

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00189

## KAI1 在尿路上皮癌组织中的表达及其与浸润转移的关系

袁红纲<sup>1</sup>, 宋兴福<sup>1</sup>, 张平<sup>1</sup>, 龙兵<sup>1</sup>, 董自强<sup>1\*</sup>, 许晓明<sup>1</sup>, 周天贵<sup>1</sup>, 陈先国<sup>2</sup>

1. 三峡大学第一临床医学院泌尿外科, 宜昌 443003

2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院泌尿外科, 武汉 430030

**[摘要]** **目的:**探讨 KAI1 基因的表达与尿路上皮癌的发生及浸润转移的关系。**方法:**采用实时荧光定量 PCR 技术检测尿路上皮癌组织及其正常尿路上皮黏膜中 KAI1 基因的表达, 免疫组化法检测其蛋白水平的表达。**结果:**实时荧光定量 PCR 发现 KAI1 基因平均模板量在癌组织中的表达明显低于其在正常尿路上皮黏膜的表达 ( $P < 0.01$ ), 且随着肿瘤病理分级、临床分期的增高及淋巴结转移的出现, KAI1 表达水平逐渐降低, 各组间差异具有显著性意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。KAI1 蛋白在癌组织中的表达明显低于正常尿路上皮黏膜 ( $P < 0.01$ ); 随着尿路上皮癌病理分级的升高, KAI1 蛋白的表达逐渐减少 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); KAI1 在浸润性癌中的表达明显低于表浅性癌病例 ( $P < 0.05$ ); 在有淋巴结转移组中的表达明显低于无淋巴结转移组 ( $P < 0.05$ )。**结论:**KAI1 基因及蛋白的表达下调与尿路上皮癌分化、浸润及淋巴转移有关, 有望成为评判尿路上皮癌恶性程度、转移潜能及预后的有效指标。

**[关键词]** 尿路上皮癌; KAI1 蛋白; 肿瘤浸润; 肿瘤转移

**[中图分类号]** R 737.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)02-0189-04

### Expression of KAI1 in urothelial cancer tissues and its relationship with invasion and metastasis of urothelial cancer

YUAN Hong-gang<sup>1</sup>, SONG Xing-fu<sup>1</sup>, ZHANG Ping<sup>1</sup>, LONG Bing<sup>1</sup>, DONG Zi-qiang<sup>1\*</sup>, XU Xiao-ming<sup>1</sup>, ZHOU Tian-gui<sup>1</sup>, CHEN Xian-guo<sup>2</sup>

1. Department of Urology, The First College of Clinical Medical Science, Three Gorges University, Yichang 443003, China

2. Department of Urology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the expression of KAI1 gene in the urothelial cancer tissues and its relationship with the invasion and metastasis of urothelial cancer. **Methods:** The expression of KAI1 mRNA was detected by real-time fluorescent quantitative (RFQ-PCR) in urothelial cancer tissues and normal mucosa of urinary tract. The KAI1 protein expression was detected by immunohistochemistry (IHC) method in bladder transitional cell carcinoma tissues and the paired normal mucosal tissues. **Results:** QRT-PCR showed that the average level of KAI1 mRNA in the urothelial cancer tissues was significantly lower than that in the normal bladder tissues ( $P < 0.01$ ); moreover, the increase of pathological grades and clinical stages and the development of lymphatic metastasis were associated with the decrease of KAI1 expression, with significant difference found between the different groups ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The protein expression of KAI1 in the urothelial cancer tissues was significantly lower than that in the normal bladder tissues ( $P < 0.01$ ). The protein expression of KAI1 was decreased with the increase of pathological grades ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). We also found that higher expression of KAI1 was associated with superficial invasion ( $P < 0.05$ ) and the presence of lymphatic metastasis ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The down-regulation of KAI1 gene is associated with differentiation, infiltration, and lymphatic metastasis of urothelial cancer, which might serve as an effective indicator for malignancy, metastasis and prognosis of urothelial cancer.

