

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.05.008

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.05.008

## ALDH1 和 KiSS-1 在大肠癌中的表达及其临床意义

田静<sup>1</sup>, 李学敏<sup>1</sup>, 吴莉莉<sup>1</sup>, 代群<sup>1</sup>, 张湛<sup>2</sup>

(1. 安徽医科大学第三临床学院, 合肥市第三人民医院病理科, 合肥 230022;

2. 肥西县人民医院病理科, 合肥 231200)

**[摘要]** 目的: 检测ALDH1和KiSS-1蛋白在结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)组织中的表达情况, 分析其与CRC浸润、转移及预后的关系。方法: 采用免疫组织化学EnVision法检测102例CRC组织和50例正常结直肠黏膜组织中ALDH1和KiSS-1蛋白的表达情况。结果: 对照组中ALDH1和KiSS-1蛋白的阳性表达率分别为10.0%和96.0%; CRC组中ALDH1和KiSS-1蛋白的阳性表达率分别为61.8%和38.2%, 两组之间表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。ALDH1和KiSS-1蛋白的阳性表达率在CRC肿瘤组织淋巴结转移与否以及不同TNM分期之间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。Spearman相关分析表明ALDH1蛋白的阳性表达与KiSS-1蛋白的阳性表达之间呈负相关( $P < 0.05$ )。Kaplan-Meier生存分析表明: 在CRC中ALDH1蛋白阳性组患者术后总的生存时间显著低于其阴性组患者, 而KiSS-1蛋白阳性组患者术后总的生存时间显著高于其阴性组患者, log-rank组间分析表明差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。多因素分析显示: ALDH1和KiSS-1蛋白的阳性表达、TNM分期均是影响CRC患者术后总的生存时间的独立预后因子。结论: 反常表达的ALDH1和KiSS-1促进CRC的浸润和转移。在CRC患者中早期联合检测ALDH1和KiSS-1蛋白的表达对预测CRC浸润、转移和预后均有意义。

**[关键词]** 结直肠癌; 乙醛脱氢酶1; KiSS-1; 免疫组织化学; 预后

## Expression of ALDH1 and KiSS-I in colorectal carcinoma and its clinical significance

TIAN Jing<sup>1</sup>, LI Xuemin<sup>1</sup>, WU Lili<sup>1</sup>, DAI Qun<sup>1</sup>, ZHANG Zhan<sup>2</sup>

(1. Department of Pathology, Third People's Hospital of Hefei, Third Clinical College of Anhui Medical University, Hefei 230022;

2. Department of Pathology, People's Hospital of Feixi County, Hefei 231200, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the expression of ALDH1 and KiSS-1 protein in colorectal carcinoma (CRC) and their clinical significance. **Methods:** Expression of ALDH1 and KiSS-1 protein was detected by immunohistochemistry containing 102 samples of CRC tissues and 50 samples of normal colorectal mucosa tissues. **Results:** The positive rates of ALDH1 and KiSS-1 protein in the control tissues and CRC tissues were 10.0%, 96.0% and 61.8%, 38.2%, respectively. And there was a significant difference between the two groups ( $P < 0.05$ ). Furthermore, their positive expressions were significantly correlated with lymph node metastasis (LNM) and tumor node metastasis (TNM)

收稿日期 (Date of reception): 2019-08-05

通信作者 (Corresponding author): 田静, Email: 839426247@qq.com

stages (all  $P < 0.05$ ). Spearman correlation analysis demonstrated that there was a negative association between ALDH1 expression and KiSS-1 expression ( $P < 0.05$ ). Kaplan-Meier survival analysis demonstrated that patients with positive expression of ALDH1 had an unfavorable overall survival time when compared with patients with negative expression of ALDH1; and there was a favorable overall survival time for patients with positive expression of KiSS-1 when compared with patients with negative expression of KiSS-1. Multivariate analysis demonstrated that positive expression of ALDH1 and KiSS-1, as well as TNM stages should be considered as independently prognostic factors for overall survival time in CRC patients. **Conclusion:** Abnormal expression of ALDH1 and KiSS-1 should promote CRC infiltration and metastasis. The combined detection of expression of ALDH1 and KiSS-1 protein should play an important role in predicting the infiltration, metastasis, and prognosis of CRC patients at the early stage.

