

# 中国人胃癌 KAI1 基因表达及遗传不稳定性

杨月琴 陈学荣<sup>1</sup> 郑枫芸 张仙土<sup>1</sup> 李继承\*(浙江大学细胞生物学研究所, 杭州 310031; <sup>1</sup>浙江省台州市第一人民医院, 黄岩 318020)

**摘要** 采用 Envision 免疫组织化学, Leica-Qwin 计算机图像分析, 石蜡包埋组织抽提 DNA, PCR-单链构象多态性(SSCP)和常规银染等方法, 对 56 例石蜡包埋胃癌标本及其相应的正常组织, 进行 KAI1 蛋白表达水平的研究和 D1S1344、D11S1326 位点微卫星不稳定(MSI)、杂合性缺失(LOH)的检测, 为揭示 KAI1 基因作用机制和肿瘤转移机制提供实验依据。实验中, 胃癌 KAI1 蛋白阳性检出率为 55.4%(31/56); 随着癌组织浸润程度的进展, 其阳性率呈降低趋势( $P < 0.01$ ); 在无淋巴结转移的肿瘤组织 KAI1 蛋白表达率为 83.9%, 显著高于淋巴结转移肿瘤组织的 20.0%; 在肿瘤结节转移(tumor node metastasis, TNM) I+II 期, KAI1 蛋白阳性率为 82.8%, 明显高于 TNM III+IV 期的 25.9% ( $P < 0.01$ )。56 例胃癌 D11S1326、D11S1344 位点的 SSCP 分析中, 均未出现 MSI 或 LOH。实验结果提示, KAI1 蛋白表达与胃癌组织浸润、淋巴结转移及恶性进展密切相关。在胃癌的发生发展中, KAI1 基因未见遗传不稳定性改变。

**关键词** KAI1 基因; 胃癌; 免疫组化; 微卫星不稳定; 杂合性缺失

Kang Ai (KAI) 基因是近年发现的一个新的肿瘤转移抑制基因, Dong 等<sup>[1]</sup>首先从前列腺癌细胞系中分离鉴定。有研究证明, 在多种癌组织和细胞系中检测到 KAI1 在分子水平上的表达, 然而它在胃癌中的表达情况, 国内外报道较少, 且结论尚有争议<sup>[2,3]</sup>。基因的遗传不稳定性是导致抑癌基因功能失调, 引起肿瘤发生的重要因素, 而 KAI1 基因的遗传不稳定性研究报道不多。为进一步了解 KAI1 基因在胃癌发生发展中的作用及作用机制, 本实验采用免疫组织化学染色与 PCR-SSCP 技术, 对 56 例原发性胃癌进行 KAI1 蛋白表达水平的研究和 D11S1344、D11S1326 位点微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)和杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)的检测, 分析 KAI1 蛋白表达及 KAI1 基因遗传不稳定性与胃癌临床病理特性的相关性, 以阐明 KAI1 基因在评估胃癌侵袭转移及预后方面的价值, 为揭示 KAI1 基因作用机制和肿瘤转移机制提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 病例样本 收集浙江省台州市第一人民医院 2002 年 1 月~2005 年 10 月石蜡包埋胃癌手术标本 56 例, 所有病例均为原发性癌, 亦无肿瘤家族史, 术前均未接受过放、化疗。其中黏液腺癌 33 例, 管

状腺癌 23 例; 有淋巴结转移 25 例, 无淋巴结转移 31 例; 浸润至浅肌层 11 例, 深肌层 12 例, 浆膜层 19 例, 浆膜外组织 14 例。其中 28 例获得随访资料, 生存时间小于 1 年 8 例, 1 年以上 20 例。每例组织均包括肿瘤组织和周围正常淋巴结。

1.1.2 引物序列 来自有关文献<sup>[4]</sup>: D11S1326 位点引物序列为 5'-TGC CAA GAA CAG CAA AAA-3' 和 5'-GGG GTT CAA AAT AAA CAA AA-3'。D11S1344 引物序列为 5'-CCC TGA ACT TCT GCA TTC AC-3' 和 5'-GCG CCT GGC TTG TAC ATA TA-3', 由上海博亚公司合成。