**[KEY WORDS]** urothelial cancer; KAI1 protein; neoplasm invasiveness; neoplasm metastasis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(2):189-192]

KAI1 基因是新近发现的一个肿瘤转移抑制基因, 最早从人前列腺癌<sup>[1]</sup>的染色体 11p11.2 中分离

**[收稿日期]** 2007-10-19 **[接受日期]** 2007-12-04

**[作者简介]** 袁红纲, 硕士生. E-mail: yuanhonggang2003@sina.com

\* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 0717-6488564, E-mail: yczxyymw@yahoo.com.cn

出来,它的产物与 CD82 结构相同,CD82 是白细胞上一种编码 267 个氨基酸的表面糖蛋白。KAI1 蛋白属于跨膜 4 超家族 TM4SF(transmembrane 4 superfamily or tetraspan superfamily) 成员。研究表明,它对前列腺癌<sup>[1]</sup>、食管癌<sup>[2]</sup>、宫颈癌<sup>[3]</sup>、肺癌<sup>[4]</sup>、喉癌<sup>[5]</sup>、骨肉瘤<sup>[6]</sup>、成视网膜细胞瘤<sup>[7]</sup>等多种恶性肿瘤转移有抑制作用。KAI1 基因与尿路上皮癌之间的关系也有报道,但尚存在一些争议<sup>[8-9]</sup>。本研究分别采用实时荧光定量 PCR 技术及免疫组化方法检测了 KAI1 基因 mRNA 及蛋白在尿路上皮癌中的表达情况,进一步分析了其与尿路上皮癌的浸润转移的关系。

1 材料和方法

1.1 病例标本 (1)手术切除标本:收集 2005 年 6 月至 2006 年 11 月我院行手术治疗的膀胱肿瘤患者的新鲜手术切除标本,每例患者的癌组织及癌旁组织均取样,共 48 患者 96 份标本,经病理检查确诊全部为尿路上皮癌。(2)存档蜡块:选用我院病理科 2004 年 6 月至 2006 年 11 月膀胱肿瘤手术标本的存档蜡块 40 例,40 例中有正常黏膜对照的有 28 例,经病理检查确诊全部为尿路上皮癌。具体资料见表 1。

表 1 尿路上皮癌病例标本一般资料

Tab 1 General data of urothelial cancer patients

Index	Fresh sample (N=48)	Pathological fixed sample (N=40)
Sex		
Male	37	28
Female	11	12
Age		
<60 years	21	16
≥60 years	27	24
Pathological grade		
G1	23	13
G2	17	11
G3	8	16
Clinical stage		
Ta-T1	28	24
T2-T4	20	16
Lymph node metastasis		
With	14	15
Without	34	25

1.2 组织标本处理 48 例新鲜标本均在离体 0.5 h 内迅速取材,分别取肿物与远端正常黏膜两部分,一部分组织置于 -196℃ 液氮保存,用于提取总 RNA,剩余组织固定于 4% 多聚甲醛中,然后石蜡包

埋切片,用于常规病理诊断及免疫组化染色。40 例存档蜡块直接切片,H-E 染色及免疫组化染色。

1.3 主要试剂 Trizol 总抽提试剂盒(美国 Sigma 公司);RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 宝生物大连有限公司);qPCRmix(已混合了 Taq DNA 聚合酶、酶抗体、dNTP、MgCl<sub>2</sub>、PCR buffer、SYBR Green)、稳定剂和增强剂等试剂,只需加入模板、引物即可进行定量 PCR 反应(TaKaRa 宝生物大连有限公司);根据 GenBank 提供的人类 KAI1 mRNA 序列(U207701),使用 Prime5.0 软件设计引物(上海生工生物工程公司合成并纯化):KAI1 上游 5'-AGC CTG TAT CAA AGT CAC CAA-3',下游 5'-AGG ATC AGG AGC AGG AAA G-3',产物长度 279 bp;GAPDH 上游 5'-GGA AAT CCC ATC ACC ATC T-3',下游 5'-GAG TCC TTC CAC GAT ACC AA-3',长度 312 bp。KAI1 鼠抗人单克隆抗体(美国 LAB VISION 公司);UltraSensitive™ SP 试剂盒及 DAB 显色剂(福州迈新)。

