

人乳腺癌 Kaiso 的核表达与乳腺癌恶性表型关系的研究

李晨曦, 黄娟, 王梅, 鄢春雨, 周琳

长沙医学院医学检验系临床生物化学教研室, 湖南长沙 410219

摘要:**目的:** 研究 BTB/P0Z 蛋白家族成员 Kaiso 在乳腺癌组织中的表达及其与乳腺癌临床病理学参数的关系。**方法:** 应用免疫组织化学法研究 120 例不同临床分期乳腺癌组织及 39 例乳腺增生组织中 Kaiso 的表达情况与亚细胞定位, 并对其与乳腺癌临床病理参数进行相关性分析。**结果:** 免疫组织化学染色表明在 120 例乳腺癌组织中 Kaiso 呈明显的核表达, 核阳性率为 65.00%(78/120), 而在 39 例对照组乳腺增生组织中呈零或极微弱的表达。Kaiso 蛋白核表达与乳腺癌组织 TNM 分期($P=0.000$)和淋巴结转移($P=0.001$)呈正相关; 而与乳腺癌患者的性别、年龄、以及乳腺癌组织分化程度均无明显相关性 ($P>0.05$)。**结论:** Kaiso 在乳腺癌中主要为核表达, 且 Kaiso 的表达与乳腺癌的恶性表型及转移呈正相关, 提示 Kaiso 可能成为乳腺癌新的肿瘤标志物和治疗靶点。

关键词: 乳腺癌; Kaiso; 核表达; 恶性表型

Correlation Study between Malignant Phenotype of Breast Cancer and Nuclear Expression of Kaiso in Human Breast Cancer Tissues

Li Chen-xi,Huang Juan,Wang Mei,Yan Chun-yu,Zhou Lin

Clinical Biochemistry Staff Room of Clinical Laboratory Medicine of Changsha Medical College,

Changsha 410219,China

Abstract:**Purpose:** To study expression of Kaiso,which is a member of BTB/P0Z protein family in breast cancer and to explore its relationship with the clinical pathological features.**Methods:** Immunohistochemical studies were performed on 120 cases of breast cancer stage tissues of different clinical stages and 39 cases of mammary hyperplasia tissues to study kaiso expression and subcellular localization,and analyze its relationship with the clinical

通讯作者: 周琳,女, 硕士, 讲师, E-mail: linxin520hao@yeah.net

基金项目: 湖南省大学生创新性课题资助项目 (No.12447);湖南省教育厅优秀青年资助项目 (No.11B017)

pathological features. **Results:** Immunohistochemical staining showed that in breast cancer tissues, Kaiso mainly expressed in the nucleus, nuclear positive rate was 65.00%(78/120), but in control group of mammary gland hyperplasia tissues, it rarely expressed in the nucleus. Kaiso nuclear protein expression and breast cancer TNM staging ($P=0.000$), lymph node metastasis ($P=0.001$) were positively correlated, respectively. However, there were no significant correlation($P>0.05$) with breast cancer patients gender, age, and tissue differentiation degree of breast cancer. **Conclusion:** Kaiso mainly expressed in the nucleus in breast cancer, and the expression of Kaiso was positively correlated with the malignant phenotype of breast cancer and metastasis. Kaiso may become a new tumor markers and therapeutic targets for breast cancer.

Key words:Breast cancer; Kaiso; Nuclear expression; Malignant phenotype

乳腺癌已成为世界范围内最常见的女性恶性肿瘤，近年的调查表明，全球乳腺癌的发病率和死亡率在女性中仅次于肺癌，而在我国乳腺癌的发病率正以每年平均 3% 的速度递增，已经成为女性中死亡率第一位的恶性肿瘤，发病年龄多在 40 岁以上^[1]，而且根据相关报道近年来乳腺癌的发病者有年轻化的趋势，严重影响着女性的健康^[2]。

