

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.11.010

KAI1 和 Smad4 在非小细胞肺癌的表达及临床病理意义

吕 铮¹, 阎继东¹, 张志勇², 周海英¹, 吴晨鹏²

(唐山市工人医院 1. 胸外科; 2. 病理科, 唐山 063000)

【摘要】目的: 研究 KAI1 和 Smad4 蛋白在非小细胞癌(Non-small cell lung carcinoma, NSCLC)组织中的表达及其相关性, 探讨其临床病理意义和作用。方法: 应用免疫组织化学 SP 法检测 150 例 NSCLC 组织及 60 例对应的正常肺组织中 KAI1 和 Smad4 蛋白的表达, 并与临床病理特征及预后进行分析, 观察其表达差别及相关性。结果: KAI1 和 Smad4 蛋白在 NSCLC 中表达的阳性率分别为 26% 和 29.33%, 在正常肺组织中的阳性率分别为 66.67% 和 75%, 差异有统计学意义 ($P < 0.000 1$)。在 NSCLC 中 KAI1 蛋白在淋巴结转移、临床分期晚的肿瘤中低表达 ($P < 0.000 1$); Smad4 蛋白在分化差、淋巴结转移、胸膜侵犯及临床分期晚的肿瘤中低表达 ($P < 0.000 1$)。但 KAI1 和 Smad4 无相关性 ($P > 0.05$)。KAI1 和 Smad4 蛋白低表达的病人生存期较短 ($P < 0.05$)。结论: KAI1 和 Smad4 蛋白在 NSCLC 中表达减少, 可能参与肿瘤的发生及发展。术后检测 KAI1 和 Smad4 蛋白可能对判断预后有一定价值。

【关键词】非小细胞肺癌; 免疫组织化学; KAI1; Smad4; 预后

【中国图书分类法分类号】R734.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-03-07

Expression and clinical pathological significance of KAI1 and Smad4 protein in non-small cell lung carcinoma

LV Zheng¹, YAN Jidong¹, ZHANG Zhiyong², ZHOU Haiying¹, WU Chenpeng²

(1. Department of Thoracic Surgery; 2. Department of Pathology, Tangshan Gongren Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the expressions and correlations of KAI1 and Smad4 protein in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) and to study their pathological significance and function in NSCLC. **Methods:** Totally 150 cases of NSCLC were chosen as experimental group and 60 cases of normal lung tissues as control group. The expressions of KAI1 and Smad4 protein were examined by immunohistochemistry and were analyzed along with their clinical pathological characteristics and prognosis of NSCLC in order to observe the differences in expressions and correlations among them. **Results:** The expressions of KAI1 and Smad4 were lower in experimental group than in control group ($P < 0.000 1$). The expressions of KAI1 and Smad4 were correlated with differentiation, lymph node metastasis, pleural invasion and clinical stage ($P < 0.000 1$). The expressions of KAI1 and Smad4 were correlated with prognosis of NSCLC ($P < 0.000 1$). **Conclusions:** The lower expressions of KAI1 and Smad4 can promote the occurrence and development of NSCLC. The combined detection of KAI1 and Smad4 protein postoperatively might be helpful to predict the prognosis of NSCLC.

【Key words】non-small cell lung carcinoma; immunohistochemistry; KAI1; Smad4; prognosis

KAI1 是肿瘤转移抑制基因, 属于跨膜超家族的成员, 对肿瘤的运动、转移和增生有明显的影响^[1]。DPC4 基因及其编码产物称为 Smad4^[2]; KAI1 和 Smad4 蛋白在肿瘤中的异常表达对肿瘤的进展均具有促进作用。本实验应用免疫组织化学方法检测非小细胞肺癌(Non-small cell lung carcinoma, NSCLC)

组织中 KAI1 和 Smad4 蛋白的表达, 分析其表达相关性及其临床病理意义, 以期为研究 NSCLC 的发生发展提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 材料

收集唐山市工人医院胸外科 2002 年 1 月-2004 年 12 月 NSCLC 的手术患者作为实验组。病例纳入标准均符合 WHO 分类中 NSCLC 的诊断标准, 并由病理科专业技术人员再次明确诊断。本组共收集 150 例, 其中男性 85 例, 女性 65