1.4 实时荧光定量 PCR 采用 Trizol 试剂一步法提取组织总 RNA,cDNA 合成按 RT-PCR 试剂盒说明书进行操作。取 10 μl RNA 模板样品,加入 0.5 μg/μl Oligo (dT)1 μl,在 70℃ 温育 5 min,在冰上再依次加入以下试剂:200 U 逆转录酶,25 U RNA 酶抑制剂,1.25 μl 10 mmol/L 的 dNTP,加入无菌去离子水至总反应体积为 20 μl。室温 10 min,42℃ 60 min,95℃ 5 min 终止反应。

FQ-PCR 在 Opticon 多元定量 PCR 仪(美国 MJ research 公司 型号:PTC-200)上进行,反应体系为 20 μl,内含 cDNA 4 μl,qPCRmix10 μl,上下游引物各 1 μl,去离子水定容至 20 μl。反应条件为:95℃ 变性 5 min;94℃ 10 s,54℃ 15 s,40 个循环;循环结束后 72℃ 延伸 10 min。每份 cDNA 样品均在相同反应条件下进行 KAI1 及 GAPDH mRNA 检测,结果采用比较 Ct(每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数)定量,根据 2<sup>-ΔCt</sup> 值计算 KAI1 基因的起始模板的量。

1.5 免疫组化 采用 SP 两步法。石蜡切片经抗原修复和血清封闭后,在切片上滴加 1:100 抗 KAI1 抗体,4℃ 过夜,次日滴加 1:200 生物素标记的第二抗体及链霉菌抗生物素-过氧化物酶,DAB 显色,苏木精复染,以 PBS 代替一抗作为阴性对照,以已知 KAI1 染色阳性的前列腺增生组织切片作阳性对照。免疫组化阳性结果判断标准:采用 Olympus BX-51 图像截取测量系统。KAI1 阳性染色呈棕褐色,分布在细胞膜上,每张切片随机选择 5 个视野(×400),计算阳性细胞数占细胞总数的百分率<sup>[6]</sup>。> 51% 为强阳性

(++), 5%~50%为阳性(+), <5%为阴性(-)。

1.6 统计学处理 数据分析均在 SPSS 11.0 统计软件上完成, 采用 *t* 检验、单因素方差分析及  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

2.1 实时荧光定量-PCR 检测 KAI1 mRNA 表达 通过引物熔解曲线分析, KAI1 基因扩增成功。

KAI1 基因平均模板量在癌组织中为  $0.0464 \pm 0.0149$ , 在正常尿路黏膜的表达量为  $0.0629 \pm 0.0076$ , 前者表达水平显著低于后者 ( $P < 0.01$ )。癌组织中 KAI1 的表达水平随着病理分级的升高、浸润深度的增加及淋巴结转移的出现, 逐渐降低 ( $P < 0.01$ , 图 1)。

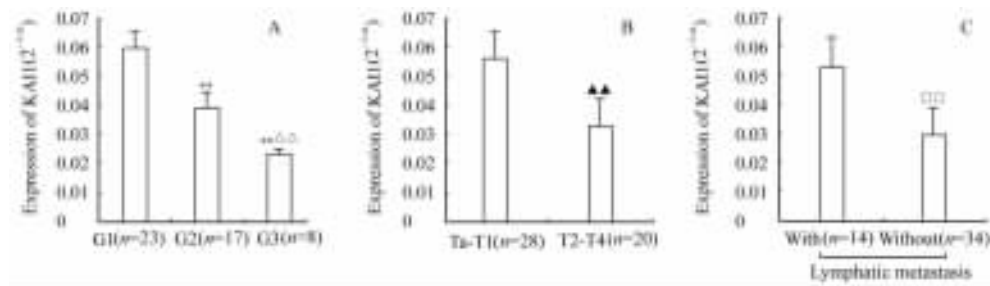


图 1 实时荧光定量检测 KAI1 在尿路上皮癌组织中的表达

Fig 1 KAI1 mRNA expression of urothelial cancer tissues by real-time PCR

A: KAI1 mRNA expression of different pathological grades; B: KAI1 mRNA expression of different clinical phages; C: KAI1 mRNA expression with or without lymph node metastasis. \*  $P < 0.01$  vs G1;  $\Delta P < 0.01$  vs G2;  $\blacktriangle P < 0.01$  vs Ta-T1;  $\square P < 0.01$  vs with lymphatic metastasis

