

Kindlin-1 在肝细胞性肝癌中的表达作用及其临床意义

马华星^{1,2}, 葛勇胜^{1,2}, 侯昌龙³, 许戈良^{1,2}, 李建生^{1,2}, 马金良^{1,2}, 英卫东^{1,2}, 余继海^{1,2}, 刘文斌^{1,2}

摘要 目的 检测黏着斑蛋白(Kindlin-1)在肝细胞性肝癌(简称肝癌)中的表达,探讨其在肝癌转移中的临床意义。方法 收集58例肝癌组织和癌旁组织及7例正常肝组织,采用免疫组化染色、Western blot法和实时定量PCR(qRT-PCR)法检测Kindlin-1的表达,分析Kindlin-1表达与肝癌临床病理特征之间的关系。结果 免疫组化染色显示Kindlin-1主要表达在细胞质中。肝癌组织中Kindlin-1阳性表达率为55%,显著高于癌旁组织的10%和正常肝组织的0%($\chi^2=26.456, 5.560, P<0.05$)。Kindlin-1表达水平与肝癌大小和有无转移相关($\chi^2=7.857, 4.076, P<0.05$),而与患者性别、年龄、肿瘤有无包膜、Edmondson分级、血清甲胎蛋白(AFP)水平及乙肝表面抗原(HBsAg)等临床病理特征无明显关系。Western blot法和qRT-PCR检测结果显示肝癌组织中Kindlin-1相对含量显著高于癌旁组织和正常肝组织($P<0.01$)。结论 Kindlin-1在肝癌组织中的表达高于癌旁组织及正常肝组织,且与肝癌大小和有无转移相关,提示Kindlin-1可能参与了肝癌的转移,可能作为肝癌转移的预测指标之一。

关键词 Kindlin-1; 肝肿瘤; 转移

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)12-1762-04

肝细胞性肝癌(简称肝癌)是全球第5大恶性肿瘤^[1],5年生存率约10%^[2-3]。术后的转移与复发是影响患者预后的主要因素^[4],目前仍缺少有效的预测指标。Kindlin-1是细胞黏着斑蛋白家族中的一员。研究^[5-11]表明,Kindlin-1广泛参与细胞的增殖、极化、黏附、迁移等多种生物学过程,且在多种恶性肿瘤中高表达,与肿瘤的转移关系密切。然而,Kindlin-1在肝癌组织中的表达及其在肝癌转移中的作用,国内外未见报道。该研究通过免疫组化染色、Western blot法和实时定量PCR(qRT-PCR)法检测

肝癌组织与癌旁组织Kindlin-1表达情况,并初步探讨肝癌组织中Kindlin-1的表达与肝癌临床病理特征间的关系,以及该蛋白在肝癌侵袭转移中的临床意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取安徽医科大学附属省立医院肝脏外科在2006年10月~2010年12月间行手术切除的肝癌标本58例,其中男50例,女8例;年龄33~79(48.0±18.2)岁;肿瘤 $\phi \leq 5$ cm者19例,>5 cm者39例;按Edmondson分级:I/II级37例,III/IV级21例;包膜完整者44例;发生肝内外转移者16例。选取我院肝胆胰外科安徽省重点实验室冻存的肝癌和配对癌旁组织标本20例。另收集因肝外伤或良性疾病手术切除的正常肝组织标本7例。患者术前均未行介入、放化疗等辅助治疗,并具有完整的临床及病理资料,且肿瘤组织标本术后经病理证实均为肝癌。

1.2 主要试剂 PVDF膜、鼠抗人Kindlin-1多克隆抗体购自美国Millipore公司;免疫组化SP试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;RIPA细胞裂解液购自江苏碧云天生物技术研究;ECL显影试剂盒、逆转录试剂盒购自美国Thermo公司;TRIzol购自美国Invitrogen公司;qRT-PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组化染色 运用免疫组化SP法检测Kindlin-1蛋白表达,所选肝癌标本行常规石蜡包埋,制成2 μ m厚切片。切片经脱蜡水化后,柠檬酸高温修复抗原,加入鼠抗人Kindlin-1多克隆抗体(1:100)4℃孵育过夜;通用型二抗室温孵育15 min,DAB显色;随后苏木精复染,酒精梯度脱水、中性树脂封片。用PBS代替一抗作为阴性对照,每例均有HE染色作为对照观察。步骤均参照试剂盒的说明书进行操作。