**Keywords** colorectal carcinoma; acetaldehyde dehydrogenase 1; KiSS-1; immunohistochemistry; prognosis

结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)的年发病率位居全球所有肿瘤中的第3位, 2018年全世界新增CRC患者超过180万人, 死亡约88.1万人<sup>[1]</sup>。在中国, CRC的年发病率位居所有肿瘤的第5位, 新增癌症患者约376 300人<sup>[2]</sup>。CRC的发病率逐年上升, 并呈现出年轻化的趋势。尽管近年来各种新的治疗技术和方法不断涌现, 但是CRC患者术后总体生存时间并没有明显延长。恶性肿瘤治疗失败最常见的原因就是患者治疗后的转移与复发。这可能与肿瘤细胞群体中的小部分细胞有关, 即肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)。CSCs在多种肿瘤中具有自我更新、不对称分裂、诱导分化和天然抵抗放化疗的能力<sup>[3-6]</sup>。乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH)家族蛋白质正常情况下位于细胞质、细胞核和线粒体中, 可以参与一系列基本的生物学过程, 如细胞增殖、分化以及氧化应激等<sup>[7-8]</sup>。ALDH1是最常见一种CSCs标志物, 同时也是ALDH蛋白家族中的重要成员, ALDH1促进许多内源性和外源性乙醛的解毒和代谢, 以及维甲酸的合成<sup>[9]</sup>。ALDH1表达异常增高参与了多种肿瘤的发生和发展, 并促进其浸润转移。肿瘤转移抑制基因的失活通常是发生在肿瘤浸润和转移的早期事件。KiSS-1是一种肿瘤转移抑制基因, 在黑色素瘤中通过消减杂交方法首次被发现。正常表达的KiSS-1蛋白可以抑制细胞的增殖、运动、浸润和转移<sup>[10]</sup>。表达降低(通过杂合性缺失或启动子区的甲基化等)的KiSS-1能够促进肿瘤组织的浸润和转移。本研究主要利用免疫组织化学EnVision方法检测102例CRC患者肿瘤组织中ALDH1和KiSS-1蛋白的表达, 并分析其与CRC肿瘤组织浸润、转移及

预后的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

收集合肥市第三人民医院临床病理科和肥西县人民医院临床病理科2010年1月至2018年12月存档石蜡包埋的CRC组织标本102例(术前未行任何新辅助抗肿瘤治疗等), 选取相应的癌旁“正常”结直肠黏膜组织50例作为对照组。病例均有完善的临床资料和随访资料, 入选病例随访至患者死亡或截止至2019年3月(通过电话、QQ和微信等随访)。随访时间为4~90(中位数47.5)个月, 年龄34~78(中位数57.2)岁。50例“正常”结直肠黏膜组织均取自远离CRC肿瘤组织 $>5.0$  cm。其他详细的病理资料见表1。本研究经安徽省合肥市第三人民医院医学伦理委员会审核批准。

### 1.2 试剂

鼠抗人单克隆抗体ALDH1购自英国Abcam公司, 鼠抗人单克隆抗体KiSS-1购自美国Santa Cruz公司; EnVision和DAB显色试剂盒购自中国北京中杉金桥生物技术开发有限公司。

### 1.3 方法

CRC标本和对照组标本均经4%中性甲醛溶液固定, 经过石蜡包埋, 连续4  $\mu\text{m}$ 厚切片, 最后用二甲苯及梯度浓度的乙醇溶液连续脱蜡至水洗。ALDH1和KiSS-1蛋白的免疫组织化学染色步骤根据试剂盒说明书操作, 阳性对照用已知阳性切片, 空白对照用PBS液替代一抗。

