡、细胞存活及细胞程序性坏死等信号传导中起关键作用^[2]。另外其功能受泛素化、锌指蛋白等的调节^[3]。目前关于 RIP1 在

2016-04-19 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(编号: 81201368)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院胸外科, 合肥 230022

² 安徽医科大学生命科学院生物学系, 合肥 230032

³ 安徽医科大学第四附属医院急诊外科, 合肥 230011

作者简介: 崔凯, 男, 硕士研究生;

于在诚, 男, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yuzaicheng@vip.sina.com

Arginine stimulation test in evaluating the function of islet β -cell

Sun Jianran, Hui Cancan, Deng Datong, et al

(Dept of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the standard bread meal test and the arginine stimulation test in evaluating beta cell function. **Methods** 118 hospitalized patients with type 2 diabetes were carried out arginine stimulation test and standard bread meal test to evaluate the function of islet β -cell. Moreover, the safety, the efficiency and the clinical value of arginine stimulation test were estimated. **Results** For each time point, there were differences of blood glucose between standard bread meal test and arginine stimulation test ($P < 0.001$). However, the blood glucose changes of arginine stimulation test were lower than those of the standard bread meal test ($P < 0.001$). Insulin area under the curve, mean value, peak value of arginine stimulation test had positive correlation with insulin area under the curve of the standard bread meal test. **Conclusion** The results of arginine stimulation test are consistent with those of standard bread meal test. Furthermore, the arginine stimulation test shows a superiority to assess islet function of type 2 diabetes patients, suggesting it has advantages such as less impact on blood sugar, simpler operation and more safety.

Key words pancreatic β -cell function; standard bread meal test; arginine stimulation test

食管癌发生发展中的作用研究较少。该研究旨在通过检测 100 例食管鳞癌患者的癌组织、相应癌旁及正常食管黏膜组织中 RIP1 的表达情况,分析 RIP1 在食管鳞癌的早期诊断、分化程度及预后中的相关意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集安徽医科大学第一附属医院胸外科 2014 年 10 月~2015 年 7 月手术切除的食管鳞癌标本 100 例,术前均经胃镜活检病理诊断明确,术前均未经放疗、化疗。男 73 例,女 27 例;年龄 36~84(60.34±10.42)岁。手术切除标本后分别于病灶中心、癌旁(距病灶 2 cm 以内)及距病灶 5 cm 外正常食管黏膜切取少许组织两份,一份立即放入 -80℃ 保存,用 Western blot 法检测 RIP1 的表达;另一份立即用 4% 中性甲醛溶液固定,常规脱水、石蜡包埋备用,其余大体标本立即置 10% 福尔马林固定送入病理科,常规石蜡包埋、切片、HE 染色,行病理学诊断。所有病例按《食管癌的国际 TNM 分期标准(2009 年第 7 版)》进行分期。

1.2 主要试剂与仪器 Western IP 细胞裂解液、BCA 定量试剂盒和一抗、二抗稀释液均购自上海碧云天公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、SP9000 通用型免疫组化试剂盒、DAB 染色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;ECL 显色试剂盒购自美国 Pierce 公司;兔抗人 RIP1 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司;Tissue lyser 组织破碎仪购自德国 QIAGEN 公司。

1.3 方法

1.3.1 Western blot 法检测 RIP1 的表达 每个病例的食管癌组织、癌旁组织及相应癌旁正常食管黏膜组织作为自身对照。尽量剪碎组织,加入细胞裂解液,于 Tissue lyser 组织破碎仪上破碎,4℃、14 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,蛋白定量 30 μg,取出相应上清液与等量 2×SDS 上样缓冲液混合,沸水浴 5 min、冰浴 2 min 后进行 SDS-PAGE 电泳 2 h,转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜),100 V 恒压电转 1 h,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 2 h,用含 0.05% Tween-20 的 TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次,RIP1 抗体(1:500,用一抗稀释液稀释)4℃过夜孵育,用 TBST 洗膜后与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:5 000,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液稀释)室温作用 2 h,TBST 洗膜后用 ECL 试剂盒显色,在暗室中用 X 线片曝光并显影和定影,X

线片晾干后扫描(以 GAPDH 作为上样内参照),运用 Image J 和 Graphpad Prism 5.0 软件进行蛋白显影后图像分析,运用 *t* 检验进行数据处理。

