

网络出版时间: 2019-09-03 17:27 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190830.1434.030.html>

KLK7 在肝细胞癌中的表达及其意义

陈康^{1,2}, 英卫东², 葛勇胜², 陈新^{1,2}

摘要 目的 探讨 KLK7 在肝细胞癌(HCC)中的表达情况及临床意义。方法 收集 88 例术后病理证实为 HCC 患者的石蜡组织标本及其临床病理资料,用免疫组化法检测 KLK7 在 HCC 组织及相对应癌旁组织中的表达,分析 KLK7 的表达情况与 HCC 患者临床病理因素的关系;用 Western blot 及 qRT-PCR 方法检测 20 对冷冻 HCC 及癌旁组织中 KLK7 mRNA 与蛋白的表达。结果 88 例石蜡组织标本的免疫组化结果显示,58 例(65.9%) HCC 组织中 KLK7 表达上调,癌旁组织中 26 例(29.5%)表达上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。qRT-PCR 检测显示,KLK7 mRNA 的表达在肝癌组织中明显高于癌旁组织 [18.39 ± 18.18 vs (9.11 ± 13.73)]。KLK7/ β -actin 的灰度比值分别为(1.45 ± 0.24)、(0.65 ± 0.16),两项实验结果差异均有统计学意义($P < 0.001$);Western blot 与 qRT-PCR 结果一致。KLK7 在 HCC 组织中的表达上调与肿瘤直径($P = 0.011$)、肿瘤 Edmondson 分级($P = 0.016$)以及肿瘤 TNM 分期($P = 0.006$)有关。结论 KLK7 在 HCC 中的表达上调,其高表达可能与 HCC 的恶性进程密切相关。

关键词 癌;肝细胞;肿瘤抑制;肿瘤侵袭

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)10-1637-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.029

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是肝脏最常见的原发性恶性肿瘤,占全球肝癌总数的 70%~85%,是世界范围内第五大常见肿瘤之一,也是全球癌症相关死亡的第二大原因。在过去的 20 年中,HCC 的发病率增加了 2 倍,而 5 年生存率仍然低于 12%^[1],每年大约发生 782 500 例新病例和 745 500 死亡病例,仅中国的新生病例和死亡占总数的 一半左右^[2]。鉴于肝细胞癌发生是通过遗传、表

观遗传和信号传导程序的复杂变化而产生的,HCC 表现出广泛的异质分子特征^[3],正是存在这种多样性,HCC 细胞具有强大的细胞存活性和增殖表型。阐明 HCC 起始和进展的分子机制可以改善诊断和治疗策略。因此,迫切需要在该领域进行旨在鉴定可靠的早期诊断生物标志物和有效治疗选择的研究。

人激肽释放酶 7(kallikrein related peptidase 7, KLK7),也曾被称为角质层胰凝乳蛋白酶(stratum corneum chymotryptic enzyme, SCCE),属于激肽释放酶相关肽酶家族,作为皮肤中最突出的蛋白酶之一,这种酶通过降解几种不同的底物而促进脱屑和皮肤免疫系统活化^[4],因此它作为治疗皮肤病的潜在靶点而被广泛研究。然而在最近的报道中,KLK7 在其他多种恶性肿瘤中显示出较高的研究价值,如研究人员发现 KLK7 在宫颈癌、结肠癌、胰腺癌等的肿瘤组织中表达上调,而在乳腺癌和肾癌中表达下调^[5]。但在肝细胞癌研究中,尚未见国内外有相关文献报道,该研究旨在探讨 KLK7 在肝细胞癌中的临床病理学意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2015 年 1 月~2017 年 12 月于安徽医科大学附属省立医院肝脏外科行根治性肝细胞癌切除术,术后经病理确认且具备完整随访资料的 88 例石蜡切片,其中男 68 例,女 20 例;年龄 20~73(52 ± 12)岁;据 Edmondson 分级法标准行肿瘤分级,I~II 级 63 例,III~IV 级 25 例;肿瘤 TNM 分期标准依据美国癌症联合会(AJCC)第八版标准,I~II 期 52 例,III~IV 期 36 例。另外收集本院肝脏外科近期行根治性肝细胞癌切除术的新鲜冷冻 HCC 组织及其对应癌旁组织 20 对和 TRIzol 浸泡的 HCC 组织及其对应癌旁组织 20 对,行 Western blot 及 qRT-PCR 检测。所选患者术前未行放疗、化疗、介入等抗肿瘤治疗。