2.2 免疫组化检测 KAI1 蛋白的表达 KAI1 阳性染色呈棕褐色, 分布在细胞膜上(图 2)。KAI1 蛋白在癌组织中的表达明显低于其正常黏膜 ( $P < 0.01$ ); 随着尿路上皮癌病理分级的升高, KAI1 蛋白的表达逐渐减少, 各级之间差异均有统计学意义 (G1、G2 及 G3 两两比较 *P* 值分别  $< 0.05$ 、 $< 0.01$ 、 $< 0.01$ ); 浸润癌 (T2-T4) KAI1 蛋白表达较表浅癌 (Ta-T1) 明显减少, 二者差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 在有淋巴结转移病例中的表达明显低于无淋巴结转移病例 ( $P < 0.05$ )。详见表 2。

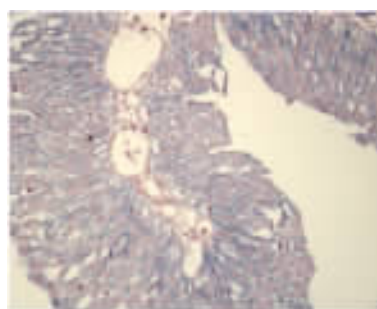


图 2 KAI1 在尿路上皮癌中阳性表达

Fig 2 Positive KAI1 expression in urothelial cancer tissue (SP, original magnification:  $\times 200$ )

表 2 尿路上皮癌组织中 KAI1 蛋白表达与临床病理学特征的关系

Tab 2 Relationship between KAI1 expression and clinic pathological characters of urothelial cancer

Index	N	KAI1 (n)			$\chi^2$	P
		-	+	++		
Normal tissue	76	9	31	36	18.449	$< 0.01$
Cancer tissue	88	37	23	28		
Pathological grade <sup>a</sup>						
G1	36	4	15	17	35.047	$< 0.01$
G2	28	12	6	10		
G3	24	21	2	1		
Clinical stage						
Ta-T1	52	16	17	19	6.824	$< 0.05$
T2-T4	36	21	6	9		
Lymph node metastasis						
With	59	17	19	23	9.215	$< 0.05$
Without	29	20	4	5		

<sup>a</sup>: G1 vs G2;  $\chi^2 = 8.810, P = 0.012$ ; G1 vs G3;  $\chi^2 = 34.712, P = 0.000$ ; G2 vs G3;  $\chi^2 = 11.579, P = 0.003$

### 3 讨论

KAI1 基因是从前列腺癌的研究中发现的一个新的肿瘤转移抑制基因,1995年 Dong 等<sup>[1]</sup>首先发现并分离了该基因。KAI1 可以联合细胞黏附分子,生长因子,信号分子等与细胞迁移相关的重要蛋白质(如整合素、表皮生长因子受体、EVI2/PGR、PKC 及 KITENIN 等)<sup>[10-11]</sup>,并且通过下调这些蛋白质的功能从而抑制肿瘤细胞的转移。

尿路上皮癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤。浸润、转移是尿路上皮癌的重要特征,也是导致患者死亡的主要原因。尿路上皮癌易发生局部淋巴结转移而较少血行扩散,研究与肿瘤转移密切相关的 KAI1 基因在尿路上皮癌中的表达对于预测尿路上皮癌转移、预后以及制订合理治疗方案具有重要意义。

本研究发现 KAI1 mRNA 在尿路上皮癌组织的表达比其正常黏膜中的表达显著降低。并且, KAI1 mRNA 的表达水平随着病理分级的升高、浸润深度的增加及淋巴结转移的出现,逐渐降低; KAI1 蛋白在癌组织中的表达明显低于其正常黏膜;随着病理分级的升高, KAI1 蛋白的表达逐渐减少;浸润癌(T2-T4) KAI1 蛋白表达较表浅癌(Ta-T1)明显减少;在有淋巴结转移病例中的表达明显低于无淋巴结转移病例。这与 Ow<sup>[8]</sup>和 Yu<sup>[12]</sup>等用原位杂交方法所得的结论一致。提示 KAI1 基因下调及 KAI1 蛋白表达降低,是使尿路上皮癌细胞侵袭能力增加的重要原因。KAI1 在尿路上皮癌中表达减少或缺失的原因可能是存在交替拼接变体<sup>[13]</sup>或表达在转录水平受到 p53 基因<sup>[14]</sup>的调节。

