

网络出版时间: 2020-9-4 13:59 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200903.1448.016.html>

胰腺导管腺癌中 KIAA1199 基因的表达及临床意义

杜少帅, 林先盛, 黄 强

摘要 目的 探讨 KIAA1199 在胰腺导管腺癌(PDAC)中的表达及其临床意义。方法 收集 60 例经术后病理确诊的 PDAC 组织及其中 20 例可获得的癌旁胰腺组织,进行免疫组织化学染色实验,检测石蜡切片中 KIAA1199 基因的表达情况,并分析其与相关临床病理因素及肿瘤术后存活时间之间的关系。同时运用 Western blot 和 qRT-PCR 实验检测 10 对新鲜冰冻 PDAC 标本和相应癌旁组织中 KIAA1199 的表达情况。结果 KIAA1199 在 PDAC 组织和癌旁组织中的阳性表达率分别为 70.0% (42/60) 和 25.0% (5/20), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。统计学分析结果显示患者的淋巴结转移($P < 0.05$)、分化程度($P = 0.010$)、神经侵犯($P = 0.016$)、TNM 分期($P = 0.047$)等临床因素和 KIAA1199 的表达密切相关($P < 0.05$); 患者的年龄($P = 0.206$)、性别($P = 0.515$)和肿瘤位置($P = 0.726$)等因素和 KIAA1199 的表达并无显著相关($P > 0.05$)。运用 Kaplan-Meier 法进行生存分析,KIAA1199 阳性患者的总生存期(OS)中位生存时间为 13.5 个月,阴性表达的 OS 中位生存时间为 17 个月; KIAA1199 阳性患者无病生存期(DFS)中位生存时间为 10 个月,而表达阴性患者的 DFS 的中位生存时间为 13.5 个月,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot 和 qRT-PCR 实验证实 KIAA1199 在 PDAC 组织中表达较癌旁组织表达高,差异有统计学意义($P = 0.0001, P < 0.0001$)。结论 KIAA1199 基因在 PDAC 组织中高表达,与 PDAC 患者的病理分化程度、TNM 分期、神经是否浸润、淋巴结有无转移密切相关,且与患者的预后生存时间有着密不可分的联系,KIAA1199 可能作为未来预测 PDAC 的新的生物学标志物。

关键词 胰腺导管腺癌; KIAA1199; 免疫组织化学; Western blot; qRT-PCR

中图分类号 R 735.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)10-1561-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.10.016

胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcino-

ma, PDAC) 是一种预后极差,且恶性程度极高的恶性肿瘤,5 年生存率不足 5%^[1],是最具侵略性的肿瘤之一,在西方国家的癌症相关死亡中排名第四^[2-4]。导致预后不佳的主要原因之一与它对胰腺周围结构的快速侵袭以及发生淋巴结和(或)远处器官转移有关。多数患者确诊时已经出现远处器官的转移,因此也就丧失了外科治疗的最佳时机。因此,早发现、早诊断、早治疗对诊治 PDAC 极为重要。目前已有多项研究^[5]表明 KIAA1199 基因与多种恶性肿瘤的发展、转移密切相关,属于一种重要的促癌基因,包括胃癌、乳腺癌、口腔鳞癌、前列腺癌和大肠肿瘤等。然而,到目前为止,关于 KIAA1199 在 PDAC 中的表达情况及其临床意义的研究甚少。该研究主要通过免疫组织化学染色方法检测 KIAA1199 基因在人类 PDAC 组织及相应癌旁组织中的表达情况,并分析其与肿瘤进展及患者术后生存时间的关系,同时通过 Western blot 和 qRT-PCR 实验进一步检测 KIAA1199 及其 mRNA 的表达情况。