1.1.3 抗体 鼠抗人 KAI1 蛋白单克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology, USA), 羊抗鼠 Envision 复合物(DAKO 公司, Cat NO.K4010), DAB 显色试剂盒(DAKO 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 常规石蜡切片, 厚度为 5  $\mu\text{m}$ , 脱蜡后行 KAI1 蛋白 Envision 免疫组织化学染色, DAB 显色, 苏木素复染、常规脱水、透明、中性树脂封片。一抗工作浓度为 1:100, 同时, 以 PBS 代替一抗作为空白对照。

收稿日期: 2006-06-29 接受日期: 2006-11-16

\* 通讯作者: Tel: 0571-88208088, E-mail: lijichen@zju.edu.cn

**1.2.2 免疫组织化学染色判断标准** 细胞浆内出现棕黄色颗粒视为阳性细胞, PBS 替代一抗作为阴性对照。高倍镜下随机计数 10 个视野, 按细胞染色强度评分<sup>[5]</sup>, 无染色为 0 分, 黄棕 - 棕褐色为 1~3 分。再按阳性细胞所占百分率, 小于等于 10% 为 1 分, 11%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, 大于 75% 为 4 分。染色强度计分与阳性细胞评分乘积大于 3 为免疫组化结果阳性。

**1.2.3 图像分析** 每例标本连续选取不重叠的 10 个高倍视野, 由 Leica-Qwin 计算机图像分析系统, 在相同灰度设定条件下测出  $G_A$  (整个背景视野灰度值)、 $G_a$  (视野内 KAI1 蛋白免疫组化阳性染色颗粒的灰度值)、 $A_{Aa}$  (KAI1 阳性细胞占视野面积的面积密度)。

**1.2.4 数据处理** 用 Excel 函数算出阳性单位值 (positive unit, PU) 代表 KAI1 蛋白在胃癌细胞的表达强度。255 为 Leica-Qwin 的最大灰度分级。

$$PU = \frac{|G_a - G_A|}{(1 - A_{Aa}) \times 255} \times 100$$

**1.2.5 基因组 DNA 的抽提** 石蜡包埋组织 10  $\mu\text{m}$  切片, 切片脱蜡后, 用苯酚 - 氯仿抽提法, 提取肿瘤组织基因组 DNA (选取含肿瘤细胞 90% 以上的组织切片进行抽提)。同时, 应用上述方法, 抽提患者胃周正常淋巴结组织基因组 DNA 作为正常组织对照。

**1.2.6 D11S1326、D11S1344 位点的 PCR 扩增** 反应总体积 50  $\mu\text{l}$ , 包含 1.0 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ 、5  $\mu\text{l}$  10  $\times$  缓冲液、200  $\mu\text{mol/L}$  dNTP、2 U Taq DNA 聚合酶、引物各 50 pmol/L; 94  $^\circ\text{C}$  变性 10min, 进入循环 94  $^\circ\text{C}$  50s、退火温度 (D11S1344, 60  $^\circ\text{C}$ ; D11S1326, 50  $^\circ\text{C}$ ) 50s、72  $^\circ\text{C}$  1min, 循环 35 次, 最后 72  $^\circ\text{C}$  延伸 10 min。扩增产物经 2% 琼脂糖电泳、溴乙锭染色, 经紫外灯下观察, 证实 PCR 扩增成功。

**1.2.7 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳** 3  $\mu\text{l}$  PCR 扩增产物与等体积变性上样缓冲液 (含 98% 去离子甲酰胺) 混合, 98  $^\circ\text{C}$  变性 10 min, 冰浴骤冷后, 加样于含 8 mol/L 尿素的 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶, 140 V 电泳 2 h。

**1.2.8 变性聚丙烯酰胺凝胶染色** 银染观察凝胶经 10% 乙醇固定 5 min, 1%  $\text{HNO}_3$  5 min, 0.1% 硝酸银溶液 15 min, 每步结束后均以双蒸水漂洗 5 min, 最后入 0.28 mol/L 碳酸钠显色至条带清晰, 10% 冰乙酸终止, 玻璃纸封胶, 自然干燥、保存。

