

# 驱动蛋白超家族 18A 在结直肠癌组织中的表达及意义

李 斌<sup>1</sup>, 冯联忠<sup>1</sup>, 王春华<sup>2</sup>, 鲍 轶<sup>3</sup>, 郑 丽<sup>3</sup>, 董来荣<sup>1</sup>

**摘要 目的:** 探讨结直肠癌组织中驱动蛋白超家族中 18A (KIF18A) 的表达及其与患者临床病理特征和预后的关系。**方法:** 采用实时荧光定量 PCR 方法, 检测 35 例患者结直肠癌组织及相应癌旁正常组织 (距肿瘤边缘大于 5 cm) 中 KIF18A mRNA 的表达水平; 回顾性分析前期接受手术治疗的 92 例结直肠癌患者的临床病理特征和术后随访资料, 采用免疫组织化学方法检测结直肠癌组织标本和 20 例正常结直肠组织 (非癌旁组织) 中 KIF18A 蛋白的表达情况; 比较不同病理特征患者的 KIF18A 的表达率, 并分析其表达水平与结直肠癌患者预后的关系。**结果:** 35 例结直肠癌组织中 KIF18A mRNA 表达量为  $4.056 \pm 0.4024$ , 明显高于相应癌旁正常组织的  $1.253 \pm 0.1438$  ( $P < 0.01$ )。KIF18A 主要表达在细胞质, KIF18A 蛋白在结直肠癌组织中的高表达率 80% (74/92), 显著高于正常结直肠组织中高表达率 15% (3/20,  $\chi^2 = 32.741$ ,  $P < 0.01$ )。KIF18A 在结直肠癌组织中的表达水平与肿瘤浸润深度 ( $\chi^2 = 15.031$ ,  $P < 0.01$ )、淋巴结转移 ( $\chi^2 = 6.064$ ,  $P < 0.05$ ) 及 pTNM 分期 ( $\chi^2 = 6.546$ ,  $P < 0.05$ ) 有关。KIF18A 高表达组 3 年生存率为 54.1%, 低表达组为 100% ( $\chi^2 = 15.326$ ,  $P < 0.01$ )。单因素 Cox 回归分析显示, 肿瘤大小 ( $P < 0.05$ )、分化程度 ( $P < 0.01$ )、浸润深度 ( $P < 0.01$ )、淋巴结转移情况 ( $P < 0.01$ )、p TNM 分期 ( $P < 0.01$ ) 及 KIF18A 表达水平 ( $P < 0.01$ ) 与预后相关。多因素 Cox 回归分析显示, KIF18A 表达水平是影响结直肠癌预后的独立危险因素 (HR = 11.419, 95% CI: 1.504~86.684,  $P < 0.05$ )。**结论:** KIF18A 在结直肠癌组织中表达水平较高, 提示其可能与结直肠癌患者的不良预后有关, 有可能作为结直肠癌诊治和预后的潜在标志物。

**关键词:** 驱动蛋白超家族 18A; 结直肠肿瘤; 预后

中图分类号: R 735.3 文献标识码: A 文章编号: 1007-6948(2019)04-0432-06

doi: 10.3969/j.issn.1007-6948.2019.04.002

## Expression of KIF18A in Colorectal Carcinoma and its Relationship with Clinicopathological Features

LI Bin, FENG Lian-zhong, WANG Chun-hua, et al. *The Second Affiliated Hospital of Jiaying University, Jiaying (314000), China*

