

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.01.004

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.01.004

Kank1 基因在食管鳞状细胞癌的表达

王玻玮¹, 王雯¹, 马方婧², 马遇庆¹

(新疆医科大学第一附属医院 1. 病理科; 2. 乳腺科, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的: 研究Kank1基因在食管鳞状细胞癌中的表达差异及与临床病理学参数的关系。方法: 采用免疫组织化学学法(IHC)和运用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术分别检测63例食管鳞状细胞癌及其相对应的癌旁组织中Kank1蛋白和mRNA的表达; 统计分析Kank1基因与食管鳞状细胞癌患者临床病理学资料的相关性。结果: Kank1蛋白在食管鳞状细胞癌组织中低表达, 阳性表达率为20%, 而在相对应的癌旁组织中高表达, 表达率为95%。Kank1蛋白在食管鳞状细胞癌组织中的阳性表达率显著低于其在正常组织中的阳性表达($P < 0.05$); Kank1在正常食管黏膜与鳞状细胞癌组织中mRNA表达有明显差异。此外, Kank1蛋白表达与肿瘤的分化程度有相关性, 与患者性别、族别、年龄、肿瘤大小、淋巴结转移无相关性。结论: Kank1在食管鳞癌组织中表达降低, 提示Kank1可能参与了食管鳞状细胞的发生发展, 可能是一个潜在抑癌基因。

[关键词] 食管鳞癌; Kank1; 抑癌基因

Kank1 gene expression in esophageal squamous cell carcinoma

WANG Bowei¹, WANG Wen¹, MA Fangjing², MA Yuqing¹

(1. Department of Pathology; 2. Department of Breast Surgery, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

Abstract **Objective:** To investigate the Kank1 expression levels in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and its relationship with clinicopathological data. **Methods:** Immunohistochemistry and real-time quantitative PCR (qRT-PCR) were used to detect the expression of Kank1 protein and mRNA in 63 cases of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and corresponding adjacent tissues, respectively. The correlation between Kank1 and the clinicopathologic parameters of ESCC was statistically analyzed. **Results:** The positive expression rate of Kank1 protein was 95% in normal tissues, and its positive expression rate in ESCC tissues was 20%. The expression of Kank1 in ESCC tissues was significantly lower than that in normal tissues ($P < 0.05$). The expression of Kank1 mRNA was significantly different in normal esophageal tissues and squamous cell carcinoma. In addition, the Kank1 expression was significantly associated with tumor differentiation. However, Kank1 protein and mRNA had

收稿日期 (Date of reception): 2017-11-15

通信作者 (Corresponding author): 马遇庆, Email: 394202231@qq.com

基金项目 (Foundation item): 新疆医科大学第一附属医院青年科学基金 (2014ZRQN20)。This work was supported by Youth Science Project Foundation of First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, China (2014ZRQN20).

no association with gender, ethnicity, age, tumor size, lymph node metastasis. **Conclusion:** The Kank1 expression levels decrease in ESCC and normal tissues, suggesting that Kank1 is a potential tumor suppressor of ESCC.

Keywords esophageal squamous cell carcinoma; Kank1; tumor suppressor gene

食管癌在不同国家和地区发病率有较大差别,是广泛流行于发展中国家的恶性肿瘤。2012年世界食管癌发病率为6.5/10万,世界人口标化死亡率为5.9/10万^[1],我国是食管癌的高发地区,发病率及病死率均居世界之首。其中,我国河南省每年因患食管癌死亡人数多达25 000余人,居全国第一位;新疆也是食管癌高发地区,以哈萨克族食管癌发病率最高。食管鳞癌是食管癌中最主要的病理学类型。

Kank1基因是kank家族的重要一员,位于9p24.3区域。起初,此基因是从肾细胞癌中克隆得到,并正式其为一个重要的肿瘤抑制基因,在肾、脑、肺等肿瘤组织中表达下调或失表达,提示Kank1基因参与了肿瘤的发生、发展^[2-3]。Kank1参与了多条信号通路的调控,包括P13K-AKT和Wnt等信号通路,通过激活或抑制此类通路发挥其生理学作用^[4]。本研究拟采用免疫组织化学方法(IHC)和实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术在蛋白水平及分子水平对已收集的63例食管鳞癌的石蜡组织标本和癌旁组织标本进行Kank1表达水平检测,并探讨其与临床病理参数的关系。