**1.2.9 遗传不稳定性判断标准** 正常淋巴结基因组 DNA, D11S1344、D11S1326 位点 PCR-SSCP 电

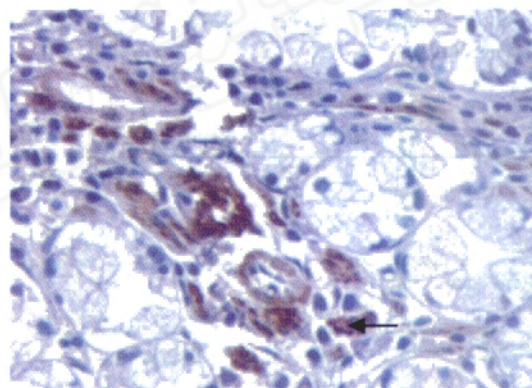
泳凝胶图中, 只出现一条主带代表一个等位基因片段, 为纯合子; 如出现两条主带则为杂合子, 后者可用于 LOH 分析。肿瘤组织条带较正常组织相应等位基因条带减少或密度降低 50% 以上, 为 LOH; 肿瘤组织较正常组织等位基因条带增多或移位, 为 MSI。

**1.2.10 统计学分析** 所有数据行均使用 SPSS 10.0 软件, 单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和  $t$  检验。

## 2 结果

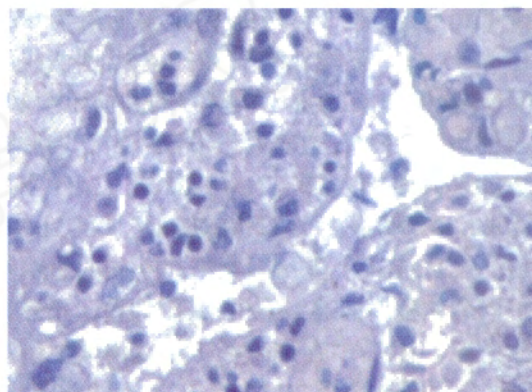
### 2.1 KAI1 蛋白免疫组织化学结果

KAI1 蛋白免疫染色反应阳性结果为棕黄色颗粒, 主要位于细胞质, 但不是所有胃癌细胞都呈现阳性 (图 1)。以 PBS 代替一抗作阴性对照的肿瘤组织细胞显示为阴性 (图 2), 表明 KAI1 蛋白阳性反应的专一性。



**Fig.1 Immunohistochemistry of KAI1 protein (200 $\times$ )**

The expression of KAI1 protein in gastric cancer. The brown-yellow granules of KAI1 protein mostly located in cytoplasm. But not all the cancer cells were stained ( $\uparrow$ ).



**Fig.2 Control group, PBS replace anti-KAI1 protein as the first antibody (200 $\times$ )**

**Table 1 The relation between clinical pathological parameter and KAI1 protein expression in gastric cancer**

Clinical pathological factors	Cases	The positive frequency of KAI1 protein % (+/n)	KAI1 protein expression intensity ( $PU=\bar{x}\pm s, n=10$ )
<b>Histological type</b>	56	55.4 (31/56)	33.56 $\pm$ 2.23
Mucoid adenocarcinoma	33	48.5 (16/33)	32.56 $\pm$ 2.26
Tubular adenocarcinoma	23	65.2 (15/23)	32.78 $\pm$ 2.38
<b>Differentiation degree</b>			
High differentiation	16	62.5 (10/16)	34.12 $\pm$ 2.76
Middle differentiation	9	66.7 (6/9)	34.05 $\pm$ 1.91
Low differentiation	31	48.4 (15/31)	32.59 $\pm$ 2.23
<b>Depth of infiltration</b>			
Superficial muscular layer	11	90.9 (10/11)	32.87 $\pm$ 2.35
Deep muscular layer	12	66.7 (8/12)	34.03 $\pm$ 2.66
Serosa layer	19	47.4 (9/19)	32.87 $\pm$ 2.93
The tissue away from serosa	14	28.6 (4/14)*	34.03 $\pm$ 1.79
<b>Lymph node metastasis</b>			
negative	31	83.9 (26/31)	33.49 $\pm$ 2.34
positive	25	20.0 (5/25) <sup>▲</sup>	33.58 $\pm$ 1.67
<b>TNM stage</b>			
I+II	29	82.8 (24/29)	34.75 $\pm$ 1.78
III+IV	27	25.9 (7/25) <sup>■</sup>	33.14 $\pm$ 2.14