表1 ALDH1和KiSS-1蛋白在CRC中的表达情况及其与临床各病理参数的关系

Table 1 Correlation between the expression of ALDH1 and KiSS-1 and clinicopathological characteristics in CRC

| 参数        | ALDH1 |    |          | KiSS-1 |    |          |
|-----------|-------|----|----------|--------|----|----------|
|           | 阴性    | 阳性 | <i>P</i> | 阴性     | 阳性 | <i>P</i> |
| 性别        |       |    | 0.141    |        |    | 0.141    |
| 男         | 23    | 46 |          | 46     | 23 |          |
| 女         | 16    | 17 |          | 17     | 16 |          |
| 年龄/岁      |       |    | 0.167    |        |    | 0.582    |
| <60       | 20    | 41 |          | 39     | 22 |          |
| ≥60       | 19    | 22 |          | 24     | 17 |          |
| 直径/cm     |       |    | 0.006    |        |    | <0.001   |
| ≤2.0      | 10    | 6  |          | 2      | 14 |          |
| >2.0~5.0  | 23    | 30 |          | 33     | 20 |          |
| >5.0      | 6     | 27 |          | 28     | 5  |          |
| 位置        |       |    | 0.182    |        |    | 0.363    |
| 结肠        | 28    | 37 |          | 38     | 27 |          |
| 直肠        | 11    | 26 |          | 25     | 12 |          |
| 大体类型      |       |    | 0.492    |        |    | 0.220    |
| 息肉型       | 14    | 18 |          | 23     | 9  |          |
| 溃疡型       | 14    | 20 |          | 17     | 17 |          |
| 浸润型       | 5     | 16 |          | 12     | 9  |          |
| 胶样型       | 6     | 9  |          | 11     | 4  |          |
| 分化        |       |    | 0.031    |        |    | 0.446    |
| 高         | 5     | 6  |          | 7      | 4  |          |
| 中         | 30    | 36 |          | 38     | 28 |          |
| 低         | 4     | 21 |          | 18     | 7  |          |
| 淋巴结转移     |       |    | <0.001   |        |    | <0.001   |
| 无         | 35    | 32 |          | 31     | 35 |          |
| 有         | 4     | 31 |          | 32     | 4  |          |
| 浸润深度      |       |    | 0.802    |        |    | 0.139    |
| 黏膜下层      | 7     | 7  |          | 6      | 8  |          |
| 肌层        | 12    | 22 |          | 19     | 15 |          |
| 浆膜层       | 19    | 32 |          | 35     | 16 |          |
| 穿透浆膜层     | 1     | 2  |          | 3      | 0  |          |
| TNM分期     |       |    | 0.001    |        |    | <0.001   |
| I         | 19    | 16 |          | 14     | 21 |          |
| II        | 15    | 17 |          | 17     | 15 |          |
| III       | 5     | 30 |          | 32     | 3  |          |
| KiSS-1表达* |       |    | <0.001   |        |    |          |
| 阴性        | 14    | 49 |          |        |    |          |
| 阳性        | 25    | 14 |          |        |    |          |

\* $r=-0.419$ , 呈负相关。\* $r=-0.419$ , showing a negative correlation.