1 材料与方法

1.1 病例资料 本研究所需临床病例资料均取自安徽医科大学附属省立医院病案室,所需预后生存期等资料通过随访获得。其中,临床病例资料包含了 60 例 PDAC 患者的性别、年龄、肿瘤位置、组织学分型、TNM 分期、神经周围浸润和淋巴结转移。最终统计结果为:男性 45 例,女性 15 例;年龄 ≤ 60 岁有 24 例, > 60 岁的有 36 例;肿瘤位于胰头处 38 例,位于胰体尾的 22 例;组织高分化 8 例,中低分化 52 例;TNM 分期中 I + II 期者 47 例,III + IV 期者 13 例;发生神经浸润的 24 例,无神经浸润 36 例;淋巴结转移者 23 例,未发生淋巴结转移者 37 例。本研究预后等资料则通过患者入院所留联系电话进行随访或者门诊随访的方式获得,随访时间截止 2019 年 12 月,收集患者的总生存期(overall survival, OS)和无病生存期(disease-free survival, DFS)等资料。自手术当日至患者因该病死亡之间的时间称为 OS;自患者行根治术当日至患者复发 PDAC 之间的时间称为 DFS;若患者截止 2019 年 12 月仍然存

2020-06-23 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1608085QH197)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院普通外科,肝胆胰安徽省重点实验室,合肥 230001

作者简介:杜少帅,男,硕士研究生;

黄 强,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: 1677702561@qq.com

活或者无复发,则称为数据删失。随访内容包括:患者术后病史及相关体格检查,血清肿瘤标志物(CA19-9、CA50、CEA)检查,腹部增强CT检查及核磁共振检查等。同时,本研究从安徽省肝胆胰重点实验室标本库中选取符合纳入标准的新鲜冰冻PDAC组织及相应的癌旁组织各10例,用于Western blot及qRT-PCR实验。

1.2 试剂与方法

1.2.1 主要试剂 KIAA1199 兔抗人多克隆抗体购自武汉 Proteintech 生物公司;通用山羊抗兔/鼠二抗 PV 6000 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒及抗体稀释液购自北京中杉金桥生物技术有限公司;RIPA 蛋白裂解液、BCA 试剂盒及 β -actin 抗体购自碧云天生物技术有限公司;TRIzol 和逆转录试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司;qRT-PCR 引物购自上海生工生物公司。

1.2.2 免疫组织化学染色法 打开电烤箱,设定温度 60℃,待烤箱达到设定温度后,将整齐摆放在染色架上的切片放入烤箱中,烘烤 30 min 左右。从烤箱中取出切片,对石蜡切片进行脱蜡,用二甲苯脱水,再依次放入浓度为 100%、95%、75% 的乙醇溶液中进行水合,各浸泡 5 min 后取出。在高压蒸汽锅中放置柠檬酸盐缓冲液,使之浸没切片,进行高压抗原修复。自然冷却后,使用 PBS 浸洗切片,然后使用 3% H_2O_2 溶液孵育切片 10 min,阻断内源性过氧化物酶活性后,PBS 浸洗切片。将 KIAA1199 和抗体稀释液按照 1:100 的比例进行稀释,得到稀释的兔抗人 KIAA1199 多克隆抗体,把稀释后的一抗均匀地滴加在切片组织表面,后置入 4℃ 冰箱中过夜孵育,注意不要倾斜导致抗体流失。次日,PBS 浸洗切片,滴加二抗,室温下孵育 30~40 min 后使用 PBS 浸洗。配制 DAB 显色液,放置载玻片于显微镜下,观察染色并及时终止。最后,使用苏木精复染,乙醇脱水,树胶封片,显微镜检查并拍照记录。

1.2.3 免疫印迹法 RIPA 试剂盒从 PDAC 组织和癌旁组织中提取总蛋白,并使用 BCA 试剂盒确定总蛋白浓度。10% SDS-PAGE 凝胶电泳,半干转移法将蛋白质转移到 PVDF 膜上,使用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,一抗(1:1 000)在 4℃ 下孵育过夜。每次用 TBST 洗涤 3 次,每次 5 min,添加二抗(1:5 000),在摇床上于室温下孵育 1 h,然后用 TBST 洗涤膜 3 次,每次 5 min,使用 Image-J 软件分析目标蛋白和内部参考蛋白的灰度值,根据目标蛋白和内部参考的灰度值之比计算相对表达量。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 使用 TRIzol 试剂盒从 PDAC 组织和癌旁组织中分离总 RNA。使用反转录试剂盒将总 RNA 样品反转录为 cDNA。使用实时 PCR 系统进行 PCR 反应。目标基因 KIAA1199 的引物序列为:(F) 5'-AGGCGTGACACTGTCTCGGC-TACAG-3',(R) 5'-CCACTCCACGTCTTGAACCCAC-3';内参蛋白 β -actin 的序列为:(F) 5'-AGCGAG-CATCCCCCAAAGTT-3',(R) 5'-GGGCACGAAGGCT-CATCATT-3'。设置反应条件为 95℃ 预变性 60 s,95℃ 变性 5 s,60℃ 退火 30 s,设置 40 个循环。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析表达水平。

