

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.01.014

· 临床研究 ·

## KISS1 及骨桥蛋白在上皮性卵巢癌中的表达及其临床意义

李万胜<sup>1</sup>, 王雪娟<sup>1</sup>, 陈书成<sup>1</sup>, 董稚明<sup>2</sup> (1. 河北医科大学第四医院妇产二科, 河北石家庄 050011; 2. 河北医科大学第四医院河北省肿瘤研究所病理研究室, 河北石家庄 050011)

**[摘要]** **目的:**探讨 KISS1(KiSS-1 metastasis-suppressor)和骨桥蛋白(osteopontin, OPN)在上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC)组织中的表达及其临床意义。**方法:**选取 2009 年 3 月至 2010 年 10 月在河北医科大学第四医院妇科接受手术的上皮性卵巢肿瘤患者组织标本 67 例,免疫组化法检测 KISS1 和 OPN 在肿瘤组织中的表达,分析其相关性和临床意义。**结果:**KISS1 蛋白在 EOC 组织中的表达明显低于其在卵巢良性肿瘤组织中的表达[39.5%(17/43) vs 75.0%(18/24)];  $\chi^2 = 7.765, P = 0.005$ ;有淋巴结转移组中 KISS1 的表达低于无淋巴结转移组[25.0%(7/28) vs 66.7%(10/15)];  $\chi^2 = 7.094, P = 0.008$ ;在不同临床分期组中, I + II 期 EOC 中 KISS1 的表达高于 III + IV 期[61.1%(11/18) vs 24.0%(6/25)];  $\chi^2 = 6.029, P = 0.014$ 。OPN 蛋白在 EOC 组织中的表达率明显高于其在卵巢良性肿瘤组织中的表达[74.4%(32/43) vs 37.5%(11/24)];  $\chi^2 = 5.475, P = 0.019$ ;在有淋巴结转移组中 OPN 的表达高于无淋巴结转移组[89.3%(25/28) vs 46.7%(7/15)];  $\chi^2 = 7.251, P = 0.007$ ;在不同临床分期组中, I + II 期 EOC 中 OPN 的表达低于 III + IV 期[50.0%(9/18) vs 92.0%(23/25)];  $\chi^2 = 7.616, P = 0.006$ 。KISS1 和 OPN 蛋白的表达与 EOC 的病理类型及患者年龄无关( $P > 0.05$ )。在 EOC 中, KISS1 与 OPN 蛋白的表达呈负相关( $r = -0.507, P = 0.001$ )。**结论:**KISS1 和 OPN 可能参与了 EOC 的发生、发展和转移,有可能成为 EOC 预后判断的生物学标志物。

**[关键词]** 上皮性卵巢癌; KISS1; 骨桥蛋白; 免疫组织化学

**[中图分类号]** R737.31; R730.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2012)01-0077-4

## Expressions of KISS1 and osteopontin in epithelial ovarian cancer and their clinical significance

LI Wan-sheng<sup>1</sup>, WANG Xue-juan<sup>1</sup>, CHEN Shu-cheng<sup>1</sup>, DONG Zhi-ming<sup>2</sup> (1. Second Department of Gynecology and Obstetrics, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Department of Pathology, Hebei Cancer Institute, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression and clinical significance of KiSS-1 metastasis-suppressor (KISS1) and osteopontin (OPN) in epithelial ovarian cancer (EOC). **Methods:** From March 2009 to October 2010, epithelial ovarian tumors of 67 patients operated in Gynecology Department of the Fourth Hospital of Hebei Medical University were selected. The expressions of KISS1 and OPN in EOC were detected by immunohistochemistry (IHC). **Results:** The frequency of KISS1 positive expression was 39.53% (17/43) in EOC tissues, which was significantly lower than that in ovarian benign tumor tissues (75.00%, 18/24), with a significant difference between two groups ( $\chi^2 = 7.765, P = 0.005$ ). The expression of KISS1 protein in the lymph node metastasis group was significantly lower than that in the without lymph node metastasis group (25.0% [7/28] vs 66.7% [10/15]);  $\chi^2 = 7.094, P = 0.008$ . In the clinical stage group, the expression of KISS1 protein was significantly higher in I + II stage than in III + IV stage (61.1% [11/18] vs 24.0% [6/25]);  $\chi^2 = 6.029, P = 0.014$ . The frequency of OPN positive expression was 74.42% (32/43) in EOC tissues, which was significantly higher than that in the ovarian benign tumor tissue group (37.50%, 11/24) with a significant difference between two groups (74.4% [32/43] vs 37.5% [11/24]);  $\chi^2 = 5.475, P = 0.019$ . The expression of