1.2 主要试剂 KLK7 PAB910Hu01(武汉优尔生商贸有限公司);通用型二抗试剂盒 PV-6000、DAB 显色剂(北京中杉金桥生物技术有限公司);RIPA

2019-06-05 接收

基金项目:安徽省 2017 年度第一批科技计划项目(编号:1704a0802150)

作者单位:¹ 安徽医科大学研究生学院,合肥 230032

² 安徽医科大学附属省立医院肝脏外科,合肥 230001

作者简介:陈康,男,硕士研究生;

英卫东,男,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: jwd1968@sina.com

细胞裂解液(上海碧云天生物技术研究);苏木精 BA-4041(珠海贝索生物技术有限公司);TRIzol 试剂(美国 Life technologies 公司);qRT-PCR 引物合成(生工生物工程上海股份有限公司);ECL 超敏发光试剂盒、逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Scientific 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 Western blot 剪取肝癌及对应癌旁组织均约 100 mg,加入 RIPA 细胞裂解液进行裂解后提取总蛋白,使用 BCA 法进行蛋白的定量测定,每对样本等量蛋白上样,电泳结束后,分离蛋白并将蛋白转至 PVDF 膜上,转膜完毕后,立即把 PVDF 膜放置到预先准备好的 Western 洗涤液中,漂洗 5 min,以洗去膜上的转膜液。加入封闭液(5% 脱脂奶粉),在摇床上缓慢摇动,室温封闭 2 h。KLK7-4 抗体在 4 °C 摇床中用兔抗 1:200 稀释液(10% 分离凝胶)孵育过夜,之后用 PBST 溶液洗膜 3 次。二抗稀释液稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:10 000),室温孵育 2 h,PBST 液洗涤 3 次后使用 ECL 超敏发光试剂盒来检测蛋白,采用北京科创锐生物凝胶成像系统对扫描、保存后的图像进行灰度值分析。同法用兔抗人 β -actin 作内参对照;获取 KLK7 条带灰度值与 β -actin 灰度值之比用于统计学分析。

1.3.2 qRT-PCR 提取肝癌及癌旁组织总 RNA,用于合成 cDNA,随后使用三步法进行 qRT-PCR 反应,设置扩增条件为:95 °C 预变性 2 min;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 10 s,共计 40 个循环,每基因样本设置 3 次重复。KLK7 引物正向序列:5'-CGAGCCCAGAT-GTGACCTTT-3',反向序列:5'-GTCACCATTGCAG-GCGTTTT-3',扩增产物长度:155 bp;内参(β -actin)引物正向序列:5'-CCCTGGAGAAGAGCTACGAG-3',反向序列:5'-GGAAGGAAGGCTGGAAGAGT-3',扩增产物长度为 96 bp;KLK7 mRNA 相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算。

1.3.3 免疫组化 本实验采用 PicTure™ 二步 SP 法对肝细胞癌及癌旁组织中 KLK7 的表达进行检测。根据 KLK7 抗体的特殊要求,通过脱蜡和水合预处理组织切片。3% H_2O_2 去离子水孵育 5 min 用以阻断内源性过氧化物酶,PBS 漂洗。用 KLK7 抗体滴注 1:200,在 37 °C 下孵育 90 min 后用 PBS 冲洗 3 次,每次 2 min。滴下通用 IgG 抗体(Fab 段)-HRP 聚合物,在 37 °C 下孵育 30 min 后用 PBS 冲洗 3 次,每次 2 min。蒸馏水冲洗、复染、脱水和密封。