1.3.2 免疫组化法检测 RIP1 的表达 采用免疫组化 SP 法,严格按照说明书进行操作:每步用 PBS 工作液洗 3 次,每次 3 min,3% 过氧化氢 20 min 阻断内源性过氧化物酶,非免疫血清作用 20 min,RIP1 一抗 1:200 稀释,4℃孵育过夜;生物素标记的二抗(1:500 稀释)孵育 30 min,链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶孵育 30 min,DAB 显色,然后常规 HE 复染、脱水、封片在显微镜下观察。

1.3.3 免疫组化结果判定 采用光学显微镜观察 RIP1 的表达情况,取高倍视野(×400)进行观察,细胞膜及细胞质呈棕色、棕褐色为阳性表达细胞。取 3 个不同的视野进行观察,计数每个视野下 100 个细胞的染色情况,取平均值。按阳性表达细胞数及染色强度进行评分:阳性表达细胞数(0:阳性细胞数 0~10%,1:阳性细胞数 11%~25%,2:阳性细胞数 26%~50%,3:阳性细胞数 51%~75%,4:阳性细胞数 76%~100%);染色强度(0:无黄染,1:浅黄色,2:深黄色,3:棕褐色)。总分=阳性细胞表达数+染色强度,>4 分者为阳性(+),≤4 分者为阴性(-)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析。运用 *t* 检验进行数据处理。组间差异比较采用 χ^2 检验及 Fisher's 确切概率法。

2 结果

2.1 Western blot 法检测 RIP1 蛋白的表达情况 应用 Western blot 法检测部分病例食管鳞癌患者癌组织与癌旁组织及正常黏膜组织中 RIP1 的表达情况,结果显示 71% 样本中 RIP1 在食管鳞癌组织中的表达高于癌旁组织和正常黏膜组织($P < 0.05$),见图 1。20% 样本中 RIP1 在食管鳞癌患者癌旁组织中的表达高于鳞癌组织和正常黏膜组织($P < 0.05$),见图 2。

2.2 免疫组化法检测 RIP1 蛋白的表达情况 RIP1 阳性染色主要定位于细胞膜和细胞质中,为不均匀的棕黄色颗粒,无规律地散在分布于癌组织中。71% 样本中 RIP1 在食管鳞癌组织中的表达高于癌旁组织和正常黏膜组织,见图 3。20% 样本中 RIP1 在食管鳞癌患者癌旁组织中的表达高于鳞癌组织和正常黏膜组织,见图 4。

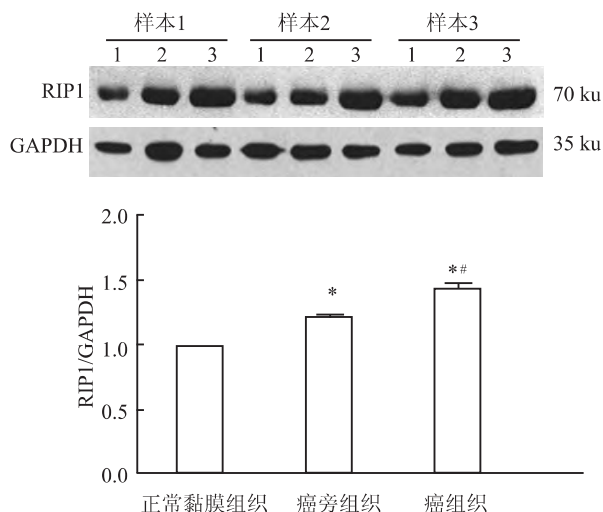


图1 Western blot 法检测 RIP1 蛋白的表达情况

1: 正常黏膜组织; 2: 癌旁组织; 3: 癌组织

与正常黏膜组织比较: * $P < 0.05$; 与癌旁组织比较: # $P < 0.05$

2.3 RIP1 在食管鳞癌中的表达与临床病理指标的关系 100 例食管鳞癌组织中 RIP1 阳性表达且高于癌旁组织及相应正常食管黏膜组织 71 例, 占 71%, 癌旁组织阳性表达且高于癌组织 20 例, 占 20%; 癌组织中高表达的 RIP1 蛋白的表达水平与其 TNM 分期、病理分级、有无淋巴结转移有关 ($P < 0.05$), 与患者的性别、年龄无关, 见表 1。癌旁组织