Kaiso是现今发现的唯一既能与甲基化的DNA又能与特定的DNA序列结合而调控基因转录的BTB/POZ蛋白家族成员^[3-4]。研究发现Kaiso调控多种肿瘤侵袭、增殖相关基因的转录(如matdlysin、cyclin D1等)^[5-6]，还存在着核浆穿梭现象^[7]，发挥其特异生物学功能。经研究表明，Kaiso在多种实体恶性肿瘤细胞中以细胞浆表达为主，而在体外培养的多种细胞系(如MDCK、NIH3T3、HT29、SW48细胞等)中，Kaiso却总是以细胞核表达为主。目前Kaiso在肿瘤中发挥的作用还很不清楚，有研究认为Kaiso可能是一个肿瘤抑制因子^[8]，还有研究则得出了完全相反的结论^[9]。而Kaiso在乳腺癌组织中是否存在表达，表达的形式是什么，与乳腺癌的临床病理学因素之间有何关系，Kaiso在核或浆中分布的生物学意义有何不同尚不清楚。因此，本研究拟以乳腺癌为研究模型，探讨Kaiso在乳腺癌中的表达及与乳腺癌临床病理学参数的关系。

1 材料与方法

1.1 资料来源

选取湖南省肿瘤医院病理科经病理诊断为乳腺癌的存档蜡块标本 120 例，患者术前均未接受放、化疗或其它针对肿瘤的治疗。其中男性 39 例，女性 81 例；年龄 > 50 岁的 69 例，年龄 ≤ 50 的 51 例；按 WHO(2007)组织学分类和国际抗癌联盟(UICC)2002 年修订的 p-TNM 分期标准，临床分期 I 期 32 例，II 期 37 例，III 期 51 例，伴淋巴结转移 56 例；低分化 48 例，中分化 35 例，高分化 37 例。并以该院病理科 39 例乳腺增生组织作为对照。

1.2 方法

1.2.1 S-P 免疫组织化学法检测 Kaiso 的表达

收集不同 TNM 分期的乳腺癌组织蜡块标本，将标本常规脱蜡至水，采用链霉素抗生物素蛋白一过氧化物酶(SP 法) 检测 kaiso 蛋白表达，以乳腺增生组织作为对照组。

具体操作为：常规二甲苯脱蜡，梯度酒精脱水；3% H₂O₂ 37℃ 孵育 10min 阻断灭活内源性过氧化物酶；置 0.01M 枸橼酸缓冲液 (pH 6.0) 中煮沸 15~20min 抗原修复，自然冷却 20min 以上，PBS 冲洗 3×5min；正常羊血清工作液封闭，37℃ 10 min，倾去勿洗；滴加一抗 4℃ 冰箱孵育过夜，PBS 冲洗 3×5min (用 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照)；滴加生物素标记二抗，37℃ 孵育 30min，PBS 冲洗 3×5min；滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液，37℃ 孵育 30min，PBS 冲洗 3×5min；DAB/ H₂O₂ 反应染色，自来水充分冲洗后，常规脱水，透明，干燥，中性树胶封片。

1.2.2 亚细胞定位与结果判定

按 Kaiso 表达百分率分为以下四个等级：<25% 为 0 分，26%~50% 为 1 分，51%~75% 为 2 分，>75% 为 3 分。根据免疫组化染色强度分为三个等级：浅黄色计为 1 分，棕黄色计为 2 分，黄褐色计为 3 分。以阳性细胞率和染色强度的分值乘积作为每一例的积分。为便于统计分析，将评分结果归为阴性表达(积分为 0 和 1 分者) 和阳性表达(积分 ≥ 2) 两组。当 Kaiso 核阳性信号的肿瘤细胞所占百分比 ≥ 5% 时判定该病例为核阳性表达。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行数据分析，采用卡方检验分析 Kaiso 表达与乳腺癌患者临床病理因素的关系，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 kaiso在乳腺癌组织中呈核表达

