

网络出版时间: 2019-1-3 17:26 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20181230.1809.023.html>

KIF20A 在胃癌中的表达与预后的关系

盛 焱 张尚鑫 闫 强 孙若川 李德关 鲁明典 张 震 李永翔

摘要 目的 研究驱动蛋白家族 20A (KIF20A) 在胃癌中的表达及其临床意义。方法 收取 37 对新鲜胃癌组织及其配对正常组织, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测组织中 KIF20A 的 mRNA 表达水平。此外, 构建由 122 例胃癌组织和 24 例随机正常胃组织构成的组织微阵列, 免疫组化法检测 KIF20A 的表达, 评价 KIF20A 阳性表达与胃癌临床病理参数和预后的关系。siRNA 沉默胃癌细胞系中 KIF20A 的表达, Western blot 法检测细胞系中 KIF20A 的表达变化。Cell-Titer-Glo 法和克隆形成实验检测细胞增殖能力的变化。结果 KIF20A mRNA 表达水平在胃癌组织中显著高于其配对正常组织 ($P < 0.05$)。与此一致, 组织微阵列中胃癌 KIF20A 的表达显著高于正常对照 ($P < 0.05$)。KIF20A 阳性表达与胃癌组织分化差相关 ($P = 0.036$), 生存分析显示 KIF20A 阳性表达与胃癌患者预后差相关 [阳性组总生存期 (40.16 ± 24.65) 月, 阴性组总生存期 (48.91 ± 21.84) 月] ($P = 0.022$)。体外试验显示下调 KIF20A 表达能够抑制 AGS 细胞的增殖能力。结论 胃癌组织中 KIF20A 在转录和翻译水平平均过表达, 下调 KIF20A 的表达能够抑制胃癌细胞增殖。KIF20A 的阳性表达是影响胃癌临床预后的风险因素。

关键词 KIF20A; 胃癌; 预后; 增殖

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)01-0116-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.01.023

1982 年, KIF 家族被首次发现存在于鲐鱼细胞中, 随后普遍在真核生物中检出。研究^[1]显示 KIF 家族是一类具有轴突运输功能的分子马达, 参与细胞分裂。2005 年, 首次发现驱动蛋白家族成员 20A (kinesin family member 20A, KIF20A) 在胰腺癌中高度表达, 在体外条件下用 siRNA 抑制胰腺癌细胞 KIF20A 的表达后, 细胞的增殖被明显抑制^[2]。自此 KIF20A 在肿瘤中的作用开始倍受关注。体外研究^[3]表明, 一些 KIF20A 衍生肽能够产生针对 KIF20A 阳性和 HLA-A2 阳性胰腺癌细胞的细胞毒 T 淋巴细胞, 从而识别并诱导癌细胞的死亡, 而对正常细胞无细胞毒反应, 这表明了其在靶向治疗上的可能性。不久之后, 针对 KIF20A 在胰腺癌的 I/II 期临床试验更是取得了令人满意的成果^[4-5]。简而言之, KIF20A 可能是一个十分有潜力的肿瘤标志物和治疗靶点。然而, KIF20A 在癌细胞中的高度表达是否具有普遍性, 及其在肿瘤中的生物学功能机制仍然是未知的。该研究通过检测 KIF20A 在胃癌中的表达水平, 分析其与临床病理特征和预后的关系, 并调控其表达探究对胃癌细胞系增殖的影响, 为胃癌的临床预后评估和靶向治疗提供新的方向。

2018-08-30 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81672389); 安徽省科技攻关重大计划项目(编号: 1704a0802167); 安徽高校自然科学研究项目(编号: KJ2016A329)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院普外科, 合肥 230022

作者简介: 盛 焱 男, 硕士研究生;

李永翔 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yongxiangli_1@hotmail.com

severe pneumonia. The predicting value of lymphocyte count for severe pneumonia was evaluated by AUROC for discrimination and Hosmer-Lemeshow goodness-of-fit test for calibration. **Results** The levels of glucocorticoid, serum creatinine and urea nitrogen levels in the patients with severe pneumonia were significantly higher than those of the mild pneumonia group ($P < 0.05$). The time of glucocorticoid and immunosuppressant treatment and the count of lymphocytes were significantly higher than those in the severe pneumonia group ($P < 0.05$). The multivariate Logistic regression analysis showed that lymphocyte count was the protective factor of severe pneumonia ($OR = 0.293$, $95\% CI: 0.088 \sim 0.974$, $P = 0.045$). The AUROC was 0.779 ($95\% CI: 0.666 \sim 0.893$, $P < 0.001$) in assessing the discrimination of lymphocyte count for severe pneumonia. The value of P was 0.645 in Hosmer-Lemeshow goodness-of-fit test. **Conclusion** The reduction of lymphocyte count may be the risk factor of severe pneumonia in patients with nephrotic syndrome after immunosuppression treatment. The peripheral blood lymphocyte number should be closely monitored during the clinical follow-up.

