

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.09.008

• 临床研究 •

食管鳞状细胞癌组织中KiSS-1的表达及其临床意义

严宝国¹, 董小川², 向正凯¹

Expression of Metastasis Suppressor Gene KiSS-1 in Esophageal Squamous Cancer and Its Clinical Significance

YAN Baoguo¹, DONG Xiaochuan², XIANG Zhengkai¹

1. Department of Thoracic and Bone-soft Tissue Surgery, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430022, China; 2. Department of Pathology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology

Corresponding Author: XIANG Zhengkai, E-mail: tjmuxzk@163.com

Abstract: Objective To investigate the expression of metastasis suppressor gene KiSS-1 in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and its clinical significance. **Methods** Expression of KiSS-1 in 65 pairs of ESCC and adjacent normal tissues were detected by real-time quantitative RT-PCR assay, and its clinical relevance with clinicopathologic parameters was evaluated. **Results** KiSS-1 expression in ESCC tissues was significantly lower than those in adjacent normal tissues ($P=0.017$). The deficient KiSS-1 expression in ESCC tissues was correlated with lymph node metastasis but not correlated with tumor size, histological type, degree of tumor invasion or invasion to adventitia ($P=0.480$, $P=0.827$, $P=0.823$). In addition, the ESCC patients with deficient KiSS-1 expression had significantly poorer overall survival ($P=0.009$). **Conclusion** Deficient KiSS-1 expression may be an important biomarker for detecting lymph node metastasis in ESCC, and KiSS-1 might be a potent prognostic marker for ESCC patients.

Key words: Esophageal squamous cell carcinoma(ESCC); KiSS-1; Metastasis; Prognosis

摘要: **目的** 探讨食管鳞状细胞癌(ESCC)组织中肿瘤转移抑制基因(KiSS-1)的表达并分析其临床意义。**方法** 采用实时定量PCR方法检测65例ESCC组织和同一患者的邻近正常食管组织中KiSS-1的表达及分析其与各种临床病理因数的关系。**结果** KiSS-1在肿瘤组织中的表达明显低于正常食管组织($P=0.017$)。同时, KiSS-1的表达缺失与肿瘤的大小、分化程度与浸润程度之间无明显的相关性($P=0.480$, $P=0.827$, $P=0.823$), 而与肿瘤淋巴结的转移相关。另外, KiSS-1表达缺失的患者五年生存率相对更差($P=0.009$)。**结论** KiSS-1表达缺失可作为ESCC发生淋巴结转移的一个指标, KiSS-1也是判断ESCC患者预后的一个指标。

关键词: 食管鳞状细胞癌; KiSS-1; 转移; 预后

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A

0 引言

食管鳞状细胞癌(Esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是常见的难治性肿瘤之一,即使是肿瘤早期的患者术后也极易发生淋巴结的转移^[1-2]。研究表明缺失某些肿瘤转移抑制基因而发生转移的患者生存率更差^[3]。表明对可能发生淋巴结转移的患者术后尽早进行放化疗可以提高患者的生存质量,因此,寻找可以预测肿瘤是否发生

淋巴结转移的指标意义重大。

目前研究发现, KiSS-1在多种人实体肿瘤表达,其表达的缺失与多种恶性肿瘤的转移呈正相关,同时KiSS-1表达缺失的患者五年生存率更低^[4-6]。本研究通过实时定量PCR方法检测KiSS-1在ESCC组织和周围正常食管组织中的表达情况,分析其与临床病理因素之间的关系,并探讨其在食管癌发生、发展及转移中的作用。

1 资料和方法

1.1 临床资料

选取湖北省肿瘤医院2005年4月—2007年3月确诊并手术治疗的ESCC患者标本65例,所有患者

收稿日期: 2013-07-29; 修回日期: 2014-03-20

作者单位: 1. 430000 武汉, 湖北省肿瘤医院胸与骨软组织外科; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院病理科