**Abstract Objective** To explore the expression of KIF18A in colorectal carcinoma tissues and its relationship with various clinicopathological parameters and prognosis of the patients. **Methods** The fresh paired colorectal cancer tissues and adjacent normal tissues (> 5 cm from the edge of tumor) from 35 colorectal cancer patients undergoing operation from Jan. 2016 to Jun. 2016 were collected. The relative expression of KIF18A at mRNA level was detected by real-time fluorescence quantitative Polymerase Chain Reaction. Clinicopathological and follow-up data of 92 patients with colorectal carcinoma undergoing operation from Jan. 2012 to Jul. 2012 were retrospectively analyzed. The expression of KIF18A protein in samples of 92 resected colorectal cancer tissues and 20 normal colorectal tissues was detected by immunohistochemistry. The expression rates of KIF18A were compared among different clinicopathological features. Moreover, the association between KIF18A expression and prognosis was analyzed. **Results** The relative expression quantity of KIF18A at mRNA level in colorectal cancer tissues ( $4.056 \pm 0.4024$ ) was significantly higher than that in adjacent normal tissues ( $1.253 \pm 0.1438$ )

with significant difference ( $P < 0.01$ ). The expression of KIF18A protein located mainly in cytoplasm. Positive rate of KIF18A expression in colorectal cancer tissues was 80% (74/92), which was obviously higher than that in normal colorectal tissues (15%,

基金项目: 浙江省嘉兴市科技技术局科技计划项目 (2015AY23027)

浙江嘉兴学院附属第二医院 1. 肿瘤外科; 2. 病理科; 3. 中心实验室 (嘉兴 314000)

通信作者: 董来荣, E-mail: chongcao504@sohu.com

3/20) with significant difference ( $\chi^2=32.741, P<0.01$ ). The analysis on clinicopathological parameters suggested that the expression level of KIF18A in cancer tissues was associated with invasion depth ( $\chi^2=15.031, P<0.01$ ), lymph node metastasis ( $\chi^2=6.064, P<0.05$ ) and pTNM staging ( $\chi^2=6.546, P<0.05$ ). The overall 3-year survival of colorectal cancer patients with high levels of KIF18A expression was lower than that of patients with low levels of KIF18A expression (54.1% vs 100%,  $\chi^2=15.326, P<0.01$ ). Univariate Cox regression analysis showed that tumor size ( $P<0.05$ ), degree of differentiation ( $P<0.01$ ), depth of tumor invasion ( $P<0.01$ ), lymph node metastasis ( $P<0.01$ ), pTNM staging ( $P<0.01$ ) and KIF18A expression level ( $P<0.01$ ) were associated with the prognosis of colorectal cancer patients. Multivariate Cox regression analysis indicated that the level of KIF18A expression was independent factor impacting the survival of colorectal cancer patients (HR =11.419, 95% CI:1.504~86.684,  $P<0.05$ ). **Conclusion** The high expression of KIF18A in colorectal cancer suggests that KIF18A may be associated with poor prognosis of patients with colorectal cancer and may be a potential marker for diagnosis, treatment and prognosis of colorectal cancer.

**Key words:** Kinesin family18A; colorectal neoplasms; prognosis

结直肠癌的发生、发展和转移是一个多阶段、多因素及多环节的复杂动态变化过程。近年来有研究发现,驱动蛋白的异常表达可影响细胞在有丝分裂过程中遗传物质的分配,导致子代细胞的缺陷,从而引起肿瘤的发生<sup>[1]</sup>。驱动蛋白超家族18A(kinesin family 18A)由894个氨基酸组成,分子质量约为100 ku( $1.0 \times 10^5$ )<sup>[2]</sup>,是驱动蛋白超家族的一个成员,属于微管解聚酶Kip3家族<sup>[3]</sup>。本研究收集2016年1月—2016年6月嘉兴学院附属第二医院手术治疗的结直肠癌患者35例,从mRNA及蛋白水平检测KIF18A在结直肠癌组织中的表达,探讨KIF18A与结直肠癌临床病理特征和预后的关系,寻求新的结直肠癌分子标记物和治疗靶点。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本组共35例,男17例,女18例;年龄42~83岁。取手术切除的新鲜结直肠癌组织及相应癌旁正常组织(距肿瘤边缘大于5 cm),迅速置入专用标本保存液的试管,再置入-80℃冰箱保存。

