

文章编号 1006-8147(2023)03-0309-05

论著

KIF22 在肾透明细胞癌中的表达及临床相关性研究

张春锋¹, 李长建², 刘沛¹, 吴春磊¹

(1.新乡医学院第一附属医院泌尿外科, 卫辉 453100; 2.新乡医学院第三附属医院泌尿外科, 新乡 453000)

摘要 目的: 探讨 KIF22 在肾透明细胞癌中的表达情况及行根治性肾癌切除术患者临床特征与生存预后的相关性。方法: 首先, 使用生物信息学分析来研究 KIF22 在肾透明细胞癌和正常组织中的表达水平, 通过 Kaplan-Meier 生存分析两组患者中 KIF22 表达水平对疾病总生存期和无进展生存期的影响。通过免疫组化染色实验分析 77 例肾透明细胞癌标本以及癌旁组织标本中 KIF22 蛋白的表达水平, 根据染色强度分为高表达组、低表达组。进一步搜集患者相关临床资料进行分析比较, 明确 KIF22 表达水平与其相关性。结果: 生物信息学分析表明, KIF22 在包括肾癌在内的多种癌组织中表达相对较高, Kaplan-Meier 分析发现 KIF22 的高表达组患者有较差的疾病总生存期和无进展生存期($P=0.012, 0.047$)。免疫组化结果显示 77 例标本中, 有 42 例标本 KIF22 呈高表达, 35 例标本呈低表达, 而癌旁正常组织均呈低表达。KIF22 表达水平与肿瘤大小($P=0.010$)具有相关性, 而与年龄性别和肿瘤分化均无关(均 $P>0.05$)。结论: KIF22 在肾透明细胞癌组织样本中异常高表达, 且与肾透明细胞癌的肿瘤大小相关, 并导致患者预后不良。

关键词 KIF22; 肾透明细胞癌; 临床特征分析; 预后

中图分类号 R692

文献标志码 A

Expression and clinical correlation of KIF22 in clear cell renal cell carcinoma

ZHANG Chun-feng¹, LI Chang-jian², LIU Pei¹, WU Chun-lei¹

(1. Department of Urology, The First Affiliated Hospital, Xinxiang Medical University, Weihui 453100, China; 2. Department of Urology, The Third Affiliated Hospital, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression of KIF22 in clear cell renal cell carcinoma and the correlation between clinical characteristics and survival prognosis of patients undergoing radical nephrectomy. **Methods:** First, bioinformatics analysis was used to investigate the expression levels of KIF22 in clear cell renal cell carcinoma and normal tissues. And the effect of KIF22 expression levels on overall disease survival and progression-free survival was analyzed by Kaplan-Meier survival in both groups of patients. After that, the expression levels of KIF22 protein in 77 clear cell renal cell carcinoma specimens as well as para-neoplastic tissue specimens were analyzed by immunohistochemistry (IHC) staining experiments. And they were divided into high expression group and low expression group according to the staining intensity. Further clinical data were collected for analysis and comparison to clarify the correlation with KIF22 expression level. **Results:** Bioinformatics analysis showed that KIF22 was relatively highly expressed in various cancer tissues, including renal cell carcinoma. Kaplan-Meier analysis revealed that patients in the high KIF22 expression group had poorer overall disease survival and progression-free survival ($P=0.012, 0.047$). IHC results showed that 42 of 82 specimens had high and 35 had low expression of KIF22, and the expression was low in the adjacent normal tissues. Besides, the level of KIF22 expression was correlated with tumor size ($P=0.010$), but not with age, sex or tumor differentiation (all $P>0.05$). **Conclusion:** KIF22 is abnormally highly expressed in clear cell renal cell carcinoma tissue, correlated with tumor size in clear cell renal cell carcinoma and resulted in poor patient prognosis.