综上所述,尿路上皮癌癌变和转移可能与 KAI1 的基因及蛋白的表达降低有关, KAI1 下调可能使得细胞具有了侵袭性,更易发生转移,并与肿瘤的分化及其浸润深度密切相关。因此,检测尿路上皮癌组织中的 KAI1 mRNA 和(或)蛋白的表达,不仅可以较好地评估肿瘤细胞的转移潜能及判断预后,也为肿瘤治疗提供了新的途径,同时也可以成为观察疗效的一个新指标。

#### [参考文献]

[1] Dong J T, Lamb P W, Rinker-Schaeffer C W, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs J T, et al. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11P11.2[J].

Science, 1995, 268: 884-886.

- [2] 郝宝岚,李珊珊,张红燕,闫爱华,任秀花.食管癌组织中 KAI1、EphA2 蛋白的表达及其意义[J].临床与实验病理学杂志, 2006, 22: 429-432.
- [3] Xiong Y, Liang L Z, Yan X J, Yuan S H, Wei M. Expression of metastasis suppressor gene KAI1/CD82 in cervical squamous cell carcinoma and its clinical significance[J]. Ai Zheng, 2005, 24: 110-115.
- [4] Takeda T, Hattori N, Tokuhara T, Nishimura Y, Yokoyama M, Miyake M. Adenoviral transduction of MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 inhibits lymph node metastasis in orthotopic lung cancer model[J]. Cancer Res, 2007, 67: 1744-1749.
- [5] 舒艳,陈鸿雁,谭毅. KAI1/CD82 在喉癌组织中的表达及其临床意义[J].临床耳鼻咽喉科杂志, 2005, 19: 1065-1067.
- [6] Leavey P J, Timmons C, Frawley W, Lombardi D, Ashfaq R. KAI-1 expression in pediatric high-grade osteosarcoma[J]. Pediatr Dev Pathol, 2006, 9: 219-224.
- [7] Mohan A, Nalini V, Mallikarjuna K, Jyotirmay B, Krishnakumar S. Expression of motility-related protein MRP1/CD9, N-cadherin, E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin in retinoblastoma[J]. Exp Eye Res, 2007, 84: 781-789.
- [8] Ow K, Delprodo W, Fisher R, Barrett J, Yu Y, Jackson P, et al. Relationship between expression of the KAI1 metastasis suppressor and other markers of advanced bladder cancer[J]. J Pathol, 2000, 191: 39-47.
- [9] Su J S, Arima K, Hasegawa M, Franco O E, Umeda Y, Yanagawa M, et al. Decreased expression of KAI1 metastasis suppressor gene is a recurrence predictor in primary pTa and pT1 urothelial bladder carcinoma[J]. Int J Urol, 2004, 11: 74-82.
- [10] 袁红纲,宋兴福,董自强.转移抑制基因 KAI1 的研究新进展[J].肿瘤, 2007, 27: 1010-1014.
- [11] Rowe A, Jackson P. Expression of KITENIN, a KAI1/CD82 binding protein and metastasis enhancer, in bladder cancer cell lines: relationship to KAI1/CD82 levels and invasive behaviour[J]. Oncol Rep, 2006, 16: 1267-1272.
- [12] Yu Y, Yang J L, Markovic B, Jackson P, Yardley G, Barrett J, et al. Loss of KAI1 messenger RNA expression in both high-grade and invasive human bladder cancers[J]. Clin Cancer Res, 1997, 3: 1045-1049.
- [13] Jackson P, Rowe A, Grimm M O. 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 behaviour[J]. Oncol Rep, 2007, 18: 1357-1363.
- [14] Jackson P, Grimm M O, Kingsley E A, Brosius U, Antalis T, Yardley G, et al. Relationship between expression of KAI1 metastasis suppressor gene, mRNA levels and p53 in human bladder and prostate cancer cell lines[J]. Urol Oncol, 2002, 7: 99-104.

[本文编辑] 孙岩