**[基金项目]** 河北省卫生厅医学科研课题资助项目(No. 05013)。Project supported by the Medical Research Projects of Health Bureau of Hebei Province (No. 05013)

**[作者简介]** 李万胜(1965-)男,河北省沧州市人,副教授,主要从事妇科肿瘤诊断治疗方面的研究。E-mail: liwansheng6655@yahoo.com.cn

**[通信作者]** 董稚明(DONG Zhi-ming, corresponding author), E-mail: dongzhiming2000@yahoo.com.cn

OPN in the lymph node metastasis group was significantly higher than that in the without lymph node metastasis group ( 89.3% [ 25/28 ] vs 46.7% [ 7/15 ];  $\chi^2 = 7.251, P = 0.007$  ). In the clinical stage group, the expression of OPN was significantly lower in I + II stage than in III + IV stage ( 50.0% [ 9/18 ] vs 92.0 [ 23/25 ];  $\chi^2 = 7.616, P = 0.006$  ). The protein expressions of KISS1 and OPN were not correlated with pathologic classification and patient's age of EOC (  $P > 0.05$  ), and there was a negative correlation between KISS1 and OPN protein expressions (  $r = -0.507, P = 0.001$  ). **Conclusion:** The protein expressions of OPN and KISS1 may participate in the carcinogenesis, invasion and metastasis of EOC, which may contribute to prognosis marker of EOC.

[ **Key words** ] epithelial ovarian cancer; KISS1; osteopontin; immunohistochemistry

[ Chin J Cancer Biother, 2012, 19(1): 77-80 ]

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一。上皮性肿瘤占所有卵巢肿瘤的 60%，其中上皮性恶性肿瘤占卵巢恶性肿瘤的 90%。卵巢癌早期不易诊断，手术后易复发和转移，5 年生存率很低，只有 25% ~ 30%<sup>[1]</sup>。目前卵巢癌的发病机制仍不明确，可能与多因素引起某些基因表达水平的改变有关。KISS1( KiSS-1 metastasis-suppressor )是最近发现的与肿瘤转移相关的基因。一些研究<sup>[2-3]</sup>表明，KISS1 在很多恶性肿瘤组织中的表达降低或缺失，可能与肿瘤的进展及转移密切相关。骨桥蛋白( osteopontin, OPN )是一种磷酸化糖蛋白，其内含唾液酸，是一种重要的细胞外基质。近年来研究<sup>[4-6]</sup>证明，OPN 蛋白表达异常与多种肿瘤的发生和预后有关，然而卵巢癌中 KISS1 和 OPN 表达的临床意义及其相关性的研究还少见报道。本研究旨在应用免疫组织化学方法探讨 KISS1 和 OPN 在卵巢癌组织中的表达及其临床意义，以及 KISS1 和 OPN 表达的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

收集 2009 年 3 月至 2010 年 10 月在河北医科大学第四医院妇科接受手术的上皮性卵巢肿瘤患者组织标本，标本常规经 10% 甲醛液固定，组织切片，H-E 染色。标本经病理证实为上皮性卵巢肿瘤 67 例，其中良性卵巢囊腺瘤 24 例，上皮性卵巢癌( epithelial ovarian cancer, EOC )43 例(浆液性及黏液性囊腺瘤 30 例，其他类型的上皮性癌 13 例)。上皮性卵巢癌临床分期：I 期患者 8 例，II 期患者 10 例，III 期患者 20 例，IV 期患者 5 例；有淋巴结转移的有 28 例，无淋巴结转移的有 15 例。全组患者年龄 40 ~ 75 岁，中位年龄 57 岁。全部患者术前均未接受放射治疗和化学治疗。