Key words KIF22; clear cell renal cell carcinoma; clinical characteristics analysis; prognosis

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)在全世界范围内每年导致超过 330 000 例被诊断的病例与大约 140 000 例死亡病例, 并且近数十年来, 其发生率一直在不断增加。仅仅是在 2018 年, 全美新确诊的肾脏癌症患者就超过 65 340 人, 而与肾癌有关的死亡人数也达到了 14 970 人^[1]。在肾细胞癌的患者中,

男性患者的数量是女性的 1.5~2.0 倍, 而高发年龄范围是 60~70 岁^[2]。肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)是肾细胞癌中最常见的一种亚型, 占到了 75%~80%^[3]。早期 ccRCC 的治愈率高, 5 年以上生存率达 90%以上^[4]。与此相反, 晚期远处转移患者的 5 年生存率则下降到了 12%^[5]。但是, 近几年来, 随着研究的不断深入和认知水平的提高, 人们对该疾病的治疗近年来取得了重大进展。

Kinesin 家族蛋白是基于微管的马达蛋白家族。Aiken 等^[6]首次报道了巨乌贼轴突中的 Kinesin 家族

基金项目新乡医学院第一附属医院博士科研基金项目(xyfy2014BS-003); 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(2018020350)

作者简介 张春锋(1984-), 男, 主治医师, 硕士, 研究方向: 泌尿系统疾病的诊治; 通信作者: 吴春磊, E-mail: wuchunleiurology@foxmail.com。

蛋白。随后,在不同的生物组织中均发现kinesin蛋白,如哺乳动物神经细胞、海胆卵和果蝇细胞^[7-8]。Kinesin家族成员22(Kinesin family member 22, KIF22)能够与微管和染色体结合,从而运输细胞器、蛋白质和 mRNA^[8]。KIF22蛋白已被报道影响多种肿瘤的发生、发展,如乳腺癌、肺癌、前列腺癌等,并与这些肿瘤的不良预后密切相关^[9-14]。然而,针对ccRCC而言,KIF22在其中的表达水平和作用仍有待进一步研究。本研究主要探究ccRCC组织中KIF22蛋白的表达,从而为在ccRCC的治疗寻找新的靶点。

1 材料和方法

1.1 生信分析 应用GEPIA在线数据库和proteintlas在线数据库提取KIF22在不同器官癌症组织中的表达(<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php?gene=KIF22>; <https://www.proteintlas.org/ENSG00000079616-KIF22/pathology>),并对其生物信息进行分析。利用这些数据库信息分析ccRCC的表达差异以及这种表达差异与疾病预后的关系,并利用Kaplan-Meier曲线比较生存期。

1.2 组织收集 为了探索KIF22与ccRCC发生、发展之间的潜在关系,本研究从接受手术治疗的患者中收集了77例ccRCC组织及其对应的癌旁组织。本研究收集我院从2012年1月—2018年12月的ccRCC手术患者的肿瘤组织和癌旁组织。这些标本的来源中有男性44例,女性33例,年龄40~74岁,平均52.6岁,其中肿瘤病理高中分化40例,低分化37例。选择诊断为ccRCC,无全身广泛远处转移,并无手术切除禁忌且有手术切除适应症的患者,术后均经病理证实为ccRCC。排除标准:有病理证实并非ccRCC或存在第2种原发性肿瘤或存在全身广泛转移或全身情况存在手术切除禁忌等。

1.3 免疫组化实验 将肿瘤组织用10%的中性缓冲福尔马林固定24 h后进行石蜡包埋,之后将石蜡包埋的组织切片在75℃加热30 min后用二甲苯溶液浸泡10 min,再放入100%、95%、85%和75%乙醇中各5 min。随后进行免疫组织化学染色。免疫组织化学检测方法主要根据免疫组织化学检测规范(Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA)。将切片标本在PBS缓冲液中洗涤2次,每次2 min,在柠檬酸盐缓冲液中进行抗原修复并用3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶后,将切片用2%牛血清白蛋白在PBS中浸泡20 min,并与抗KIF22抗体(thermo fisher scientific, Waltham, MA, USA, 1:200)一起孵化,在4℃环境下过夜。

