

·论 著·

肿瘤转移抑制基因 KAI1 在原发性胆囊癌中的表达及其临床意义

姜文霞^{1*}, 宋伯根¹, 汤如勇², 方建萍²

(1. 同济大学医学院病理学教研室, 上海 200092; 2. 同济大学附属同济医院病理科, 上海 200065)

[摘要] 目的:研究肿瘤转移抑制基因 KAI1 在原发性胆囊癌中的表达及其临床意义。方法:将 35 例原发性胆囊癌患者按照国际抗癌联合会(UICC)胆囊癌的 TNM 分期进行临床分期,病理标本分别行常规 H-E 染色及免疫组化染色以了解其病理组织学分级和肿瘤转移抑制基因 KAI1 的表达。所有病例随访 3 年。结果:35 例原发性胆囊癌中:原位癌 1 例(0 期),早期癌 13 例(1 期 2 例; 2 期 11 例),中晚期癌 21 例(3 期 13 例; 4 期 8 例);病理组织学分级:高分化癌 14 例,中分化癌 10 例,低分化癌 11 例。KAI1 基因蛋白阳性表达者 21 例,其中早期阳性表达率为 92.31%(12/13),高于晚期的 42.86%(9/21)($P_{确切}=0.00476$),且 KAI1 基因蛋白阳性表达率与胆囊癌的临床分期呈负相关($P_{趋势}=0.004$)。高分化胆囊癌中 KAI1 基因蛋白阳性表达率为 92.86%(13/14),中分化癌为 60.00%(6/10),低分化癌为 18.18%(2/11),三组有显著性统计学差异($P_{确切}=0.00475$),且 KAI1 基因蛋白阳性表达率与胆囊癌的病理组织学分级呈正相关($P_{趋势}=0.001$)。三年存活的 19 例中 KAI1 基因蛋白阳性表达占 89.47%(17/19),死亡 16 例中 KAI1 基因蛋白阳性表达占 25.00%(4/16),有显著性统计学差异($P=0.001$)。结论:KAI1 基因蛋白与胆囊癌的临床分期呈负相关;与病理组织学分级呈正相关;KAI1 基因蛋白的高表达预示着胆囊癌患者有较好的预后。

[关键词] 胆囊肿瘤; KAI1; 临床分期; 病理组织学分级

[中图分类号] R 735.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)10-1101-04

Metastatic suppressor Kiangai 1 in primary gallbladder carcinoma :expression and clinical significance

JIAN G Wen-xia^{1*}, SONG Bo-gen¹, TANG Ru-yong², FAN G Jian-ping² (1. Department of Pathology, Medical College, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. Department of Pathology, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the expression of metastatic suppressor Kiangai 1 (KAI1) expression in the primary gallbladder carcinoma and its clinical significance. **Methods:** The clinical stages of 35 primary gallbladder carcinoma patients were determined according to the TNM criteria of International Union Against Cancer (UICC). Histopathologic changes and the expressions of KAI1 were detected by H-E and immunohistochemical methods, respectively. All the patients were followed up for 3 years. **Results:** It was found that 1 patient had carcinoma *in situ* (0 stage), 13 had early carcinoma (1-2 stage), and 21 had intermediate or advanced carcinoma (3-4 stage). Histopathologic grading showed that 14 patients had well-differentiated carcinomas, 10 had moderately differentiated ones, and 11 had poorly differentiated ones. Immunohistochemical results revealed that 60.00% (21/35) of the patients were positive of KAI1, with the positive rate being 92.31% (12/13) in early carcinoma (1-2 stage) and 42.86% (9/21) in intermediate and advanced carcinoma (3-4 stage), and the former was significantly higher than the latter ($P_{exact}=0.00476$). The positive rate of KAI1 protein was negatively correlated with the clinical staging of patients ($P_{trend}=0.004$) and positively correlated with histopathologic grading ($P_{trend}=0.001$). The positive rate of KAI1 protein in well differentiated carcinoma was 92.86% (13/14), in moderately differentiated carcinoma was 60.00% (6/10), and in poorly differentiated carcinoma was 18.18% (2/11) ($P_{exact}=0.000475$ between the 3 groups). The positive rate of KAI1 protein was 89.47% (17/19) in 19 survival patients and 25.00% (4/16) in 16 death cases. Obvious significance of the expression of KAI1 protein was found between the 2 groups ($P=0.001$). **Conclusion:** The positive rate of KAI1 is negatively correlated with the clinical staging but positively correlated with the histopathologic grading in patients with primary gallbladder carcinoma. The high expression of KAI1 genes may indicate a better prognosis of gallbladder carcinoma.