经免疫组化染色分析发现，kaiso 蛋白的表达为大量棕褐色颗粒，其中也可见少许淡黄色颗粒，粗细不一，主要在细胞核中分布，也有少量存在于细胞浆中。在乳腺癌组织中明显可见 kaiso 表达的阳性颗粒（见图 1 A、B），而对照组乳腺增生组织中未见明显颗粒附着（见图 2）。按照本研究制定的 Kaiso 核阳性标准(Kaiso 核阳性信号的肿瘤细胞所占百分比 $\geq 5\%$ 时判定该病例为核阳性表达)。120 例乳腺癌组织中 kaiso 蛋白呈明显核阳性表达的共有 78 例，核阳性表达率为 65.00%（78/120）。对照组乳腺增生组织共有 39 例，kaiso 蛋白未见阳性表达。

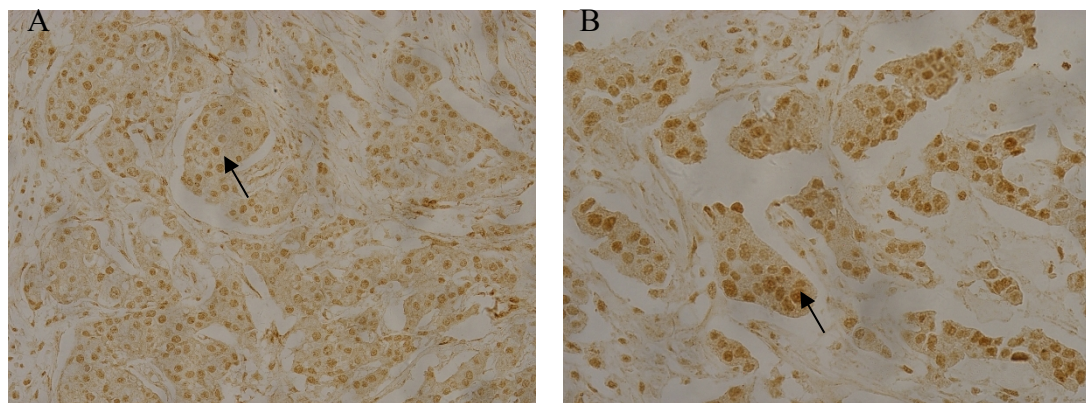


图1.Kaiso在乳腺癌组织中呈核阳性高表达（A.SP×200,B.SP×400）

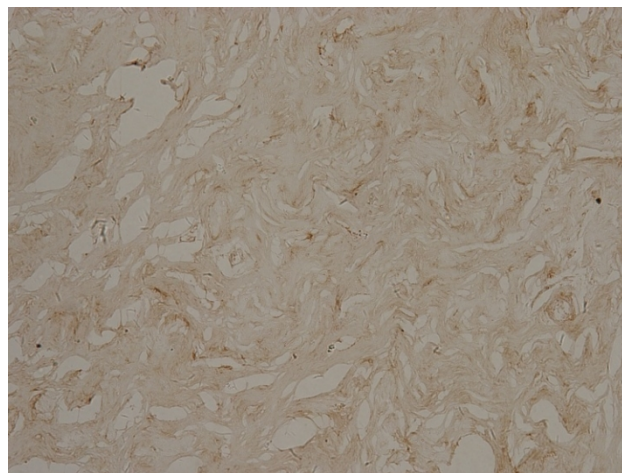


图2.Kaiso在乳腺增生组织中无表达（SP×200）

2.2 kaiso 的表达与乳腺癌恶性表型相关性分析

经表 1 分析可知，Kaiso 蛋白核表达与乳腺癌患者的年龄（ $P=0.954$ ）、性别

($P=0.337$)、及乳腺癌组织的分化程度($P=0.884$)无明显相关性, 差异无统计学意义; 而从表中可明显看出, kaiso 蛋白核表达与 TNM 分期和淋巴结转移密切相关。乳腺癌 III 期 Kaiso 核阳性表达率 94.11%(48/51)显著高于 I + II 期核阳性表达率 43.48%(30/69) , 差异有统计学意义($P=0.000$); 而有淋巴结转移的乳腺癌组织 Kaiso 核阳性表达率 80.36%(45/56)显著高于无淋巴结转移的乳腺癌组织 51.56%(33/64), 差异有统计学意义($P=0.001$)。