作者介绍: 吕 铮(1975-), 男, 主治医师, 硕士,

研究方向: 呼吸系统肿瘤的临床治疗与基础研究。

通信作者: 张志勇, 女, 教授, Email: zhiyongzhang1@hotmail.com。

基金项目: 唐山市科学研究与发展指导计划资助项目(编号: 09130248a)。

例,年龄为 37~74 岁,平均(55.2±7.1)岁。病理类型:鳞状细胞癌 99 例,腺癌 51 例。本组无淋巴结转移的为 76 例,有淋巴结转移的为 74 例。选取 60 例距肿瘤 10 cm 以上的癌旁正常肺组织作为对照组。实验组与对照组病例在性别构成、年龄等常规指标的比较中,差异无统计学意义,具有可比性(表1)。

1.2 主要试剂及免疫组化

一抗兔抗 KAI1 和 Smad4 抗体的浓缩液均购自武汉博士德生物技术有限公司。抗体的稀释及配比均进行预实验,稀释度为 1:50。二抗 SP(鼠/兔)试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司。应用 SP 法进行,操作严格按说明书进行操作,严格质控。主要步骤:①常规脱蜡水化后,用柠檬酸缓冲液高温高压抗原修复及 EDTA 抗原热修复。②滴加过氧化物阻断溶液,以阻断内源性过氧化物酶的活性。③滴加非免疫性动物血清阻断非特异性反应。④滴加第一抗体 KAI1 或 Smad4 蛋白,4℃过夜。⑤滴加生物素标记的第二抗体。⑥滴加链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液。⑦滴加新鲜配制的 DAB 溶液,显微镜下观察 3~10 min,阳性显色为棕色,以上各步之间均用 PBS 浸洗 3 次,每次 5 min。⑧自来水冲洗终止染色,苏木素复染,0.1%盐酸分化,PBS 冲洗返蓝。切片经梯度酒精脱水干燥,中性树胶封固。

1.3 结果判定

Smad4 蛋白以定位于细胞浆或细胞核内为阳性表达,

KAI1 蛋白以定位于细胞膜或细胞浆为阳性表达。每个切片于高倍镜下随机取 5 个不重复视野计数,计数所有的细胞,表达强度按阳性细胞所占百分比进行判断,取其平均值,以阳性细胞所占百分比分为阳性与阴性,阳性细胞<5%为阴性,阳性细胞数≥5%为阳性。

1.4 统计学方法

应用 SAS 6.12 统计软件进行统计分析,计数资料采用 χ^2 检验,相关分析采用 Spearman 秩相关,生存分析应用单变量 Logrank 检验,并进行线性相关性分析,均以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 KAI1 和 Smad4 蛋白在 NSCLC 与正常肺组织中的表达比较

KAI1 和 Smad4 蛋白在 NSCLC 中表达的阳性率分别为 26%和 29.33%,在正常肺组织中的阳性率分别为 66.67%和 75%,差异有统计学意义($P<0.000 1$,表 2,图 1、2)。

2.2 KAI1 和 Smad4 蛋白的表达与 NSCLC 临床病理特征的关系

KAI1 在淋巴结转移组的表达阳性率 9.46%,明显低于无淋巴结转移组 42.11%,在 I+II 期的阳性表达率 41.89%,明显高于 III+IV 期 10.53%(均 $P<0.000 1$,表 3)。而与肿瘤的分

表 1 性别与年龄构成在对照组与实验组中的比较

Tab.1 Comparison of gender and age between control group and experiment group

组别	例数(n)	性别		χ^2 值	P 值	年龄(岁)		χ^2 值	P 值
		男	女			≥50	<50		
对照组	60	34(56.7%)	26(43.3%)	0.008	0.93	38(63.3%)	22(36.7%)	0.306	0.58
实验组	150	84(56.2%)	66(43.8%)			101(67.3%)	49(32.7%)		

表 2 KAI1 和 Smad4 蛋白在对照组与实验组中的表达

Tab.2 Expressions of KAI1 and Smad4 protein in control group and experiment group

组别	例(n)	KAI1		χ^2 值	P 值	Smad4		χ^2 值	P 值
		+	-			+	-		
对照组	60	39(26.00%)	111(74.00%)	30.20	<0.000 1	44(29.33%)	106(70.67%)	36.60	<0.000 1
实验组	150	40(66.67%)	20(33.33%)			45(75.00%)	15(25.00%)		