免疫组化实验结果判定标准:首先根据切片着色细胞强度评分:显色不清或不显色者计为 0 分;浅黄色计为 1 分;棕黄色计 2 分;棕褐色计 3 分。另外对于每张组织切片都随机选择 5 个高倍视野(400 倍),根据着色细胞所占百分比评分:0~25% 细胞着色为 1 分;26%~50% 细胞着色为 2 分;51%~75% 细胞着色为 3 分;76%~100% 细胞着色为 4 分。切片最终分数=着色细胞所占百分比分数×着色细胞强度评分,分数 ≥ 6 分定为高表达,得分 < 6 分定为低表达。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行分析,实验数据中计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, F 检验方差齐性, $P > 0.05$ 时,组间比较采用 t 检验,否则采用 Mann-Whitney U 检验,计数资料分析选用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blot 与 qRT-PCR 实验结果 通过 Western blot 法检测 HCC 中 KLK7 表达情况,定量结果显示 HCC 组织中 KLK7 相对含量(1.45 ± 0.24)高于癌旁组织(0.65 ± 0.16),差异具有统计学意义($t = 28.03, P < 0.001$),见图 1。qRT-PCR 检测结果显示,20 对标本中 KLK7 在癌组织中的 mRNA 表达均高于对应癌旁组织,定量结果显示 KLK7 在 HCC 组织及对应癌旁组织中的 mRNA 相对表达量分别

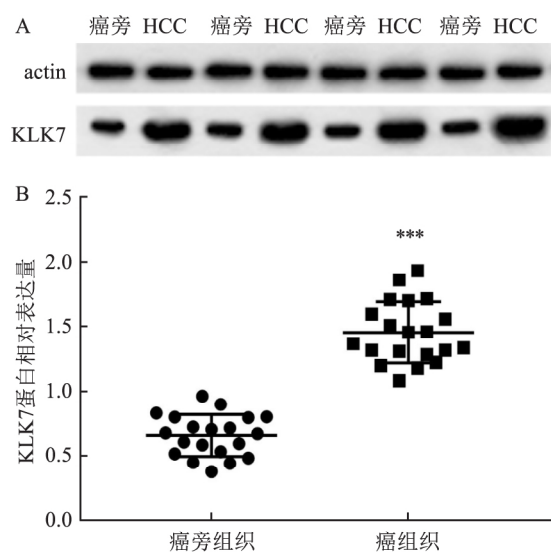


图 1 Western blot 法检测 KLK7 的表达

A: KLK7 蛋白在 4 对代表性 HCC 及对应癌旁组织中的表达; B: KLK7 蛋白在 20 对 HCC 及对应癌旁组织中的相对表达量;与癌旁组织比较:*** $P < 0.001$

为(18.39 ± 18.18) 和(9.11 ± 13.73), 差异有统计学意义($t=5.804, P<0.001$), 见图2。

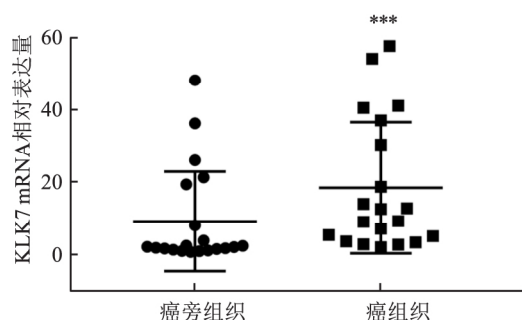


图2 qRT-PCR 法检测 KLK7 mRNA 在 20 对肝癌及癌旁组织中相对表达量
与癌旁组织比较: *** $P<0.001$

2.2 免疫组化结果 本研究通过对 88 例组织切片观察结果显示, 有 58 例显示 KLK7 在 HCC 细胞质中呈高表达(65.9%), 低表达有 30 例(34.1%)。在对应癌旁组织中有 26 例呈高表达(29.5%), 低表达有 62 例(70.5%), 差异具有统计学意义($P<0.05$), 见图3、4。