中高表达的 RIP1 蛋白的表达水平与肿瘤浸润深度、TNM 分期有关 ($P < 0.05$), 与患者的性别、年龄、有无淋巴结转移及病理分级无关, 见表 2。

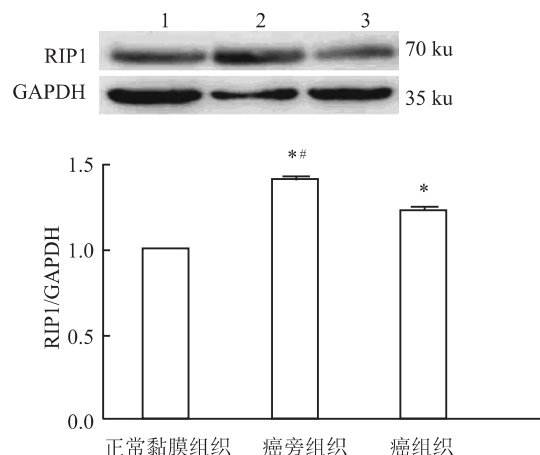


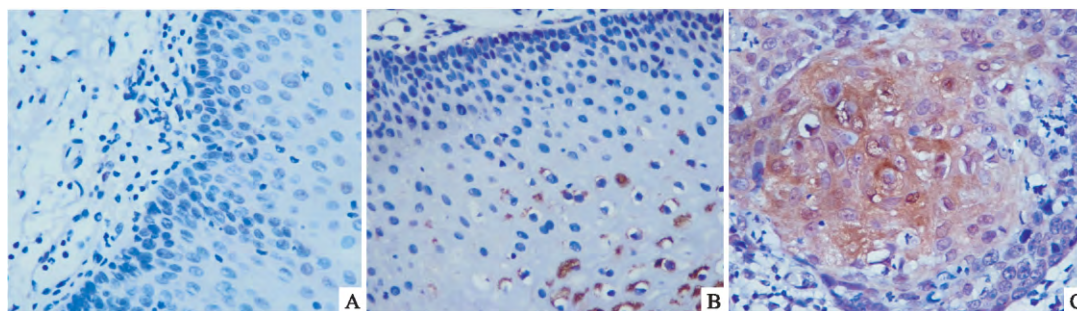
图2 Western blot 法检测 RIP1 蛋白的表达情况

1: 正常黏膜组织; 2: 癌旁组织; 3: 癌组织

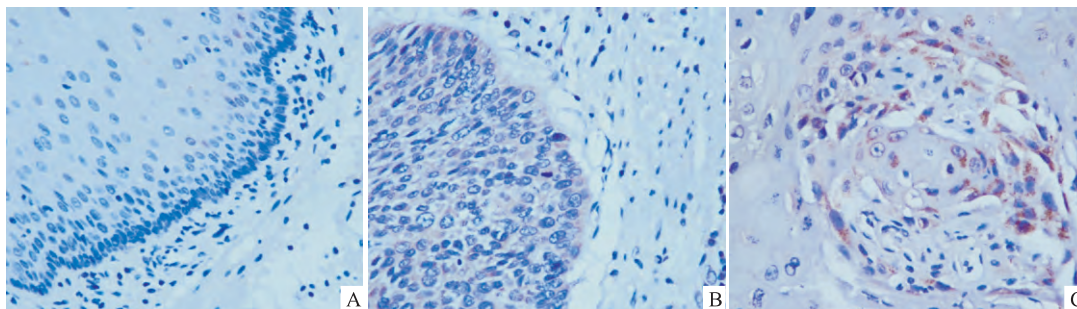
与正常黏膜组织比较: * $P < 0.05$; 与癌旁组织比较: # $P < 0.05$

3 讨论

恶性肿瘤的发生发展与癌细胞的存活增殖密切相关, RIP1 的泛素链的锚定位置决定了其作为一个存活的基础架构或是细胞凋亡信号的功能。赖氨酸 63 连接泛素链的 RIP1 参与调控 NF- κ B 通路^[4] 以此