次日,将切片室温放置1 h,用PBS缓冲液洗涤2次,每次2 min。室温下辣根过氧化物酶标记二抗(Sanying, China, 1:1 000)孵育1 h,用二氨基苯胺(DAB, Cell Signaling Technology, Pudong, Shanghai, China)洗涤染色5 min,最后用中性树胶封片后在显微镜(Nikon, Tokyo, Japan)下观察。

本研究进一步根据染色面积和染色强度对KIF22表达进行评分。无颜色为0分,浅黄色为1分,棕色为2分,深棕色为3分。每个视野下0分是阴性,1~4分是弱阳性,5~8分是阳性,9~12分是强阳性。在本研究中,本研究将KIF22的阳性表达分为低表达(阴性和弱阳性)和高表达(阳性和强阳性)。结果用双盲法判断。

1.4 统计学处理 数据采用SPSS 22.0软件(SPSS Inc, IBM Corp, Armonk, NY)进行分析,并通过 χ^2 检验比较临床特征与蛋白表达之间的相关性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KIF22在多种肿瘤组织中表达上调 研究显示,KIF22在不同的肿瘤组织中的表达上调,且与肿瘤的预后密切相关。本研究利用proteintlas数据库和GEPIA在线数据库对来自不同组织器官的肿瘤细胞中的KIF22表达情况进行研究。

在proteintlas数据库之中,本研究选取了包括肾癌在内的17种不同类型的肿瘤加入到了此次生物信息学分析之中,根据肿瘤基因组ALTAS(TCGA)的数据库分析其中KIF22基因的RNA表达。结果显示,KIF22基因的RNA表达水平出现明显较高者,且RNA表达的特异性较低(图1)。

而在GEPIA数据库中,本研究选取包括肾癌在内的20种肿瘤结果显示有大部分肿瘤细胞KIF22表达水平较高。在甲状腺癌、结肠癌和头颈部肿瘤的肿瘤细胞中,KIF22表达较高。然而,在淋巴瘤、子宫内膜癌与肺癌等中KIF22表达较低,皮肤癌中KIF22不表达。肾癌中KIF22的表达水平不高,但依然具有一定的提示价值(图2)。

2.2 KIF22的表达与ccRCC患者不良预后相关 本研究利用GEPIA数据库对KIF22与ccRCC患者预后进行了Kaplan-Meier生存分析,发现KIF22的表达水平与患者的预后不良相关。在研究KIF22高表达患者的疾病总生存期时,选择GEPIA数据库516例患者,高表达与低表达患者各258例,研究结果显示KIF22高表达的患者总生存期低于低表达的患者($P=0.012$,图3)。而在研究无病生存期时,收录的患者数为517例,高表达患者52例,低表达患者465