第2组收集2012年1月—2012年7月结直肠癌92例患者的石蜡标本。男46例,女46例。年龄30~86岁,≤60岁30例,>60岁62例。肿瘤位于结肠48例,直肠44例。肿瘤直径≤4 cm者51例,>4 cm者41例。有淋巴结转移39例,无淋巴结转移53例。分化程度为高分化5例,中分化67例,低分化20例。TNM分期根据美国癌症联合委员会(AJCC)制定的第7版肿瘤分期,I期11例,II期41例,III期38例,IV期2例。

另有2010年1月—2016年1月因结肠损伤等

疾病接受手术治疗20例(男17例,女3例;年龄37~69岁)患者的正常结直肠组织(非癌旁组织),制成组织切片,经免疫组化方法进行染色。本研究经医院伦理委员会批准。

**1.2 随访** 所有结直肠癌病例均经病理学检查证实,均为第一次行结直肠癌手术,术前均未行化疗、放疗及其他抗肿瘤治疗。术后采用门诊和电话方式进行随访,随访至2017年7月6日。术后到患者因肿瘤死亡的时间为总生存时间。

**1.3 试剂** TRIzol(美国 invitrogen 公司);SYBR-Green 荧光染料、定量PCR试剂盒、反转录试剂盒(美国ABI公司);一抗,兔抗人KIF18A抗体(美国 Proteintech 公司);抗兔二抗(武汉博士得生物公司);实时荧光定量PCR引物由上海生工合成。

**1.4 检测方法** 实时荧光定量PCR:按照TRIzol说明书对35对新鲜样本提取RNA并检测RNA完整性,然后按反转录试剂盒说明书要求,逆转录生成cDNA。KIF18A扩增的正向引物5'-GTTCAGCCTATTCCTTGTTGCT-3',反向引物5'-GCACACTTTGAGTGGTGGA-3'。

扩增条件:变性阶段(95℃,5 min),扩展定量阶段(95℃,30 s;60℃,60 s),共40个循环,绘制溶解曲线。每个样本的检测均重复2次,以GAPDH为内参;CT表示目的基因的荧光值设定的阈值时的反应循环数。基因相对表达量采用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算,分析目的基因表达量的差异。

**免疫组化检测:**对组织切片样本进行脱蜡,水化,柠檬酸抗原修复液行热抗原修复,灭活内源性过氧化物酶,加KIF18A抗体过夜,加抗兔二

抗工作液, DAB 显色, 苏木精复染, 冲洗, 脱水, 封片。检测结果由病理医师双盲阅片判定。

1.5 判断标准 以细胞膜/细胞浆呈棕黄色细颗粒状染色为阳性染色。染色面积: 未着色为 0 分, 少于 25% 为 1 分, 25%~75% 为 2 分, 大于 75% 为 3 分; 着色强度: 无着色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 黄色为 2 分, 棕黄色为 3 分。两者乘积为样本最终评分, 样本最终评分 0~3 分为低表达组, 大于 3 分为高表达组<sup>[4]</sup>。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析。计量资料比较采用配对 *t* 检验, 采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 精确概率法分析 KIF18A 与结直肠癌临床病理特征的关系; 生存曲线采用 Kaplan-Meier 法绘制, 生存率的比较采用 *Log-Rank* 检验。采用 Cox 回归模型进行单因素和多因素回归分析。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 KIF18A mRNA 在结直肠癌组织及相应癌旁正常组织中的表达情况 实时定量 PCR 检测结果显示, 35 例结直肠癌组织及相应癌旁正常组织中的 KIF18A mRNA 表达量分别为  $4.056 \pm 0.4024$  和  $1.253 \pm 0.1438$ , 结直肠癌组织中 KIF18A