1.3 免疫组织化学结果分析 染色结果判定^[8] 依据显微镜下可以观察到黄色或者棕黄色颗粒主要位于 PDAC 细胞的细胞质中。最后的评分通常按染色强弱等级和染色细胞阳性百分比两种方式进行。未染色的记为 0 分,染色淡黄或者阳性细胞百分比小于 10% 的记为 1 分,染色为黄色或者阳性百分比大于 10% 小于 50% 的记为 2 分,染色棕黄或阳性细胞百分比大于 50% 的统一记为 3 分,两项结果之和即为总分。最终总分大于 3 分记为阳性表达或高表达。所有切片均由两位高年资病理科医师独立阅片进行打分,如产生异议,由两名医师讨论分析最后打分。

1.4 随访 本研究随访方式主要为电话随访和(或)门诊随访,随访终止时间为患者因疾病死亡或本研究截止日,随访发现其中失访患者有 2 例(1 例患者 KIAA1199 高表达,另 1 例患者 KIAA1199 低表达),随访率为 97%。为了研究分析 PDAC 患者中 KIAA1199 基因的表达与患者预后生存时间是否有关系,通过 Kaplan-Meier 法来绘制患者的生存曲线图。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件和 Graph Prism 软件进行统计分析。通过 Kaplan-Meier 方法绘制患者的生存曲线,通过 Log-Rank 检验对组间差异进行分析。分类变量使用 χ^2 检验;定量资料使用 t 检验进行统计, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

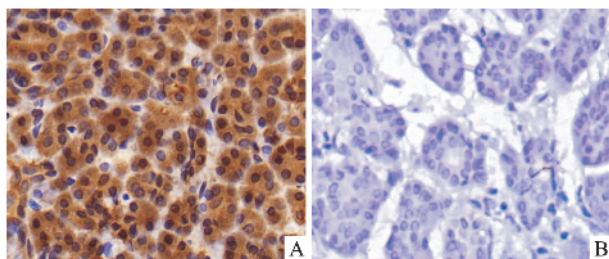
2 结果

2.1 KIAA1199 基因在 PDAC 组织及癌旁组织中的表达 通过免疫组织化学染色方法检测 PDAC 组织和癌旁组织中的 KIAA1199 基因的表达,结果显示:与癌组织(42/60,70%)相比,癌旁组织中 KIAA1199 基因的表达较低(5/20,25%),差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1、图 1。

2.2 KIAA1199 基因的表达与患者临床病理特征

表1 KIAA1199 在 PDAC 组织和癌旁组织中的表达(*n*)

组别	<i>n</i>	KIAA1199 高表达	KIAA1199 低表达	χ^2 值	<i>P</i> 值
癌组织	60	42	18	12.534	<0.05
癌旁组织	20	5	15		