表1.乳腺癌中Kaiso的表达与临床病理学参数的相关性

临床病理学参数		n	Kaiso+(%)	χ^2	P
年龄	>50	69	45(65.2%)	0.003	0.954
	≤50	51	33(64.7%)		
性别	男	39	23(58.9%)	0.922	0.337
	女	81	55(67.9%)		
病理分期	I	32	8(25.0%)	42.011	0.000
	II	37	22(59.5%)		
	III	51	48(94.1%)		
分化程度	低	48	30(62.5%)	0.247	0.884
	中	35	23(65.7%)		
	高	37	25(67.6%)		
淋巴结转移	有	56	45(80.4%)	10.885	0.001
	无	64	33(51.6%)		

3 讨论

转录抑制因子Kaiso是BTB/Poxvirus和锌指蛋白亚家族的重要成员, 具有N末端参与蛋白相互作用的POZ结构域和C末端的锌指结构域, 并通过锌指结构识别结合DNA序列调控靶基因的转录, 可以通过补充组蛋白脱乙酰酶及后续染色体重构起到强力转录阻遏作用^[10]。目前Kaiso与肿瘤的关系尚不明确, 有研究表明它是一种致癌因子, 也是一种肿瘤转移相关因子^[11-13], 还可通过抑制致癌基因来抑制肿瘤的发生^[14]。因此, Kaiso在肿瘤的形成、进展以及转移均有很重要的作用且关系复杂。

本实验中, 我们通过免疫组化技术检测了120例乳腺癌组织中Kaiso的表达情况, 结果发现, 120例乳腺癌组织中呈阳性表达的为78例, 呈明显的核表达, 阳性率为65%。学者

Soubry A等人利用免疫组织化学的方法检测了多种人类良恶性组织(均为小样本)的表达后现, Kairo在多种实体恶性肿瘤细胞中表达, 大多以浆表达为主, 而在体外培养的细胞中却以核表达为主。但在本实验中, Kairo在乳腺癌中的表达呈核阳性, 与以往在其他一些实体恶性肿瘤中取得的研究结果不同的, 这是否说明Kairo在乳腺癌中的表达呈现特异性有待进一步验证。有研究发现, p120tcn在很多恶性肿瘤中都有表达, 且影响Kairo的核浆穿梭^[15], 而在乳腺癌中p120tcn是否发挥了不同于其他肿瘤的机制, 使Kairo呈现核表达, 有待进一步研究。经过数据分析, 我们不难发现, Kairo蛋白核表达与乳腺癌患者的年龄、分化程度甚至性别均无明显相关性, 而我们知道, 乳腺癌的发病率在性别上差异很大, 男女比例约1:62, 故乳腺癌的病因应与kairo的表达无很大关联。而Kairo的表达与TNM分期和淋巴结转移密切相关, 在高TNM分期(III期)的乳腺癌组织中阳性率要明显高于低TNM分期(I期+II期) ($P=0.000$), 有淋巴结转移组Kairo的核阳性表达率显著高于无淋巴结转移组($P=0.001$)。这些结果这说明临床分期越晚, kairo的阳性率越高, 故kairo对乳腺癌的恶变具有提示作用。曾有文献表明, kairo既有促癌作用也有抑癌作用^[8,10], 而在本实验中, kairo随着肿瘤的恶变阳性率增加, 是否说明kairo在乳腺癌中所起的是促癌作用有待进一步验证。而淋巴结的转移癌阳性率的升高, 提示细胞核表达中的Kairo蛋白很可能是肿瘤转移相关因子。若经过进一步研究, kairo可作为靶向基因检测乳腺癌的恶变以及转移, 对临床上恶性乳腺癌患者的诊断具有重要意义。