mRNA 的表达水平显著高于相应癌旁正常组织 ( $P < 0.01$ )。见图 1。

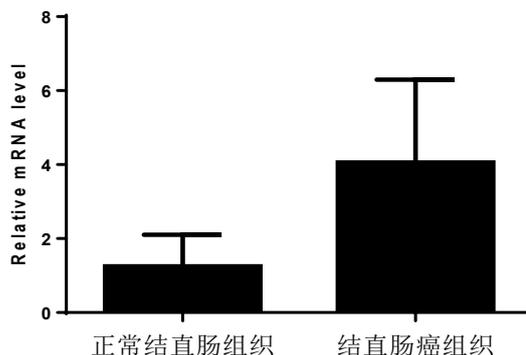


图 1 35 对标本中 KIF18A mRNA 表达差异 (结直肠癌组织 - 癌旁正常组织)

2.2 KIF18A 蛋白的表达情况 免疫组化方法检测 92 例结直肠癌组织及 20 例结直肠正常组织中 KIF18A 蛋白的表达, 发现其主要表达于细胞质。见图 2。KIF18A 蛋白在结直肠癌组织中的高表达

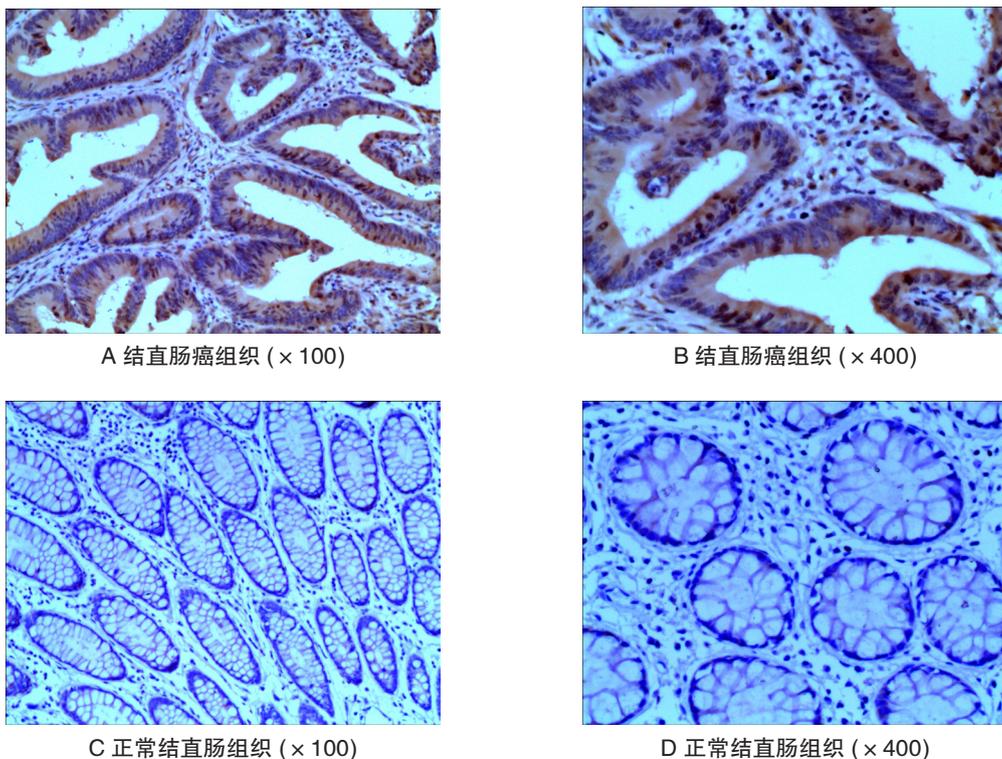


图 2 结直肠癌及正常结直肠组织中 KIF18A 蛋白表达情况 (免疫组化染色)