1 材料与方法

1.1 标本

收集新疆医科大学第一附属医院2012年1月至2014年12月手术切除食管癌组织蜡块63例及其对应的癌旁组织,均有术后组织病理证实,患者临床资料完整,均为首诊,未接受过任何治疗(放射治疗和化学治疗),临床资料和标本的收集均征求患者及家属的知情同意,并签署知情同意书。其中男46例,女17例;年龄35~81(中位64.03)岁;汉族27例,哈萨克族19例,维吾尔族17例。

1.2 主要试剂

兔多克隆抗体, Kank1抗体购自美国Abnova公司;免疫组织化学试剂盒、苏木精染色剂、DAB显色剂均购自上海生化试剂厂;中性树脂凝胶购

自上海碧云天生物技术有限公司;石蜡组织RNA提取试剂盒,反转录试剂盒及荧光染料及Kank1引物购自日本Takara公司。

1.3 主要仪器

高速低温离心机购于美国Thermo公司;核酸定量仪购于美国Thermo公司;ABI real-time PCR system, PCR仪和核酸凝胶成像系统购于美国Biosystems公司。

1.4 免疫组织化学检测 Kank1 蛋白表达

染色采用免疫组织化学SP法,严格按照试剂盒说明书操作,标本经石蜡包埋,常规组织4 μm切片,切片经二甲苯脱蜡,系列酒精脱水后微波炉进行抗原修复。自然冷却至室温,然后滴加1:400稀释的Kank1抗体,于4℃孵育过夜。以PBS漂洗,按说明书滴加二抗,DAB显色,苏木精复染,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.5 qRT-PCR 检测 Kank1 mRNA 表达

提取总RNA用TRIzol法,用紫外分光光度计进行定量,严格根据反转录试剂盒说明书将总RNA反转录成cDNA。Kank1上游引物序列为5'-GCAAGAAGAGAAAAGGCAGTTG-3',下游引物序列为5'-TCCTCACACCACAGACATTGAT-3';β-actin上游引物序列为5'-TG GTGACAGGGAA-GACAT-3',下游引物序列为5'-CCATAGTGAAGGCG-AACT-3';PCR反应温度条件为95℃ 3 min, 95℃ 10 s、退火30 s(Kank1, β-actin的退火温度分别为63℃, 55℃),反应共进行40个循环,并绘制熔解曲线。每个样本设置1个平行孔,取拷贝数均值进行统计分析。以β-actin作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行相对定量的方法分别比较食管癌组织及其癌旁组织中的Kank1 mRNA的表达差异。

1.6 结果判读

Kank1蛋白表达于细胞膜和细胞浆,呈黄色细小颗粒状,结果判定标准:随机选取至少10个

高倍镜视野, 计数1 000个细胞, 即根据每张切片的染色强度和阳性细胞比例计分, 结果均由两位以上高年资病理医师进行判读。根据细胞膜或细胞质着色深浅可分为: 无色0分; 浅黄色1分; 中黄色2分; 深棕色3分。根据阳性细胞率计分原则: 0%为0分; 1%~10%为1分; 11%~50%为2分; 51%~80%为3分, 81%~100%为4分; 着色强度和着色细胞率所得积分相乘, 0表示阴性, 1~2分为弱阳性表达(+), 3~4分为阳性表达(++), ≥ 5 分为强阳性表达(+++)。计分 ≤ 2 的统计为低表达组, 计分 ≥ 3 统计为高表达组。

1.7 统计学处理

采用SPSS 19.0统计学软件进行分析。计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 计数资料比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Kank1 蛋白在食管鳞癌和癌旁组织中的差异表达

本研究首先采用免疫组织化学法(IHC)检测63例食管鳞癌组织及对应的癌旁正常组织中Kank1蛋白的差异表达情况, 结果显示Kank1蛋白在食管鳞癌组织和癌旁组织中均有表达, 但存在表达差异。Kank1蛋白阳性表达主要定位于细胞浆和细胞膜上, 呈橙黄色细小颗粒, 其中在正常食管组织中Kank1的表达呈强阳性, 即细胞浆和细胞膜均着色; 在分化程度高的食管鳞癌组织中Kank1的阳性表达主要定位于细胞浆, 呈颗粒状着色; 而在分化程度低的食管鳞癌组织中Kank1的呈低表达或者失表达状态(图1)。Kank1在食管鳞癌组织中的高表达率为20%, 而在正常组织中的高表达率为95%, 差异有统计学意义($P<0.05$, 表1)。