[KEY WORDS] gallbladder neoplasms; KAI1; clinical staging; histopathologic grading

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(10): 1101-1104]

原发性胆囊癌起病隐匿,发现时多已转移,总体 5 年生存率仅为 5.0%~12.0%^[1]。KAI1 基因属于 TM4SF 家族(transmembrane 4 superfamily or tetraspanin super-family)成员,它与胆囊癌发生发展之间的关系尚未见报道。本实验通过研究肿瘤转移

抑制基因 KAI1 在原发性胆囊癌中的表达及其与临床分期和病理分级的关系,为胆囊癌的治疗和预后

[作者简介] 姜文霞,硕士,讲师、主治医师。

* Corresponding author. E-mail: Wenxia68@sina.com

提供信息。

1 材料和方法

1.1 患者资料和标本 收集上海同济医院 1998 ~ 2002 年间手术治疗的 35 例原发性胆囊癌患者的临床、病理资料。术前均未经放、化疗。男 13 例,女 22 例,年龄 37 ~ 85 岁,平均 66.94 岁。所有病例随访 3 年。

1.2 方法 每例原发性胆囊癌标本蜡块行 4 μm 厚连续切片,分别行常规 H-E 染色及免疫组化染色。

1.2.1 常规 H-E (hematoxylin-eosin) 染色 石蜡切片脱蜡至蒸馏水,苏木精浸染 10 min,盐酸乙醇分化,自来水蓝化,伊红浸染 1 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封固。

1.2.2 免疫组化方法 鼠抗人 KAI1 单抗(美国 Santa Cruz 公司,基因编号 sc-17752),工作浓度 1 : 200。采用 EnVision⁺ 二步法,操作如下:石蜡切片经 3%过氧化氢孵育 5 min(以消除内源性过氧化物酶活性),10%山羊血清封闭,加入一抗,4 ℃温育过夜,第 2 天滴加生物素标记的相应二抗,37 ℃温育 15 min,加入辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素,37 ℃温育 15 min,DAB 显色,苏木精复染后,蒸馏水充分冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,封片。以 PBS 替代一抗作阴性对照。

1.2.3 结果判定 光镜下观察切片,KAI1 蛋白呈现棕褐色、细颗粒状物,弥漫性分布在癌细胞胞膜上。任意选择 2 ~ 4 张连续切片,观察其中 10 个高

倍视野,采用二相加权法(染色强度积分 × 染色阳性细胞数积分)判断阳性表达。染色强度积分:不着色或浅黄色为 0 分;浅黄色至褐色为 1 分;褐色至棕褐色 2 分;棕色或棕黑色为 3 分。染色阳性肿瘤细胞数积分:0 ~ 10% 为 0 分;10% ~ 25% 为 1 分;25% ~ 50% 为 2 分;50% ~ 100% 为 3 分。正好落在百分数值上计为高一级表达。阳性表达评定:二项加权法积分 2 ~ 3 分为 (+);4 ~ 6 分为 (++) ;7 ~ 9 分为 (+++)。

1.3 统计学处理 数据使用 SAS 6.12 软件进行统计处理,各组间率的比较采用 ² 检验。

2 结果

2.1 35 例胆囊癌临床及病理结果 35 例胆囊癌患者 3 年存活者 19 例,占 54.29% (19/35);死亡者 16 例,占 45.71% (16/35)。国际抗癌联合会(UICC)胆囊癌的 TNM 分期:原位癌 1 例(0 期)占 2.86% (1/35);早期癌 13 例(I 期 2 例, II 期 11 例),占 37.14% (13/35);中晚期癌 21 例(III 期 13 例, IV 期 8 例),占 60.00% (21/35)。组织学类型:腺癌 31 例,黏液腺癌 2 例,乳头状腺癌 1 例,鳞癌 1 例。组织学分级为:高分化癌 14 例,占 40.00% (14/35);中分化癌 10 例,占 28.57% (10/35);低分化癌 11 例,占 31.43% (11/35)。

2.2 肿瘤转移抑制基因 KAI1 蛋白在胆囊癌中的阳性表达 35 例胆囊癌中 KAI1 基因蛋白阳性表达者 21 例(图 1),占 60.00% (21/35)。