总之, 本研究发现在乳腺癌中存在着kairo的核表达, 且与乳腺癌的恶性表型呈正相关。而kairo在核表达与浆表达中具体有什么不同, 造成差异的原因, 是否受肿瘤微环境的影响, 以及kairo核浆穿梭的意义有待进一步研究。而乳腺癌由于病因尚未阐明, 在治疗方面仍是比较棘手的肿瘤之一, 若能继续深入探讨Kairo蛋白在乳腺癌表达的机制, 找到突破, 对于乳腺癌的诊断、寻找潜在的治疗靶点都具有重要临床意义。

参考文献:

- [1] 刘秀梅,于代友,陈雯,等.女性乳腺癌及危险因素相关知识的认知度调查[J].实用预防医学, 2012,19(12):1838-9.
- [2] 张敏璐,黄哲宙,郑莹.中国 2008 年女性乳腺癌发病、死亡和患者情况的估计及预测[J].中国流行病学杂志,2012,33(10):1049-1051
- [3] Soubry A,Staes K,Stove C, *et al*.The transcriptional repressor Kairo localizes at the mitotic spindle and is a constituent of the pericentriolar material[J]. PLoS

One,2010,5(2):920-923.

- [4] Sasai N,Nakao M,Defossez PA.Sequence-specific recognition of methylated DNA by human zinc-finger proteins[J]. Nucleic Acids Res,2010,38(15):5015-5022.
- [5] Lopes EC,Valls E,Figueroa ME, *et al*.Kaiso contributes to DNA methylation-dependent silencing of tumor suppressor genes in colon cancer cell lines[J].Cancer Res,2008,68(18):7258-7263.
- [6] 刘树立,张盛,戴顺东,等.靶向 Kaiso 基因的 shRNA 技术对人肺癌细胞生物学行为的影响[J].解剖科学进展,2011,17(3):227-231,235.
- [7] Soubry A,Hengel J,Parthoens E, *et al*.Expression and nuclear location of the transcriptional repressor Kaiso is regulated by the tumor microenvironment[J].Cancer Res,2005,65(6):2224-2233.
- [8] Woll PS, Morris JK, *et al*.Wnt signaling promotes hematoendothelial cell development from human embryonic stem cells[J]. Blood,2008,111(1):122-131.
- [9]Collins T,Stone JR,Williams AJ.All in the family:the BTB/POZ,KRAB,and SCAN domains[J].Mol Cell Biol 2001,21(11):3609-3615
- [10]Kelly KF ,Daniel JM.POZ for effect-POZ-ZF transcription factors in cancer and development[J]. Trends in cell biology. 2006, 16(11):578-587
- [11] Liu SL, Zhang S, Dai SD, *et al*. Cytoplasmic Kaiso is associated with malignant phenotype of non-small-cell-lung cancer[J]. Progress of Anatomical Sciences,2011,17(3):242-245
- [12] Dai SD,Wang Y, Jiang GY,*et al*.Kaiso is expressed in lung cancer: its expression and localization is affected by p120ctn[J]. Lung Cancer,2010,67(2):205-215
- [13] 梁晋军,李丹,张勤. p120ctn 和 Kaiso 在食管癌中的表达及意义[J].现代肿瘤医学, 2011,19(8):1548-1551
- [14] Woll PS, Morris JK, *et al*.Wnt signaling promotes hematoendothelial cell development from human embryonic stem cells. Blood,2008 ,111(1):122-131
- [15] 薛杭,王妍.Kaiso与 β -catenin/TCF-4相互作用调节经典Wnt信号通路[J].医学信息,2011,24(9):6296-9.