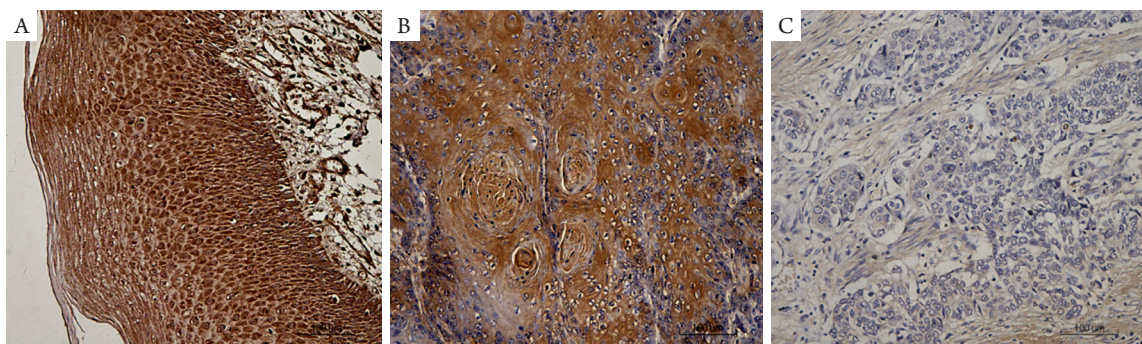


图1 Kank1 蛋白在不同食管组织中的表达

Figure 1 Expression of Kank1 protein in different esophageal tissues

(A)Kank1 蛋白在癌旁正常食管黏膜的表达(SP法, $\times 200$); (B)Kank1 蛋白在高分化鳞癌中的表达(SP法, $\times 200$); (C)Kank1 蛋白在低分化鳞癌中的表达(SP法, $\times 200$)。

(A) Expression of Kank1 protein in normal esophageal mucosa adjacent to cancer (SP, $\times 200$); (B) Expression of Kank1 protein in highly differentiated squamous cell carcinoma (SP, $\times 200$); (C) Expression of Kank1 protein in low differentiated squamous cell carcinoma (SP, $\times 200$).

表1 食管鳞癌和癌旁组织中Kank1蛋白表达情况($n=63$)

Table 1 Expression of Kank1 protein in esophageal squamous cell carcinoma and para cancerous tissue ($n=63$)

组别	阴性/[例(%)]	弱阳性/[例(%)]	阳性/[例(%)]	强阳性/[例(%)]	高表达率/%	P
癌组织	11 (18)	39 (62)	9 (14)	4 (6)	20	0.001
癌旁组织	2 (3)	1 (1)	8 (13)	52 (82)	95	

2.2 食管癌组织中 Kank1 蛋白表达与临床病理特征的关系

收集63例食管鳞癌患者的临床病理学资料,包括:民族、年龄、性别、瘤体大小、分化程度、TNM分期、淋巴结转移等,并根据Kan1的表达进行统计学分析,结果显示Kan1的表达与肿瘤患者的民族、性别、年龄、瘤体直径、淋巴结转移差异均无统计学意义($P>0.005$); Kank1的表达与肿瘤的分化程度有关,高分化鳞癌中Kan1的表达高于中-低分化鳞癌,差异有统计学

意义($P=0.001$, 表2)。

2.3 食管癌和癌旁组织中 Kank1 mRNA 的表达

食管鳞癌组织中Kank1 mRNA的相对表达量为 1.028 ± 0.056 ,癌旁正常组织中Kank1 mRNA的相对表达量为 1.685 ± 0.043 ,差异有统计学意义($P<0.001$)。癌旁正常组织中Kank1 mRNA的表达显著高于食管鳞癌组织中的表达; Kank1和 β -actin的扩增和熔解曲线如图2所示。

表2 食管鳞癌组织中Kank1蛋白表达情况与临床病理参数之间的相关性

Table 2 Correlation between the expression of Kank1 protein and the clinicopathological parameters in the tissue of esophageal squamous cell carcinoma