Key words nephrotic syndrome; pneumonia; severe; related factor

1 材料与方法

1.1 材料 经医院伦理委员会批准,以及患者知情同意并签字后,于安徽医科大学第一附属医院胃肠外科收集胃癌患者的手术后肿瘤样本。第一批样本为 37 对胃癌组织及配对癌旁组织,取样后加入 RNA 保存液,之后立刻储存于 -80°C 冰箱,用 qRT-PCR 检测表达。第二批样本为 122 例患者术后胃癌组织和随机选取的 24 例癌旁组织,取样后用福尔马林浸泡并石蜡包埋,制作成组织微阵列(TMA),用免疫组化染色检测表达。人胃癌细胞系 AGS 来自上海生命科学院,用于细胞增殖实验。

1.2 主要试剂和方法

1.2.1 主要试剂 TransZol Up RNA 提取试剂盒购自北京 Transgen 公司;第一链 cDNA 合成试剂盒、荧光定量试剂盒购自瑞士 Roche 公司;RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、鼠/兔二抗购自上海碧云天公司;鼠一抗购自美国 Abcam 公司;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;超级 ECL 发光试剂盒、KIF20A 抗体购自美国 Thermo Fisher 公司;RPMI-1640 培养基、胎牛血清、青霉素/链霉素和 PBS 溶液购自澳大利亚 Gibco 公司;siRNA-KIF20A 购自美国 Santa Cruz 公司;CellTiter-Glo 发光法细胞活性检测试剂盒购自美国 Promega 公司。

1.2.2 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 按照 TransZol 试剂盒说明书提取总 RNA。按照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA,KIF20A 正向引物 5'-ACTTT-GCGGCTATGCGAGGAT-3',反向引物 5'-TGAGAA GATGCTGTGACTGCG-3', β -actin 正向引物:5'-CAT-GTACGTTGCTATCCAGGC-3',反向引物:5'-CTCCT-TAATGTCACGCACGAT-3'。qRT-PCR 的反应条件包括:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 预变性,然后按 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,共做 45 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 延伸。以 β -actin 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行相对定量分析。

1.2.3 Western blot 实验 RIPA 法提取蛋白后按照 BCA 试剂盒说明书检测蛋白浓度,配制 20 μl 蛋白量体系。经 SDS-PAGE 胶电泳后,转至 PVDF 膜上。经 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱一抗(KIF20A 按 1:1 000 稀释, β -actin 按 1:3 000 稀释)孵育过夜。TBST 洗 3 次,每次 10 min,二抗(1:3 000)孵育 2 h,再次清洗后使用增强化学发光法显影。

1.2.4 免疫组化 将组织切片进行 HE 染色,观察

并取样典型胃癌组织,制作为组织微阵列。将组织微阵列放入 50 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱,烘烤 2 h,全自动染色机中脱蜡,乙醇脱水,超纯水洗涤后柠檬酸抗原修复,阻断内源性过氧化物酶,滴加 KIF20A 一抗(1:2 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,PBS 洗涤,滴加兔二抗,孵育 1 h,DAB 显色,苏木精复染后封片。使用兔血清替代一抗重复实验作为阴性对照。由两名经验丰富的病理医师对组织微阵列进行判读和评分,染色强度计分:无染色记 0 分,浅黄色记 1 分,棕黄色记 2 分,棕褐色记 3 分;阳性细胞数计分:0% 记 0 分,<25% 记 1 分,25% ~ 75% 记 2 分,>75% 记 3 分。免疫活性计分(IRS) = 染色强度计分 $\times$ 阳性细胞数计分。IRS ≤ 2 记为阴性,将 IRS > 2 记为阳性,从而将所有样本分为阴性和阳性两组。

1.2.5 细胞培养与转染 AGS 细胞系采用混有 10% 胎牛血清和 1% 的抗生素(青霉素/链霉素)的 RPMI-1640 培养液。培养在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 的细胞培养箱中。待细胞系处于对数生长期,按照 sc-91657 说明书进行转染,24 h 后提取总 RNA 和蛋白并进行后续试验。