1.3.2 Western blot法检测 参考试剂盒的说明书,制备蛋白标本,BCA法检测蛋白浓度,100℃变性10 min。取15 μ l样品上样,使用SDS-PAGE胶电泳分离蛋白,半干式电转膜仪转移蛋白至PVDF膜

2014-07-17 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81272398);安徽省自然科学基金(编号:1308085MH147);安徽高校省级科学研究项目(编号:KJ2012Z186)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院¹ 肝脏外科、³ 放射介入科、² 肝胆胰外科安徽省重点实验室 合肥 230001

作者简介:马华星 男 硕士研究生;

葛勇胜 男 博士 副教授 副主任医师 硕士生导师 责任

作者 E-mail: ahslyygs@163.com

上 5% 脱脂奶粉封闭, Kindlin-1 一抗 4 °C 孵育过夜, 辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育 2 h。ECL 显影和定影。结果拍照、扫描。Kindlin-1 相对含量 = Kindlin-1 灰度值/ β -actin 灰度值。

1.3.3 qRT-PCR 法检测 采用 qRT-PCR 法检测 Kindlin-1 mRNA 在肝癌、癌旁及正常肝组织中的表达水平, 参照 TRIzol 说明书提取组织总 RNA, 使用逆转录试剂盒合成 cDNA。PCR 反应扩增条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环; Kindlin-1 正向 5'-GTTGGAGGAGTGATGCTCAAGTTAG-3', 反向 5'-ATTTTATGCTGAGGGGTGAAGAGA-3', 扩增产物大小 173 bp; 内参 (β -actin) 正向 5'-GGGAAATCGTGCGTGACATTAAGG-3', 反向 5'-CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3', 扩增产物大小 185 bp。Kindlin-1 基因的相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。

1.4 结果判定 免疫组化结果判读 根据细胞染色强度与阳性细胞比例综合评分。细胞的染色强度: 染色阴性 0 分, 淡黄色 1 分, 棕黄色 2 分, 褐色 3 分; 阳性细胞比例: 每例随机观察 5 个视野, 每个视野计数 100 个细胞, 计算 500 个细胞中阳性细胞所占百分比, 阳性细胞数 $\leq 5\%$ 为 0 分, $6\% \sim 25\%$ 为 1 分, $26\% \sim 50\%$ 为 2 分, $> 50\%$ 为 3 分。其中两者评分乘积 ≥ 2 分确定为阳性。免疫组化切片综合评分由两名经验丰富的病理医师采用双盲法阅片完成。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 t 检验、 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法进行检验分析。

2 结果

2.1 Kindlin-1 在肝癌、癌旁及正常肝组织中的相对表达量 qRT-PCR 检测结果显示。肝癌组织中 Kindlin-1 mRNA 相对表达水平显著高于癌旁和正常组织 ($t = 6.301, 10.601, P < 0.01$)。见图 1。Western blot 法分析显示, 肝癌组织中 Kindlin-1 相对含量明显高于癌旁组织和正常组织, 差异有统计学意义 ($t = 4.906, 8.686, P < 0.01$)。见图 2。

2.2 Kindlin-1 蛋白在不同肝组织中的表达 免疫组化染色检测显示 58 例标本中, 肝癌组织有 32 例和癌旁组织有 6 例 Kindlin-1 蛋白呈阳性表达; 7 例正常肝组织中未见 Kindlin-1 蛋白表达。统计显示, 肝癌组织 Kindlin-1 表达阳性率为 55% (32/58) 显著高于癌旁组织 10% (6/58) 和正常组织 0% (0/7) ($\chi^2 = 26.456, P < 0.05; \chi^2 = 5.560, P < 0.05$)。

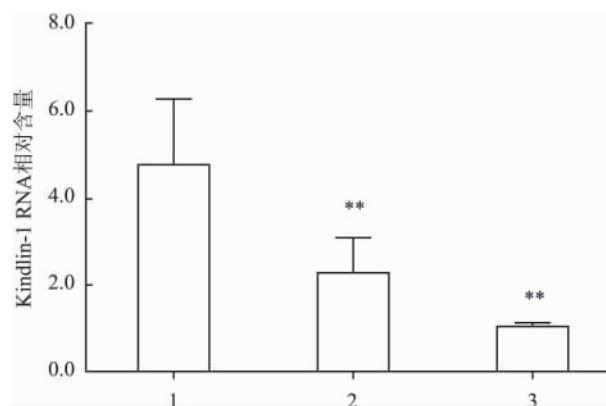


图1 qRT-PCR 检测 Kindlin-1 mRNA 在不同组织中的相对表达量
1: 肝癌组织; 2: 癌旁组织; 3: 正常肝脏组织; 与肝癌组织比较: ** $P < 0.01$

