

· 论著 ·

Kiss-1 基因在乳腺肿瘤组织中的表达及其临床意义

谢菲 周波 杨德启

【摘要】 目的 探讨 Kiss-1 mRNA 在乳腺肿瘤组织和正常腺体组织中的表达及其临床意义。**方法** 采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测 70 例乳腺癌、40 例乳腺纤维腺瘤及肿瘤旁正常腺体中 Kiss-1 mRNA 的表达,采用配对 t 检验、成组 t 检验及方差分析比较各组间 Kiss-1 mRNA 的相对表达水平。**结果** Kiss-1 mRNA 在乳腺癌组织及纤维腺瘤组织中的表达量分别为 (0.952 ± 0.576) 、 (0.587 ± 0.496) ,均高于正常腺体组织($t=7.917, P=0.00; t=2.656, P=0.011$),乳腺癌组织中的表达量高于纤维腺瘤组织($t=3.365, P=0.001$)。有淋巴结转移的乳腺癌组织中 Kiss-1 mRNA 表达量为 (0.662 ± 0.530) ,低于无淋巴结转移乳腺癌组织 (1.124 ± 0.537) ($t=3.495, P=0.001$)。**结论** Kiss-1 mRNA 在乳腺肿瘤组织中相对高表达,可能成为潜在的乳腺肿瘤标志物; Kiss-1 mRNA 低表达可能与乳腺癌淋巴结转移相关。

【关键词】 Kiss-1 基因;乳腺肿瘤;转移

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Expression of Kiss-1 gene in breast tumor tissues and its clinical significance XIE Fei, Zhou Bo, YANG De-qi. Breast Disease Center, People's Hospital of Peking University, Beijing 100044, China

Corresponding author: Zhou Bo, E-mail: zhoubo@pkuph.edu.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the expression of Kiss-1 mRNA in normal breast tissues and breast tumor tissues and its clinical significance. **Methods** The expression of Kiss-1 mRNA was detected by reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR) in normal breast tissues and breast tumor tissues of 70 patients with breast cancer and 40 patients with fibroadenoma. **Results** The expression of Kiss-1 mRNA in breast cancer tissues (0.952 ± 0.576) and fibroadenoma tissues (0.587 ± 0.496) were higher than that in adjacent normal tissues($t=7.917, P=0.00; t=2.656, P=0.011$). The expression of Kiss-1 mRNA in breast cancer tissues was higher than that in fibroadenoma tissues ($t=3.365, P=0.001$). The expression of Kiss-1 mRNA in breast cancer patients with lymph node metastasis (0.662 ± 0.530), was lower than that in patients without lymph node metastasis (1.124 ± 0.537) ($t=3.495, P=0.001$). **Conclusion** With the relatively high expression in breast tumor tissues, Kiss-1 mRNA may serve as a new marker of breast tumor. The low expression of Kiss-1 mRNA may be related to lymph node metastasis of breast cancer.

【Key words】 Kiss-1 gene; breast neoplasms; metastasis

Kiss-1 作为一个新发现的肿瘤转移相关基因被广泛关注,研究发现其与

多种肿瘤的进展、转移程度密切相关^[14]。有关 Kiss-1 在乳腺癌中作用的结论尚不一致,而在乳腺良性肿瘤中表达的研究也较少。本文比较乳腺正常腺体、纤维腺瘤及乳腺癌中 Kiss-1 表达的差异并研究其与乳腺癌淋巴结转移的关系,探讨其是否可能成为预测乳腺肿瘤发生、发展及淋巴结转移的生物学指标。

1 资料和方法

1.1 研究对象

收集北京大学人民医院乳腺外科 2006 年 12 月至 2007 年 7 月手术切除并经病理确诊的原发性乳腺癌标本 70 例,乳腺纤维腺瘤标本 40 例,每例标本均留取肿瘤旁正常腺体作为对照,患者均为女性。乳腺癌患者年龄为 26 ~ 81 岁,中位年龄为 53 岁,术前未行放射治疗、化疗;病理组织学类型:浸润性导管癌 62 例,浸润性小叶癌 6 例,黏液腺癌 2 例;肿瘤直径 ≤ 2 cm 者 28 例, > 2 cm 者 42 例;组织学分级:1 级 16 例,2 级 30 例,3 级 24 例 临床分期:I 期 18 例,II 期 43 例,III 期 9 例;其中伴淋巴结转移者 26 例,无淋巴结转移者 44 例,无远处脏器转移患者。乳腺纤维腺瘤患者年龄 19 ~ 47 岁,中位年龄 31 岁,均无恶性肿瘤病史。