通信作者: 向正凯, E-mail: tjmuxzk@163.com

作者简介: 严宝国(1966-), 男, 本科, 副主任医师, 主要从事胸与骨软组织肿瘤的基础和临床研究

术前均未接受放疗和化疗。患者的临床资料和相关病理信息来自于患者的病历和本院病理报告。患者均被告知其组织标本用于本实验研究。其中,男44例,女21例,年龄45~74岁,平均年龄50.9岁。所有组织标本均进行TNM分期:Ⅰ期12例,Ⅱ期21例,Ⅲ期24例,Ⅳ期8例。同时取距肿瘤中心边缘至少5 cm处的正常食管组织作为对照研究。所有患者均获随访,随访从手术日至2013年2月,时间1~73月,平均36.8月。

1.2 方法

所有组织样本均在液氮中研碎,总RNA采用Trizol(美国Life公司)提取,具体按说明书进行操作。RNA样品 A_{260}/A_{280} 吸光度值在2.0左右为合格。采用Thermo公司反转录试剂盒进行反转录反应,反应条件如下:42℃孵育60 min,70℃孵育5 min,终止反转录反应。利用2×PCR Taqman Universal PCR试剂盒(日本TaKaRa公司)进行PCR扩增,反应条件为50℃ 2 min,95℃ 10 min 预变性,95℃ 15 s,60℃ 30 s,共40个循环。以GAPDH作为内参基因。引物序列为:KiSS-1(F)5'-GACCTGCCTCTTCTCACCAA-3',(R)5'-CAGTAGCAGCTGGCTTCCTC3'; GAPDH(F)5'-GGGTGTGAACCATGAGAAGT-3',(R)5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'。

所有反应均设立3个复孔,目的基因KiSS-1计算方法为相对定量分析 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。在ESCC组织中,定义KiSS-1表达量低于均数-2倍标准误(Mean-2×SE)为表达的缺失^[7]。

1.3 统计学方法

数据均采用SPSS18.0软件进行处理,组间差异通过t检验和 χ^2 检验,生存分析采用Kaplan-Meier分析,病理因素对淋巴结转移的影响采用多因素的Cox回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

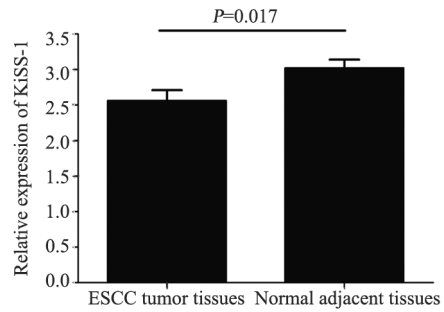
2 结果

2.1 KiSS-1在ESCC组织和正常食管组织中的表达

KiSS-1在65例ESCC组织和正常食管组织中均有表达,且在ESCC组织中的表达(2.56±0.15)低于在邻近正常食管组织中的表达(3.02±0.12),两者之间差异有统计学意义($P=0.017$),见图1。

2.2 KiSS-1表达与ESCC患者临床病理之间的关系

65例ESCC患者中有26例患者属于KiSS-1表达缺失。KiSS-1表达缺失与ESCC患者临床病理因素之间的关系,见表1。经统计分析发现,KiSS-1表达缺失与肿瘤的大小、分化程度、浸润程度以及血管外膜受累之间无明显的相关性($P=0.480$,



ESCC:esophageal squamous cell carcinoma

图1 KiSS-1在65例食管癌组织和周围正常食管组织中的表达
Figure1 KiSS-1 expression in 65 pairs of EC and adjacent normal esophageal tissues detected by qRT-PCR analysis

$P=0.827$, $P=0.823$),而与淋巴结的转移有关($P=0.011$)。通过Cox回归分析发现KiSS-1是引起淋巴结转移的一个重要因素。

表1 KiSS-1在65例食管癌中的表达和一般临床病理因素之间的关系
Table1 Correlation between KiSS-1 expression and general clinicopathologic parameters in 65 ESCC patients