1.2.6 细胞活力实验 成功转染后,待细胞系处于对数生长期。细胞计数,制备密度为 3×10^4 个/ml 的细胞悬液 1 ml。分别取 100 μl 细胞悬液,以 3 000 个/孔的密度种植于 96 孔板中。培养 72 h 后,各孔中加入 Cell Titer-Glo 试剂 20 μl ,轻轻混匀后室温静置 10 min,在多孔板酶标仪上检测获取数据。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。采用配对 t 检验,验证 KIF20A mRNA 在胃癌及其癌旁组织中的表达情况。KIF20A 表达高低与临床病理特征的关系采用 Pearson χ^2 检验。采用 Kaplan-Meier 方法制作生存曲线。采用 Log-Rank 检验进行临床病理特征及 KIF20A 表达与总生存期间的单因素分析。采用独立样本 t 检验来验证细胞系增殖的差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KIF20A 在胃癌中高表达 为了研究胃癌中 KIF20A 基因表达情况,在 37 对胃癌及配对癌旁组织中检测 KIF20A mRNA 表达,发现其中 27 例胃癌患者的 KIF20A 基因在转录水平高于其癌旁组织($P < 0.05$),见图 1。之后在包含了 122 例胃癌组织和 24 例随机癌旁组织的组织微阵列中进行免疫组化染色,可以发现 KIF20A 主要表达于胞质中(图 2A)。如图 2B 所示,根据免疫组化评分结果,胃癌

组织中的 KIF20A 阳性表达(54. 92%) 明显高于其癌旁组织(29. 17%) ($P < 0. 001$)。实验结果分别从转录和翻译水平验证了在胃癌中 KIF20A 表达均是上调的。

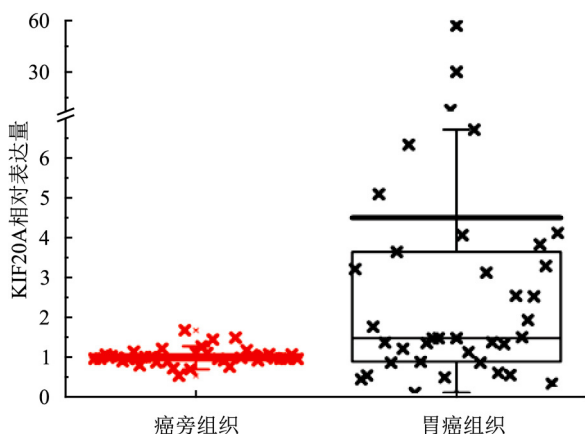


图1 胃癌及其癌旁组织中 KIF20A mRNA 的相对表达

2.2 KIF20A 表达与临床病理特征的关系 结合临床病理资料, 用 χ^2 检验来验证 KIF20A 基因表达与临床病理参数的关系。表1显示, KIF20A 表达与胃癌病理分化有关($P = 0. 036$), 但 KIF20A 与年龄、

表1 胃癌患者中 KIF20A 表达与临床病理特征的关系

项目	总数	KIF20A 表达		χ^2 值	P 值
		低表达 ($n = 55$)	高表达 ($n = 67$)		
性别				2. 457	0. 117
男	94	46	48		
女	28	9	19		
年龄(岁)				<0. 001	0. 986
< 61	60	27	33		
> 61	62	28	34		
肿瘤大小(cm)				1. 953	0. 162
< 6	39	14	25		
> 6	83	41	42		
肿瘤位置					
上部	64	28	36	2. 072	0. 355
中部	25	9	16		
下部	33	18	15		
浸润深度				1. 025	0. 311
T1 / T2	26	14	12		
T3 / T4	96	41	55		
分化程度				4. 412	0. 036
高分化 / 中分化	35	21	14		
低分化 / 未分化	87	34	53		
淋巴结转移				1. 835	0. 176
无	41	22	19		
有	81	33	48		
TNM 分期				2. 186	0. 139
I / II	51	27	24		
III / IV	71	28	43		