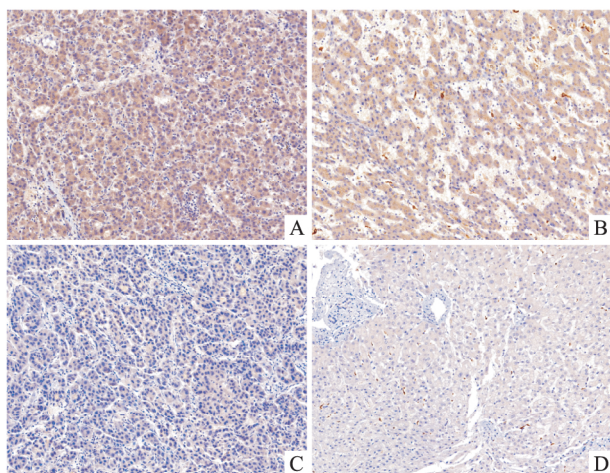


图3 HCC 组织与癌旁组织 KLK7 的表达 ×100

A、C: KLK7 在 HCC 组织中的表达; B、D: KLK7 在癌旁组织中的表达

2.3 KLK7 在 HCC 组织中的表达与临床病理因素的关系 KLK7 在 HCC 组织中的表达上调与肿瘤直径、肿瘤 Edmondson 分级、肿瘤 TNM 分期有关($P=0.011, 0.016, 0.006$); 与年龄、性别、甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)、肿瘤包膜、肝硬化等无关(均 $P>0.05$), 见表1。

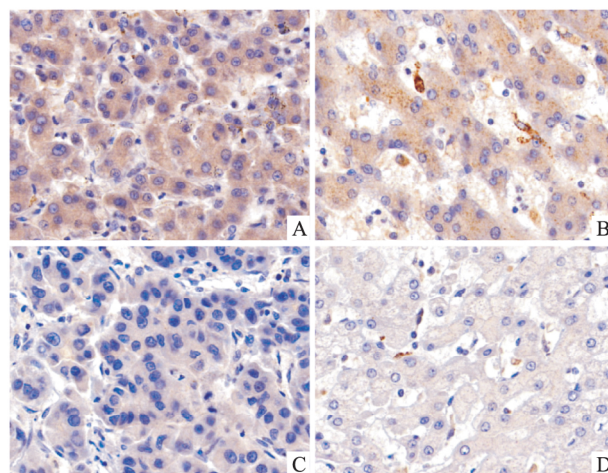


图4 HCC 组织与癌旁组织 KLK7 的表达 ×400

A、C: KLK7 在 HCC 组织中的表达; B、D: KLK7 在癌旁组织中的表达

表1 KLK7 的表达与患者临床病理特征之间的关系(n)

因素	n	KLK7 表达强度		χ^2 值	P 值
		高表达	低表达		
年龄(岁)					
≤65	66	25	41	0.064	0.800
>65	22	9	13		
性别					
男	68	25	43	0.442	0.502
女	20	9	11		
AFP(ng/ml)					
≤20	44	17	27	0.420	0.517
>20	44	20	24		
肝硬化					
无	33	10	23	1.167	0.280
有	55	23	32		
肿瘤包膜					
缺失	47	15	32	1.343	0.247
完整	41	18	23		
肿瘤直径(cm)					
≤5	34	14	20	6.401	0.011
>5	54	37	17		
Edmondson 分级					
I ~ II 级	63	30	33	5.842	0.016
III ~ IV 级	25	19	6		
TNM 分期					
I ~ II 期	52	27	25	7.536	0.006
III ~ IV 期	36	29	7		

3 讨论

人激肽释放酶基因家族由 15 个同源分泌的胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶样丝氨酸蛋白酶组成, 由染色体 19q13.4 区域中发现的紧密聚簇基因编码, 人激肽释放酶的异常表达干扰恶性肿瘤生长的不同阶

段,特别是在肿瘤转移和侵袭中,这可能是因为它在从胚胎发育到组织重塑的生理过程中都起到重要作用,并通过协助基底膜和结缔组织细胞外基质的降解而在恶性肿瘤的扩散中发挥重要作用密切相关^[9]。KLK7 是一种类似胰凝乳蛋白酶的丝氨酸蛋白酶,属于激肽释放酶家族,最初是从皮肤中提纯得到的,如其他激肽酶家族成员一样,KLK7 同样以组织特异性方式表达,并且分别受转录和转录后机制如类固醇激素(雄激素反应元件)和丝氨酸蛋白酶抑制剂的调节,因其在肿瘤的发生发展中可能发挥重要作用而作为癌症生物标志物被广泛研究。