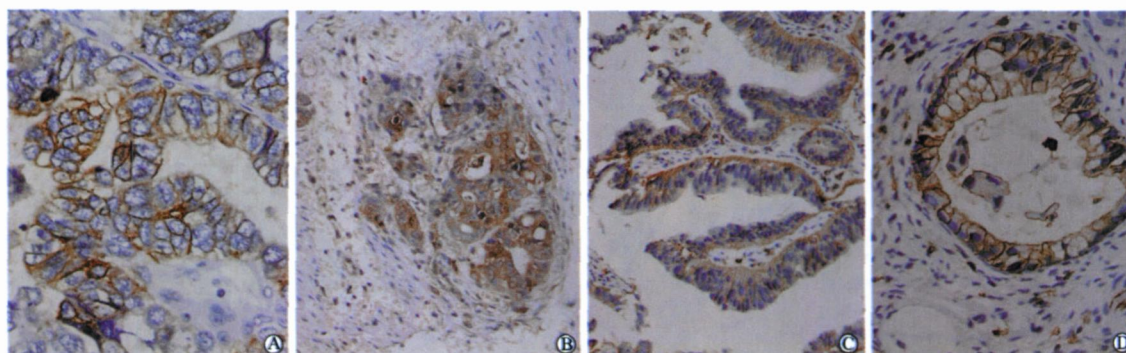


图 1 KAI1 在胆囊癌中的表达(En Vision 二步法)

Fig 1 KAI1 expression in carcinoma of gallbladder (En Vision diplo-methods staining)

A: In well differentiated carcinoma of gallbladder ,brown or yellow positive staining on malignant cell membrane (×400);B: In moderately differentiated carcinoma of gallbladder ,brown or yellow positive staining on malignant cell membrane (×200);C: In papillary adenocarcinoma of gallbladder ,brown or yellow positive staining on malignant cell membrane (×200);D: In mucous gland of gallbladder ,brown or yellow positive staining on malignant cell membrane (×400)

2.2.1 KAI1 蛋白表达与胆囊癌临床分期的关系

早期胆囊癌患者中, KAI1 基因蛋白阳性表达率为 92.31% (12/13), 晚期胆囊癌患者中为 42.86% (9/21)。比较两者的 KAI1 阳性表达率, $P_{\text{确切}} = 0.00476$, 有显著性统计学差异。且 KAI1 基因蛋白阳性表达率与胆囊癌的临床病理分期呈负相关, $P_{\text{趋势}} = 0.004$ 。

2.2.2 KAI1 蛋白表达与胆囊癌病理组织学分级的关系 高分化胆囊癌病例中 KAI1 基因蛋白阳性表达率为 92.86% (13/14), 中分化癌中为 60.00% (6/10), 低分化癌中为 18.18% (2/11)。比较分析三组的 KAI1 基因蛋白阳性表达率, $P_{\text{确切}} = 0.00475$, 有显著性统计学差异。且 KAI1 基因蛋白阳性表达率与胆囊癌的病理组织学分级呈正相关, $P_{\text{趋势}} = 0.001$ 。

2.2.3 KAI1 蛋白表达与胆囊癌患者术后 3 年存亡的关系 35 例原发性胆囊癌患者术后三年存活者 19 例中 KAI1 基因蛋白阳性表达占 89.47% (17/19), 术后 3 年死亡者 16 例中 KAI1 基因蛋白阳性表达占 25.00% (4/16), 两者有显著性统计学差异 ($P = 0.001$)。

3 讨论

KAI1 基因是新发现的一个肿瘤转移抑制基因。1995 年 Carl Barrett 实验室首先发现 KAI1 基因在动物体内可抑制前列腺癌转移。随后 Dong 等^[2]分离了该基因, 表达产物为 CD82, 命名为 KAI1 (取自中文抗癌 kang ai) 基因。

KAI1 基因蛋白尚处于试验研究阶段, 它是 TM4SF (transmembrane 4 superfamily) 或称 TST (tetraspanins transmembrane) 家族成员^[3]。TM4SF 家族调节肿瘤的浸润和转移, 可能通过以下两个机制: (1) 与整合素结合在细胞表面形成大的复合物, 通过调节整合素的功能, 从而影响细胞的黏附; (2) 直接调节细胞黏附。KAI1 基因产物和其他 TM4SF 成员是互相结合在一起的^[4,5]。肿瘤转移是一个复杂、级联的过程, 肿瘤侵袭的第一步就是肿瘤细胞从原发瘤脱落游离, 本质是细胞间的黏附因子的损失所致, 结果赋予了肿瘤细胞转移潜能; 接着更为重要的是循环肿瘤细胞与脉管内皮细胞及细胞外基质细胞的黏附。在这些过程中包含众多黏附因子及促进黏附或分离的因素。因此, 黏附在肿瘤转移