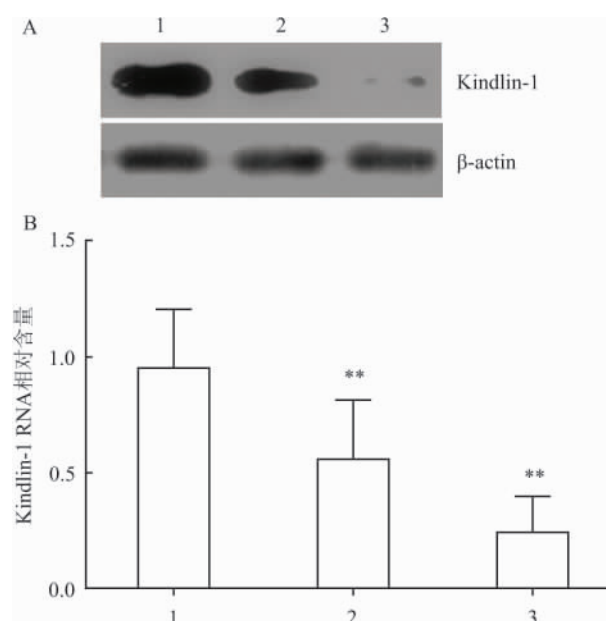


图2 肝癌、癌旁和正常肝脏组织中 Kindlin-1 蛋白的表达情况
1: 肝癌组织; 2: 癌旁组织; 3: 正常肝脏组织; A: Western blot 法检测 Kindlin-1 蛋白的表达; B: Kindlin-1 蛋白的相对表达量; 与肝癌组织比较: ** $P < 0.01$

Kindlin-1 主要表达在细胞质中。见图 3。

2.3 肝癌组织中 Kindlin-1 的表达与临床病理特征间的关系 肝癌患者中 Kindlin-1 阳性表达与肿瘤的大小和有无转移相关 ($\chi^2 = 7.857, 4.076, P < 0.01, P < 0.05$), 而与性别、年龄、肿瘤有无包膜、Edmondson 分级、血清甲胎蛋白 (alpha fetoprotein, AFP) 水平及乙肝表面抗原 (hepatitis B virus surface antigen, HBsAg) 等临床病理特征无明显关系。见表 1。