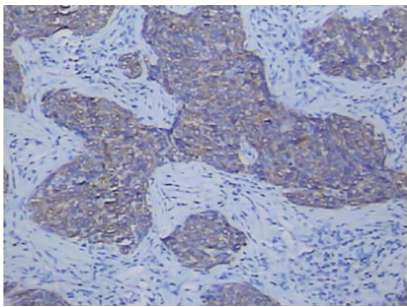


图 1 KAI1 在肺 NSCLC 组织中的表达 (IHC,200×)
Fig.1 Expressions of KAI1 in NSCLC (IHC,200×)

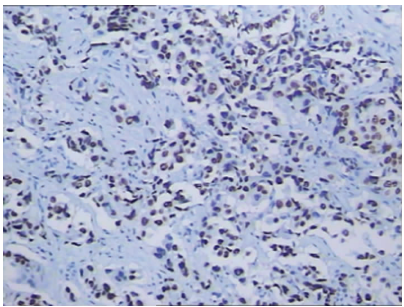


图 2 Smad4 在肺 NSCLC 组织中的表达 (IHC,200×)
Fig.2 Expressions of Smad4 in NSCLC (IHC,200×)

化程度、胸膜是否受侵犯无关 ($P>0.05$); Smad4 表达阳性率在分化好、无淋巴结转移、无胸膜侵犯及临床分期早的肿瘤明显高于分化差、淋巴结转移、胸膜受侵、临床分期晚的肿瘤 (37.23% vs. 16.07%, 42.11% vs. 16.22%, 36.54% vs. 13.04%, 43.24% vs. 15.79%, 均 $P<0.0001$, 表 3)。

2.3 NSCLC 中 KAI1 和 Smad4 蛋白表达的相关分析

经 Spearman 秩相关分析显示, NSCLC 中 Smad4 与 KAI1 蛋白表达未见明显的相关性 ($r_s=-0.007$, $P>0.05$)。

2.4 KAI1 和 Smad4 蛋白的表达与 NSCLC 患者生存期的关系

本患者随访时间为 8~70 个月, 150 例术后生存 3 年以上者 87 例, 占 58%。KAI1 阳性患者生存 3 年以上者为 30 例, 占 76.92%, KAI1 阴性患者生存 3 年以上者为 57 例, 占 51.35%。Smad4 阳性患者生存 3 年以上者为 35 例, 占 79.55%, Smad4 阴性患者生存 3 年以上者为 52 例, 占 49.06%。经检验, NSCLC 中 KAI1 ($\chi^2=10.0142$, $P=0.0075$) 和 Smad4 ($\chi^2=18.5544$, $P<0.0001$) 蛋白表达与患者预后相关。即 KAI1 和 Smad4 蛋白低表达的患者生存期短, 如图 3、4 所示。

3 讨论

KAI1 作为一种抑癌基因, 首先发现于前列腺癌细胞, 因此将其命名为前列腺癌转移抑制基因^[3]。KAI1 在细胞粘附、运动、信号转导、免疫等方面均具有重要的生物学功能^[4], KAI1 基因的异常表达使 KAI1 正常功能减弱或丧失, 引起癌细胞粘附力减弱、移动性增强、细胞分化降低, 从而侵袭性加强, 并容易发生淋巴道转移和血道播散^[5,6]。Smad4 也是一种抑癌基因, 是 TGF- β 1 信号转导通路的中心分子。TGF- β 1 作为配体与跨膜受体结合之后可激活其下游的 Smad2、Smad3 蛋白, 二者必须与 Smad4 结合形成 Smad 复合物才能转入细胞核发挥抑癌效应, 在此过程中 Smad4 起着瓶颈作用。Smad4 突变或表达异常引起的 TGF- β 信号减弱或转导中断, 可

表 3 KAI1 和 Smad4 蛋白的表达与 NSCLC 临床病理特征的关系

Tab.3 Correlation between the expression of KAI1, Smad4 protein and the prognosis of NSCLC

