

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.01.008

结直肠癌中 KAI1/CD82 的表达及其与临床病理的联系

季润元¹, 史恩溢², 王永实¹, 李小宁², 赵玉芳³, 冯振卿⁴

(1. 江苏省淮阴卫生高等职业技术学校淮安市消化道肿瘤重点实验室, 淮安 223300; 2. 江苏省苏州卫生职业技术学院病理教研室, 苏州 215009; 3. 江苏省淮安市肿瘤医院病理科, 淮安 223200; 4. 南京医科大学基础医学院病理学系, 南京 210029)

【摘要】目的:探讨结直肠癌组织中 KAI1/CD82 的表达及其与肿瘤转移的关系。**方法:**应用组织芯片和免疫组织化学技术检测 233 例结直肠癌组织中 KAI1/CD82 的表达。**结果:**KAI1/CD82 在结直肠癌组织中阳性率为 51.5%, 其表达与患者的性别、年龄、浸润深度、淋巴结转移无关, 而与肿瘤的分化程度、Dukes 分期有关 ($P < 0.05$)。二元 Logistic 回归前进法显示: 分化是影响 KAI1/CD82 表达最显著因素 [$\text{Exp}(b) = 0.431, P = 0.038$]。其次是 Dukes 分期 [$\text{Exp}(b) = 0.363, P = 0.043$]。结直肠癌中 KAI1/CD82 在分化低的肿瘤和 Dukes D 期肿瘤表达降低。**结论:**KAI1/CD82 在结直肠癌组织中的表达缺失与肿瘤的分化程度、分期密切相关, 有望成为判断结直肠癌预后的新标志。

【关键词】结直肠癌; KAI1/CD82; 转移; 组织芯片; 免疫组织化学

【中国图书分类法分类号】R735.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-05-05

Expressions of KAI1/CD82 in colorectal carcinoma and their relationship with clinicopathological characteristics

JI Runyuan¹, SHI Enyi², WANG Yongshi¹, LI Xiaoning², ZHAO Yufang³, FENG Zhenqing⁴

(1. Huai'an Key Laboratory of the Tumor of Digestive System, Huaiyin Advanced Vocational and Technical Hygiene School; 2. Department of Pathology, Jiangsu Province Suzhou Health College; 3. Department of Pathology, Cancer Hospital of Huai'an City; 4. Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate expressions of KAI1/CD82 in colorectal carcinoma and their correlation with the metastasis of colorectal carcinoma. **Methods:** Tissue microarray and immunohistochemistry were used to detect expressions of KAI1/CD82 in 233 cases of colorectal carcinoma. **Results:** Positive rate of KAI1/CD82 expression in colorectal carcinoma was 51.5%. Expressions of KAI1/CD82 were not correlated with patients' sex, age, depth of infiltration and lymphnode metastasis, but were correlated with differentiation degrees and Dukes stages ($P < 0.05$). Forward stepwise binary Logistic regression revealed that differentiation was the most significant influencing factor of KAI1/CD82 expression, $\text{Exp}(b) = 0.431, P = 0.038$, followed by Dukes stage, $\text{Exp}(b) = 0.363, P = 0.043$. Expressions of KAI1/CD82 were decreased in colorectal carcinoma with poor differentiation and at Dukes D stage. **Conclusions:** Expressions of KAI1/CD82 are closely correlated with differentiation degrees and stages, which are expected to become a new target for tumor prognosis.

【Key words】colorectal carcinoma; KAI1/CD82; metastasis; tissue microarray; immunohistochemistry

组织芯片 (tissue microarray, TMA) 是生物芯片的一个重要组成部分, 属于新型生物高科技技术。它将几十、几百种不同个体的组织标本按预定序列排列在石蜡等载体上, 进行形态学观察或分子生物学实验, 是一种新型高通量、多样本的研究工具。TMA 技术可与传统的病理形态、组织化学、免疫组织化学、原位杂交、荧光核酸原位杂交及原位 PCR 等技

术相结合, 对特定基因和蛋白质进行定性、半定量的研究。KAI1 基因是 1995 年发现的肿瘤转移抑制基因^[1], 对绝大多数肿瘤的转移起抑制作用, 与肿瘤的侵袭力、预后明显相关。KAI1 编码区编码 267 个氨基酸残基、分子量为 29.6 kD 的蛋白质, 与已发现的 CD82 结构相同。CD82 是一种白细胞表面糖蛋白, 属于跨膜 4 超家族成员^[2]。本研究通过 TMA 技术, 应用免疫组织化学方法, 探讨结直肠癌组织中此蛋白的表达情况及其与临床病理参数之间的关系, 以期对结直肠癌的治疗找到新的分子靶点。