\* $P<0.01$ , compared in groups of different depth of infiltration; <sup>▲</sup> $P<0.01$ , vs lymph node metastasis positive group; <sup>■</sup> $P<0.01$ , vs TNM stage I+II group.

**Table 2 The relation between KAI1 protein expression and survival rate in gastric cancer**

Survival Time	Cases	The positive frequency of KAI1 protein % (+/n)	KAI1 protein expression intensity ( $PU=\bar{x}\pm s, n=10$ )
Less than 1 year	8	37.5 (3/8)	33.38 $\pm$ 2.38
More than 1 year	20	55.5 (11/20)*	33.23 $\pm$ 2.34

\* $P>0.05$ , vs the group of less than 1 year.

胃癌的 KAI1 蛋白阳性检出率为 55.4%(31/56) (表 1), 且阳性率与胃癌的浸润深度、淋巴结转移情况及肿瘤结节转移(tumor node metastasis, TNM)分期密切相关。随着癌组织浸润程度的增加, 其阳性率呈降低趋势, 在浅肌层为 90.9%, 深肌层为 66.7%, 浆膜层为 47.4%, 浆膜外组织为 28.6%, 两两组间差异显著( $P<0.01$ ); 在无淋巴结转移的肿瘤组织 KAI1 蛋白阳性率为 83.9%, 显著高于淋巴结转移的肿瘤组织的 20.0%( $P<0.01$ )。在 TNM I+II 期, KAI1 蛋白阳性率为 82.8%, 明显高于 TNM III+IV 期的 25.9%( $P<0.01$ )。然而, KAI1 蛋白阳性率在不同的组织学类型与不同分化程度的癌组织中, 其阳性检出率差异无统计学意义。术后生存期限在 1 年以内的 8 例患者中 KAI1 蛋白阳性率为 37.5%, 1 年以上的 20 例患者阳性率为 55.5%, 无显著差异( $P>0.05$ )(表 2)。经 Leica-Qwin 计算机图象定量分析显示, 在各临床病理

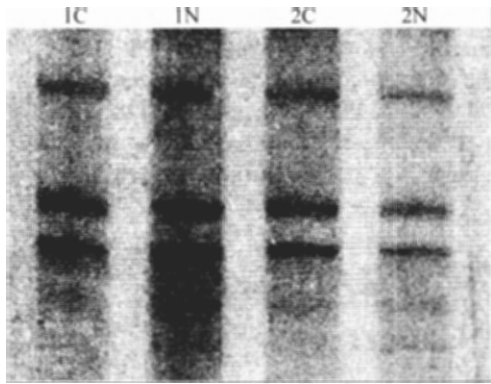
参数影响下, KAI1 蛋白的表达强度没有差异。

## 2.2 D11S1326、D11S1344 位点 MSI、LOH 结果

实验组和对照组 D11S1326、D11S1344 位点微卫星片段均扩增成功。经 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 其等位基因均为杂合子。然而检测结果表明, 56 例胃癌 D11S1326、D11S1344 位点的 SSCP 分析中, 均未出现 MSI 或 LOH(图 3, 图 4)。56 例胃癌 D11S1326 位点 MSI 和 LOH 发生率均为 0, D11S1344 位点 MSI 和 LOH 发生率也均为 0。