中是一极为重要的环节, 起着双重作用: 一方面肿瘤细胞必须从原来黏附的原发灶脱离才能浸润, 即同质性黏附的解除; 另一方面肿瘤细胞又需借黏附才能移动, 即异质性黏附的接触, 肿瘤细胞是从连续的黏附解除和黏附接触中获得移动的牵引力进行转移的。KAI1 蛋白通过促进细胞的同质性黏附而抑制肿瘤的转移, 体外实验发现转染 KAI1 基因的细胞同质性黏附能力强于对照组, 而异质性黏附及侵袭力明显降低^[6]。还有研究发现: 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^[7], 这表明 KAI1 基因具有直接的抑制肿瘤转移作用。KAI1 基因蛋白与胆囊癌发生发展之间的关系尚未见文献报道。本研究结果显示, 在 35 例原发性胆囊癌中, KAI1 基因蛋白阳性表达者 21 例, 占 60.00% (21/35); 早期胆囊癌患者 (I ~ II 期), KAI1 基因蛋白阳性表达率占 92.31% (12/13), 晚期胆囊癌患者 (III ~ IV 期) KAI1 基因蛋白阳性表达率占 42.86% (9/21); 比较临床病理分期的早、晚期的 KAI1 基因蛋白阳性表达率, 有显著统计学差异。且 KAI1 基因蛋白阳性表达率与胆囊癌的 TNM 分期呈负相关。我们知道, 临床晚期多伴有淋巴结转移和远处转移, 而本实验中 KAI1 基因蛋白的阳性表达在临床晚期显著下降, KAI1 基因蛋白的表达下调, 是否意味着它与肿瘤的转移抑制功能有关。

KAI1 基因在前列腺癌转移中的作用已经得到公认^[8]。在研究前列腺癌转移中发现, 正常的前列腺组织和前列腺良性增生组织 KAI1 表达大致相同, 仅有 10% 的正常组织为下降; 大部分前列腺癌原发灶表现为下降或缺失, 转移瘤则全部表现为下降或缺失。研究^[9~11]认为前列腺癌的 Gleason 分级及它的临床分期与 KAI1 蛋白的表达呈负相关。不仅如此, 在肺癌^[12]、胰腺癌^[13]、乳腺癌^[14]、胃癌^[15]、结肠癌^[6]、宫颈鳞状细胞癌^[16]、卵巢癌^[17,18]、子宫内膜癌^[19]、喉鳞状细胞癌^[20]、膀胱癌^[21]等亦有相同报道。因此, 我们推测认为, 在原发性胆囊癌这种组织学类型的肿瘤中 KAI1 基因也具有肿瘤转移抑制作用。

本实验研究结果还显示, 在 35 例原发性胆囊癌中其病理组织学分化程度高的胆囊癌 KAI1 基因蛋白阳性表达率占 92.86% (13/14), 而在分化程度低的胆囊癌中 KAI1 基因蛋白阳性表达率占 18.18% (2/11)。KAI1 基因蛋白在胆囊癌患者病理组织学

分级中的阳性表达分析比较有显著统计学差异。KAI1 基因蛋白的阳性表达率与病理组织学分级(从高到低)呈正相关。在低分化癌中 KAI1 表达下调,是否低分化癌具有高的转移潜能与其有关?抑或 KAI1 基因蛋白在低分化的胆囊癌里表达降低或消失,是该类肿瘤的特征?导致它们易于转移、恶性程度高。

另外实验还显示:35 例原发性胆囊癌患者术后三年存活者 19 例中 KAI1 基因蛋白阳性表达占 89.47% (17/19),而术后三年死亡者 16 例中 KAI1 基因蛋白阳性表达占 25.00% (4/16)。KAI1 基因蛋白在胆囊癌患者三年存活和死亡中的阳性表达分析比较有显著统计学差异。KAI1 基因蛋白的高表达预示着胆囊癌患者有较好的预后,因此我们得出^[22]: KAI1 基因蛋白对反映胆囊癌的预后有价值。