免疫组化试剂盒 SP-9001、SP-9002 和 DAB 显色试剂盒购自北京中衫金桥生物技术有限公司(批号为 720219A、740415A 和 673767A)。KISS1 兔抗

人多克隆抗体购自武汉博士德生物技术有限公司(批号为 BA1654)。OPN 鼠抗人单克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology, Inc(批号为 LotH2709)。

### 1.2 免疫组化方法检测 KISS1 在上皮性卵巢癌中的表达

全部标本均经 10% 中性甲醛固定，石蜡包埋后，4  $\mu\text{m}$  连续切片并进行常规 H-E 染色，病理诊断。免疫组化 SP 法按试剂盒操作说明进行，DAB 显色，苏木精复染。KISS1 兔抗人多克隆抗体工作液稀释度均为 1:100，用 PBS 作为空白对照。

### 1.3 免疫组化结果判定

经 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 系统显色，苏木精复染后 KISS1 和 OPN 抗体阳性显色部位为细胞质，细胞质中呈黄色颗粒显色。参照 Toula Bouras<sup>[7]</sup>评分标准：在 20 倍物镜下计数 500 ~ 1 000 个肿瘤细胞，阳性细胞  $\leq 10\%$  为 1 分、 $> 10\% \sim 50\%$  为 2 分、 $> 50\% \sim 75\%$  为 3 分、 $> 75\%$  为 4 分。染色强度评分标准：无色为 0 分、淡黄色为 1 分、棕黄色为 2 分、棕褐色为 3 分。两种得分相加后得 1 分为阴性、2 ~ 3 分为阳性(+)、4 ~ 5 分为较强阳性(++)、6 ~ 7 分为强阳性(+++)。

### 1.4 统计学处理

应用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析，免疫组化结果采用  $\chi^2$  检验，相关性分析用 Spearman 等级相关分析。 $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 KISS1 蛋白在上皮性卵巢癌中的表达

KISS1 蛋白在上皮性卵巢癌组织中的阳性表达率为 39.5% ( 17/43 )，明显低于其在卵巢良性肿瘤组织中的表达率( 75.0% , 18/24 )，差异具有统计学意义(  $\chi^2 = 7.765, P = 0.005$  ) (图 1A、B)。有淋巴结转移组 KISS1 蛋白的表达低于无淋巴结转移组(  $\chi^2 = 7.094, P = 0.008$  )；在不同临床分期组中，I + II 期上皮性卵巢癌中 KISS1 蛋白的表达高于 III + IV 期上皮性卵巢癌(  $\chi^2 = 6.$

029,  $P=0.014$ ); 在上皮性卵巢癌的不同病理类型及不同年龄组, KISS1 的表达无明显差异 ( $P>0.05$ ) (表 1)。

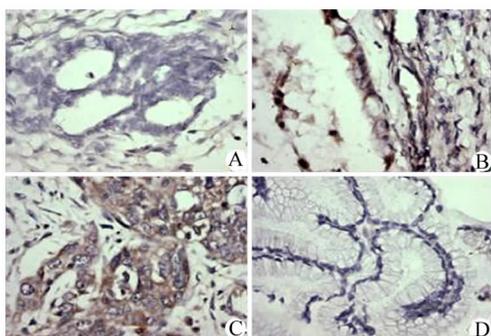


图 1 KISS1 和 OPN 在上皮性卵巢癌和卵巢良性肿瘤中的表达 (SP,  $\times 400$ )

Fig. 1 Expressions of KISS1 and OPN in epithelial ovarian cancer and ovarian benign tumor tissues (SP,  $\times 400$ )