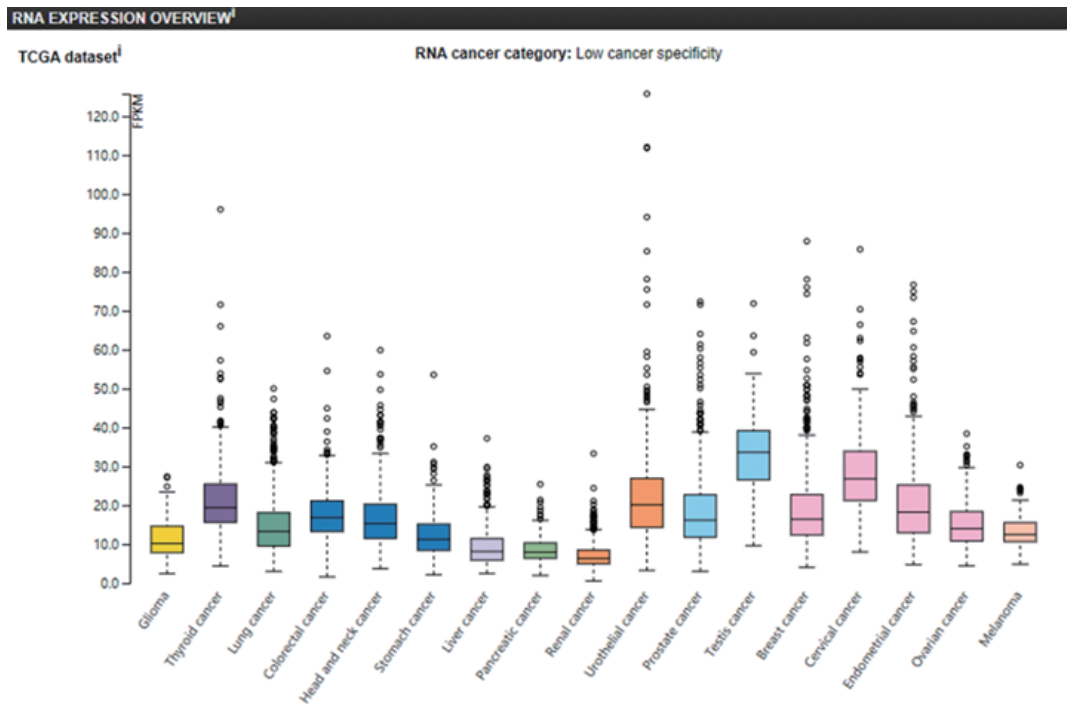


图 1 KIF22 基因的 RNA 表达在多种癌细胞中呈低特异性

Fig 1 The RNA expression of KIF22 gene shows low specificity in a variety of cancer cells