分组	n	Kank1蛋白表达/[例(%)]		χ^2	P
		低表达	高表达		
民族				0.827	0.661
汉族	27	20 (74)	7 (26)		
哈萨克族	19	16 (84)	3 (16)		
维吾尔族	17	14 (82)	3 (18)		
性别				1.095	0.295
男性	46	38 (83)	8 (17)		
女性	17	12 (71)	5 (29)		
年龄/岁				0.785	0.376
<60	18	13 (72)	5 (28)		
≥ 60	45	37 (82)	8 (18)		
瘤体直径/cm				0.443	0.506
<3	14	12 (86)	2 (14)		
≥ 3	49	38 (78)	11 (22)		
分化程度				11.293	0.001
高分化	16	8 (50)	8 (50)		
中-低分化	47	42 (89)	5 (11)		
淋巴结转移				0.027	0.87
转移	23	18 (78)	5 (22)		
未转移	40	32 (80)	8 (20)		

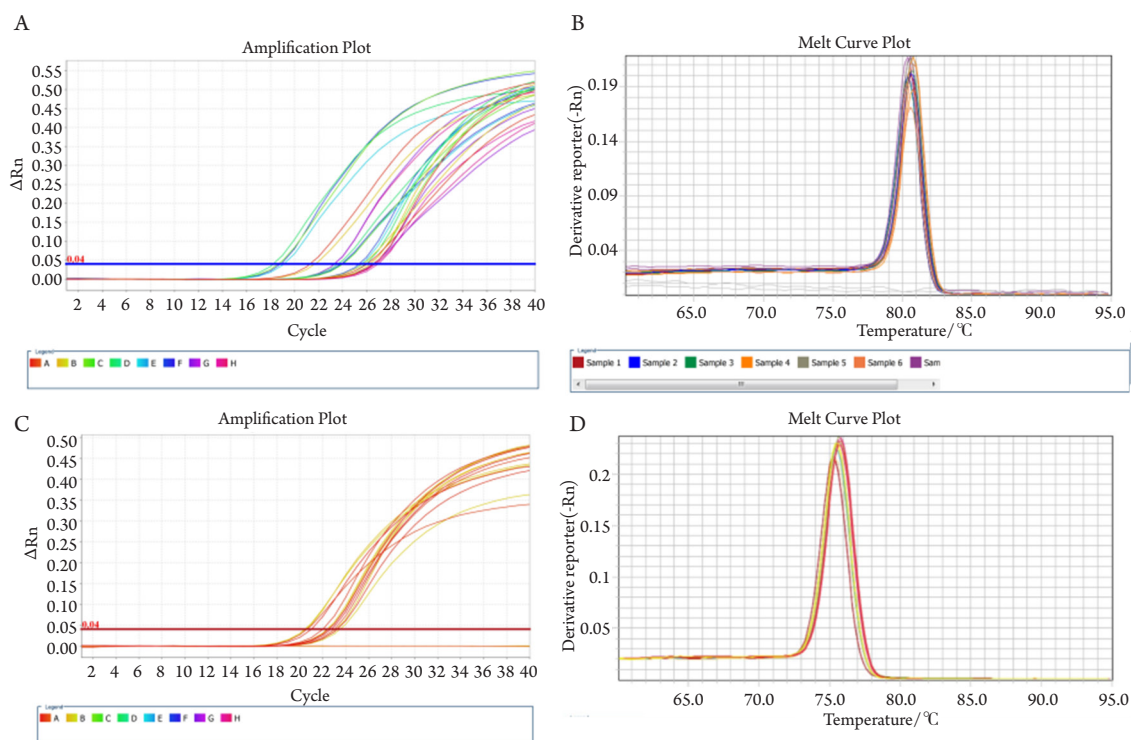


图 2 Kank1 和 β -actin 的扩增和溶解曲线

Figure 2 Amplification and dissolution curves of Kank1 and β -actin

(A) Kank1 的扩增曲线; (B) Kank1 的溶解曲线; (C) β -actin 的扩增曲线; (D) β -actin 的溶解。

(A) Amplification curve of Kank1; (B) Dissolution curve of Kank1; (C) Amplification curve of β -actin; (D) Dissolution of β -actin.

3 讨论

在全世界范围内, 中国是食管癌高发国家之一, 尤其是从中国横跨中亚的食管癌高发地带, 生活在此地区的居民罹患食管癌的风险比周边地区同等人群罹患率高 5~20 倍^[5]。然而, 新疆是一个多民族聚居区, 同样也是我国食管癌高发地区之一。其中, 哈萨克族食管癌罹患率很高(150/10 万)^[6-7], 并且呈逐年上升趋势。研究^[8]表明: 食管癌的发生具有显著的种族特异性和地域特异性, 这一特征提示研究人员, 食管癌可能是一种与遗传和环境密切相关的疾病。此外, 食管癌还存在着基因组表达的不稳定现象。由此得出, 遗传易感性可能也是食管癌发生、发展的一个重要影响因素, 对食管癌易感基因的探索研究已经逐渐成为阐明其发生机制的关键。抑癌基因即为细胞代谢内的正常基因, 其表达产物对细胞增殖具有负性调节作用, 对维持体内、外正常的生理平衡具有极其重要的作用。当抑癌基因低表达或者失表达时, 体内的生理平衡会因此遭到破坏, 促使细胞增殖失控, 凋亡产生异常, 进而促进了肿瘤的发生与发