- A: Expression of KISS1 in epithelial ovarian cancer tissues;  
 B: Expression of KISS1 in ovarian benign tumor tissues;  
 C: Expression of OPN in epithelial ovarian cancer tissues;  
 D: Expression of OPN in ovarian benign tumor tissues

表 1 上皮性卵巢癌组织中 KISS1, OPN 蛋白表达与临床病理特征的关系 [n (%)]

Tab. 1 Correlations between protein expressions of KISS1, OPN and clinical parameters in epithelial ovarian cancer [n (%)]

Factor	N	KISS1		OPN	
		Positive	P	Positive	P
Lymph node metastasis					
Present	28	7 (25.0)		25 (89.3)	
Absent	15	10 (66.7)	0.008	7 (46.7)	0.007
Clinical stage					
I + II	18	11 (61.1)		9 (50.0)	
III + IV	25	6 (24.0)	0.014	23 (92.0)	0.006
Pathological type					
Cystadenocarcinoma	30	12 (40.0)		21 (70.0)	
Other	13	5 (38.5)	0.925	11 (84.6)	0.530
Age					
$\leq 60$	19	6 (31.6)		13 (68.4)	
$> 60$	24	11 (45.8)	0.342	19 (79.2)	0.635

## 2.2 OPN 蛋白在上皮性卵巢癌中的表达

OPN 蛋白在上皮性卵巢癌组织中的表达率为 74.4% (32/43), 明显高于其在卵巢良性上皮性腺瘤组织中的表达率 (37.5%, 11/24), 差异具有统计学意义 ( $\chi^2=5.475, P=0.019$ ) (图 1C、D)。在有淋

巴结转移组中 OPN 的表达率为 98.3% (25/28), 高于无淋巴结转移组的 46.7% (7/15) ( $\chi^2=7.215, P=0.007$ ); 在不同临床分期组中, I + II 期中 OPN 的表达低于 III + IV 期 ( $\chi^2=7.616, P=0.006$ ); 在上皮性卵巢癌的不同病理类型及不同年龄组, OPN 的表达无明显差异 ( $P>0.05$ , 表 1)。

## 2.3 上皮性卵巢癌中 KISS1 和 OPN 的蛋白表达的相关性

上皮性卵巢癌中 KISS1 表达阳性的 17 例组织中 OPN 蛋白表达阳性 2 例, 26 例阴性表达 KISS1 的组织中 OPN 有 18 例蛋白表达阳性, 经 Spearman 等级相关分析, KISS1 和 OPN 蛋白的表达呈负相关 ( $r=-0.507, P=0.001$ )。

## 3 讨论

卵巢恶性肿瘤早期没有症状, 不易发现, 就诊时多为中晚期, 5 年生存率很低。对于恶性肿瘤浸润和转移机制的研究, 已成为恶性肿瘤研究的热点。

KISS1 基因是 Lee 等<sup>[8]</sup>在 1996 年发现的一种肿瘤转移抑制基因。KISS1 基因定位于人染色体 1q32-q41 区, 有 4 个外显子; 第 I、II 外显子为非编码碱基外显子。Metastin (或称 KISS1 肽; 转移抑素) 是 KISS1 的初始编码产物, 大小约 145 个氨基酸残基。Metastin 包含 3 个磷酸化位点, 分别是蛋白激酶 C 磷酸化位点、蛋白激酶 A 磷酸化位点以及酪氨酸激酶磷酸化位点。此外, KISS1 基因的表达可能受维生素 D 受体结合蛋白 130 (vitamin D receptor interacting protein 130 000, CRSP3/DRIP 130) 和硫氧还原蛋白结合蛋白 (thioredoxin interacting protein, TXNIP) 的调节<sup>[9]</sup>。KISS1 基因在很多正常组织如脑、胎盘、胰腺、肝脏、肾等中均有不同程度的分布, 但是其在正常组织中的功能尚不完全清楚, 可能与 SH-3 的配体有关。