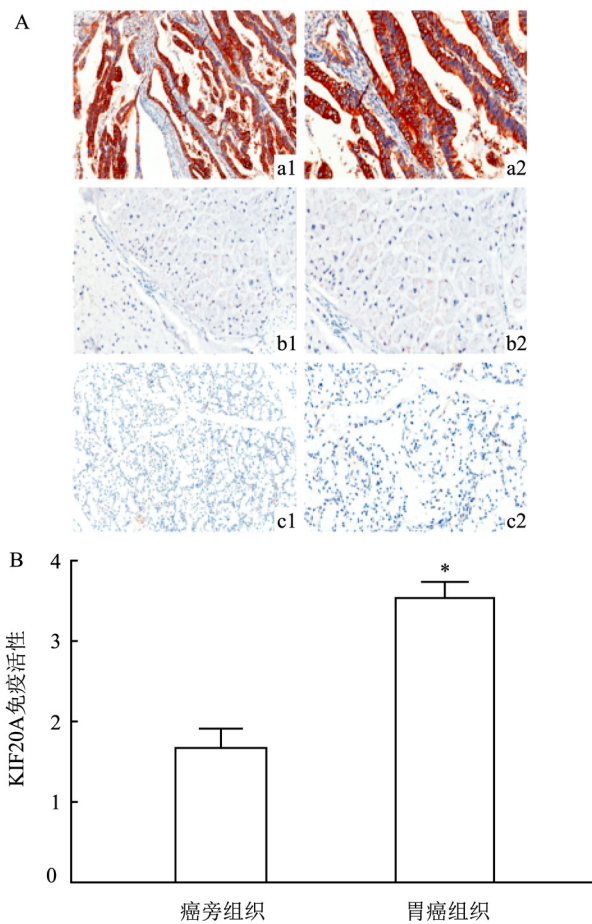


图2 胃癌组织及其癌旁正常组织中 KIF20A 的蛋白表达

A: 免疫组化图; a: KIF20A 在胃癌组织中的阳性表达; b: KIF20A 在胃癌组织中的阴性表达; c: KIF20A 在癌旁正常组织中的阴性表达; 1: $\times 100$; 2: $\times 200$; B: 免疫组化法检测胃癌和正常组织 KIF20A 蛋白表达; 与癌旁组织比较: * $P < 0. 05$

性别、肿瘤大小、肿瘤位置、肿瘤浸润程度、淋巴结转移和 TNM 分期无关。

2.3 KIF20A 表达与预后的关系 采用 Log-Rank 检验法分析了 KIF20A 表达与预后之间的关系。针对 KIF20A 表达在胃癌中的生存分析显示, KIF20A 高表达的胃癌患者总生存期为($40. 16 \pm 24. 65$) 月, 相较于 KIF20A 低表达的胃癌患者($48. 91 \pm 21. 84$) 月明显偏低($P = 0. 022$), 见图 3。综上所述, KIF20A 可作为胃癌的一个独立预后风险因子。

2.4 KIF20A 对 AGS 细胞增殖能力的影响 鉴于 KIF20A 的高表达可能与胃癌进展有密切关系, 在体外水平探索 KIF20A 对胃癌细胞增殖能力的影响。利用 siRNA 转染 AGS 细胞系, 并成功下调了 KIF20A 的表达($P = 0. 005$), 见图 4A、4B。采用 CellTiter-Glo 法检测 AGS 细胞系的增殖能力。如图 4C 所示, 在体外水平, 下调 KIF20A 基因表达能明