图3 免疫组化法检测 RIP1 蛋白的表达情况 SP $\times 400$

1: 正常黏膜组织; 2: 癌旁组织; 3: 癌组织

图4 免疫组化法检测 RIP1 蛋白的表达情况 SP $\times 400$

1: 正常黏膜组织; 2: 癌旁组织; 3: 癌组织

表1 癌组织中高表达的 RIP1 与临床病理指标的关系

项目	n	阳性数(n)	阳性率(%)	χ^2 值	P 值
性别				1.299	0.254
男	73	52	71.23		
女	27	19	70.37		
年龄(岁)				1.959	0.162
<60	25	15	60.00		
≥60	75	56	74.67		
分化程度				8.997	0.011
高	43	36	83.72		
中	36	25	69.44		
低	21	10	47.61		
T 分期				10.534	0.001
T1 ~ T2	54	31	57.41		
T3 ~ T4	46	40	86.96		
N 分期				6.947	0.008
N0	45	26	57.78		
N1	55	45	81.82		
TNM 分期				5.275	0.022
I ~ II	51	31	60.78		
III ~ IV	49	40	81.63		

表2 癌旁组织中高表达的 RIP1 与临床病理指标的关系

项目	n	阳性数(n)	阳性率(%)	χ^2 值	P 值
性别				0.114	0.735
男	73	14	19.18		
女	27	6	22.22		
年龄(岁)				1.333	0.248
<60	25	7	28.00		
≥60	75	13	17.33		
分化程度				0.720	0.698
高	43	10	23.26		
中	36	7	19.44		
低	21	3	14.29		
T 分期				4.438	0.035
T1 ~ T2	54	15	27.78		
T3 ~ T4	46	5	10.87		
N 分期				0.253	0.615
N0	45	8	17.78		
N1	55	12	21.82		
TNM 分期				7.307	0.007
I ~ II	51	16	31.38		
III ~ IV	49	4	8.16		

促细胞增殖, RIP1 转变泛素链锚定位置^[8]后可与 FADD 和 Caspase-8 结合形成复合体 II a^[9], 执行细胞凋亡。另外 RIP1 与 RIP3 通过 RHIM 结构域相互作用形成的淀粉样沉积物在执行细胞程序性坏死过程中必不可少^[10]。说明 RIP1 在肿瘤细胞的存活增殖、凋亡及程序性坏死等信号传导中起着中枢调控的作用。

对人类黑色素瘤中 RIP1 的研究^[8]表明沉默 RIP1 可以一定程度抑制黑色素瘤细胞的增殖, 小鼠

动物实验也证实 RIP1 的沉默可以一定程度上延缓肿瘤细胞的生长。另外, 乳腺癌、神经胶质瘤的发生发展与过表达的 RIP1 相关^[9]。刘复兴等^[10]在评估 RIP1 在食管鳞癌的表达状况中, 发现 RIP1 在癌组织的表达显著高于对应正常食管组织, 且其表达水平与肿瘤的分期、分级、有无淋巴结转移、浸润深度呈正相关性。本研究中, 食管癌组织 RIP1 的阳性表达率为 71%, 主要定位于肿瘤细胞的细胞质。中晚期患者癌组织中的表达情况明显高于对应癌旁及正常食管黏膜组织, 提示 RIP1 可能与食管鳞癌 TNM 分期及食管鳞癌细胞增殖有关。这与以往研究结果一致, 提示在食管鳞癌中 RIP1 促进癌细胞增殖。章余妹等^[11]发现在顺氯氨铂(cisplatin)诱导食管癌细胞凋亡过程中, DDP 处理后的食管癌细胞株 RIP1 表达水平增高, 联合 RIP1 特异性抑制剂后, 较敏感的 KYSE510 细胞株凋亡率明显减少, 推测 DDP 可能通过转变 RIP1 上泛素化链锚定位置^[12]进而导致肿瘤细胞程序性凋亡。关于 RIP1 泛素化链锚定位置对食管鳞状癌细胞生存、增殖的影响需进一步研究来证实。

本研究还表明部分病例癌旁组织中 RIP1 的表达水平高于相应癌组织及正常食管黏膜组织, 占早中期病例的 31%。此种情况下, 食管鳞癌癌旁组织中 RIP1 表达水平高于癌组织且与肿瘤 TNM 分期呈负相关性, 推测部分早中期食管鳞癌组织中 RIP1 可以通过形成复合体 II 执行细胞凋亡的方式抑制早期恶性肿瘤细胞的存活增殖。食管鳞癌患者癌旁 RIP1 的表达水平对诊断肿瘤的 TNM 分期有一定参考意义。