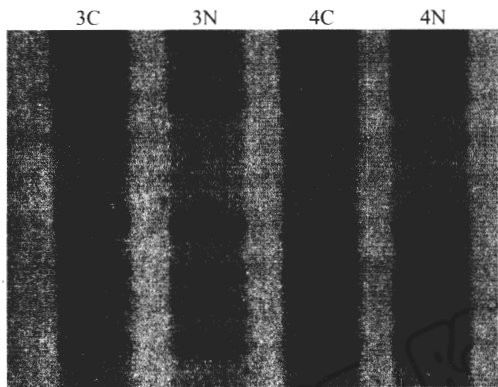
## 3 讨论

KAI1 基因最初由 Dong 等<sup>[1]</sup>在实验中用 Alu-PCR 分离出来, 能抑制鼠前列腺癌细胞肺转移但不影响其致瘤能力。已有研究表明, KAI1 基因对绝大多数恶性肿瘤起到抑制转移的作用, 如食管癌<sup>[6]</sup>、结肠癌<sup>[7]</sup>、



**Fig.3 Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of D11S1344 locus**

There was no difference between tumor tissue (1C, 2C) and their normal tissue (1N, 2N), respectively.



**Fig.4 Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of D11S1326 locus**

There was no difference between tumor tissue (3C, 4C) and their normal tissue (3N, 4N), respectively.

乳腺癌<sup>[8]</sup>等,其表达水平与肿瘤的分化程度、转移、预后显著相关,可作为肿瘤预后的一个指标。而该基因在胃癌组织中的表达,各学者得出的结论分歧较大。我们的研究表明,KAI1蛋白与胃癌组织的浸润深度、淋巴转移情况及TNM分期密切相关:随着癌组织浸润程度的加深,KAI1蛋白表达率呈降低趋势,淋巴结转移组显著低于无淋巴结转移组,TNM III+IV期明显低于TNM I+II期, $P<0.01$ 。这与Tsutsumi等<sup>[3]</sup>实验结果相一致。可见,与食管癌、结肠癌等其他肿瘤一样,在胃癌发生发展中,KAI1蛋白表达水平的下降是常见的分子事件,同时KAI1蛋白表达水平的降低可能提高了胃癌的转移潜能,其表达水平可作为评估肿瘤生物学行为的重要指标<sup>[9]</sup>。

肿瘤的浸润和转移预示着患者不良的预后,KAI1蛋白表达水平对肿瘤患者的预后也有一定的影响。Schindl等<sup>[10]</sup>观察了107例I~IV期的卵巢上皮癌中

KAI1基因的表达情况,结果表明KAI1基因高表达组相对KAI1基因低或缺失表达组的存活率明显增加( $P<0.01$ ),认为KAI1基因表达减少可作为卵巢癌的一个独立的预后标志。Son等<sup>[8]</sup>研究KAI1蛋白表达与乳腺癌患者的生存率关系,结果发现两者紧密相关,并认为KAI1的表达水平是乳腺癌的预后因子。而我们的实验结果显示,KAI1蛋白表达对胃癌患者的术后生存期并无影响( $P>0.05$ ),这种研究结果的差异可能与肿瘤组织的不同,或样本量及术后生存年数的界定有关,有待于进一步的研究。

微卫星是由2~6个核苷酸组成,具有高度多态性的简单串联核苷酸重复序列。MSI是指由于复制错误导致微卫星的增多或减少。LOH是指一个位点上两个多态性的等位基因中的一个出现缺失或变异。大量研究表明,抑癌基因MSI与LOH在肿瘤的多步骤发生过程中起着重要的作用。作为KAI1基因的分子标志,微卫星D11S1344、D11S1326位点被认为是检测KAI1基因MSI和LOH的候选位点。Tagawa等<sup>[4]</sup>对46例肺癌KAI1基因D11S1344、D11S1326位点微卫星分析,结果未检测到LOH或MSI的发生,并认为KAI1基因表达水平的降低与该基因遗传不稳定无关。我们对56例原发性胃癌D11S1344、D11S1326的SSCP分析中,也未发现MSI或LOH,该结果提示在胃癌的发展中,KAI1基因并没有遗传不稳定性的改变,遗传不稳定可能不是影响该基因在胃癌中表达改变及胃癌恶性进展的因素。这与我们曾报道过的nm23H1基因的遗传不稳定性相差甚远,在胃癌<sup>[11]</sup>、结肠癌<sup>[12]</sup>及卵巢上皮性肿瘤<sup>[13]</sup>中,nm23H1基因MSI多发生在预后较好的临床早期癌组织中,LOH多发生于癌晚期,两者通过不同的途径调控癌的发生和转移。对于KAI1基因与nm23H1基因遗传不稳定性研究的截然不同的结果差异,可能与基因的表达及作用机制不同有关,有待于进一步深入研究。