KISS1 在多种恶性肿瘤及其转移灶中的表达减少或缺失, 提示 KISS1 对恶性肿瘤的浸润和转移有抑制作用。研究<sup>[10]</sup>发现在浸润深度大于 4 mm 的原发性黑素瘤及转移灶中 KISS1 表达明显降低甚至缺失<sup>[10-13]</sup>。关于 KISS1 在卵巢癌中的表达国内外研究较少。KISS1 对卵巢癌的转移具有明显的抑制作用, 能显著抑制上皮性卵巢癌的侵袭能力<sup>[12, 14]</sup>。本研究结果也证实, KISS1 在上皮性卵巢癌和卵巢良性上皮性肿瘤中的表达存在显著差异, 说明 KISS1 的表达异常可能与上皮性卵巢癌的发生有关; 同时发现 KISS1 的低表达与上皮性卵巢癌的浸润、转移有关, 提示 KISS1 在抑制上皮性卵巢癌的浸润和转

移过程中发挥着重要的作用。

OPN 是一种具有多种生理、病理功能的磷酸化蛋白。OPN 包含一个精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸( Arg-Glu-Asp,RGD)结构域,该结构能够增强 OPN 与其受体的结合,从而在增强细胞的黏附、介导细胞的移行中起重要作用。RGD 结构还参与 OPN 对基质金属蛋白酶-2 的激活,增强肿瘤细胞的侵袭和转移<sup>[15]</sup>。OPN 可以促进肿瘤细胞增殖,诱导新生血管的形成,增强肿瘤细胞的黏附和转移,参与肿瘤的浸润和转移<sup>[12]</sup>。

研究<sup>[16]</sup>发现,OPN 在正常的卵巢细胞中无表达,但是在卵巢囊腺瘤、交界性卵巢肿瘤和浆液性卵巢癌中的表达依次升高。本研究发现,OPN 在上皮性卵巢癌中的阳性表达率明显增高,与其在良性肿瘤中的表达率差异显著,说明 OPN 可能与卵巢恶性肿瘤的发生、发展关系密切,与国外研究结果一致。进一步分析发现,OPN 在有淋巴结转移上皮性卵巢癌中表达明显高于无淋巴结转移组,临床分期Ⅲ、Ⅳ期病例组的表达率高于Ⅰ、Ⅱ期病例组的表达率,其差别具有统计学意义,提示 OPN 在卵巢癌的发生、发展和复发、转移过程发挥着重要的作用。

研究<sup>[17]</sup>发现,KISS1 能够降低 MMP-9 的表达水平,减弱酶活性,降低肿瘤细胞的侵袭能力。OPN 对于 MMP-9 的作用则与 KISS1 相反,能够通过激活相关信号转导通路使 pro-MMP-9 活化为 MMP-9<sup>[18]</sup>。另外,OPN 蛋白中含有 MMP 的酶切位点,经 MMP 酶切后能与细胞表面的整合素结合,促进细胞的黏附与迁移,有利于肿瘤的浸润和转移<sup>[18-19]</sup>。本研究结果也显示,在卵巢癌中 KISS1 与 OPN 表达呈负相关。通过对 KiSS1 及 OPN 与肿瘤关系及其作用机制的研究,发现两者之间的相关性可能与 MMP-9 的作用关系密切,对两者的关系进行深入、广泛的研究,明确其相互作用机制,可能为卵巢癌的临床治疗与改善卵巢癌患者的预后提供实验依据。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] 曹泽毅.中华妇产科学 [ M ]. 人民卫生出版社,北京,1999: 1882-1888.

[ 2 ] Sanchez-Carbayo M, Capodiceci P, Cordon-Cardo C. Tumor suppressor role of KiSS-1 in bladder cancer: Loss of KiSS1 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome [ J ]. Am J Pathol, 2003, 162( 2 ): 609-617.

[ 3 ] Ikequehi M, Yamauchi K, Kaibara N, et al. Clinical significance of the loss of KiSS1 and orphan G-protein-coupled receptor ( hOT7T175 ) gene expression in esophageal squamous cell carcinoma Clin [ J ]. Cancer Res, 2004, 10( 4 ): 1379-1383.