1.2 主要试剂

Trizol™ 试剂盒购自美国 GIBICO 公司;RT-PCR 逆转录试剂盒购自日本 TOYOBO 公司;2×Mix 及 DNA ladder 购自天根生化科技(北京)有限公司。采用已知高表达 Kiss-1 的胎盘组织作为阳性对照^[1]。

1.3 总 RNA 的提取

取组织约 100 mg 于液氮浴中研碎,加入 1 ml Trizol 裂解,按照 Trizol 试剂说明书提取总 RNA,用紫外分光光度计测定样品的 $D(260\text{ nm})$ 和 $D(280\text{ nm})$ 吸光度值,计算 RNA 样本浓度[RNA 样本浓度 = $D(260\text{ nm}) \times 100 \times 40\text{ ng}/\mu\text{l}$]。

1.4 cDNA 合成

在逆转录反应体系中加入 RNA 1.5 μl 、Rnase Free H_2O 9.5 μl 、5×RT 缓冲液 4 μl 、10 mmol/L dNTPs 2 μl 、Rnase 抑制剂 1 μl 、Random Primer 1 μl (25 pmol/ μl) 及 Rever Tra Ace 1 μl ,于 30 °C 孵育 10 min,42 °C 逆转录反应 20 min,99 °C 逆转录灭活 5 min,置于 4 °C,以 1200 r/min(离心机半径为 6 cm)离心 30 s。

1.5 PCR 扩增

Kiss-1 基因上游引物序列为 5'-TAGAATCCCTGGGCTCCTG-3',下游引物序列为 5'-TCCCTTGGTGCCGTCTTC-3'。反应条件为 94 °C 2 min,94 °C 45 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,40 个循环,72 °C 后延伸 7 min。

1.6 产物凝胶电泳

用 2% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)电泳。紫外灯下观察电泳结

果。以 GAPDH 为内对照检测转录效率,用 Image Pro-plus 图像处理软件分析各电泳带的吸光度值,以 Kiss-1 片段与 GAPDH 片段的吸光度之比值作为 Kiss-1 mRNA 的相对表达水平。

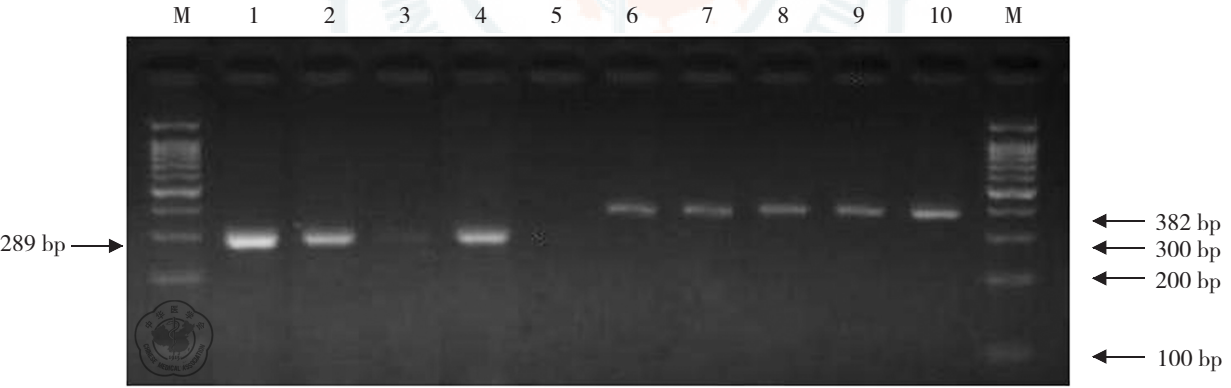
1.7 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件进行分析。经正态性检验和方差齐性检验,乳腺癌组织、乳腺纤维腺瘤组织及正常腺体组织中 Kiss-1 的表达水平均符合正态分布且方差整齐,故数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。乳腺癌及癌旁正常腺体、乳腺纤维腺瘤及瘤旁正常腺体间 Kiss-1 相对表达水平的比较采用配对 t 检验,乳腺癌及乳腺纤维腺瘤、癌旁腺体和瘤旁腺体间 Kiss-1 相对表达水平的比较采用成组 t 检验;乳腺癌 Kiss-1 表达水平与临床病理指标间的关系采用 t 检验及方差分析, $P < 0.050$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Kiss-1 mRNA 在不同乳腺组织中的表达