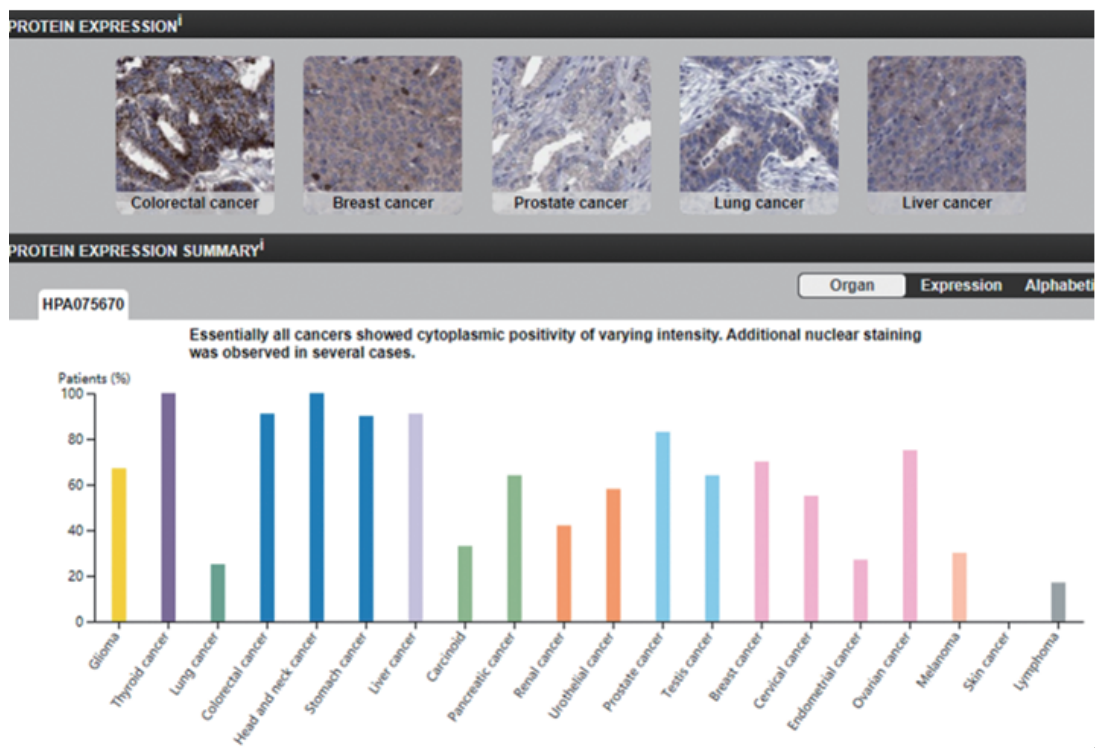


图 2 KIF22 基因在不同肿瘤组织中的表达上调

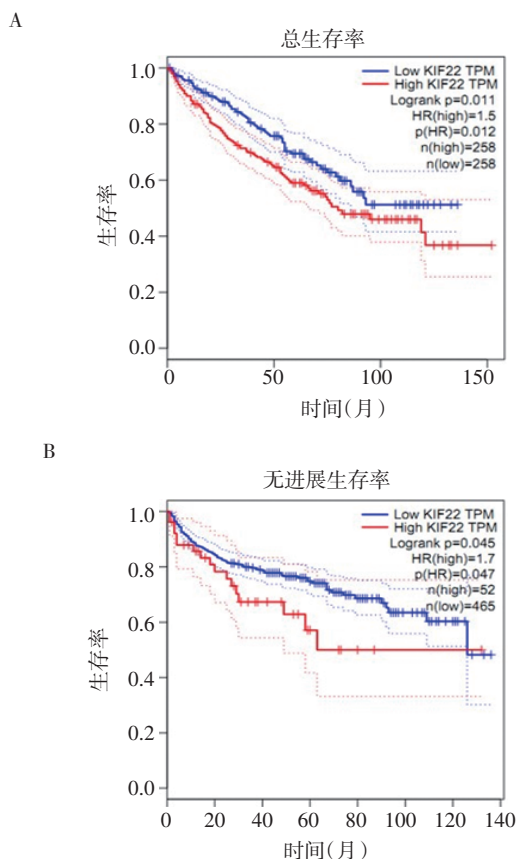
Fig 2 The expression of KIF22 gene was up-regulated in different tumor tissues

例,结果为 KIF22 高表达患者的无病生存期显著低于 KIF22 低表达的患者($P=0.047$,图 3)。

2.3 KIF22 在 ccRCC 中高表达 本研究首先通过对 ccRCC 肿瘤样本中的 KIF22 进行免疫组化染色,发现 KIF22 主要位于 ccRCC 组织的细胞核中(图

4A)。而根据染色结果发现,与肿瘤组织相比,KIF22 在癌旁组织中的表达较低(图 4B)。

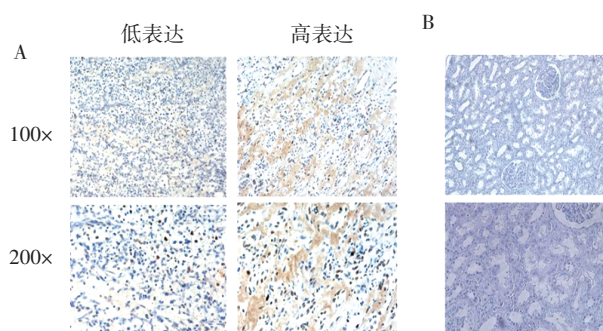
2.4 KIF22 的表达与 ccRCC 患者的临床特征相关性 本研究进一步对于 KIF22 的染色强度进行评分,并由此分析了 KIF22 高、低表达患者的临床



注:A:KIF22 表达水平与患者总生存率的相关性;B:KIF22 表达水平与患者无进展生存率的相关性

图3 KIF22 高表达及低表达患者的疾病总生存期和无进展生存期比较

Fig 3 Overall disease survival and disease free survival in patients with high and low expression of KIF22



注:A:肿瘤组织;B:癌旁组织,将肿瘤组织根据染色分为高表达及低表达

图4 免疫组化检测 KIF22 在 ccRCC 患者肿瘤样本中的表达水平

Fig 4 The expression level of KIF22 in tumor samples of renal clear cell carcinoma was determined by immunohistochemistry

病理特征差异。数据显示,ccRCC 中 KIF22 的表达与 ccRCC 肿瘤直径 ($P=0.010$) 具有显著相关性,但 KIF22 的表达与其他临床特征,如患者年龄、性别、肿瘤分化程度等特征无显著相关性(表 1)。