### 1.4 结果判定

ALDH1和KiSS-1蛋白均主要以细胞质出现黄色或棕黄色颗粒为阳性着色。阳性结果的判定主要根据染色强度和染色范围分别计分相乘得出的分数, 具体判定方法可见文献[4]。染色强度: 不着色为0分, 淡黄色为1分, 黄色为2分, 棕黄色为3分。染色范围根据阳性细胞数分为: <11%为1分, 11%~50%为2分, 51%~75%为3分, >75%为4分。将染色强度和染色范围相乘, 得出一个介于0~12的值。根据均数来计算, 若积分 $\geq 3$ 分为阳性表达, <3分为不表达。免疫组织化学标记染色结果的判定由2位高年资病理医师通过独立双盲法得出。

### 1.5 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件进行数据分析。在CRC组织中, ALDH1和KiSS-1蛋白的阳性表达与对照组“正常”结直肠黏膜组织、各临床参数之间以及相互的关系采用 $\chi^2$ 和Spearman等级相关检验; ALDH1和KiSS-1蛋白阳性表达组和阴性组患者术后总体生存时间分析采用Kaplan-Meier法, 组

间比较采用log-rank法检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组 ALDH1 蛋白的表达情况及其与临床病理参数的关系

在对照组中, ALDH1蛋白的阳性表达率为10.0%(5/50), CRC组中其阳性率为61.8%(63/108), 两组之间的表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 图1A, 1B)。在CRC组中, 随着肿瘤组织分化越差, ALDH1蛋白的阳性率越高; 肿瘤组织越大, ALDH1蛋白的阳性率越高, 淋巴结转移组中的ALDH1蛋白的阳性表达率显著高于其在未转移组中的表达率, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 高TNM分期中ALDH1蛋白阳性率显著其在低TNM分期中的阳性率, 差异亦有统计学意义( $P < 0.05$ )。ALDH1蛋白的阳性率与CRC患者的年龄、性别、位置、大体类型及浸润深度之间差异均无统计学意义( $P > 0.05$ , 表1)。

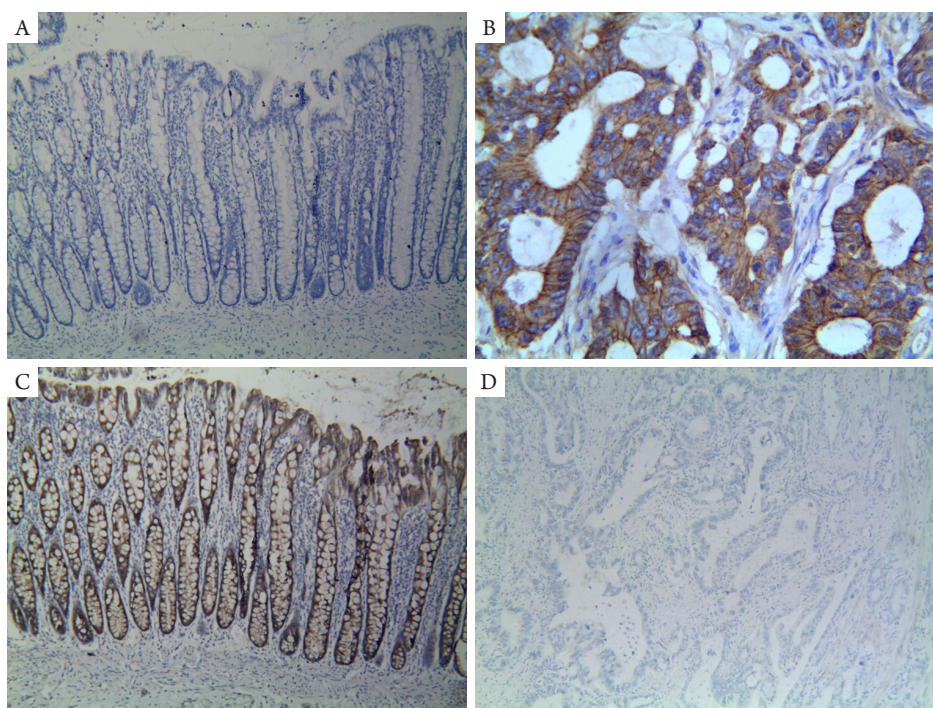


图1 ALDH1和KiSS-1在对照组和CRC组织中的表达

Figure 1 Expression of ALDH1 and KiSS-1 in the control group and CRC group

(A)ALDH1在对照组中的阴性表达(IHC,  $\times 100$ ); (B)ALDH1在CRC中的阳性表达(IHC,  $\times 400$ ); (C)KiSS-1在对照组中的阳性表达(IHC,  $\times 100$ ); (D)KiSS-1在CRC中的阴性表达(IHC,  $\times 40$ )。