Kiss-1 mRNA 在乳腺癌、乳腺纤维腺瘤及正常乳腺组织中均有表达(图 1)。乳腺癌中 Kiss-1 mRNA 的表达量高于乳腺纤维腺瘤 ($P < 0.050$, 表 1),也高于癌旁正常腺体 ($P < 0.050$, 表 2)。



M:标记条带;1-5: Kiss-1 产物;1: 胎盘(阳性对照);2:乳腺癌;3: 癌旁腺体;4: 乳腺纤维腺瘤;5: 瘤旁腺体;6-10:GAPDH 产物;6: 胎盘(阳性对照);7: 乳腺癌;8: 癌旁腺体;9: 乳腺纤维腺瘤;10:瘤旁腺体

图 1 Kiss-1 在不同组织中的表达产物电泳图(RT-PCR 法)

表 1 Kiss-1 mRNA 在乳腺癌组织和乳腺纤维腺瘤组织中的表达(RT-PCR 法)

组织类型	例数	Kiss-1 mRNA 相对表达水平	t 值	P 值
乳腺癌	70	0.952 ± 0.576	3.365	0.001
乳腺纤维腺瘤	40	0.587 ± 0.496		

表 2 Kiss-1 mRNA 在乳腺癌组织和癌旁腺体组织中的表达(RT-PCR 法)

组织类型	例数	Kiss-1 mRNA 相对表达水平	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
乳腺癌	70	0.952±0.576	7.917	0.000
癌旁正常腺体	70	0.503±0.275		

Kiss-1 mRNA 在乳腺纤维腺瘤组织中的表达量高于癌旁正常腺体组织($P<0.050$, 表 3); 癌旁正常腺体组织中 Kiss-1 mRNA 的表达量与纤维腺瘤旁正常腺体组织中的表达量之间差异无统计学意义($P>0.050$, 表 4)。

表 3 Kiss-1 mRNA 在乳腺纤维腺瘤组织和癌旁腺体组织中的表达(RT-PCR 法)

组织类型	例数	Kiss-1 mRNA 相对表达水平	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
乳腺纤维腺瘤	40	0.587±0.496	2.656	0.011
癌旁正常腺体	40	0.423±0.237		

表 4 Kiss-1 mRNA 在癌旁腺体组织和癌旁腺体组织中的表达(RT-PCR 法)

组织类型	例数	Kiss-1 mRNA 相对表达水平	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
癌旁正常腺体	70	0.503±0.275	1.528	0.129
癌旁正常腺体	40	0.423±0.237		

2.2 Kiss-1 mRNA 水平与乳腺癌临床病理指标的关系

在 70 例乳腺癌标本中, 淋巴结转移者的 Kiss-1 mRNA 表达量低于无淋巴结转移者 [(0.662 ± 0.530) 比 (1.124 ± 0.537) , $t = 3.495$, $P = 0.001$]。Kiss-1 mRNA 在乳腺癌组织中的表达与患者年龄、绝经与否、肿瘤组织学分级、肿瘤大小、临床分期等均无关系($P>0.050$, 表 5、6)。

3 讨论

Kiss-1 最初是从黑色素瘤细胞株中分离的一个肿瘤转移抑制基因, 其表达产物为 Metastin^[1], 是 G 蛋白偶联受体 GPR54 的天然配体。研究发现, Kiss-1 在有转移的肿瘤组织中表达缺失^[2], 而在正常组织如脑、胎盘、胰腺、肝脏、子宫和乳腺中均有不同水平表达, 故将其定义为“转移抑制基因”。Kiss-1 在肿瘤形成中的作用目前结论尚不一致。在体研究发现早期乳腺癌患者体内可能存在 Kiss-1 基因的转录抑制, 间接提示 Kiss-1 可能起到抑制乳腺癌形成的作用^[3]。Jiang 等^[4]应用免疫组织化学技术研究发现 Kiss-1 蛋白在卵巢癌和

表 5 Kiss-1 mRNA 表达水平与乳腺癌临床病理指标间的关系

临床病理指标	例数	Kiss-1 mRNA 表达水平	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
年龄			-1.343	0.184
<50 岁	28	0.840±0.622		
≥50 岁	42	1.027±0.538		
绝经			-0.973	0.334
未绝经	25	0.862±0.622		
已绝经	45	1.002±0.550		
淋巴结转移			3.495	0.001
有	26	0.662±0.530		
无	44	1.124±0.537		
肿瘤直径			0.648	0.519
≤2 cm	28	1.007±0.573		
>2 cm	42	0.916±0.582		

