

## 组织芯片检测 Kif2a 在乳腺癌中的表达及与预后的相关性

朱 燕<sup>1</sup>, 刘宏斌<sup>1\*</sup>, 杨其昌<sup>1</sup>, 张晓娟<sup>1</sup>, 沈 屹<sup>1</sup>, 孙永强<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>南通大学第二附属医院病理科, <sup>2</sup>外科, 江苏 南通 226001)

**[摘要]** 目的:组织芯片检测 Kif2a 在乳腺浸润性导管癌中的表达及与预后的相关性。方法:采用组织芯片技术及免疫组织化学方法检测 101 例乳腺浸润性导管癌组织及癌旁组织中 Kif2a 表达。对有随访结果的 63 例作单因素和多因素相关生存分析。结果:Kif2a 在乳腺浸润性导管癌中的表达与组织学分级、TNM 分期及淋巴结转移呈正相关( $P < 0.05$ )。在随访的 63 例中,单因素分析显示:乳腺浸润性导管癌中 Kif2a 表达、组织学分级、TNM 分期及淋巴结转移均与患者生存率有关,多因素 Cox 比例风险分析显示均具有独立的预后意义。结论:Kif2a 在乳腺浸润性导管癌组织中高表达,且与组织学分级、TNM 分期及淋巴结转移呈正相关。通过对 Kif2a 表达水平的检测为乳腺浸润性导管癌的转移潜能及预后判断提供了有效手段。

**[关键词]** Kif2a;组织芯片;乳腺浸润性导管癌;免疫组织化学

**[中图分类号]** R737.9

**[文献标志码]** B

**[文章编号]** 1007-4368(2017)02-217-03

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170217

组织芯片是生物芯片技术的一个重要分支,可在同一张切片上高通量获得组织学、基因和蛋白的表达信息,并可以与很多常规技术如免疫组织化学(IHC)、核酸原位杂交(ISH)、荧光原位杂交(FISH)、原位 PCR 等结合应用。乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,近年来其发病率有逐年上升及年轻化的趋势<sup>[1]</sup>。因此构建大规模乳腺癌组织芯片进行乳腺癌的发病机制研究,寻找乳腺癌防治的新途径具有理论和现实的双重意义。20 世纪 90 年代人们发现了微管驱动蛋白,最近研究发现,某些驱动蛋白与肿瘤发生、发展有关<sup>[2]</sup>。本研究采用组织芯片技术及免疫组织化学方法,检测乳腺浸润性导管癌中驱动蛋白 Kif2a 表达水平,并结合临床分期、分化程度、腋窝淋巴结转移等情况进行统计学分析及随访调查研究,从而为预测乳腺癌的进展及预后提供依据。

### 1 对象和方法

#### 1.1 对象

101 例浸润性导管癌选自本院病理科 2000 年 1 月—2005 年 7 月间行乳腺癌改良根治术的手术标本,术前未经过任何治疗(放疗、化疗及内分泌治

疗),所有患者均为女性,发病年龄 34~85 岁,平均年龄 53 岁,随访 77 例乳腺癌患者(101 例患者中地址不详 24 例),有 63 例获得随访结果,随访时间 156(120~189)个月。

按照 WHO 的浸润性导管癌组织学分类标准分类:Ⅰ级 35 例;Ⅱ级 39 例;Ⅲ级 27 例。按照 TNM 临床分期标准进行分期:Ⅰ期+Ⅱ期 81 例;Ⅲ期+Ⅳ期 20 例。按照淋巴结转移情况分组:淋巴结无转移 56 例;淋巴结有转移 45 例。

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 组织芯片的制作

所有标本均经 10%中性福尔马林溶液固定、石蜡包埋。收集 101 例浸润性导管癌组织及癌旁 3 cm 内组织的蜡块,根据 HE 切片对石蜡标本中有代表性的部位加以标记,根据预先芯片微阵列的设计,通过组织芯片制作机细针打孔的方法制成癌组织及癌旁组织芯片蜡块,然后对芯片蜡块进行切片,将切片转移到载玻片上制成组织芯片。

##### 1.2.2 免疫组织化学染色

对已制作好的组织芯片进行免疫组织化学染色(S-P 法),鼠抗人单克隆抗体 Kif2a(ab55383)购自美国 Abcam 公司。工作浓度(1:80),用已知阳性切片作为阳性对照,用 PBS 溶液代替一抗作为阴性对照。

##### 1.2.3 结果判定

Kif2a 阳性表达主要定位于肿瘤细胞质及细胞核上,呈棕黄色,参考 Kif2a 蛋白表达的评分标准<sup>[3]</sup>,

**[基金项目]** 南通市卫生局青年科研基金项目(WQ2014022)

\*通讯作者 (Corresponding author),Email:zhuyan85129087@163.com

阳性细胞的评分:0分(0个阳性细胞),1分(阳性细胞数≤1%),2分(1%<阳性细胞数≤10%),3分(10%<阳性细胞数≤33%),4分(33%<阳性细胞数≤67%),5分(67%<阳性细胞数)。染色强度的评分:1分(浅棕色),2分(中等度着色),3分(深棕色)。将两者分值相加:阴性(0~1分),弱表达(2~3分),中等表达(4~5分),强表达(6~8分)。