(A) Negative expression of ALDH1 in the control tissue (IHC,  $\times 100$ ); (B) Positive expression of WWOX in the membrane and cytoplasm of CRC tissue (IHC,  $\times 400$ ); (C) Positive expression of KiSS-1 in the membrane and cytoplasm of control tissue (IHC,  $\times 100$ ); (D) Negative expression of KiSS-1 in the CRC tissue (IHC,  $\times 40$ ).



## 2.2 两组 KiSS-1 蛋白的表达情况及其与临床病理参数的关系

在对照组中, KiSS-1 蛋白的阳性率为 96.0% (48/50), CRC 组中起阳性率为 38.2% (39/102), 表达差异在两组之前有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 1C, 1D)。随着 CRC 肿瘤组织越大, KiSS-1 蛋白的阳性率越低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); KiSS-1 蛋白在淋巴结转移组中的阳性率显著低于其在未转移组中的阳性率, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 随着 TNM 分期越高, KiSS-1 蛋白的阳性率越低, 差异亦有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。此外, KiSS-1 蛋白的阳性表达率差异与 CRC 患者不同年龄、性别、肿瘤位置、浸润深度、大体类型及分化程度等之间均无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 表 1)。

## 2.3 CRC 组织中 ALDH1 和 KiSS-1 蛋白的关系

Spearman 等级相关分析显示: 在 CRC 组织中 ALDH1 蛋白的阳性率与 KiSS-1 蛋白的阳性率之间

呈负相关 ( $r = -0.419$ ,  $P < 0.001$ ; 表 1)。

## 2.4 多因素分析

将 CRC 患者的性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤位置、组织学类型、分化程度、浸润深度、淋巴结转移、TNM 分期、ALDH1 表达组、KiSS-1 表达组等因素带入 COX 多因素回归模型进行分析, 结果表明: ALDH1 和 KiSS-1 蛋白的阳性表达以及 TNM 分期是影响 CRC 患者术后生存时间的独立预后因素 (表 2)。

## 2.5 生存分析

Kaplan-Meier 生存分析表明: ALDH1 阳性表达组与阴性组患者的中位生存时间分别为 ( $38.1 \pm 20.0$ ) 个月和 ( $62.6 \pm 17.7$ ) 个月, log-rank 组间分析表明两组之间差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ , 图 2A); KiSS-1 阳性表达组与阴性组患者的中位生存时间分别为 ( $66.5 \pm 11.6$ ) 个月和 ( $35.7 \pm 19.3$ ) 个月, log-rank 组间分析提示两组之间差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ , 图 2B)。

表 2 102 例 CRC 患者的多因素分析

Table 2 Multivariate survival analysis of 102 patients with CRC

| 参数     | 偏回归系数  | 标准误   | P      | 相对风险度 | 95%CI       |
|--------|--------|-------|--------|-------|-------------|
| ALDH1  | 1.474  | 0.311 | <0.001 | 4.365 | 2.373~8.029 |
| KiSS-1 | -1.635 | 0.355 | <0.001 | 0.195 | 0.097~0.391 |
| TNM 分期 | 0.846  | 0.391 | 0.031  | 2.330 | 1.083~5.013 |