[参考文献]

- [1] Amaud JP, Casa C, Georgeac C, et al. Primary carcinoma of the gallbladder: review of 143 cases[J]. *Hepatogastroenterology*, 1995, 42: 811-815.
- [2] Dong JT, Lamb PW, Rinker SCW, et al. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2[J]. *Science*, 1995, 268: 884-886.
- [3] Liu WM, Zhang XA. KAI1/CD82, a tumor metastasis suppressor[J]. *Cancer Lett*, 2006, 240: 183-194.
- [4] Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin in superfamily: molecular facilitators[J]. *FASEB J*, 1997, 11: 428-442.
- [5] Zoller M. Gastrointestinal tumors: metastasis and tetraspanins[J]. 2006, 44: 573-586.
- [6] 刘莉, 李祖国, 杨光之, 等. 抑癌基因 KAI1 对大肠癌细胞生物学特性的影响[J]. *第一军医大学学报*, 2003, 23: 587-590.
- [7] Takaoka A, Hinoda Y, Sato S, et al. Reduced invasive and metastatic potential of KAI1 transfected melanoma cells[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1998, 89: 397-404.
- [8] Dong JT, Suzuki H, Pin SS, et al. Down-regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss[J]. *Cancer Res*, 1996, 56: 4387-4390.
- [9] Ueda T, Ichikawa T, Tamaru J, et al. Short communication. Expression of the KAI1 protein in benign prostate hyperplasia and prostate cancer[J]. *Am J Pathol*, 1996, 149: 1435-1440.
- [10] Kawana Y, Komiya A, Ueda T, et al. Location of KAI1 on the short arm of human chromosome 11 and frequency of allelic loss in advanced human prostate cancer[J]. *Prostate*, 1997, 32: 205-213.
- [11] Lijovic M, Somers G, Frauman AG. KAI1/CD82 protein expression in primary prostate cancer and in BpH associated with cancer[J]. *Cancer Detect Prev*, 2002, 26: 69-77.
- [12] Shinohara T, Miki T, Nishimura N, et al. Nuclear factor kappaB dependent expression of metastasis suppressor KAI1/CD82 gene in lung cancer cell lines expressing mutant p53[J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 673-678.
- [13] Guo XZ, Friess H, Shao XD, et al. KAI1 gene is differently expressed in papillary and pancreatic cancer: influence on metastasis[J]. *World J Gastroenterol*, 2000, 6: 866-871.
- [14] Yang X, Wei L, Tang C, et al. KAI1 protein is down-regulated during the progression of human breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6: 3424-3429.
- [15] Zheng HC, Wang MC, Li JY, et al. Expression Maspin and KAI1 and their clinicopathological significance in carcinogenesis and progression of gastric cancer[J]. *Chin Med Sci J*, 2004, 19: 193-198.
- [16] Liu FS, Chen JT, Ong JT, et al. KAI1 metastatic suppressor gene is frequently down-regulated in cervical carcinoma[J]. *Am J Pathol*, 2001, 159: 1629-1634.
- [17] Schindl M, Birner P, Breitenecker G, et al. Down regulation of KAI1 metastasis suppressor protein is associated with a dismal prognosis in epithelial ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2001, 83: 244-248.
- [18] Houle CD, Ding XY, Foley JF, et al. Loss of expression and altered localization of KAI1 and CD9 protein are associated with epithelial ovarian cancer progression[J]. *Gynecol Oncol*, 2002, 86: 69-78.
- [19] Liu FS, Dong JT, Chen JT, et al. KAI1 metastasis suppressor protein is down-regulated during the progression of human endometrial cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 1393-1398.
- [20] Jia GU, Qian SC. KAI1 gene relates to squamous cell carcinoma of the larynx[J]. *Chin Med J*, 2003, 116: 1304-1307.
- [21] Jackson P, Kingsley EA, Russell PJ. Inverse correlation between KAI1 mRNA levels and invasive behaviour in bladder cancer cell lines[J]. *Cancer Lett*, 2000, 156: 9-17.
- [22] Tsutsumi S, Shimura T, Morinaga N, et al. Loss of KAI1 expression in gastric cancer[J]. *Hepatogastroenterology*, 2005, 52: 281-284.

[收稿日期] 2006-03-25

[修回日期] 2006-09-21

[本文编辑] 孙岩