Parameters	n	KiSS-1 expression		P
		Preserved (n=39)	Loss (n=26)	
Gender				0.194
Male	44	24	20	
Female	21	15	6	
Age(years)				0.362
≥51	33	18	15	
<51	32	21	11	
Tumor sizes*				0.480
Large	36	21	15	
Small	29	18	11	
Differentiation				0.827
Well	11	7	4	
Moderate	37	21	16	
Depth of invasion				0.823
Superficial muscular	7	4	3	
Deep muscularis	20	11	9	
Fiber membrane	38	24	14	
Lymph node metastasis				0.011
No	30	23	7	
Yes	35	16	19	
Death				0.006
Yes	31	24	7	
No	34	15	19	

Notes: *:all tumors were divided into two groups according to median tumor size(6.3cm)

2.3 KiSS-1在ESCC患者预后中的意义

在随访过程中,有3例(其中KiSS-1表达缺失1例)死于与本研究无关疾病,对余下62例患者进行生存分析。根据Kaplan-Meier生存分析表明,KiSS-1表达缺失的食管癌患者相比表达阳性的患者五年生存率更高($P=0.002$),见图2;多因素Cox回归分析发现,KiSS-1表达缺失与否与淋巴结是否发生转移有一定相关性($P=0.009$),见表2。

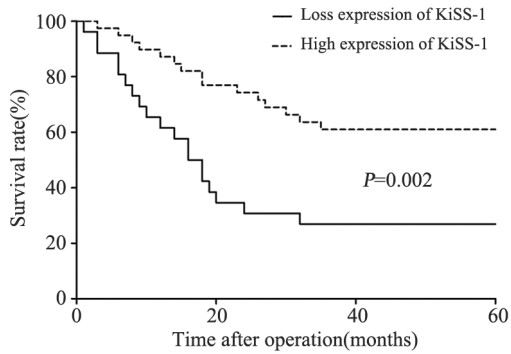


图2 食管癌患者KiSS-1表达和生存时间之间的关系
Figure2 Correlation between KiSS-1 expression and survival rates in 65 ESSC patients

表2 临床病理因素对淋巴结转移影响的Cox回归分析
Table2 Effect of clinicopathologic parameters on lymph node metastasis analyzed by multivariate analysis

Factors	SE	χ^2	ν	P	RF	95% CI
Tumor sizes	0.559	1.385	1	0.239	0.518	0.173-1.550
Differentiation	0.384	1.269	1	0.260	0.649	0.306-1.377
Depth of invasion	0.316	0.006	1	0.938	0.976	0.525-1.812
KiSS-1 expression	0.575	6.727	1	0.009	0.225	0.073-0.694

Notes:SE: standard error; RF: risk factor

3 讨论

Lee等^[8]通过转染KiSS-1至黑色素瘤和乳腺癌细胞后发现转染KiSS-1的细胞转移能力受到抑制，证实KiSS-1是一个新的肿瘤转移抑制基因。最近有研究表明KiSS-1通过结合hOT7T175、GPR54等引起一系列生理生化改变，从而增强成簇黏附激酶的表达和活性，从而抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭能力^[9-11]。

KiSS-1在脑、胎盘等正常组织中均有不同程度的水平表达^[12]。同时研究表明KiSS-1在多种人实体肿瘤中表达缺失，并与肿瘤的转移密切相关^[9-10,13-14]。本实验结果显示在食管癌组织中，KiSS-1表达明显低于正常食管组织，二者统计学有显著性差异；同时发现在有淋巴结转移的癌组织中KiSS-1的表达明显降低，且KiSS-1表达缺失明显高于不伴淋巴结转移的癌组织。表明KiSS-1基因与食管鳞状细胞癌是否发生淋巴结转移有一定的相关性。同时本研究结果还发现KiSS-1在不同肿瘤大小、分化程度和浸润深度的癌组织中的表达率无明显差异，说明KiSS-1的表达与食管鳞癌的大小、组织学分级及浸润深度无关。