图1 KIAA1199 在 PDAC 和癌旁组织中的表达 $\times 400$
A: PDAC 组织; B: 癌旁组织

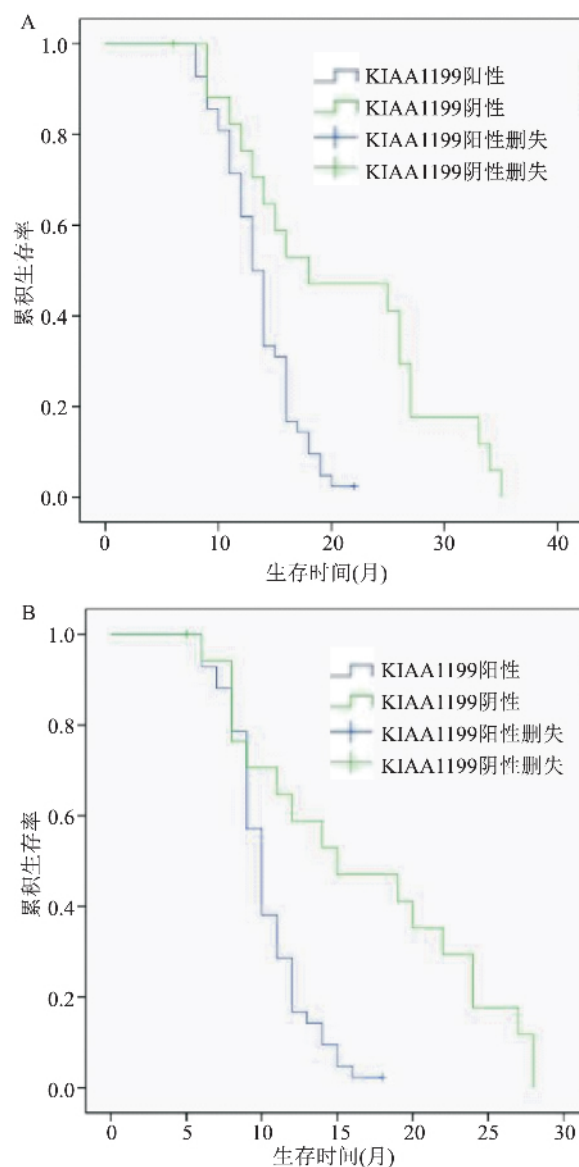
的关系 进一步评估 PDAC 患者的临床特征与组织中 KIAA1199 表达之间的相关性。如表 2 所示, KIAA1199 基因的表达与 PDAC 的病理分化程度($P = 0.010$)、TNM 分期($P = 0.047$)、神经浸润($P = 0.016$)、淋巴结转移($P < 0.05$)有关, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。而与患者的性别($P = 0.515$)、年龄($P = 0.206$)、肿瘤位置($P = 0.726$)并无显著相关性($P > 0.05$)。

表2 KIAA1199 的表达与 PDAC 临床病理特征的关系

临床病理特征	<i>n</i>	KIAA1199 高表达数	KIAA1199 低表达数	χ^2 值	<i>P</i> 值
性别					
男	45	33	12	0.423	0.515
女	15	9	6		
年龄(岁)					
≤ 60	24	19	5	1.601	0.206
> 60	36	23	13		
肿瘤位置					
胰头	38	26	12	0.123	0.726
胰体尾	22	16	6		
分化程度					
高	8	2	6	6.600	0.010
中低	52	40	12		
TNM 分期					
I + II	47	30	17	3.933	0.047
III + IV	13	12	1		
神经浸润					
有	24	21	3	5.833	0.016
无	36	21	15		
淋巴结转移					
有	23	21	2	8.061	<0.05
无	37	21	16		

2.3 KIAA1199 的表达与 PDAC 患者生存期的关系 Kaplan-Meier 生存分析显示 KIAA1199 阳性患

者的 OS 中位生存时间为 13.5 个月, 阴性表达的 OS 中位生存时间为 17 个月; KIAA1199 阳性患者 DFS 中位生存时间为 10 个月, 而阴性表达患者的 DFS 的中位生存时间为 13.5 个月, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

图2 Kaplan-Meier 分析 KIAA1199 的表达与 OS、DFS 的关系
A: OS; B: DFS

2.4 Western blot 检测 KIAA1199 的表达 通过 Western blot 实验检测 10 对 PDAC 组织和癌旁组织中 KIAA1199 蛋白的相对表达量。结果显示, KIAA1199 蛋白在 PDAC 患者组织中较癌旁组织明显高表达。其中, KIAA1199 在癌组织中的表达量为(1.130 ± 0.079), 在癌旁组织中的相对表达量为(0.501 ± 0.033), 差异有统计学意义($t = 6.376, P$

= 0.000 1), 如图 3。

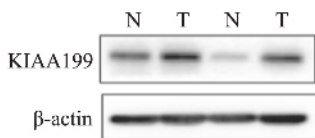


图3 Western blot 检测 KIAA1199 在 PDAC 和癌旁组织中的表达
N: 癌旁组织; T: PDAC 组织

2.5 qRT-PCR 检测 KIAA1199 的表达 qRT-PCR 实验检测 KIAA1199 在 10 对 PDAC 患者组织和癌旁组织中的 mRNA 表达量, 结果显示, PDAC 组 (9.10 ± 0.55) 中 KIAA1199 mRNA 的表达水平明显高于癌旁组 (1.87 ± 0.13), 差异有统计学意义 ($t = 11.99, P < 0.000 1$)。