表 6 Kiss-1 mRNA 与乳腺癌临床分期及组织学分级的关系

临床病理指标	例数	Kiss-1 mRNA 表达水平	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
组织学分级			1.071	0.348
1 级	16	0.976±0.581		
2 级	30	0.844±0.642		
3 级	24	1.073±0.475		
临床分期			0.394	0.676
I 期	18	1.028±0.634		
II 期	43	0.949±0.558		
III 期	9	0.818±0.581		

卵巢交界性肿瘤组织中的阳性率高于良性肿瘤组织及正常卵巢组织;张淑兰等^[5]采用 RT-PCR 技术检测 37 例卵巢上皮癌、15 例卵巢交界性上皮肿瘤、15 例卵巢良性上皮肿瘤及 11 例正常卵巢组织中 Kiss-1 mRNA 的表达,发现 Kiss-1 mRNA 在卵巢上皮癌及卵巢交界性上皮肿瘤组织中的表达水平均高于卵巢良性上皮肿瘤和正常卵巢组织,提示 Kiss-1 在卵巢肿瘤组织中相对高表达,并且可能在卵巢癌的形成过程中起到促进作用。本研究通过 RT-PCR 及免疫组织化学方法检测 Kiss-1 mRNA 在乳腺癌、乳腺纤维腺瘤中的表达,发现 Kiss-1 在乳腺癌、乳腺纤维腺瘤中的表达水平均高于正常腺体,而且其在乳腺癌中的表达水平高于乳腺纤维腺瘤($P<0.050$),提示 Kiss-1 可能在乳腺肿瘤的形成中起到促进作用。这与此前笔者在蛋白水平中检测 Kiss-1 与乳腺癌淋

巴结转移间关系的结论相吻合^[6],也与 Martin 等^[7]的研究结论相似,该研究发现 Kiss-1 在乳腺癌组织中表达高于正常组织,似乎表明 kiss-1 在乳腺癌的形成和转移中起促进作用。Kiss-1 在乳腺肿瘤中起促进还是抑制作用的结论尚不一致,其在乳腺肿瘤形成中所起的作用,还有待进一步研究证实。

Kiss-1 的抗肿瘤转移作用在许多研究中均有报道。Sanchez-Carbayo 等^[8]发现随着膀胱癌进展 Kiss-1 基因表达水平降低;采用原位杂交方法发现 25 例正常膀胱癌组织的 Kiss-1 基因表达均为阳性,而 80% 的浸润性膀胱癌中检测不到 Kiss-1 基因,提示 Kiss-1 基因在膀胱癌组织中有抑制肿瘤转移的作用,并在判断膀胱癌患者预后中具有价值。Dhar 等^[9]研究 40 例胃癌及邻近正常胃粘膜标本,发现低表达组脉管浸润、远处转移、肿瘤复发率更高,总体生存率及无瘤生存率更低,多因素分析说明 Kiss-1 基因是胃癌最强的独立预后因素。Ikeguchi 等^[10]通过实时定量 RT-PCR 技术检测 71 例食管鳞状细胞癌及其邻近正常组织中 Kiss-1 及其受体的表达情况,癌组织中两者的缺失率分别为 38%、61%,Kiss-1 和(或)hOT7T175 表达缺失与肿瘤大小、浸润深度无关,但与淋巴结转移低度相关。本研究发现 Kiss-1 在有淋巴结转移的乳腺癌中表达水平低于无淋巴结转移者($P=0.001$),且 Kiss-1 的表达与患者年龄、绝经与否、肿瘤组织学分级、肿瘤大小、临床分期等无关。这与 Kostadima 等^[11]的研究结果一致。该研究发现低表达 Kiss-1 基因的乳腺癌细胞系转移能力明显增强;而 Martin 等^[7]采用定量 PCR 法发现:淋巴结阳性的癌组织中 Kiss-1 基因表达量高于淋巴结阴性者,并且随临床分期的进展而增高;用 Kiss-1 转染人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 后,发现肿瘤细胞侵袭性明显增加,表明 Kiss-1 在乳腺癌的形成和转移中起促进作用。