本研究从蛋白质水平表明了KAI1基因在胃癌中的转移抑制作用,其表达水平可作为评估肿瘤细胞的转移潜能的一个指标,也为控制肿瘤扩散的治疗提供了新思路。但KAI1基因在胃癌中的表达机制,KAI1基因对胃癌的转移抑制机制以及KAI1基因作为胃癌患者的一个预后因子,其临床实际应用价值仍有待大规模、多角度作进一步研究。

#### 参考文献(References)

- [1] Dong JT et al. *Science*, 1995, 268: 884



- [2] Guo XZ *et al. Cancer Res*, 1998, **58**: 753  
[3] Tsutsumi S *et al. Hepatogastroenterology*, 2005, **52**: 281  
[4] Tagawa K *et al. Jpn J Cancer Res*, 1999, **90**: 970  
[5] Hao XP *et al. Cancer Res*, 2000, **60**: 18  
[6] Miyazaki T *et al. Anticancer Res*, 2005, **25**: 4005  
[7] Wu DH *et al. World J Gastroenterol*, 2004, **10**: 2245  
[8] Son BH *et al. Pathology*, 2005, **37**: 131  
[9] Zheng HC *et al. Chin Med Sci J*, 2004, **19**: 193  
[10] Schindl M *et al. Gynecol Oncol*, 2001, **83**: 244  
[11] 林兴秋等. *实验生物学报*, 2005, **38**: 148  
[12] Su ZH *et al. World J Gastroenterol*, 2004, **10**: 2800  
[13] 杨月琴等. *实验生物学报*, 2005, **38**: 233

## Expression and Genetic Instability of KAI1 Gene in Chinese with Gastric Cancer

Yue-Qin Yang, Xue-Rong Chen<sup>1</sup>, Feng-Yun Zheng, Xian-Tu Zhang<sup>1</sup>, Ji-Cheng Li\*

(*Institute of Cell Biology, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China; <sup>1</sup>Taizhou First Hospital of Zhejiang, Huangyan 318020, China*)

**Abstract** The aim of the study was to study the expression of KAI1 protein and the genetic instability of KAI1 gene, and their relationship with clinical pathological behaviors in Chinese with gastric cancer, which will illustrate the evaluation of tumor metastasis and the prognosis in gastric carcinoma, and provide experimental basis for the mechanism of KAI1 gene. Techniques such as Envision immunohistochemistry and Leica-Qwin computer imaging techniques were used to assess the expression of KAI1 protein. DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues, polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP), ordinary silver stain were used to study microsatellite instability (MSI) and loss of heterozygosity (LOH) of locus D11S1344 and D11S1326. In our experiment, the expression rate of KAI1 protein was 55.4% (31/56). With the infiltration of tumor, the frequency of KAI1 protein appeared decrease tendency ( $P < 0.01$ ). Moreover, the frequency in lymph node metastasis cases was (83.9%) significantly higher than those without (20.0%,  $P < 0.01$ ). Stage TNM I+II (82.8%) also exhibited higher frequency of KAI1 protein than stage TNM III+IV (25.9%,  $P < 0.01$ ). However, none of 56 gastric cancers showed LOH or MSI at locus D11S1344 and D11S1326. The results indicated that the expression of KAI1 protein has great relationship with the infiltration of tumor, the lymph node metastasis and the prognosis of gastric carcinoma. There is rare LOH or MSI in KAI1 gene in gastric carcinoma.

**Key words** KAI1 gene; gastric carcinoma; immunohistochemistry; microsatellite instability; loss of heterozygosity

Received: June 29, 2006 Accepted: November 16, 2006

\*Corresponding author. Tel: 86-571-88208088, E-mail: lijichen@zju.edu.cn