3 讨论

PDAC 是一种恶性程度高, 预后不良的消化系统肿瘤。目前, 尽管 PDAC 的检测和治疗取得了一些进展, 但大部分患者确诊时已为晚期, 无法进行手术切除。更不幸的是, PDAC 对大多数化疗药物的反应很差。因此, 对胰腺肿瘤发生发展的生物学机制的研究非常重要。KIAA1199 是一种分子量为 150 ku 的蛋白质^[7], 位于染色体上 KIAA 基因群上游 15q 25.1 的染色体条带上^[8], 编码包含 G8 结构域的蛋白质的 1 361 个氨基酸, 该结构域由 8 个甘氨酸残基和 5 个 β 链对组成, G8 域的功能未知^[9-10]。KIAA1199 具有 N 端信号肽和信号肽切割位点, 这表明 KIAA1199 可能具有细胞外分泌或膜靶向特性。KIAA1199 与肿瘤的发展、转移密切相关, 属于一种促癌基因。Suh et al^[11] 研究发现 KIAA1199 在 PDAC 细胞和胰腺癌早期病变(胰腺上皮内瘤变)中特异表达, 因此联合检测 KIAA1199 和 CA 19-9 可能有助于早期 PDAC 的筛查。Kohi et al^[2] 通过敲低 siRNA 的表达, 证实 KIAA1199 高表达提升了胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的能力。Matsuzaki et al^[5] 采用 qRT-PCR 实验检测 KIAA1199 mRNA 的表达, 并从临床和病理因素的角度分析 KIAA1199 mRNA 的表达状况, 进行单因素和多因素分析, 发现 KIAA1199 在胃癌中高表达, 与其预后和淋巴结转移有关。也有研究^[12] 证实 KIAA1199 在肝细胞癌中过表达, 不仅促进了肝组织上皮间充质转化(EMT)这一发生于肿瘤细胞远处转移过程中的早期事件, 更进一步导致严重的临床病理症状, 是肝细胞癌预后不良的标志。另有研究^[13] 发现 KI-

AA1199 可通过 PP2A/stathmin 通路调节破坏大肠癌细胞微管稳定, 促进大肠癌细胞的转移, 证实了 KIAA1199 的过表达会加速大肠癌细胞的 EMT 进程。

本研究探讨了 KIAA1199 在 PDAC 组织中的表达及其与 PDAC 患者的临床病理特征的关系。结果表明, 与癌旁组织相比, PDAC 组织中 KIAA1199 表达上调。并且 KIAA1199 的表达与 PDAC 患者的 TNM 分期、组织学分级、神经浸润和淋巴结转移等因素紧密相关。此外, 生存分析也显示 KIAA1199 在 PDAC 组织中的高表达与不良预后相关, 表明它可能是 PDAC 患者不良预后的独立预测因子。

综上, 该研究认为 KIAA1199 基因在 PDAC 组织存在高表达情况, 并与 PDAC 的病理分化程度、TNM 分期、神经是否浸润、淋巴结有无转移及预后生存时间密切相关。作为单一的较小样本的回顾性研究, 该研究尚存一些不可避免的局限性, 还需更完善的实验设计方法和进一步的前瞻性研究来对目前的研究成果进行补充。总之, 该研究证实 KIAA1199 基因在 PDAC 组织存在高表达情况, 并与 PDAC 患者的临床病理因素和预后息息相关, 有望作为预测 PDAC 患者肿瘤进展及预后的有效因子。