是否发生淋巴结转移影响食管癌患者的预后，即使PET的广泛应用，早期判断是否发生淋巴结转移也并不易。如果可以早期预测，我们就可以对可能会发生淋巴结转移的食管癌患者早期就开始进行放化疗。研究证实KiSS-1表达缺失会促

进肿瘤发生转移^[15]。本实验中发现KiSS-1表达缺失的患者发生淋巴结转移的可能明显增高，同时KiSS-1表达缺失的患者五年生存率更差。

总之，在本研究中我们通过定量PCR发现KiSS-1在食管癌组织中的表达明显低于邻近正常食管组织，KiSS-1表达缺失与食管癌发生淋巴结转移和患者的预后呈明显的相关性。KiSS-1可作为食管癌患者五年生存率一个独立的预后因素。

参考文献:

- [1] Tachibana M, Kinugasa S, Dhar DK, *et al.* Prognostic factors in T1 and T2 squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus[J]. Arch Surg, 1999, 134(1): 50-4.
- [2] Hosch SB, Stoecklein NH, Pichlmeier U, *et al.* Esophageal cancer: the mode of lymphatic tumor cell spread and its prognostic significance[J]. J Clin Oncol, 2001, 19(7): 1970-5.
- [3] Sanchez-Carbayo M, Capodiceci P, Cordon-Cardo C. Tumor suppressor role of KiSS-1 in bladder cancer: loss of KiSS-1 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome[J]. Am J Pathol, 2003, 162(2): 609-17.
- [4] Martin TA, Watkins G, Jiang WG. KiSS-1 expression in human breast cancer[J]. Clin Exp Metastasis, 2005, 22(6): 503-11.
- [5] Nicolle G, Comperat E, Nicolaiew N, *et al.* Metastin (KiSS-1) and metastin-coupled receptor (GPR54) expression in transitional cell carcinoma of the bladder[J]. Ann Oncol, 2007, 18(3): 605-7.
- [6] Ringel MD, Hardy E, Bernet VJ, *et al.* Metastin receptor is overexpressed in papillary thyroid cancer and activates MAP kinase in thyroid cancer cells[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(5): 2399.
- [7] Cheung IY, Cheung NK. Quantitation of marrow disease in neuroblastoma by real-time reverse transcription-PCR[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(6): 1698-705.
- [8] Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, *et al.* KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene[J]. J Natl Cancer Inst, 1996, 88(23): 1731-7.
- [9] Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, *et al.* Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor[J]. Nature, 2001, 411(6837): 613-7.
- [10] Shengbing Z, Feng LJ, Bin W, *et al.* Expression of KiSS-1 gene and its role in invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma[J]. Anat Rec (Hoboken), 2009, 292(8): 1128-34.
- [11] Lee KH, Kim JR. Kiss-1 suppresses MMP-9 expression by activating p38 MAP kinase in human stomach cancer[J]. Oncol Res, 2009, 18(2-3): 107-16.
- [12] Kuohung W, Kaiser UB. GPR54 and KiSS-1: role in the regulation of puberty and reproduction[J]. Rev Endocr Metab Disord, 2006, 7(4): 257-63.
- [13] Ikeguchi M, Yamaguchi K, Kaibara N. Clinical significance of the loss of KiSS-1 and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(4): 1379-83.
- [14] Curtis AE, Murphy KG, Chaudhri OB, *et al.* Kisspeptin is released from human prostate cancer cell lines but plasma kisspeptin is not elevated in patients with prostate cancer[J]. Oncol Rep, 2010, 23(6): 1729-34.
- [15] Kostadima L, Pentheroudakis G, Pavlidis N. The missing kiss of life: transcriptional activity of the metastasis suppressor gene KiSS1 in early breast cancer[J]. Anticancer Res, 2007, 27(4B): 2499-504.

[编辑: 刘红武; 校对: 尤婷婷]