临床病理变量	例数 (n)	KAI1		χ^2 值	P 值	Smad4		χ^2 值	P 值
		+	-			+	-		
分化程度									
高 + 中	94	40 (42.60%)	54 (57.40%)	1.710	0.1910	35 (37.23%)	59 (92.77%)	7.58	0.0059
低	56	30 (53.60%)	26 (46.40%)			9 (16.07%)	47 (83.93%)		
淋巴结转移									
无	76	32 (42.11%)	44 (57.89%)	20.770	<0.0001	32 (42.11%)	44 (57.89%)	12.12	0.0005
有	74	7 (9.46%)	67 (90.54%)			12 (16.22%)	62 (83.78%)		
胸膜侵犯									
无	104	44 (42.30%)	60 (57.70%)	2.589	0.1080	38 (36.54%)	66 (63.46%)	8.49	0.0036
有	46	26 (56.5%)	20 (43.50%)			6 (13.04%)	40 (86.96%)		
临床分期									
I + II	74	31 (41.89%)	43 (58.11%)	19.170	<0.0001	32 (43.24%)	42 (56.76%)	13.63	0.0002
III + IV	76	8 (10.53%)	68 (89.47%)			12 (15.79%)	64 (84.21%)		

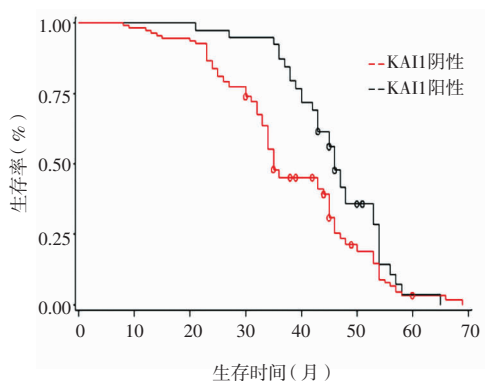


图 3 KAI1 蛋白的表达与 NSCLC 预后的相关性

Fig.3 Correlation between the expression of KAI1 protein and the prognosis of NSCLC

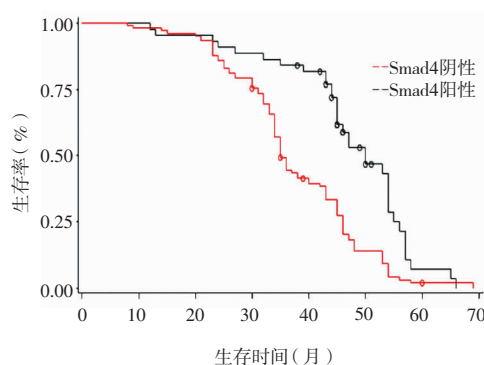


图 4 Smad4 蛋白的表达与 NSCLC 预后的相关性

Fig.4 Correlation between the expression of Smad4 protein and the prognosis of NSCLC

导致某些肿瘤细胞对 TGF- β 的生长抑制作用逃逸,最终导致一些肿瘤的发生^[7]。目前,KAI1 与 Smad4 的抑癌作用已在乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、喉癌^[8]等多种恶性肿瘤中证得到实。

本实验通过免疫组织化学方法检测 KAI1 和 Smad4 蛋白在 NSCLC 中的表达,发现肿瘤中 KAI1 和 Smad4 蛋白的表达均低于正常组织,提示 KAI1 和 Smad4 蛋白参与了 NSCLC 的发生发展。实验结果显示 NSCLC 中 KAI1 和 Smad4 蛋白的表达与肿瘤的分化程度、淋巴结转移、胸膜侵犯及临床分期密切相关,提示 KAI1 和 Smad4 蛋白参与了 NSCLC 的发展及转移,由于分化程度、淋巴结转移、胸膜侵犯及临床分期均为与患者预后密切相关的因素,因此联合检测 KAI1 和 Smad4 的表达提示预后不良,生存分析的结果直接证实了此结果,即 KAI1 和 Smad4 低表达患者的生存时间短,此结果对判断 NSCLC 的预后及指导治疗有重要帮助。秩相关分析显示 KAI1 和 Smad4 无相关性,即二者作用机制及作用过程不在同一通路上。黎传奎等^[9]研究 KAI1 蛋白在 NSCLC 中的表达也得出了类似结论。Higashiyama 等^[10]通过免疫组织化学方法得出结论,KAI1 基因在肺癌发生早期高表达,而在肺癌进展期或发生转移时呈低表达。Ke 等^[11]研究发现 Smad4 在 NSCLC 组织中表达高于正常组织,且同淋巴转移密切相关,另外 Smad4 还可以抑制血管内皮生长因子、凝血酶敏感蛋白 1 的表达,表明 Smad4 可能通过抑制血管的生成来抑制肿瘤转移。Wu 等^[12]研究表明 KAI1 低表达的患者 5 年生存率明显提高,可作为独立的预后因子。Tong 等^[13]在对 NSCLC 的研究中认为 Smad4 不仅在癌组织中高表达,而且同病人的分期、预后密切相关。综上所述,联合检测 KAI1 和 Smad4 对判断 NSCLC 的预后及指导治疗有重要帮助。