展。在分子遗传学上, 导致抑癌基因低表达或者失表达的机制主要包括基因突变和染色体丢失, 表观分子遗传学上包括 DNA 启动子甲基化、组蛋白乙酰化、染色体重构、长链 RNA 和非编码 RNA 的调控几个方面^[9-10]。

2002 年, 日本学者^[2]采用杂合性缺失分析等方法在肾细胞癌组织中克隆鉴定得到的一个候选抑癌基因, 即 Kank1 基因, 此基因位于人染色体 9P24.3, Kank1 在人体的表达非常广泛, 在很多组织内均有表达, 如肾小管上皮细胞和结肠的腺细胞、胃及其它消化器官。在腺细胞内, 如甲状腺、胰腺、肾上腺、内分泌腺、前列腺等细胞中可见^[11]。近年来, 许多研究发现抑癌基因高频突变或缺失可能是导致基因表达异常和功能失活的原因之一。其中染色体 9p 在多种肿瘤中存在表达缺失, 如肾细胞癌、子宫颈鳞癌、膀胱移行细胞癌、肝癌、前列腺腺癌、肺癌、急性淋巴细胞白血病和乳腺癌。并发现 kank1 基因所在位点缺失可能因为表观遗传学改变, 导致其基因表达下调^[12-16]。因此, 可以推测 kank1 基因的表达异常可能与肿瘤的发生、发展密切相关。

本研究结果显示在食管癌旁组织中Kank1蛋白的阳性高表达率为95%，而在其对应的癌组织中阳性高表达率仅为20%；在食管鳞癌组织与癌旁组织中Kank1 mRNA的相对表达量差异有统计学意义。本实验通过Kank1的免疫组织化学染色和RT-PCR技术分别在蛋白水平和mRNA水平检测了食管鳞癌组织中Kank1基因存在表达下调或缺失，表明Kank1可能是一个潜在的抑癌基因。这与国内外文献[12-16]报道相一致。

本研究还对食管鳞癌组织中Kank1蛋白表达与临床病理间的关系做了统计学分析，结果表明：食管鳞癌组织中Kank1蛋白表达与患者的族别、性别、年龄、瘤体直径、淋巴结是否转移无明显相关性，而与肿瘤的分化程度有相关性。研究数据显示：肿瘤的分化程度越高，蛋白表达率越高。本组数据中共有16例高分化(光镜下可以看到角化珠)的食管鳞癌，其中8例呈阳性/强阳性表达，在低表达组的8例中，亦有4例呈弱阳性表达，阳性率为75%。而在中低分化组的47例组织中，有5例呈阳性/强阳性表达，42例低表达组中，有7例呈弱阳性，阳性表达率为26%；显著低于高分化组，两者之间存在统计学意义。本研究结果也证实了肿瘤分化程度越高，其细胞的形态就越接近正常细胞，因此抗原丢失的相对较少，表达就相对较多，这与肿瘤的分化程度的定义是一致的^[17]。我国肖珊等^[18]在研究Kank1在肺癌的表达研究中提示肿瘤的分化程度与Kank1表达无明显相关性，结果的差异提示Kank1基因的与肿瘤作用机制尚未明确，可能需要其他复杂的作用机制完成对肿瘤的抑制作用，需要加大样本量进一步研究。