显抑制 AGS 细胞增殖能力 ($P < 0.001$)。

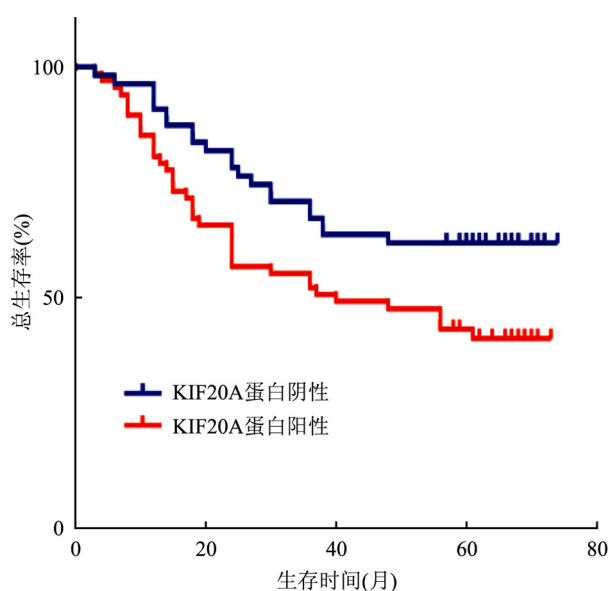


图3 Kaplan-Meier 生存曲线 KIF20A 表达与胃癌患者术后总生存期的关系

3 讨论

作为驱动蛋白-6 亚家族之一, KIF20A 是一种微管相关马达蛋白, 其生物学功能主要参与细胞分裂, 以及细胞器或细胞膜的转运等细胞活动^[6]。近期有越来越多的研究发现 KIF20A 的上调与癌症相关。2005 年, KIF20A 被首次发现在胰腺癌中过表达, 而在体外水平采用 siRNA 下调 KIF20A 基因表达后能抑制胰腺癌细胞的增殖^[2]。研究发现 KIF20A 在肝癌细胞中过表达, 而正常肝细胞中 KIF20A 几乎不表达, 沉默肝癌细胞中 KIF20A 基因的表达会导致细胞染色体多倍体化, 这种现象与 KIF20A 能够促进细胞分裂和增殖但不会诱导细胞

凋亡的功能基本一致^[7]。更有研究发现在正常组织中, KIF20A 在胎儿肝脏、成人胸腺和骨髓中高表达, 在胎盘和成人心脏中低表达, 在成人脑、肺、肝、脾、肾、骨骼肌和淋巴中不表达^[8]。此外, 研究发现针对 KIF20A 的衍生肽可以诱导产生对胰腺癌细胞具有免疫杀伤功能的细胞毒 T 细胞, 而对正常细胞几乎无害^[9]。随之开展的针对 KIF20A 在胰腺癌的一些 I/II 期临床实验中, 也取得了成功。这些研究都说明了 KIF20A 很可能是癌症中一个极有潜力的肿瘤治疗靶点。但是其潜在的分子机制仍不清楚, 而且 KIF20A 与胃癌的关系也不清楚。

本研究 qRT-PCR 和免疫组化显示, 相较于正常对照, 胃癌中 KIF20A 在转录和翻译水平均高表达, 这提示了 KIF20A 在胃癌中可能扮演着促癌基因的作用。通过组织微阵列结果, 结合临床病理资料发现, KIF20A 高表达与胃癌组织分化程度差显著相关。结合胃癌患者随访资料, 通过生存分析显示, KIF20A 高表达的胃癌患者总生存期更短。上述结果提示 KIF20A 的高表达可能是参与胃癌发展、迁移等过程的关键基因。在初步体外试验中, 发现沉默 KIF20A 的表达后, 胃癌细胞的增殖能力受到明显抑制, 这为胃癌靶向治疗提供了一个新的可能性。

本实验依然存在一些不足之处。首先, 在生物学功能上, 可以进行细胞侵袭和迁移试验, 来验证癌细胞 KIF20A 高表达是否能够增强肿瘤的侵袭和迁移能力。其次, 细胞死亡形式包括细胞凋亡、细胞坏死、细胞自噬和有丝分裂突变等。而 KIF20A 在细胞分裂中占有重要地位, 探索 KIF20A 在上述细胞死亡形式特别是有丝分裂突变过程中是否具有重要作用以及怎样的作用是我们进一步的研究方向。

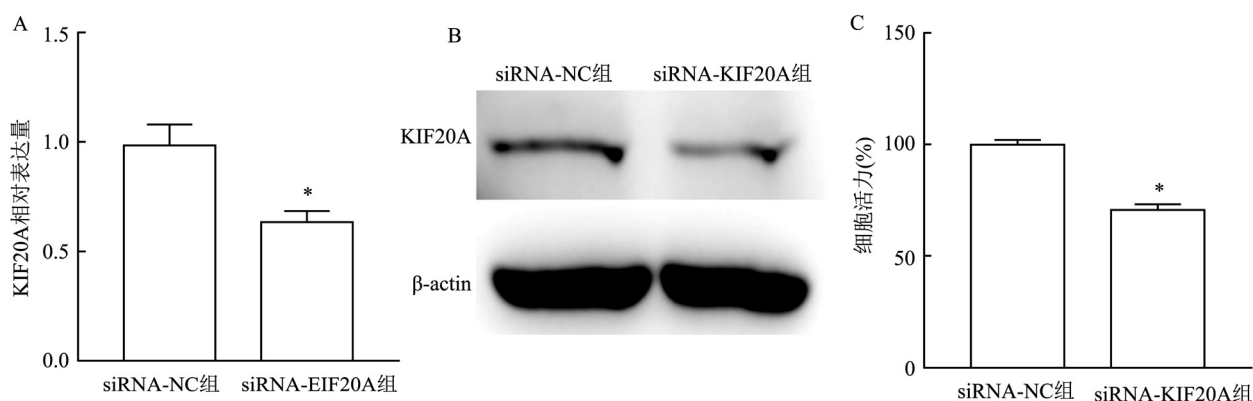


图4 siRNA 转染 AGS 细胞后对细胞增殖的影响

A: 转染 siRNA 后 KIF20A mRNA 的表达降低; B: 转染 siRNA 后 KIF20A 蛋白的表达降低; C: 转染 siRNA 后 AGS 细胞增殖能力下降; 与 siRNA-NC 组比较: * $P < 0.05$