[ 4 ] Karadag F, Gulen ST, Karul AB, et al. Osteopontin as a marker of weight loss in lung cancer [ J ]. Scand J Clin Lab Invest, 2011,

71( 8 ): 690-694.

[ 5 ] Zhao XQ, Dong JH, Zhang WZ, et al. Prognosis of ampullary cancer based on immunohistochemical type and expression of osteopontin [ J ]. Diagn Pathol, 2011, 13( 6 ): 98-104.

[ 6 ] Sreekanthreddy P, Srinivasan H, Kumar DM, et al. Identification of potential serum biomarkers of glioblastoma: Serum osteopontin levels correlate with poor prognosis [ J ]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010, 19( 6 ): 1409-1422.

[ 7 ] Bouras T, Southey MC, Venter DJ. Overexpression of the steroid receptor coactivator AIB1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and HER2/neu [ J ]. Cancer Res, 2001, 61( 3 ): 903-907.

[ 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 ): 1731-1737.

[ 9 ] Goldberg SF, Miele ME, Hatta N, et al. Melanoma metastasis suppression by chromosome 6: Evidence for a pathway regulated by CRSP3 and TXNIP [ J ]. Cancer Res, 2003, 63( 2 ): 432-440.

[ 10 ] Shirasaki F, Takata M, Hatta N, et al. Loss of expression of the metastasis suppressor gene KiSS-1 during melanoma progression and its association with LOH of chromosome 6q16. 32q23 [ J ]. Cancer Res, 2001, 61( 20 ): 7422-7425.

[ 11 ] Stark AM, Tongers K, Maass N, et al. Reduced metastasis-suppressor gene mRNA-expression in breast cancer brain metastases [ J ]. J Cancer Res Clin Oncol, 2005, 131( 3 ): 191-198.

[ 12 ] Shengbing Z, Feng LJ, Bin W, et al. Expression of KiSS1 gene and its role in invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma [ J ]. Anat Rec ( Hoboken ), 2009, 292( 8 ): 1128-1134.

[ 13 ] Shoji S, Tang XY, Umemura S, et al. Metastin inhibits migration and invasion of renal cell carcinoma with overexpression of metastin receptor [ J ]. Eur Urol, 2009, 55( 2 ): 441-449.

[ 14 ] Jiang Y, Berk M, Singh LS, et al. KiSS1 suppresses metastasis in human ovarian cancer via inhibition of protein kinase C alpha [ J ]. Clin Exp Metastasis, 2005, 22( 5 ): 369-376.

[ 15 ] Zohar R, Suzuki N, Suzuki K, et al. Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration [ J ]. J Cell Physiol, 2000, 184( 1 ): 118-130.

[ 16 ] Rosen DG, Wang L, Atkinson JN, et al. Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer [ J ]. Gynecol Oncol, 2005, 99( 2 ): 267-277.

[ 17 ] Yan C, Wang H, Boyd DD. KiSS1 represses 92-kDa type IV collagenase expression by down-regulating NF-kappa B binding to the promoter as a consequence of I kappa B alpha-induced block of p65/p50 nuclear translocation [ J ]. J Biol Chem, 2001, 276( 2 ): 1164-1172.

[ 18 ] Philip S, Kundu GC. Osteopontin induces nuclear factor kappa B mediated promatrix metallo-proteinase-2 activation through I kappa B Alpha/IKK signaling pathways, and curcumin( diferulolylmethane )down-regulates these pathways [ J ]. J Biol Chem, 2003, 278( 6 ): 14487-14497.

[ 19 ] Rangaswami H, Bullbule A. Nuclear factor inducing kinase plays crucial role in osteopontin induced MAPK/IKK dependent nuclear factor kappa B mediated promatrix metalloproteinase-9 activation [ J ]. J Biol Chem, 2004, 279( 37 ): 38921-38935.

[ 收稿日期 ] 2011 - 08 - 09 [ 修回日期 ] 2011 - 11 - 11

[ 本文编辑 ] 韩丹