1.3 统计学方法

采用 Stata7.0 软件包进行数据分析。Kif2a 染色评分以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较用 *t* 检验,对有随访结果的病例单因素分析用 Log rank 检验,多因素生存分析用 Cox 比例风险模型统计,并做出 Kaplan-Meier 生存曲线。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 浸润性导管癌组织与癌旁组织中 Kif2a 的表达及意义

Kif2a 阳性表达主要定位于肿瘤细胞质及细胞核上(图 1),本研究 101 例浸润性导管癌患者中 Kif2a 均呈强表达,癌组织与癌旁组织中的染色评分分别为(7.03 ± 0.758)分和(6.35 ± 0.889)分,两者表达有显著性差异( $t=5.849, P < 0.001$ )。

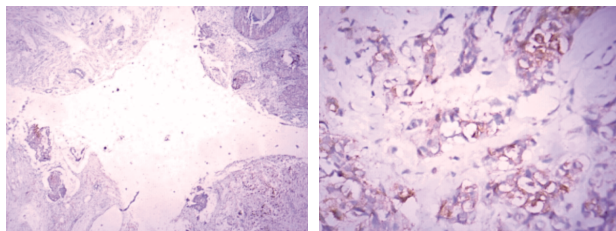


图 1 Kif2a 在乳腺浸润性导管癌中的表达

2.2 浸润性导管癌中 Kif2a 的表达与临床病理因素的相关性

Kif2a 在浸润性导管癌中的表达评分与临床病理因素进行统计学相关性分析(表 1)。浸润性导管癌中 Kif2a 的表达与组织学分级、TNM 分期及淋巴

结转移呈正相关( $P < 0.05$ ),与年龄、肿瘤大小无相关性( $P > 0.05$ )。

表 1 浸润性导管癌中 Kif2a 表达与临床病理因素

因素	n	Kif2a	t 值	P 值
年龄(岁)			-0.378	0.706
≤53	57	7.01 ± 0.44		
>53	44	7.06 ± 0.86		
肿瘤大小(cm)			-1.001	0.319
≤2	42	6.98 ± 0.63		
>2	59	7.09 ± 0.48		
组织学分级			-2.329	0.038
G1	35	6.55 ± 0.62		
G2	39	6.98 ± 0.49		
G3	27	7.18 ± 0.78		
TNM 分期			-2.033	0.044
I+II	81	6.86 ± 0.72		
III+IV	20	7.22 ± 0.66		
淋巴结转移			-3.326	0.001
0	56	6.78 ± 0.83		
≥1	45	7.28 ± 0.65		

2.3 影响乳腺癌预后的临床病理因素分析

该组 63 例获得随访资料,随访率 81.82%(63/77),其中 49 例存活,14 例死亡。对可能影响乳腺癌预后因素进行单因素(Log rank 检验)和多因素(Cox 比例风险模型)生存分析(表 2)。单因素 Log rank 检验结果显示淋巴结转移、TNM 分期、组织学分级及 Kif2a 表达与预后相关( $P < 0.05$ ),而患者年龄、肿瘤大小与预后无显著相关性( $P > 0.05$ )。多因素 Cox 比例风险模型结果显示乳腺浸润性导管癌淋巴结转移、TNM 分期、组织学分级及 Kif2a 表达具有独立的统计学意义( $P$ 均 $< 0.05$ )。

按照乳腺浸润性导管癌中 Kif2a 表达评分均值 7 为界,分为 L-Kif2a 组(≤7)(25 例)和 H-Kif2a 组(>7)(38 例)。进一步作两者的 Kaplan-Meier 生存曲线(图 3),可见 H-Kif2a 组的生存率显著低于 L-Kif2a 组。

表 2 63 例浸润性导管癌单因素和多因素生存分析结果

因素	Log rank		Cox's Proportional Hazard Model				
	$\chi^2$ 值	P 值	Coefficient	Standard Error	Z 值	P 值	95% CI
年龄	0.10	0.751					
肿瘤大小	2.25	0.134					
组织学分级	16.56	<0.001	1.495	0.418	3.58	<0.001	0.676~2.313
TNM 分期	9.52	0.002	1.388	0.490	2.83	0.005	0.428~2.347
淋巴结转移	9.15	0.002	1.704	0.638	2.67	0.008	0.453~2.956
Kif2a	6.09	0.014	1.440	0.640	2.25	0.024	0.186~2.693