表 1 77 例 ccRCC 患者的 KIF22 表达和临床病理特征的关系

Tab 1 Correlation between KIF22 expression and clinicopathologic features in 77 patients with renal clear cell carcinoma

患者特征	总体 (n=77)	KIF22 表达		χ^2	P
		低(n=35)	高(n=42)		
年龄(岁)				2.381	0.123
<55	41	22	19		
≥55	36	13	23		
性别				0.214	0.644
男	44	21	23		
女	33	14	19		
肿瘤分化				0.007	0.934
低分化	40	18	22		
高分化	37	17	20		
肿瘤直径				6.684	0.010
<4 cm	36	22	14		
≥4 cm	41	13	28		

3 讨论

目前 ccRCC 的治疗主要以手术为主。尽管医学技术在不断提高,但其实总体治疗效果仍不尽如人意。行根治性肾切除术的患者仍有 30%~40% 复发^[15]。且虽然无转移患者的 5 年生存率可较高,但有转移的晚期患者的预后明显较差^[4-5]。这一结果的部分原因是缺乏可用的治疗靶点。因此,ccRCC 靶向化疗药物的选择非常重要。

此前广泛的研究证明,KIF22 是一种马达蛋白,能够调控多种重要的细胞过程,如细胞分裂、细胞迁移中的物质运输与重新分布、纤毛发生等^[16]。这种马达蛋白基于微管的功能可能直接对于肿瘤细胞的增殖、迁移及侵袭等产生重要影响。也有报道证实 KIF22 可对多种信号通路产生影响,比如其受 SIAH-1 调控^[13]。另外,KIF22 与微管结合,而微管在受体转运中起重要作用,这些受体即包括 EGFR^[17-18]。KIF22 调控微管稳定性,上调 EGFR 信号通路,刺激细胞分裂,进一步对肿瘤细胞的异常增殖产生影响^[19]。而且此前文献报道,KIF22 还能够参与纺锤体的形成及有丝分裂过程中的染色体运动,这暗示其可能也会通过影响 ccRCC 细胞分裂而影响其发展。

研究显示,KIF22 参与肿瘤的发生、发展^[13]。在 Yu 等^[9]的报道中提及,抑制 KIF22 能够抑制肿瘤细胞的有丝分裂,进而使得肿瘤细胞的增殖能力降低。他们同时发现 KIF22 在多种肿瘤组织中均有高表达。为了进一步研究 KIF22 与肿瘤发生的关系,他们在癌基因数据库中分析几种肿瘤中的 KIF22 表达,证实 KIF22 在卵巢癌、肺癌和宫颈癌中有高

表达^[9]。Zhang等^[14]检测62个原发性乳腺癌组织和成对邻近正常组织中KIF22表达水平,结果显示,与邻近组织相比,肿瘤组织KIF22的表达均显著上调。而本研究同样发现KIF22在多种肿瘤中出现表达上调的情况,且进一步研究发现,表达上调与ccRCC患者的不良预后有关,提示KIF22可能参与了ccRCC的发生和发展,也提示KIF22可以作为ccRCC新的治疗靶点。

在生信分析中本研究发现了KIF22在ccRCC中的高表达,KIF22与ccRCC患者的预后相关。而在接下来的研究中,本研究收集了77个ccRCC组织和邻近正常组织标本检测KIF22的表达水平,其结果为KIF22在ccRCC组织中高表达。之后,本研究又通过结合患者临床信息分析肿瘤组织中KIF22的表达水平,发现KIF22的表达水平与ccRCC肿瘤组织直径存在一定联系。先前Liu等^[20]的研究也报道,KIF22在肿瘤的生长中发挥了重要作用。Pike等^[19]研究表明,KIF22的下调会显著抑制肿瘤细胞的增殖,从而进一步抑制相关肿瘤的发展。而本研究的研究数据表明,KIF22参与了ccRCC的发生、发展的调控过程。

综上所述,本研究主要发现了KIF22在ccRCC细胞中显著高表达,并与患者的不良预后紧密相关。KIF22与肿瘤直径、患者的不良预后显著相关。所以,KIF22基因可能在ccRCC的发生、发展中起到了不可忽略的作用。