率为 80% (74/92), 显著高于结直肠正常组织中的高表达率 15% (3/20,  $\chi^2=32.741, P < 0.01$ )。

**2.3 KIF18A 蛋白的表达与结直肠癌患者临床病理特征的关系** 分析结直肠癌患者临床病理特征与组织切片中 KIF18A 蛋白表达情况, 结果发现, KIF18A 蛋白高表达率与结直肠癌的浸润深度、淋

巴结转移及 pTNM 分期相关 (均  $P < 0.05$ ); 浸润至浆膜层、有淋巴结转移和 pTNM 分期较晚的患者, 结直肠癌组织中 KIF18A 蛋白高表达率较高; 而与患者性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤部位及分化程度无关 (均  $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 92 例结直肠癌患者临床病理特征与 KIF18A 蛋白表达的关系 (n, %)

临床病理特征	例数	KIF18A 蛋白表达 (例 %)		$\chi^2$	P 值
		高表达 (%)	低表达 (%)		
性别				0	1.0
男	46	37(80)	9(20)		
女	46	37(80)	9(20)		
年龄 (岁)				1.099	0.295
$\leq 60$	30	26(87)	4(13)		
$> 60$	62	48(77)	14(23)		
肿瘤部位				0.536	0.464
结肠	48	40(83)	8(17)		
直肠	44	34(77)	10(23)		
肿瘤直径 (cm)				4.522	0.033
$\leq 4$	51	37(73)	14(27)		
$> 4$	41	37(90)	4(10)		
肿瘤分化程度				0.338	0.561
高、中分化	72	57(79)	15(21)		
低分化	20	17(85)	3(15)		
肿瘤浸润深度				15.031	0.000
T1-2	27	15(56)	12(44)		
T3-4	65	59(91)	6(9)		
淋巴结转移				6.064	0.014
无	53	38(72)	15(28)		
有	39	36(92)	3(8)		
p TNM 分期				6.546	0.011
I ~ II	52	37(71)	15(29)		
III ~ IV	40	37(93)	3(7)		

**2.4 KIF18A 蛋白表达与结直肠癌患者累计生存率及预后的关系** 对 92 例结直肠癌患者术后生

存曲线采用 Kaplan-Meier 法绘制, 行 Log-Rank 检验发现, KIF18A 蛋白高表达组患者的 3 年生

存率为 54.1%，明显低于低表达组患者的 100% ( $\chi^2=15.326.0, P=0.000$ )。见图 3。

单因素 Cox 回归模型分析提示，肿瘤大小、分化程度、浸润程度、淋巴结转移情况、p TNM 分期及 KIF18A 蛋白表达水平与结直肠癌患者预后相关 ( $P<0.05$ )。因肿瘤浸润深度、淋巴结转移与 p TNM 分期具有相关关系，故将患者性别、年龄、肿瘤大小、分化程度、pTNM 分期及 KIF18A 蛋白表达水平纳入多因素 Cox 回归，结果提示 KIF18A 蛋白表达水平、pTNM 分期为影响本组结直肠癌患者预后的独立危险因素 ( $P=0.019, 0.024$ )。见表 2。