Kiss-1 究竟是肿瘤转移抑制基因还是促进基因,目前尚无定论,但是,Marot 等^[12]的研究为学者们提供了一个新的视角。该研究将雌激素受体 α 亚型(ER- α)阴性的 MDA-MB-231 细胞转染 ER- α 后,Kiss-1 mRNA 的表达水平显著下降;而用雌激素受体拮抗剂他莫昔芬(TAM)处理 ER- α 阳性的 MCF-7 和 T47D 细胞后,Kiss-1 mRNA 的表达水平明显上升,提示 Kiss-1 的表达可能受到 ER- α 的负调控;同时,对 92 例绝经后乳腺癌患者的研究证实了 Kiss-1 的表达量随着乳腺癌分期的进展而增高,并且在绝经后 ER 阳性应用 TAM 治疗的乳腺癌患者中,Kiss-1 及其受体高表达的患者无瘤生存期较短,预后不良。此研究也证实了 Kiss-1 在乳腺癌中的促转移作用,另外还将 Kiss-1 的表达情况与雌激素受体状态相联系。本研究结果提示 Kiss-1 在乳腺肿瘤的形成中可能起到促进作用,但未研究 Kiss-1 的表达与乳腺癌雌、孕激素受体的关系。患者激素受体状态并不等同于激素水平状态,故研究不同雌、孕激素水平状态下 Kiss-1 的表达情况将是进一步研究的重点。

综上所述,本研究提示:Kiss-1 mRNA 在乳腺癌和乳腺纤维腺瘤中的表达水平均高于正常腺体,在乳腺癌中的表达水平也高于乳腺纤维腺瘤,并且与乳腺癌淋巴结转移有关;Kiss-1 mRNA 低表达时肿瘤发生、发展及转移的风险较高。但 Kiss-1 在乳腺肿瘤发生、发展过程中的真正作用目前还未完全明了,仍需进一步研究。对 Kiss-1 基因的深入研究有助于为乳腺癌转移的早期诊断、预后判断及合理治疗提供重要依据。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Shirasaki F, Takata M, Hatta N, et al. Loss of expression of the metastasis suppressor gene Kiss1 during melanoma progression and its association with LOH of chromosome 6q16.3-q23[J]. Cancer Res, 2001, 61(20):7422-7425.
- [3] Pentheroudakis G, Kostadima L, Dova L, et al. A twisted kiss: *in vitro* and *in vivo* evidence of genetic variation and suppressed transcription of the metastasis-suppressor gene Kiss1 in early breast cancer [J]. Neoplasma, 2010, 57(1):47-54.
- [4] Jiang Y, Berk M, Singh LS, et al. Kiss1 suppresses metastasis in human ovarian cancer via inhibition of protein kinase C alpha [J]. J Clin Exp Metastasis, 2005, 22(5):369.
- [5] 张淑兰, 于艺, 姜涛, 等. 卵巢上皮性癌组织中 Kiss-1 基因及其受体 GPR54 mRNA 的表达及其意义[J]. 中华妇产科杂志, 2005, 40(10):689-692.
- [6] 周波, 谢菲, 郭嘉嘉, 等. Kiss-1 及 nm23 表达与乳腺癌淋巴结转移的关系[J]. 中国癌症杂志, 2009, 19(3):171-174.
- [7] Martin TA, Watkins G, Jiang WG. Kiss-1 expression in human breast cancer[J]. Clin Exp metastasis, 2005, 22(6):503-511.
- [8] Sanchez-Carbayo M, Capodiceci P, Cordon-Cardo C. Tumour 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):609-617.
- [9] Dhar DK, Naora H, Kubota H, et al. Downregulation of Kiss-1 expression is responsible for tumor invasion and worse prognosis in gastric carcinoma [J]. Int J Cancer, 2004, 111(6):868-872.
- [10] 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):1379-1383.
- [11] 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):2499-2504.
- [12] Marot D, Bieche I, Aumas C, et al. High tumoral levels of Kiss1 and G-protein-coupled receptor 54 expression are correlated with poor prognosis of estrogen receptor-positive breast tumors[J]. Endocr Relat Cancer, 2007, 14(3):691-702.

(收稿日期:2010-02-20)

(本文编辑:罗承丽)

谢菲, 周波, 杨德启. Kiss-1 基因在乳腺肿瘤组织中的表达及其临床意义[J/CD]. 中华乳腺病杂志; 电子版, 2012, 6(1): 31-37.