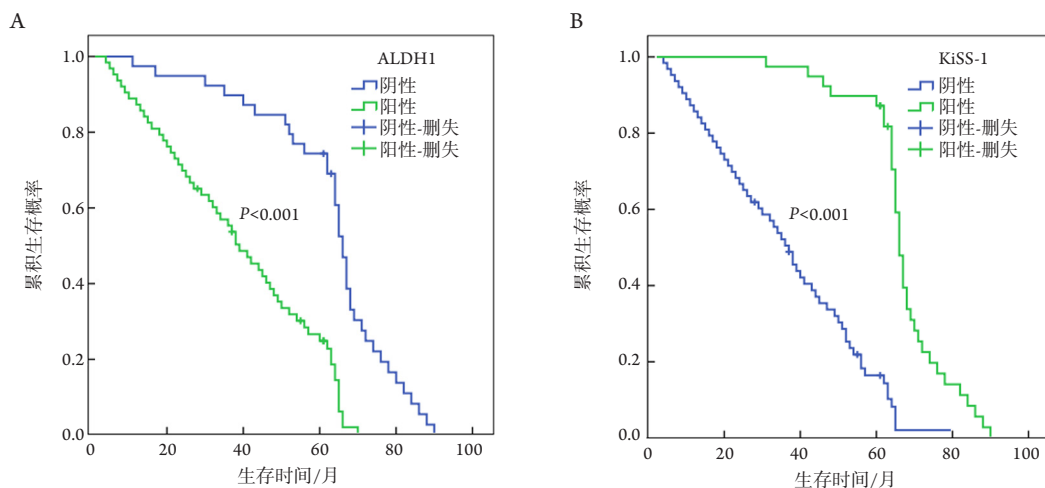


图 2 ALDH1(A)和 KiSS-1(B)阳性表达组与阴性组 CRC 患者生存曲线

Figure 2 Survival curves of CRC patients with positive or negative expression of ALDH1 (A) and KiSS-1 (B)

### 3 讨论

CRC是一种高度异质性的肿瘤,这种异质性会影响肿瘤标志物有效性的全面评估。因此,迫切需要找到能够充分、有效地评估CRC生物学行为的生物标志物。ALDH1是一种维生素A代谢相关的酶,也是一种常见的CSCs标志物。ALDH1的过表达能够增加乙醇相关癌症的发病风险<sup>[11]</sup>。在本研究中,我们发现ALDH1蛋白的阳性率与CRC肿瘤大小、分化程度高低、淋巴结转移与否及TNM分期高低之间呈正相关。此外,Kaplan-Meier生存分析表明ALDH1阳性表达的CRC患者其术后总体生存时间显著低于其阴性组患者。本研究结果与其他学者<sup>[4-5,12]</sup>的研究结果一致,表明ALDH1是一个预测CRC预后有价值的生物标志物。

KiSS-1是一种肿瘤转移抑制基因。KiSS-1可以抑制细胞的运动、浸润和转移,同时还可以降低肿瘤组织的转移潜力<sup>[13]</sup>。但KiSS-1的表达不能够抑制肿瘤的形成<sup>[14]</sup>。在本研究中,我们发现KiSS-1蛋白的阳性率与CRC肿瘤大小、淋巴结转移与否及TNM分期高低之间呈负相关;且生存分析表明KiSS-1蛋白阳性表达的CRC患者术后总体生存时间显著高于其阴性组患者。这些结果表明KiSS-1蛋白表达异常降低可能会促进CRC的进展和转移,这与其他学者的研究结果相似<sup>[5,10,14]</sup>。

TNM分期可以决定患者的预后和治疗策略,但是由于肿瘤在侵袭进展过程中的异质性表达,导致目前的TNM分期很难准确的反应每一个肿瘤的具体生物学行为。本研究的多因素分析发现ALDH1和KiSS-1蛋白的阳性表达及TNM分期是影响CRC患者术后生存时间的独立预后因子,Spearman等级相关分析发现ALDH1蛋白的阳性表达与KiSS-1蛋白的阳性表达之间呈负相关。ALDH1表达异常增高可能与CRC的发生有关,且会促进CRC的浸润、进展和转移。KiSS-1主要通过抑制NF- $\kappa$ B与MMP9启动子的结合,从而抑制MMP9对细胞外基质的降解,抑制肿瘤的浸润和转移<sup>[15]</sup>。而表达降低的KiSS-1(杂合性缺失或启动子的甲基化等)则丧失了其抑制CRC细胞浸润和转移的能力,因而进一步促进CRC的浸润和转移。