作者介绍: 季润元, Email: christ7777@163.com,

研究方向: TM4SF 与肿瘤的关系。

基金项目: 江苏省卫生厅医学科技发展基金资助项目 (编号: J201116)。

1 材料与方法

1.1 材料

收集江苏省淮安市肿瘤医院 2005–2010 年结直肠癌手术切除标本 233 例。男性 120 例,女性 113 例。结直肠癌的诊断标准按 WHO 肠道肿瘤组织学分型进行,所有样本切片均经组织病理学证实。病理分型均为腺癌,其中高分化 34 例,中分化 155 例,低分化 44 例。Dukes 分期:A 期 10 例、B 期 127 例、C 期 74 例、D 期 22 例。所有患者均无肠癌家族遗传史,术前均未接受过放化疗。

1.2 TMA 构建

所有病例的肿瘤组织标本均经 10% 中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,4 μm 连续切片。依据 HE 切片确定具有代表性的病变部位,应用自有专利技术(专利号 200920350099.2) TMA 构建仪制备 TMA。主要步骤如下:用构建仪在选取的组织蜡块中穿取组织,直径 1.5 mm。应用自有的 TMA 制备系统(包括 TMA 包埋底模、TMA 片胶、TMA 阵列模、一次性加取样针及其配套使用的针芯和针帽、定位冷却器以及植芯器等组成部分)依次按序操作,成功制成含有 233 例结直肠癌的 TMA 蜡块,每个病例均含有 2 个原发灶肿瘤组织。用德国 LEICA 石蜡切片机进行连续切片,厚度为 4 μm 。

1.3 试剂

鼠抗人 KAI1/CD82 购自美国 Santa Cruz 公司,MaxVision 试剂盒、DAB 酶底物显色试剂盒等试剂购自福州迈新公司。

1.4 实验方法

采用 MaxVision 法,KAI1/CD82 工作浓度为 1:50。结直肠癌 TMA 常规脱蜡水化后,1 mmol/L EDTA (pH 8.0) 水浴修复 20 min,加一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,第 2 天切片恢复室温后,加 MaxVision 二抗温箱培育 30 min,DAB 显色,苏木精衬染。以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.5 结果判定

KAI1/CD82 免疫组化阳性产物呈棕褐色颗粒状位于肿瘤细胞膜,以阳性细胞数>25%为阳性(+),肿瘤细胞膜全部不着色或阳性细胞数<25%为阴性(-)。结直肠癌组织 2 个点阵中有 1 个染色阳性即判断为此病例阳性,2 个点阵中无 1 个染色阳性即判断为此病例阴性。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件作统计处理。KAI1/CD82 蛋白的表达与临床病理参数之间的单因素分析采用 χ^2 检验;多因素分析采用二元 Logistic 回归前进法。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧),以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义;4 组进行两两比较时检验水准 $\alpha=0.05/6=0.083\ 3$,即 $P<0.083\ 3$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌 TMA

466 个组织点阵排列整齐,HE、免疫组化染色均匀,无掉

片、脱片、扭曲和重叠现象。233 例结直肠癌中 120 例阳性(图 1),阳性率为 51.5%。

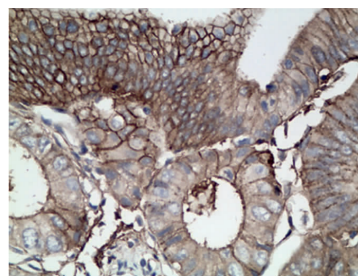


图 1 KAI1/CD82 在结直肠癌中阳性表达 (MaxVision, 100 $\times$)

Fig.1 Positive expressions of KAI1/CD82 in colorectal carcinoma (MaxVision, 100 $\times$)

2.2 单因素分析(表 1)

KAI1/CD82 的表达与肿瘤的分化程度有关($\chi^2=8.958$, $P=0.011$)。KAI1/CD82 在结直肠癌中的表达在高、中、低分化组中呈递减趋势(高、中分化 vs. 低分化, $\chi^2=4.977$, $P=0.026$; 高分化 vs. 中、低分化, $\chi^2=5.806$, $P=0.016$)。