综上所述, KIF20A 在胃癌中高度表达, 也是胃癌中一个独立预后风险因子。此外, 沉默 KIF20A 抑制了胃癌细胞增殖, 提示了 KIF20A 在胃癌中可能发挥着癌基因的作用, 并很可能是一个新的胃癌治疗靶点。进一步研究其潜在分子机制, 能够为胃癌的靶向治疗提供新的策略。

参考文献

- [1] Vale R D, Reese T S, Sheetz M P. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility [J]. *Cell* 1985 42: 39 - 50.
- [2] Taniuchi K, Nakagawa H, Nakamura T, et al. Down-regulation of RAB6KIFL/KIF20A, a kinesin involved with membrane trafficking of discs large homologue 5, can attenuate growth of pancreatic cancer cell [J]. *Cancer Res* 2005 65: 105 - 12.
- [3] Imai K, Hirata S, Irie A, et al. Identification of HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel tumour-associated antigen, KIF20A, over-expressed in pancreatic cancer [J]. *Br J Cancer* 2011 104: 300 - 7.
- [4] Asahara S, Takeda K, Yamao K, et al. Phase I/II clinical trial using HLA-A24-restricted peptide vaccine derived from KIF20A for patients with advanced pancreatic cancer [J]. *J Transl Med* 2013 11: 291.
- [5] Suzuki N, Hazama S, Ueno T, et al. A phase I clinical trial of vaccination with KIF20A-derived peptide in combination with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer [J]. *J Immunother* 2014 37: 36 - 42.
- [6] Meng D, Chen Y, Yun D, et al. High expression of N-myc (and STAT) interactor predicts poor prognosis and promotes tumor growth in human glioblastoma [J]. *Oncotarget* 2015 6: 4901 - 19.
- [7] Nguyen P A, Groen A C, Loose M, et al. Spatial organization of cytokinesis signaling reconstituted in a cell-free system [J]. *Science* 2014 346: 244 - 7.
- [8] Lai F, Fernald A A, Zhao N, et al. cDNA cloning, expression pattern, genomic structure and chromosomal location of RAB6KIFL, a human kinesin-like gene [J]. *Gene* 2000 248: 117.
- [9] Gasnereau I, Boissan M, Margall-Ducos G, et al. KIF20A mRNA and its product MKlp2 are increased during hepatocyte proliferation and hepatocarcinogenesis [J]. *Am J Pathol* 2012 180: 131 - 40.

The relationship between KIF20A expression and prognosis in gastric cancer

Sheng Yi, Zhang Shangxin, Yan Qiang, et al

(Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To detect the expression of kinesin family member 20A (KIF20A) in gastric cancer and adjacent normal mucosal tissue, and to explore the relationship between KIF20A expression and clinicopathological characteristics in gastric cancer (GC). **Methods** mRNA level of KIF20A were detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) in 37 pairs of fresh GC and corresponding normal specimens. Immunohistochemistry assay based on a tissue microarray (TMA) consisting of 146 cases was performed to evaluate the expression, clinicopathologic characteristics and prognosis value of KIF20A. After silencing KIF20A for GC cell lines, cell viability and colony formation assay were carried out to evaluate the effects of KIF20A on GC *in vitro*. **Results** KIF20A expression level was increased in GC ($P < 0.05$). TMA showed that percentage of KIF20A(+) is significantly higher in GC tissues ($P < 0.05$). Pearson χ^2 test method indicated the close relationship between KIF20A and histological grade ($P = 0.036$). Survival analysis showed that median survival for patients with KIF20A was (40.16 ± 24.65) months, which was lower than patients without KIF20A (48.91 ± 21.84) months ($P = 0.022$). Besides, silencing KIF20A markedly inhibited cell viability of AGS *in vitro*. **Conclusion** KIF20A expression is upregulated at both the transcriptional and translational levels in GC. Overall survival is lower in GC patients with KIF20A. Down-regulation of KIF20A can inhibit cell proliferation *in vitro*. KIF20A is an independent prognostic factor for GC.

Key words KIF20A; gastric cancer; prognosis; proliferation