参考文献

- [1] Hidalgo M. Pancreatic cancer [J]. *N Eng J Med*, 2010, 362 (17): 1605-17.
- [2] Kohi S, Sato N, Koga A, et al. KIAA1199 is induced by inflammation and enhances malignant phenotype in pancreatic cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(10): 17156-63.
- [3] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34.
- [4] Ansari D, Tingstedt B, Andersson B, et al. Pancreatic cancer: yesterday, today and tomorrow [J]. *Future Oncol*, 2016, 12 (16): 1929-46.
- [5] Matsuzaki S, Tanaka F, Mimori K, et al. Clinicopathologic significance of KIAA1199 overexpression in human gastric cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2009, 16(7): 2042-51.
- [6] 孟府陶, 黄强, 刘臣海, 等. 胆管癌中 GPR120 蛋白的表达及其临床意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(7): 1076-9.
- [7] Boerboom A, Reusch C, Pieltain A, et al. KIAA1199: a novel regulator of MEK/ERK-induced Schwann cell dedifferentiation [J]. *Glia*, 2017, 65(10): 1682-96.
- [8] Zhang Y, Jia S, Jiang W G. KIAA1199 and its biological role in human cancer and cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(4): 1503-8.
- [9] Guo J, Cheng H, Zhao S, et al. GG: a domain involved in phage LTF apparatus and implicated in human MEB and non-syndromic hearing loss diseases [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(2): 581-4.

- [10] He Q, Liu X, Li Q, et al. G8: a novel domain associated with polycystic kidney disease and non-syndromic hearing loss [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(18): 2189–91.
- [11] Suh H N, Jun S, Oh A Y, et al. Identification of KIAA1199 as a biomarker for pancreatic intraepithelial neoplasia [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 38273.
- [12] Jiang Z, Zhai X, Shi B, et al. KIAA1199 overexpression is associated with abnormal expression of EMT markers and is a novel independent prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 8341–8.
- [13] Zhao L, Zhang D, Shen Q, et al. KIAA1199 promotes metastasis of colorectal cancer cells via microtubule destabilization regulated by a PP2A/stathmin pathway [J]. *Oncogene*, 2019, 38(7): 935–49.

Expression and clinical significance of KIAA1199 gene in pancreatic ductal adenocarcinoma

Du Shaoshuai, Lin Xiansheng, Huang Qiang

(Dept of General Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Key Laboratory of Hepatobiliary and Pancreas in Anhui Province, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the expression of KIAA1199 in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and its clinical significance. **Methods** 60 PDAC tissues confirmed by pathological diagnosis and 20 pancreatic tissues adjacent to the cancer were collected, and immunohistochemical staining experiments were performed to detect the expression of KIAA1199 gene in paraffin sections. And we analyzed its relationship with related clinicopathological factors and tumor survival time after surgery. At the same time, Western blot and qRT-PCR experiments were used to detect the expression of KIAA1199 in 10 pairs of fresh frozen pancreatic cancer specimens and corresponding adjacent tissues. **Results** The high expression rates of KIAA1199 in PDAC tissue and adjacent tissues were 70.0% (42/60) and 25.0% (5/20), and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Statistical analysis showed that clinical factors such as lymph node metastasis ($P < 0.05$), differentiation degree ($P = 0.010$), nerve invasion ($P = 0.016$), TNM stage ($P = 0.047$) were closely related to the expression of KIAA1199 ($P < 0.05$). However, factors such as age ($P = 0.206$), gender ($P = 0.515$), and tumor location ($P = 0.726$) were not significantly related to the expression of KIAA1199 ($P > 0.05$). Using Kaplan-Meier method for survival analysis, the median survival time of KIAA1199 positive overall survival (OS) was 13.5 months and the median survival time of negatively expressed OS was 17 months. The median survival time for disease-free survival (DFS) in KIAA1199-positive patients was 10 months, while the median survival time for DFS in negative-expression patients was 13.5 months. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). Western blot and qRT-PCR experiments confirmed that the expression of KIAA1199 in PDAC tissues was higher than that in adjacent tissues, and the difference was statistically significant ($P = 0.0001$, $P < 0.0001$). **Conclusion** KIAA1199 gene is highly expressed in PDAC tissues, which is closely related to the pathological differentiation of PDAC, TNM stage, nerve infiltration, lymph node metastasis and the prognosis survival time of patients. KIAA1199 may be a new biomarker for predicting PDAC in the future.

Key words pancreatic ductal adenocarcinoma; KIAA1199; immunohistochemistry; Western blot; qRT-PCR