Du et al^[10] 在胰腺癌研究中发现 KLK7 在胰腺癌中呈现高表达,进一步沉默 KLK7 基因后诱导获得肿瘤的抗迁移和抗侵袭能力,将其相关的分子机制解释为 KLK7 对细胞外基质蛋白和连接、黏附分子的切割导致的。苏晓峰等^[11] 也同样证实了 KLK7 在胃癌中的高表达后筛选出沉默 KLK7 效率最高的 KLK7-siRNA-416 片段,瞬时转染入胃低分化腺癌 AGS 细胞株,发现 KLK7 沉默后在 mRNA 水平及蛋白水平均匀下调。这一研究证明了胃癌细胞增殖变化的过程中有着 KLK7 的参与,KLK7 基因的沉默影响了细胞周期的前 DNA 合成从而抑制细胞增殖。Xi et al^[12] 也通过鼠异种移植实验检查 KLK7 表达及在体内调节食管腺癌的生长情况,证实了 KLK7 在食管腺癌中起致癌基因的作用,其可能的机制也与 KLK7 切割细胞间连接分子相关。在另外一项关于黑色素瘤的研究中,Yu et al^[13] 发现高表达水平的 KLK7 表达与黑色素瘤患者的良好预后相关,这是少数关于高表达 KLK7 在肿瘤中起保护作用的报道。上述研究中,包括以往的另外一些研究^[11-12],KLK7 在肿瘤中的作用机制通常被描绘为直接降解细胞外基质的组成成分(例如纤连蛋白)促进肿瘤的转移,同时还通过降解桥粒蛋白如桥粒蛋白 1 和桥粒芯糖蛋白 2,导致细胞黏附减少并促进肿瘤细胞侵袭,在肿瘤发生发展中起重要作用。目前人们了解到细胞外蛋白水解通过主动降解和修饰细胞外基质而促进肿瘤进展,导致恶性肿瘤的侵袭和最终转移。几种蛋白酶系统在癌症中持续失调,并且它们负责的信号传导直接影响肿瘤微环境^[13]。这些蛋白水解级联中的非常重要的两个蛋白酶是基质金属蛋白酶和属于丝氨酸蛋白酶的尿激酶纤溶酶原激活物(uPA)及其受体(uPAR),而这两种蛋白酶又恰恰是被几种激肽释放酶激活的,这其中也包括 KLK7。这种失调通常会改善癌症进展的条件,例如通过增加细

胞黏附受体来促进细胞黏附和细胞迁移,并在释放细胞外生长因子后产生化学梯度。

KLK7 在生理学和病理学作用已在各种组织中广泛研究,特别是皮肤、胰腺这些广泛受到激素调节的组织,然而其在肝脏中的生理和病理学作用仍然知之甚少,国内外尚未见对 KLK7 在 HCC 中表达情况及其与 HCC 患者临床病例特征之间关系的探讨,本研究旨在检测 KLK7 在 HCC 中的表达情况,并分析 KLK7 的表达与 HCC 患者相关临床病理特征之间的关系。一方面本研究进行免疫组织化学实验、qRT-PCR、Western blot 实验显示 KLK7 在 HCC 中呈现高表达,另一方面本研究通过对临床资料的分析显示,KLK7 的表达上调与肿瘤直径、肿瘤 Edmondson 分级、TNM 分期有关($P=0.011, 0.016, 0.006$),而与年龄、性别、肿瘤包膜、AFP、肝硬化等无关($P>0.05$),这表明 KLK7 在 HCC 中呈高表达可能会促进肿瘤侵袭和迁移能力,增加肿瘤的恶性程度。KLK7 在 HCC 中作用的机制同样可能是对 HCC 的细胞外基质进行重塑,对细胞黏附分子进行降解,或者通过作为其他细胞的旁分泌因子调节机制从而改变 HCC 的肿瘤微环境,进而增加 HCC 的迁移和侵袭能力。

虽然本研究只探讨了 KLK7 在 HCC 中的表达情况,分析其与临床病理资料之间的相关性,但对其具体行为机制未作深入探究,仍然有必要进行更大样本的进一步研究 KLK7 在 HCC 中的作用靶点及调控机制,随着研究的深入,KLK7 可能成为 HCC 潜在的治疗靶点或分子标志物。