表 1 KAI1/CD82 在结直肠癌组织中的表达与临床病理特征的关系

Tab.1 Relationships between expressions of KAI1/CD82 and their clinicopathological characteristics in colorectal carcinoma

临床病理特征	例数 (n)	阳性 (%)	χ^2 值	P 值
结直肠癌	233	120(51.5)		
性别			0.003	0.959
男	120	62(49.2)		
女	113	58(51.8)		
年龄(岁)			0.252	0.616
<60	91	45(49.5)		
≥ 60	142	75(51.0)		
分化程度			8.997	0.011
高	34	24(70.6)	4.977(高、中分化 vs. 低分化)	0.026
中	155	80(51.6)	5.806(高分化 vs. 中、低分化)	0.016
低	44	16(36.4)		
浸润深度			0.650	0.420
浆膜内	57	32(56.1)		
浆膜外	176	88(50.0)		
Dukes分期			12.711	0.005
A	10	8(80.0)	3.98(Dukes 分期 A 期 vs. B 期)	0.046
B	127	60(47.2)	4.17(Dukes 分期 B 期 vs. C 期)	0.041
C	74	46(62.2)	8.31(Dukes 分期 C 期 vs. D 期)	0.004
D	22	6(27.3)		
淋巴结转移				
无	137	68(49.3)	0.464	0.496
有	96	52(52.1)		

KAI1/CD82 的表达与肿瘤的 Dukes 分期有关 ($\chi^2=13.931$, $P=0.003$)。如果以 $\alpha=0.05$ 作为检验标准, Dukes A 期 KAI1/CD82 的阳性表达率高于 B 期 ($\chi^2=3.98$, $P=0.046<0.05$); Dukes B 期 KAI1/CD82 的阳性表达率低于 C 期 ($\chi^2=4.17$, $P=0.041$); Dukes C 期 KAI1/CD82 的阳性表达率高于 D 期 ($\chi^2=8.31$, $P=0.0039$)。可能存在复杂的双向变化; Dukes B 期的阳性表达率低于 A 期可能是肿瘤发生后 KAI1/CD82 的表达下调; Dukes C 期的阳性表达率高于 B 期可以认为是肿瘤发生淋巴结转移时人体的抵抗性表达增高; Dukes D 期的阳性表达率低于 C 期可能是发生淋巴结转移后人体不能对抗淋巴结转移的趋势 KAI1/CD82 的表达下调。考虑这是 4 组等级资料, 两两比较需降低检验水准, 设定 $\alpha=0.05/6=0.00833$ 作为检验标准, 不能证明 Dukes A 期 KAI1/CD82 的阳性表达率与 B 期有差异 ($\chi^2=3.98$, $P=0.046>0.00833$); 不能证明 Dukes B 期 KAI1/CD82 的阳性表达率与 C 期有差异 ($\chi^2=4.17$, $P=0.041>0.00833$); Dukes C 期 KAI1/CD82 的阳性表达率高于 D 期 ($\chi^2=8.31$, $P=0.0039<0.00833$)。Dukes A 期和 Dukes B 期之间、Dukes B 期和 Dukes C 期之间均无差异, 但肿瘤进展到 Dukes D 期时表达下调。

KAI1/CD82 的表达与患者的年龄、性别、浸润深度、淋巴结转移均无关 ($P>0.05$)。

2.3 多因素分析(表 2)

将年龄小于 60 岁、男性、高分化、淋巴结无转移、Dukes 分期 ABC 期赋值“0”, 年龄大于 60 岁、女性、中低分化、淋巴结有转移、Dukes 分期 D 期赋值“1”进行二元 Logistic 回归前进法分析。结果表明只有分化、Dukes 分期和 KAI1/CD82 表达显著相关。进入方程的变量有分化和 Dukes 分期, 其对应的 Exp(B) 分别为: 0.431 ($P<0.05$) 和 0.363 ($P<0.05$), 分化是影响 KAI1/CD82 表达的最显著因素, 其次是 Dukes 分期。分化低的肿瘤 KAI1/CD82 表达降低, Dukes 分期 D 期肿瘤 KAI1/CD82 表达降低。

3 讨 论

KAI1/CD82 在其抑制肿瘤转移作用发现之前, 是作为一种白细胞膜糖蛋白被认识的。Dong 等^[3]将 KAI1 cDNA 转染高转移的鼠黑色素瘤细胞系, 结果发现表达 KAI1 的克隆吞噬能力及侵袭能力均下降, 而且这些改变均呈剂量效应关系。表达 KAI1 的