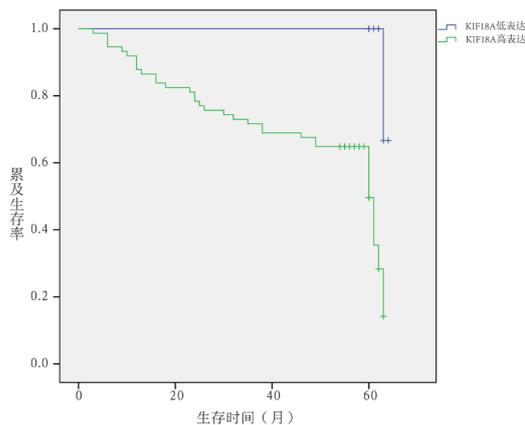


图 3 KIF18A 蛋白低表达与高表达结直肠癌患者生存曲线的比较

表 2 影响本组 92 例结直肠癌患者总生存率的危险因素分析

临床病理因素	例数	单因素分析		多因素分析	
		HR(95%CI)	P 值	HR(95%CI)	P 值
性别 (男/女)	46/46	0.803 (0.409~1.578)	0.524	0.949 (0.461~1.955)	0.888
年龄 ( $\leq 60$ 岁 / $> 60$ 岁)	30/62	0.842 (0.424~1.674)	0.624	1.468 (0.689~3.128)	0.320
肿瘤部位 (结肠男/直肠)	48/44	0.729 (0.372~1.427)	0.356		
肿瘤直径 ( $> 4$ cm / $\leq 4$ cm)	41/51	2.378 (1.207~4.686)	0.012	1.743 (0.854~3.557)	0.127
肿瘤分化程度 (低分化/高、中分化)	20/72	0.351 (0.178~0.691)	0.002	0.672 (0.290~1.557)	0.354
肿瘤浸润深度 (T3-4/ T1-2)	65/27	8.420 (2.495~28.419)	0.001		
淋巴结转移 (有/无)	39/53	3.679 (1.822~7.431)	0.000		
p TNM 分期 (III~IV / I~II)	40/52	4.327 (2.075~9.025)	0.000	2.683 (1.137~6.331)	0.024
KIF18A 表达 (高表达/低表达)	74/18	18.462 (2.481~137.369)	0.004	11.419 (1.504~86.684)	0.019

### 3 讨论

结直肠癌是世界范围内常见的消化道恶性肿瘤之一。目前我国结直肠癌发病率位居所有恶性肿瘤的第 6 位，其死亡率为第 5 位，呈逐年上升趋势<sup>[5]</sup>。其治疗主要是以手术为主，包括化疗、放疗及靶向治疗等的综合治疗<sup>[6]</sup>，但整体疗效欠佳<sup>[7]</sup>。近年来靶向治疗发展迅速，寻找结直肠癌新的、有效的分子标记物和治疗靶点，以提高结直肠癌综合治疗水平。

近年来有研究表明，驱动蛋白超家族是细胞内重要的功能性蛋白，参与细胞器、染色体及 RNA 结合蛋白的转运，在细胞的有丝分裂过程中起着重要的作用<sup>[8]</sup>。KIF18A 能沿微管向正极运

动，并且在微管末端发挥微管解聚酶的作用，从而调节微管长度<sup>[9]</sup>。动粒微管的长度决定 KIF18A 的微管解聚能力，KIF18A 与姐妹染色体的中板集合及分离密切相关<sup>[10-12]</sup>。近年来有研究发现，KIF18A 蛋白异常表达，将导致细胞有丝分裂过程中姐妹染色体的分离异常，引起细胞的非整倍体发生，从而诱发肿瘤<sup>[13]</sup>。有研究表明，KIF18A 在细胞的有丝分裂周期中发挥重要作用，与细胞周期素 B1 的表达量周期相似，其表达量在细胞有丝分裂期比分裂间期明显增多<sup>[3]</sup>。有研究发现，KIF18A 在人乳腺癌中呈高表达，其高表达与肿瘤的恶性程度、转移及预后相关<sup>[14]</sup>。有研究通过对早期肝癌中的 KIF18A 表达分析，发现其在肝癌

组织中高表达水平与患者的不良预后相关<sup>[15]</sup>。在本研究中,我们首先通过荧光定量 PCR 方法,发现结直肠癌组织中的 KIF18A mRNA 表达水平显著高于癌旁组织,说明 KIF18A 在结直肠癌组织中呈高表达。进一步通过免疫组化染色方法,对 92 例结直肠癌组织和 20 例的正常结直肠组织中的 KIF18A 表达水平进行了检测,分析其与结直肠癌临床病理特征和预后的关系。结果表明,结直肠癌组织中的 KIF18A 表达水平显著高于正常结直肠组织,并且发现 KIF18A 表达与结直肠癌浸润深度、淋巴结转移及 pTNM 分期有关, KIF18A 在浸润至浆膜层、有淋巴结转移和 pTNM 分期较晚的结直肠癌组织中的高表达率较高。生存分析结果显示, KIF18A 高表达患者 3 年生存率显著低于低表达者,说明 KIF18A 表达水平与患者术后生存时间有关。Cox 回归分析结果提示 KIF18A 蛋白表达水平为影响本组结直肠癌患者预后的独立危险因素,进一步提示结直肠癌组织中 KIF18A 高表达可能不利于患者预后,是潜在的结直肠癌预后指标。