综上，Kank1基因在食管鳞癌组织中表达下调或缺失，该基因食管鳞癌的发生发展，可能是一个潜在的抑癌基因，有关其表达下调的机制有待进一步深入研究。

参考文献

1. International Agency for Research on cancer. GOLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012, 2015[EB/OL]. [2016-5-11]. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
2. Sarkar S, Roy BC, Hatano N, et al. A novel ankyrin repeat containing gene(kank) located at 9p24 is a growth suppressor of renal cell carcinoma[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(39): 36585-36591.
3. Medves S, Duhoux FP, Ferrant A, et al. KANK1, a candidate tumor suppressor gene, is fused to PDGFRB in an imatinib responsive myeloid neoplasm with severe thrombocytopenia[J]. *Leukemia*, 2010, 24(5): 1052-1055.
4. Roy BC, Kakinuma N, Kiyama R. Kank attenuates actin remodeling by preventing interaction between IRSp53 and Rac1[J]. *J Cell Biol*, 2009, 184(2): 253-267.
5. Kaïrakbaev MK. Malignant neoplasms among ethnic groups in the Kazakh SSR[J]. *Vopr Onkol*, 1978, 24(6): 100-104.
6. 李连弟, 鲁凤珠, 张思维, 等. 中国恶性肿瘤死亡率20年变化趋势和近期预测分析[J]. *中华肿瘤杂志*, 1997, 19(1): 3-9.
7. LI Liandi, LU Fengzhu, ZHANG Siwei, et al. The 20 year change trend and recent prediction analysis of the mortality of malignant tumor in China[J]. *Chinese Journal of Oncology*, 1997, 19(1): 3-9.
8. 周素明, 伊利亚尔·夏合丁, 杨婷, 等. HPV16与新疆维吾尔族食管鳞癌的相关性[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(31): 3214-3217.
9. ZHOU Suming, ILYAR Sheyhidin, YANG Ting, et al. Relationship between human papillomavirus 16 and esophageal squamous cell carcinoma in Uygur population in Xinjiang Uygur Autonomous Region[J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2009, 17(31): 3214-3217.
10. 王慧, 李梦妍, 袁媛, 等. 172例新疆哈萨克族食管鳞状细胞癌临床病理资料分析[J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(4): 562-565.
11. WANG Hui, LI Mengyan, YUAN Yuan et al. The clinicopathological data of 172 patient with esophageal squamous cell carcinoma in the Kazak population in Xinjiang[J]. *Journal of Modern Oncology*, 2016, 24(4): 562-565.
12. Esteller M. Epigenetics in cancer[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(11): 1148-1159.
13. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, et al. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer[J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(7): 687-692.
14. Roy BC, Aoyagi T, Sarkar S, et al. Pathological characterization of Kank in renal cell carcinoma[J]. *Exp Mol Pathol*, 2005, 78(1): 41-48.
15. Huang SF, Hsu HC, Fletcher JA. Investigation of chromosomal aberrations in hepatocellular carcinoma by fluorescence in situ hybridization[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 1999, 111(1): 21-27.
16. Heidenriblad M, Schoenmakers EF, Jonson T, et al. Genome-wide array-based comparative genomic hybridization reveals multiple amplification targets and novel homozygous deletions in pancreatic carcinoma cell lines[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(9): 3052-3059.
17. Lo KC, Stein LC, Panzarella JA, et al. Identification of genes involved in squamous cell carcinoma of the lung using synchronized data from DNA copy number and transcript expression profiling analysis[J]. *Lung Cancer*, 2008, 59(3): 315-331.
18. An HX, Claas A, Savellyeva L, et al. Two regions of deletion in 9p23-24 in sporadic breast cancer[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(16): 3941-3943.
19. 郑志范, 苏华芳, 邹燕, 等. microRNA在食管癌放射抵抗细胞表

- 达谱研究[J]. 中华医学杂志, 2011, 91(9): 639-642.
- ZHENG Zhifan, SU Huafang, ZOU Yan, et al. Expression profiles of microRNAs in radioresistant esophageal cell line[J]. National Medical Journal of China, 2011, 91(9): 639-642.
17. 李玉林, 文继舫, 唐建武, 等. 病理学[M]. 8版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 83.
- LI Yulin, WEN Jifang, TANG Jianwu, et al. Pathology[M]. 8th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2014: 83.
18. 肖珊, 魏旺丽, 肖志强, 等. Kank1基因在肺癌中的表达及其意义[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 21(31): 26-29.
- XIAO Shan, WEI Wangli, XIAO Zhiqiang, et al. Expression and clinical significance of Kank1 in lung cancer[J]. China Journal of Modern Medicine, 2014, 21(31): 26-29.

本文引用: 王玻玮, 王雯, 马方婧, 马遇庆. Kank1基因在食管鳞状细胞癌的表达[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(1): 16-22. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.01.004

Cite this article as: WANG Bowei, WANG Wen, MA Fangjing, MA Yuqing. Kank1 gene expression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2018, 38(1): 16-22. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.01.004