参考文献

- [1] Zhou X, Wen Y, Tian Y, et al. Heat shock protein 90 α -dependent B-cell-2-associated transcription factor 1 promotes hepatocellular carcinoma proliferation by regulating MYC proto-oncogene c-MYC mRNA stability [J]. *Hepatology*, 2019, 69(4): 1564-81.
- [2] Chen Z, Gao W, Pu L, et al. PRDM8 exhibits antitumor activities toward hepatocellular carcinoma by targeting NAP1L1 [J]. *Hepatology*, 2018, doi: 10.1002/hep.29890.
- [3] Noh J H, Gorospe M. AKTions by Cytoplasmic lncRNA CASC9 promote hepatocellular carcinoma survival [J]. *Hepatology*, 2018, 68: 1675-7.
- [4] Schultz S, Saalbach A, Heiker J T, et al. Proteolytic activation of prochemerin by kallikrein 7 breaks an ionic linkage and results in C-terminal rearrangement [J]. *Biochem J*, 2013, 452(2): 271-80.
- [5] Tamir A, Jag U, Sarojini S, et al. Kallikrein family proteases KLK6 and KLK7 are potential early detection and diagnostic bio-

- markers for serous and papillary serous ovarian cancer subtypes [1]. *J Ovarian Res*, 2014, 7(1):109.
- [6] Oliveira J R, Bertolin T C, Douglas A, et al. Specificity studies on Kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) and effects of osmolytes and glycosaminoglycans on its peptidase activity [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2015, 1854(1):73–83.
- [7] Du J P, Li L, Zheng J, et al. Kallikrein-related peptidase 7 is a potential target for the treatment of pancreatic cancer [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(16):12894–906.
- [8] 苏晓峰, 王文苓, 蔡洪培. KLK7 siRNA 对胃癌 AGS 细胞的抑制作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2013, 20(2):207–11.
- [9] Xi S, Inchauste S, Guo H, et al. Cigarette smoke mediates epigenetic repression of miR-217 during esophageal adenocarcinogenesis [J]. *Oncogene*, 2015, 34(44):5548–59.
- [10] Yu Y, Prassas I, Dimitromanolakis A, et al. Novel biological substrates of human kallikrein 7 identified through degradomics [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(29):17762–75.
- [11] Delaunay T, Deschamps L, Haddada M. Aberrant expression of kallikrein-related peptidase 7 is correlated to human melanoma aggressiveness by stimulating cell migration and invasion [J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(10):1330–47.
- [12] Tailor P D, Kodeboyina S K, Bai S, et al. Diagnostic and prognostic biomarker potential of kallikrein family genes in different cancer types [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(25):17876.
- [13] Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity [J]. *Cell*, 2011, 147(5):992–1009.

Expression and significance of KLK7 in hepatocellular carcinoma

Chen Kang^{1,2}, Jia Weidong², Ge Yongsheng², et al

(¹Graduate School, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of General Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract *Objective* To investigate the expression and clinical significance of KLK7 in hepatocellular carcinoma (HCC). *Methods* The paraffin-embedded tissue specimens and clinicopathologic data of 92 patients with HCC confirmed by postoperative pathology were collected, and the KLK7 expressions in HCC and the adjacent tissues were detected by immunohistochemical staining and the relations of KLK7 expression with clinicopathologic factors of the patients were analyzed. The mRNA and protein expressions of KLK7 in 20 paired frozen tissue samples of HCC and adjacent tissues were determined by qRT-PCR and Western blot analysis, respectively. *Results* The immunohistochemical results of 88 paraffin-embedded specimens showed that KLK7 expression was up-regulated in 58 cases (65.9%) of HCC tissues, and 26 cases (29.5%) were up-regulated in adjacent tissues ($P < 0.05$). The qRT-PCR assay showed that the expression of KLK7 mRNA was significantly higher in the liver cancer tissues than in the adjacent tissues [18.39 ± 18.18 vs (9.11 ± 13.73)]. The gray scale ratios of KLK7/ β -actin were (1.45 ± 0.24) and (0.65 ± 0.16), respectively, with significant difference ($P < 0.001$). Western blot result was consistent with RT-PCR results. High expression of KLK7 in HCC tissues was associated with tumor diameter ($P = 0.011$), tumor Edmondson grade ($P = 0.016$), and tumor TNM stage ($P = 0.006$). *Conclusion* The expression of KLK7 is up-regulated in HCC tissue and the high KLK7 expression may be closely related to the malignant process of HCC.

Key words carcinoma; hepatocellular; tumor suppressor; neoplasm invasiveness