克隆细胞在裸鼠肺内形成的转移克隆数也较亲代明显减少。这些都说明 KAI1/CD82 具有直接的抑制肿瘤转移作用。KAI1/CD82 的表达缺失或下调已经在多种恶性肿瘤中发现, 如肺癌^[2]、胃癌^[4]、胰腺癌^[5]、乳腺癌^[6]、膀胱癌^[7]等。本研究发现, KAI1/CD82 在低分化结直肠癌组织中的表达显著低于高分化癌组织, 说明分化越差的结直肠癌细胞, KAI1/CD82 表达缺失的越多。在 Dukes A、B、C、D 期癌组织中 KAI1/CD82 的表达变化复杂。一种可能是存在复杂的双向变化(两两比较以 $\alpha=0.05$ 作为检验标准); Dukes B 期的阳性表达率低于 A 期可能是肿瘤发生后 KAI1/CD82 的表达下调; Dukes C 期的阳性表达率高于 B 期可以认为是肿瘤发生淋巴结转移时人体的抵抗性表达增高; Dukes D 期的阳性表达率低于 C 期可能是发生淋巴结转移后人体不能对抗淋巴结转移的趋势, KAI1/CD82 的表达下调。这样的双向表达本研究^[8]和 Uchida 等^[9]在食管癌的 KAI1/CD82 的表达中得出过相似结论。但不同的是食管癌的研究中本研究发现食管癌发生时表达增高, 淋巴结转移时表达下调。另一种可能是(两两比较降低检验水准, 以 $\alpha=0.00833$ 作为检验标准); Dukes A 期和 Dukes B 期之间、Dukes B 期和 Dukes C 期之间均无差异, 但肿瘤进展到 Dukes D 期时表达下调。如果要得到精确结论, 可以考虑扩大样本数量, 进行研究。

本研究显示结直肠癌中 KAI1/CD82 的表达与患者的性别、年龄、肿瘤浸润深度、淋巴结转移均无关。其中, 研究结果所显示的结直肠癌中 KAI1/CD82 的表达与淋巴结转移无关, 是一个不同于国内外绝大部分研究的结论。Guo 等^[10]和李珊珊等^[11]分别用 Northern blot 及原位杂交法得出了 KAI1/CD82 的表达与转移无关的结论。除此外, 国内外的研究均认为 KAI1/CD82 是肿瘤转移的抑制基因, 肿瘤发生淋巴结转移时表达下调^[12]。作者以前在食管癌^[8]和胃癌^[12]中的研究, 也认为 KAI1/CD82 是肿瘤转移的抑制基因。本研究尝试用 KAI1/CD82 表达阳性细胞数不同百分比作为分组标准, 均得出相同的结论, KAI1/

表 2 二元 Logistic 回归方程中的变量

Tab.2 Variables in equation of binary Logistic regression

	<i>b</i>	SE(<i>b</i>)	Wald χ^2	<i>df</i>	<i>P</i> 值	Exp(<i>b</i>)	Exp(<i>b</i>) 的 95% CI	
							下限	上限
分化程度	-0.842	0.405	4.311	1	0.038	0.431	0.195	0.954
步骤 2 Dukes	-1.015	0.502	4.090	1	0.043	0.363	0.136	0.969
常量	1.717	0.768	5.003	1	0.025	5.568		

CD82 的表达与淋巴结转移无关。但本研究所显示 Dukes 分期不同阶段 KAI1/CD82 表达的复杂变化结合其他学者的研究使作者有理由相信, KAI1/CD82 是结直肠癌的转移抑制基因, 只是抑制的方式、时机变化复杂。Dukes A、B 期和 Dukes C、D 期比较同样没有差别, 是因为结直肠癌进展过程中复杂的双向变化互相抵消的结果。但 Dukes D 期癌组织中 KAI1/CD82 的表达低于 Dukes A、B、C 期癌组织, 因此可以认为, 当结直肠癌进展到 Dukes D 期才出现 KAI1/CD82 的表达明显下调。本研究样本数量较大、实验判断精确, 为什么会得出这样与其它实验不同的结论, 值得进一步探讨。

根据 Logistic 回归前进法得出的结果, 分化是影响 KAI1/CD82 表达的最显著因素, 其次是 Dukes 分期。分化低的肿瘤 KAI1/CD82 表达降低, Dukes D 期肿瘤 KAI1/CD82 表达降低。结合单因素分析结果, 结直肠癌在进展、转移过程中 KAI1/CD82 表达变化复杂, 晚期肿瘤 KAI1/CD82 表达降低。