另外, 癌旁组织中该蛋白的表达水平与肿瘤病理分级无关, 结合癌组织中该蛋白表达与肿瘤病理分级的关系, 考虑 RIP1 表达水平可能与肿瘤组织的恶性程度相关, 从而能够作为食管鳞癌患者判断预后的一个参考指标。由于 RIP1 具备多个结构域, 在细胞信号转导中的作用更为复杂, 其泛素化、磷酸化等修饰作用异常所导致的结果与食管鳞癌的关系等仍需要进一步的研究。

参考文献

- Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-300.
- Christofferson D E, Li Y, Yuan J. Control of life-or-death decisions by RIP1 kinase. Annu Rev Physiol, 2014, 76: 129-50.
- Ofengeim D, Yuan J. Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15: 643-54.

- Biol,2013,14(11):727–36.
- [4] Jain M V, Paczulla A M, Klonisch T, et al. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development [J]. *J Cell Mol Med*,2013,17(1):12–29.
- [5] Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, et al. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF- κ B signalling by deubiquitination [J]. *Nature*,2003,424(6950):801–5.
- [6] Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. RIP kinases at the crossroads of cell death and survival [J]. *Cell*,2009,138(2):229–32.
- [7] Li J, McQuade T, Siemer A B, et al. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis [J]. *Cell*, 2012, 150(2): 339–50.
- [8] Liu X Y, Lai F, Yan X G, et al. RIP1 kinase is an oncogenic driver in melanoma [J]. *Cancer Res*,2015,75(8):1736–48.
- [9] Habib A A, Chatterjee S, Park S K, et al. The epidermal growth factor receptor engages receptor interacting protein and nuclear factor-kappa B (NF-kappaB)-inducing kinase to activate NF-kappa B. Identification of a novel receptor-tyrosine kinase signalosome [J]. *J Biol Chem*, 2001,276(12):8865–74.
- [10] 刘复兴, 庞洪, 武倩, 等. 受体相互作用蛋白1 RIP1 在食管鳞癌的表达及意义 [J]. *解剖学研究*,2013,35(3):183–5.
- [11] 章余妹, 吴萍, 张林杰, 等. RIP1 增强顺铂诱导食管癌细胞的凋亡 [J]. *安徽医科大学学报*,2015,50(2):172–6.
- [12] Wertz I E, O'Rourke K M, Zhou H, et al. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF- κ B signalling [J]. *Nature*,2004,430(7000):694–9.

Receptor interacting protein kinase 1 expression in esophageal squamous carcinoma and clinical significance

Cui Kai¹, Geng Huiwu², Ji Qiang², et al

(¹*Dept of Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;*

²*Faculty of Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)*

Abstract Objective The investigation of the expression and clinical significance of receptor interacting protein kinase 1 (RIP1) in esophageal squamous cell carcinoma. **Methods** Immunohistochemistry and Western blot analysis were applied to detect and analyze the expression of RIP1 in cancer tissue and the relevant pericarcinomatous tissue, as well as in the corresponding normal esophageal mucosa in 100 cases of ESCC patients. **Results** RIP1 expression levels in 71% of cases were demonstrated to be the highest in cancer tissue, then in pericarcinomatous tissue and normal esophageal mucosa in sequence, with statistical significance ($P < 0.05$). 20% of cases indicated that expression of RIP1 in pericarcinomatous tissue relating to esophageal squamous carcinoma was higher than that in cancer tissue and normal esophageal mucosa orderly ($P < 0.05$). The investigated up-regulated expression of RIP1 in cancer tissue was proved to be relevant with TNM stage, pathologic grade and lymph node metastasis ($P < 0.05$), while it was not associated with sex and age. The up-regulated expression of RIP1 in pericarcinomatous tissue was suggested to be corresponding to invasion depth and TNM stage ($P < 0.05$), but not to sex, age lymph node metastasis or pathological grading. **Conclusion** The up-regulated expression of RIP1 in esophageal squamous carcinoma is supposed to be relevant to pathological grading, TNM stage and prognosis, which also is effective in the genesis and development of esophageal squamous carcinoma.

Key words esophageal neoplasms; squamous cell; immunohistochemistry; receptor interacting protein kinase 1