综上所述, KIF18A 在结直肠癌组织中的表达水平显著高于正常结直肠组织。 KIF18A 在结直肠癌组织中的表达水平与结直肠癌浸润深度、淋巴结转移及 pTNM 分期有关。结直肠癌组织中 KIF18A 呈高表达,则可能提示结直肠癌患者预后不良。个人的饮食习惯、有无吸烟等不良的生活方式以及生活环境的污染等因素可能对本研究有所影响,但随着 KIF18A 基因与结直肠肿瘤关系研究的不断深入, KIF18A 有望成为结直肠癌潜在肿瘤标记物和治疗靶点。

#### 参考文献:

- [1] Yue Y, Feng YM. The role of kinesin Family Proteins in tumorigenesis and progression: potential biomarkers and molecular targets for cancer therapy [J]. *Cancer*, 2010, 116 (22) :5150-5160.
- [2] Mayr MI, Hummer S, Bormann J, et al. The human kinesin Kif 18A is a motile microtubule depolymerase essential for chromosome congression[J]. *Curt Biol*, 2007, 17(6):488-498.
- [3] Luboshits G, Benayahud D. MS KIF18A, new kinesin; Structure and cellular expression[J]. *Gene*, 2005, 351:19-28.
- [4] Yang S, Li Y, Lu M, et al. Overexpression of eukaryotic elongation factor 1 alpha-2 is associated with poorer prognosis in patients gastric cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 1419(7):1265-1275.
- [5] 陈万青, 张思维, 曾红梅, 等. 中国 2010 年恶性肿瘤发病与死亡 [J]. *中国肿瘤*, 2014, 23 (1) :1-10.
- [6] Rougier P, Andre T, Panis Y, et al. Colon cancer[J]. *Gastroenterol Clin Biol*, 2006, 30(2): 2S24-2S29.
- [7] McCormick D, Kibbe PJ, Morgan SW. Colon cancer: prevention, diagnosis, treatment [J]. *Gastroenterol Nurs*, 2002, 25(5):204-211.
- [8] Miki H, Okada Y, Hirokawa N. Analysis of kinesin superfamily: insights into structure and function [J]. *Trends Cell Biol*, 2005, 15(9):467-476.
- [9] Jr GM, Carvalho P, Roof DM, et al. Plus end-specific depolymerase activity of Kip3, a kinesin-8 protein, explains its role in positioning the yeast mitotic spindle[J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(9):913-923.
- [10] Huang Y, Yao Y, Xu HZ, et al. Defects in chromosome congression and mitotic progression in KIF18A deficient cells are paaly mediated through impaired functions of CENPE[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(16): 2643-2649.
- [11] Stumpff J, Woemanrd L. Chromosome congression: The kinesin-8-step path to alignment[J]. *Curr Biol*, 2007, 17(9):326-328.
- [12] Gardner MK, Odde DJ, Bloom K. Kinesin-8 molecular nlotors: Putting the brakes on chromosome oscillations[J]. *Trends Cell Biol*, 2008, 18(7):307-310.
- [13] Draviam VM, Xie S, Sorger PK. Chromosome segregation and genomic stability[J]. *Curt Opin Genet*, 2004, 14(2):120-125.
- [14] Zhang C, Zhu C, Chen H, et al. KIF18A is involved in human breast carcinogenesis[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(9) :1676-1684.
- [15] Liao W, Huang H, Liao Y, et al. High KIF18A expression correlates with unfavorable prognosis in primary hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2014, 15 (21) :10271-10279.

(收稿: 2018-06-21 发表: 2019-07-31)