综上所述,表达异常增高的ALDH1可能与CRC的发生相关,促进CRC的浸润、进展和转移,而表达异常降低的KiSS-1可能会进一步促进其浸润转移。因此,可以早期联合检测CRC患者肿瘤组织中ALDH1和KiSS-1蛋白的表达情况,在某

种程度上能够预测CRC患者术后的浸润和转移以及预后情况。

### 参考文献

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
2. Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
3. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon cancer-initiating cells[J]. *Nature*, 2007, 445(7123): 111-115.
4. Zhou L, Yu L, Zhu B, et al. Metastasis-associated in colon cancer-1 and aldehyde dehydrogenase 1 are metastatic and prognostic biomarker for non-small cell lung cancer[J]. *BMC Cancer*, 2016, 16(1): 876.
5. Yu L, Zhu B, Wu S, et al. Evaluation of the correlation of vasculogenic mimicry, ALDH1, KiSS-1, and MACC1 in the prediction of metastasis and prognosis in ovarian carcinoma[J]. *Diagn Pathol*, 2017, 12(1): 23.
6. Balic A, Dorado J, Alonso-Gómez M, et al. Stem cells as the root of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(6): 691-704.
7. Kim IG, Lee JH, Kim SY, et al. Fibulin-3 negatively regulates ALDH1 via c-MET suppression and increases c-radiation-induced sensitivity in some pancreatic cancer cell lines[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 454(3): 369-375.
8. Li X, Xu Q, Fu X, et al. ALDH1A1 overexpression is associated with the progression and prognosis in gastric cancer[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 705.
9. Huo W, Du M, Pan X, et al. Prognostic value of ALDH1 expression in lung cancer: a meta-analysis[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(2): 2045-2051.
10. Zhu B, Wang Y, Wang X, et al. Evaluation of the correlation of MACC1, CD44, Twist1, and KiSS-1 in the metastasis and prognosis for colon carcinoma[J]. *Diagn Pathol*, 2018, 13(1): 45.
11. Druesne-Pecollo N, Tehard B, Mallet Y, et al. Alcohol and genetic polymorphisms: effect on risk of alcohol-related cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(2): 173-180.
12. Vogler T, Kriegl L, Horst D, et al. The expression pattern of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is an independent prognostic marker for low survival in colorectal tumors[J]. *Exp Mol Pathol*, 2012, 92(1): 111-117.
13. Babwah AV, Pampillo M, Min L, et al. Single-cell analyses reveal that KISS1R-expressing cells undergo sustained kisspeptin-induced

- signaling that is dependent upon an influx of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ [J]. *Endocrinology*, 2012, 153(12): 5875-5887.
14. Quevedo EG, Aguilar GM, Aguilar LA, et al. Polymorphisms rs12998 and rs5780218 in KiSS1 suppressor metastasis gene in Mexican patients with breast cancer[J]. *Dis Markers*, 2015, 2015: 365845.
15. Takeda T, Kikuchi E, Mikami S, et al. Prognostic role of KiSS-1 and possibility of the therapeutic modality of metastin, the final peptide of the KiSS-1 gene in urothelial carcinoma[J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(4): 853-863.

**本文引用:** 田静, 李学敏, 吴莉莉, 代群, 张湛. ALDH1和KiSS-1在大肠癌中的表达及其临床意义[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(5): 1122-1128. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.05.008

**Cite this article as:** TIAN Jing, LI Xuemin, WU Lili, DAI Qun, ZHANG Zhan. Expression of ALDH1 and KiSS-1 in colorectal carcinoma and its clinical significance[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(5): 1122-1128. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.05.008