3 讨论

Kindlin-1 是 Kindlin 家族中的一员, 由 Kindler

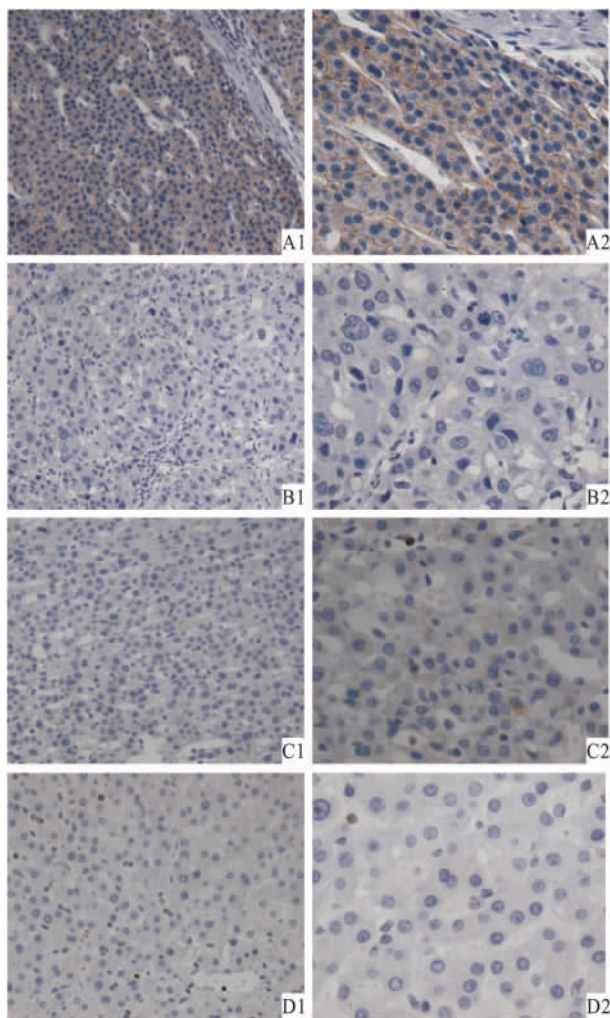


图3 免疫组化染色检测 Kindlin-1 在肝癌和癌旁组织中的表达

A: 肝癌组织中 Kindlin-1 蛋白阳性表达; B: 肝癌组织中 Kindlin-1 蛋白阴性表达; C: 癌旁组织中 Kindlin-1 蛋白阳性表达; D: 癌旁组织中 Kindlin-1 蛋白阴性表达; 1: $\times 200$; 2: $\times 400$

首次在 Kindler 综合征患者角化上皮细胞中发现异常。目前已明确其基因定位于染色体 20p12.3。Kindlin-1 的蛋白序列包含恒定区和可变区,FERM 结构域是其恒定区特征性结构,多见于细胞骨架蛋白^[12]通过结合胞质尾段整合素 β 亚基,调节角蛋白细胞的延伸^[13]。

新近研究^[9-10]显示,Kindlin-1 与多种上皮来源肿瘤的转移与侵袭有关,但机制尚不明确。Weinstein et al^[10]通过 qRT-PCR 法检测发现,在结肠癌和肺癌中 Kindlin-1 mRNA 相对表达量显著高于相应的癌旁组织,高表达率为 70% 和 60%。Sin et al^[9]研究发现,在乳腺癌和转移性肺癌组织中,Kindlin-1 的表达水平高于癌旁组织,Kindlin-1 的高表达与乳腺癌的肺转移相关,且与患者的不良预后关系密切。本研究通过免疫组化染色、Western blot

表1 Kindlin-1 的表达与临床病理特征之间的关系(n)

临床因素	n	Kindlin-1		χ^2 值	P 值
		阴性	阳性		
性别					
男	50	23	27	0.040	0.947
女	8	3	5		
年龄(岁)					
≤ 45	12	4	8	0.328	0.567
> 45	46	22	24		
肿瘤直径(cm)					
≤ 5	19	14	5	7.857	0.005
> 5	39	12	27		
有无包膜					
无	14	5	9	0.229	0.632
有	44	21	23		
Edmondson 分级					
I ~ II	37	18	19	0.603	0.437
III ~ IV	21	8	13		
有无转移					
无	42	23	19	4.076	0.030
有	16	3	13		
AFP(ng/ml)					
≤ 400	26	14	12	1.550	0.213
> 400	32	12	20		
HBsAg					
阴性	10	3	7	0.472	0.492
阳性	48	23	25		

法和 qRT-PCR 法检测肝癌、癌旁和正常肝组织中 Kindlin-1 的表达,显示 Kindlin-1 在肝癌组织中表达高于相应癌旁组织和正常肝组织,且 Kindlin-1 的表达水平增高与肝癌的大小及有无转移相关,而与患者性别、年龄、有无包膜、分化程度、血清 AFP 水平和 HBsAg 表达等无明显关系。肝癌组织中的 Kindlin-1 相对表达量高于癌旁和正常肝组织。综合上述结果提示,Kindlin-1 可能具有促进肝癌细胞的增殖和转移的作用。

目前,有研究^[7-9]表明,Kindlin-1 促进肿瘤转移的机制可能与上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)有关。EMT 在肿瘤的复发与转移过程中,扮演着重要的作用^[14]。Kloeker et al^[7]研究发现,Kindlin-1 在人乳腺上皮细胞中表达促使 TGF- β 介导的 EMT 进程。有研究^[9]显示,Kindlin-1 高表达的细胞株具有较强的侵袭、转移和增殖等能力,同时 Kindlin-1 在依赖 TGF- β 的 EMT 过程中起着重要的作用。由此推测,Kindlin-1 可能通过 TGF- β 信号通路调控肝癌细胞 EMT 的发生和发展,上皮细胞的极性丧失和间质细胞特征获得,使得细胞间的连接减弱,进而导致肝癌细胞的更易发生转移。此途径也可能是肝癌发生和转移众多环节的一部分,其具