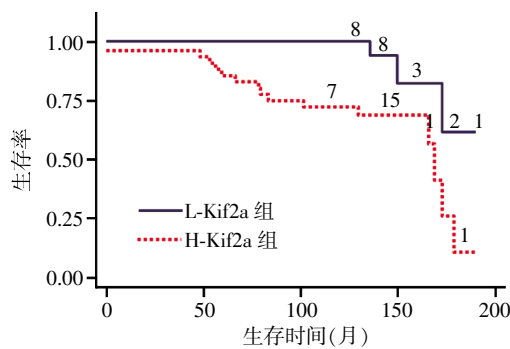


图 3 Kif2a 表达 Kaplan-Meier 生存曲线

### 3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,浸润性导管癌占乳腺浸润性癌的绝大多数,患者死亡的主要原因是复发与转移,研究表明在肿瘤侵袭转移等影响因素中,细胞骨架的改变在肿瘤转移过程中发挥了极其重要的作用,其中构成细胞骨架主要成分之一——微管的减少及解聚与恶性肿瘤的转移潜能有关。Kinesin-13 是驱动蛋白家族中的一类特殊的蛋白质,具有解聚微管的作用,在哺乳动物中可分为 Kif2a、Kif2b 和 Kif2c/MCAK 三个亚家族。其中 Kif2c 与肿瘤增殖及转移的关系的研究较多,Kif2c 过表达与肿瘤的转移及预后相关<sup>[4]</sup>,而 Kif2a 与肿瘤的发生发展及与预后的关系国内外研究报道甚少。驱动蛋白 Kif2a 具有微管解聚酶的功能,参与了细胞的生长、有丝分裂、染色体的移动及胞膜的运输等过程,因此具有多方面重要功能。当 Kif2a 高表达时,微管不稳定性表现更明显,Kif2a 对于细胞有丝分裂中染色体的精确分离是必须的。鉴于 Kif2a 在细胞分裂过程中纺锤体形成及细胞运动过程中骨架改变中的重要作用,我们推测其在肿瘤组织中可能存在异常表达并与肿瘤细胞侵袭、转移存在相关性。

本组资料显示,浸润性导管癌组织中 Kif2a 呈高表达,癌组织与癌旁组织中的染色评分有显著性差异( $t=5.849, P < 0.001$ )。提示 Kif2a 与乳腺癌的发生密切相关。浸润性导管癌中 Kif2a 的表达与浸润性导管癌组织学分级、TNM 分期、淋巴结转移呈正相关( $P < 0.05$ ),与年龄、肿瘤大小无相关性( $P > 0.05$ )。提示 Kif2a 高表达,细胞染色体出现异常,细胞继而发生恶性改变并进一步增殖,同时 Kif2a 的高表达导致细胞骨架不稳定,肿瘤易发生侵袭,并进一步转移。这与已有的对 Kinesin-13 家族成员在癌组织中研究相一致<sup>[4-6]</sup>。本组资料中 Kif2a 表达与浸润性导管癌的组织学分级呈正相关( $P < 0.05$ ),

分化差的癌组织中 Kif2a 表达高于分化好的癌组织,与 Wang 等<sup>[7]</sup>研究不太一致,但与 Bie 等<sup>[8]</sup>在脑胶质瘤中 Kif2c 的研究相一致,推测可能与低分化癌恶性程度高、发展快、转移多有关。

本研究采用 Log rank 检验显示浸润性导管癌中 Kif2a 高表达组(H-Kif2a 组)患者的生存率显著低于低表达组(L-Kif2a 组),生存分析显示浸润性导管癌中淋巴结转移、TNM 分期、组织学分级及 Kif2a 表达与预后相关( $P < 0.05$ )。乳腺浸润性导管癌淋巴结转移、TNM 分期、组织学分级及 Kif2a 表达具有独立的预后意义( $P$ 均 $< 0.05$ )。提示这些因素均增加乳腺癌死亡风险。总之,Kif2a 在浸润性导管癌中高表达及与肿瘤发生发展、侵袭转移密切相关的研究,有望成为抗肿瘤药物治疗的新靶点,且为预测患者预后提供新思路。

### [参考文献]

- [1] Ahmedin J,Rebecca S,Jiaquan X,et al. Cancer statistics,2010[J]. CA Cancer J Clin,2010,60(5):277-300
- [2] Hirokawa N,Takemura R. Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics[J]. Exp Cell Res,2004,301(1):50-59
- [3] Wang CQ,Qu X,Zhang XY,et al. Overexpression of Kif2a promotes the progression and metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue[J]. Oral Oncol,2010,46(1):65-69
- [4] Shimo A,Tanikawa C,Nishidate T,et al. Involvement of kinesin family member 2C/mitotic centromere-associated kinesin overexpression in mammary carcinogenesis[J]. Cancer Sci,2008,99(1):62-70
- [5] Gnjjatic S,Cao Y,Reichelt U,et al. NY-CO-58/KIF2C is overexpressed in a variety of solid tumors and induces frequent T cell responses in patients with colorectal cancer[J]. Int J Cancer,2010,127(2):381-393
- [6] Wang CQ,Xiang FG,LI YJ,et al. Relation between the expression of mitotic centromere-associated kinesin and the progression of squamous cell carcinoma of the tongue [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2014,117(3):353-360
- [7] Wang J,Ma S,Ma R,et al. Kif2a silencing inhibits the proliferation and migration of breast cancer cells and correlates with unfavorable prognosis in breast cancer [J]. BMC Cancer,2014,14:461-469
- [8] Bie L,Zhao G,Wang YP,et al. Kinesin family member 2c (KIF2c/mcak)is a novel marker for prognosis in human gliomas [J]. Clin Neurol Neurosurg,2012,114(4):356-360