总之,KAI1 和 Smad4 蛋白在 NSCLC 中异常表达,并可能参与肿瘤的发生及发展,术后常规检测 KAI1 和 Smad4 蛋白可能对诊断和判断预后有一定价值。进一步探究其致病机制,其可能成为治疗 NSCLC 新的靶点。

参 考 文 献

- [1] Jiang W X, Song B G, Wang P J. Expression of nm23, KAI1 and spiral computed tomography findings in primary gallbladder carcinoma[J]. Chin Med J(Engl), 2009, 122(21): 2666–2668.
- [2] Lee K T, Chang W T, Wang S N, et al. Expression of DPC/Smad4 gene in stone-containing intrahepatic bile duct[J]. J Surg Oncol, 2006, 94(4): 338–343.
- [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] Yusenko M V, Kovacs G. Identifying CD82 (KAI1) as a marker for human chromophobe renal cell carcinoma[J]. Histopathology, 2009, 55(6): 687–695.
- [5] Liu W, Iizumi-Gairani M, Okuda H, et al. KAI1 gene is engaged in NDRG1 gene-mediated metastasis suppression through the ATF3–NFkappaB complex in human prostate cancer[J]. J Biol Chem, 2011, 286(21): 18949–18959.
- [6] 罗秉庆, 郑绍光, 唐青梅, 等. COX-2、E-cadherin 和 KAI1 在乳腺浸润性导管癌中的表达及意义[J]. 诊断病理学杂志, 2007, 14(3): 215–217.
- [7] Luo B Q, Zheng S G, Tang Q M, et al. Expression of COX-2, E-cadherin and KAI1 and their clinical significances in invasive ductal carcinoma of breast[J]. Chinese Journal of Diagnostic Pathology, 2007, 14(3): 215–217.
- [8] 杨竹林, 李永国, 王群伟, 等. 胰腺良恶性疾病组织中 Smad4 mRNA, PTEN mRNA, p73 mRNA 表达及意义[J]. 中华肝胆外科杂志, 2003, 9(3): 169–170.
- [9] Yang Z L, Li Y G, Wang Q W, et al. Expression of Smad4, PTEN and P73 mRNA in benign and malignant pancreatic lesions and its significance[J]. Chinese Journal of Hepatobiliary Surgery, 2003, 9(3): 169–170.
- [10] 王洪鹏, 叶琳, 黄闯, 等. Kai1 对喉癌 Hep-2 细胞株增殖及生长周期的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(4): 519–521.
- [11] Wang H P, Ye L, Hang C, et al. Effect of gene Kai1 on the proliferation and cell cycle of laryngeal carcinoma Hep-2 cell line[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2010, 35(4): 519–521.
- [12] 黎传奎, 王祖义, 王萍, 等. 转移抑制基因 KAI1 在非小细胞肺癌中的表达及意义[J]. 中国全科医学, 2010, 8(1): 15–17.
- [13] Li C K, Wang Z Y, Wang P, et al. Expression of metastasis suppressor gene KAI1 in non-small cell lung cancer and its significance[J]. Chinese Journal of General Practice, 2010, 8(1): 15–17.
- [14] Higashiyama M, Kodama K, Yokouchi H, et al. KAI1/CD82 expression in non small cell lung carcinoma is a novel favorable prognostic factor: an immunohistochemical analysis[J]. Cancer, 1998, 83(3): 466–474.
- [15] Ke Z, Zhang X, Ma L, Wang L. Expression of DPC4/Smad4 in non-small-cell lung carcinoma and its relationship with angiogenesis[J]. Neoplasia, 2008, 55(4): 323–329.
- [16] Wu S, Cheng Z, Yu L, et al. Expression of CD82/KAI1 and HIF-1 α in non-small cell lung cancer and their relationship to vasculogenic mimicry[J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2011, 14(12): 918–925.
- [17] Tong X D, Liu H X, Zhao H R, et al. The role of Smad4 and MAPK proteins in signal transduction pathway in non-small cell lung cancer[J]. Chinese Journal of Oncology, 2006, 28(10): 741–745.

(责任编辑:唐秋姗)