体相关机制尚未明确, 还需进一步研究。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69–90.
- [2] Altekruse S F, McGlynn K A, Reichman M E. Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005[J]. *J Clin Oncol* 2009 27(9): 1485–91.
- [3] El-Serag H B. Hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(12): 1118–27.
- [4] Forner A, Llovet J M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet* 2012 379(9822): 1245–55.
- [5] Patel H, Zich J, Serrels B, et al. Kindlin-1 regulates mitotic spindle formation by interacting with integrins and Plk-1[J]. *Nat Commun* 2013 4: 2056.
- [6] Ussar S, Moser M, Widmaier M, et al. Loss of Kindlin-1 causes skin atrophy and lethal neonatal intestinal epithelial dysfunction[J]. *PLoS Genet* 2008 4(12): e1000289.
- [7] Kloeker S, Major M B, Calderwood D A, et al. The Kindler syndrome protein is regulated by transforming growth factor-beta and involved in integrin-mediated adhesion[J]. *J Biol Chem* 2004, 279(8): 6824–33.
- [8] Herz C, Aumailley M, Schulte C, et al. Kindlin-1 is a phosphoprotein involved in regulation of polarity, proliferation, and motility of epidermal keratinocytes[J]. *J Biol Chem* 2006, 281(47): 36082–90.
- [9] Sin S, Bonin F, Petit V, et al. Role of the focal adhesion protein kindlin-1 in breast cancer growth and lung metastasis[J]. *J Natl Cancer Inst* 2011, 103(17): 1323–37.
- [10] Weinstein E J, Bournier M, Head R, et al. URP1: a member of a novel family of PH and FERM domain-containing membrane-associated proteins is significantly over-expressed in lung and colon carcinomas[J]. *Biochim Biophys Acta* 2003, 1637(3): 207–16.
- [11] Papachristou D J, Gkretsi V, Tu Y, et al. Increased cytoplasmic level of migfilin is associated with higher grades of human leiomyosarcoma[J]. *Histopathology*, 2007, 51(4): 499–508.
- [12] Lai-Cheong J E, Parsons M, McGrath J A. The role of kindlins in cell biology and relevance to human disease[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(5): 595–603.
- [13] Malinin N L, Plow E F, Byzova T V. Kindlins in FERM adhesion[J]. *Blood*, 2010, 115(20): 4011–7.
- [14] Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance[J]. *Cancer Sci* 2010, 101(2): 293–9.

Expression and clinical significance of Kindlin-1 in hepatocellular carcinoma

Ma Huaxing^{1,2}, Ge Yongsheng^{1,2}, Hou Changlong³, et al

(¹Dept of Hepatic Surgery, ²Dept of Radioactive Intervention, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, ³Anhui Province Key Laboratory of Hepatopancreatobiliary Surgery, Hefei 230001)

Abstract Objective To explore the expression of Kindlin-1 in hepatocellular carcinoma(HCC) tissues and detect its clinical significance in hepatocellular carcinoma metastasis. **Methods** Fifty-eight cases of HCC tumor and paracarcinomatous tissues, and seven cases of normal liver tissues were collected. The expression of Kindlin-1 and the relationship between Kindlin-1 and clinicopathological features of HCC were detected and analyzed using the immunohistochemistry, Western blot and quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR). **Results** Kindlin-1 was mainly expressed in the cytoplasm of liver cancer cell. The positive expression rate of Kindlin-1 in HCC tissues was 55%, which appeared at a high level compared to adjacent tissues (10%) and normal liver tissues(0%) ($\chi^2 = 26.456$, 5.560; $P < 0.05$). The expression of Kindlin-1 was correlated with tumor diameter and HCC metastasis ($\chi^2 = 7.857$, 4.076; $P < 0.05$), while not with sex, age, capsule, edmondson grade, alpha fetoprotein(AFP) level and the expression of hepatitis B surface antigen(HBsAg). Western blot and qRT-PCR analysis showed that the relative content of Kindlin-1 in the HCC tissues was significantly higher than those in paracarcinomatous and normal tissue ($P < 0.01$). **Conclusion** The expression of Kindlin-1 in HCC tissues is higher than those in adjacent and normal tissues, and Kindlin-1 expression is associated with size and metastasis of liver cancer, which indicate that Kindlin-1 may play a role in the metastasis of HCC, and it can be used as an indicator for HCC metastasis.

Key words Kindlin-1; liver neoplasms; metastasis