TMA 以其高通量、大样本、实验条件一致以及快速的优点, 在肿瘤研究中应用渐趋广泛。本研究使用自主研发的技术制备了结直肠癌 TMA, 实验结果稳定可靠。KAI1/CD82 与肿瘤关系的研究, 国外已有不少研究; 国内对 KAI1/CD82 在膀胱癌、肺癌、肝癌、食管癌等多种恶性肿瘤中的表达研究也有文献报道, 但国内外均未见到有关 KAI1/CD82 在大样本结直肠癌中表达的研究报道。本研究与其他恶性肿瘤的研究结果有相似之处, 也有不同之处。KAI1/CD82 抑制肿瘤细胞转移的功能已经在多种肿瘤中得到证实, 但本研究结论出人意料。对 KAI1/CD82 与肿瘤相关性的深入研究, 将有助于进一步揭示肿瘤的浸润和转移机制, 找到抑制肿瘤转移的靶点或预测肿瘤患者预后的指标。

参 考 文 献

- [1] Jackson P, Marreiros A, Russell P J. KAI1 tetraspanin and metastasis suppressor[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(3): 530-534.
- [2] Malik F A, Sanders A J, Jiang W G, et al. KAI-1/CD82, the molecule and clinical implication in cancer and cancer metastasis[J]. Histol Histopathol, 2009, 24(4): 519-530.
- [3] Dong J T, Lamb P W, Rinker-Schaeffer C W, et al. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2[J]. Science, 1995, 268(5212): 884-886.
- [4] Chen Z, Gu S, Trojanowicz B, et al. Down-regulation of TM4SF is associated with the metastatic potential of gastric carcinoma TM4SF members in gastric carcinoma[J]. World J Surg Oncol, 2011, 9: 43-51.
- [5] Xu J H, Guo X Z, Ren L N, et al. KAI1 is a potential target for anti-metastasis in pancreatic cancer cells[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(7): 1126-1132.
- [6] Malik F A, Sanders A J, Jones A D, et al. Transcriptional and translational modulation of KAI1 expression in ductal carcinoma of the breast and the prognostic significance[J]. Int J Mol Med, 2009, 23(2): 273-278.
- [7] Jackson P, Rowe A, Grimm M O, et al. An alternatively spliced KAI1 mRNA is expressed at low levels in human bladder cancers and bladder cancer cell lines and is not associated with invasive behavior[J]. J Oncol Rep, 2007, 18(6): 1357-1363.
- [8] 季润元, 束晓明, 张徐宁, 等. 食管癌组织 KAI1/CD82、MRP1/CD9 的表达及其病理临床联系[J]. 江苏医药, 2010, 36(13): 1498-1501.
- [9] Ji R Y, Shu X M, Zhang X N, et al. The expressions of KAI1/CD82、MRP1/CD9 in esophageal cancer tissues and their pathologic clinical correlation[J]. Jiangsu Medical Journal, 2010, 36(13): 1498-1501.
- [10] Uchida S, Shimada Y, Watanabe G, et al. Motility-related protein (MRP-1/CD9) and KAI1/CD82 expression inversely correlate with lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Br J Cancer, 1999, 79(7-8): 1168-1173.
- [11] Guo X Z, Friess H, Maurer C, et al. KAI1 is unchanged in metastatic and nonmetastatic esophageal and gastric cancer[J]. Cancer Res, 1998, 58: 753.
- [12] 李珊珊, 方伟岗, 晏梅, 等. 转移性和非转移性食管癌组织中 KAI1 基因的表达[J]. 河南医科大学学报, 2000, 35(2): 103-104.
- [13] Li S S, Fang W G, Yan M, et al. Expressions of KAI1 gene in metastatic and nonmetastatic esophageal cancer tissues[J]. Journal of Henan Medical University, 2000, 35(2): 103-104.
- [14] 赵玉芳, 季润元, 束晓明, 等. 胃癌 KAI1/CD82、Ki67 的表达与其临床病理特征的关系[J]. 江苏医药, 2011, 37(18): 2192-2193.
- [15] Zhao Y F, Ji R Y, Shu X M, et al. The expression of KAI1/CD82、Ki67 and its clinicopathological significance in gastric cancer[J]. Jiangsu Medical Journal, 2011, 37(18): 2192-2193.

(责任编辑: 冉明会)