然而,本研究中存在了一定的局限。首先,本研究预后分析使用的数据库为公共数据库,而非本研究单位组建。其次,本研究的实验样本较少,缺乏多中心大样本研究的实验数据支持。再次,本研究在KIF22的作用机制上研究较浅,在ccRCC中的表达水平和作用仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] BRUNA F A, ROMEO L R, CAMPO-VERDE-ARBOCCO F, et al. Human renal adipose tissue from normal and tumor kidney: its influence on renal cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2019, 10(52): 5454-5467.
- [3] RUSSO L, AVESANI G, GUI B, et al. Immunotherapy-related imaging findings in patients with gynecological malignancies: what radiologists need to know[J]. *Korean J Radiol*, 2021, 22(8): 1310-1322.
- [4] KANNO H, NAITO S, OBARA Y, et al. Effect of extracellular signal-regulated protein kinase 5 inhibition in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Int J MolSci*, 2022, 23(15): 8448.
- [5] CHAKRABORTY S, BALAN M, SABARWAL A, et al. Metabolic reprogramming in renal cancer: events of a metabolic disease[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1876(1): 188559.
- [6] AIKEN J, HOLZBAUR ELF. Cytoskeletal regulation guides neuronal trafficking to effectively supply the synapse[J]. *Curr Biol*, 2021, 31(10): R633-R650.
- [7] TANG F, PAN M H, WAN X, et al. Kif18a regulates sirt2-mediated tubulin acetylation for spindle organization during mouse oocyte meiosis[J]. *Cell Div*, 2018, 13: 9.
- [8] DATE S S, PARKS J M, RUSH K W, et al. Kinetics of enzymatic mercury methylation at nanomolar concentrations catalyzed by Hg-cAB[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2019, 85(13): e00438-19.
- [9] WU S, LI H, WANG L, et al. Motor proteins and spermatogenesis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1288: 131-159.
- [10] LI K, LI S, TANG S, et al. KIF22 promotes bladder cancer progression by activating the expression of CDCA3[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 48(6): 211.
- [11] YANG Y, GAO L, WENG N N, et al. Identification of novel molecular therapeutic targets and their potential prognostic biomarkers among kinesin superfamily of proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 708900.
- [12] GU S, LIANG H, QI D, et al. Knockdown of KIF26B inhibits breast cancer cell proliferation, migration, and invasion[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 3195-3203.
- [13] KALANTARI S, FILGES I. Kinesinopathies: emerging role of the kinesin family member genes in birth defects[J]. *J Med Genet*, 2020, 57(12): 797-807.
- [14] ZHANG Z, XIE H, ZHU S, et al. High expression of KIF22/kinesin-like DNA binding protein (Kid) as a poor prognostic factor in prostate cancer patients[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 8190-8197.
- [15] WANG K, WU Z, WANG G, et al. Survival nomogram for patients with bone metastatic renal cell carcinoma: a population-based study[J]. *Int Braz J Urol*, 2021, 47(2): 333-349.
- [16] CHEN C, LIN W, HUANG Y, et al. The essential factors of establishing patient-derived tumor model[J]. *J Cancer*, 2021, 12(1): 28-37.
- [17] HE L, GAO L, SHAY C, et al. Histone deacetylase inhibitors suppress aggressiveness of head and neck squamous cell carcinoma via histone acetylation-independent blockade of the EGFR-Arf1 axis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 84.
- [18] YOUNG K A, BIGGINS L, SHARPE H J. Protein tyrosine phosphatases in cell adhesion[J]. *Biochem J*, 2021, 478(5): 1061-1083.
- [19] PIKE R, ORTIZ-ZAPATER E, LUMICISI B, et al. KIF22 coordinates CAR and EGFR dynamics to promote cancer cell proliferation[J]. *Sci Signal*, 2018, 11(515): eaaq1060.
- [20] LIU M, RAN J, ZHOU J. Non-canonical functions of the mitotic kinesin Eg5[J]. *Thorac Cancer*, 2018, 9(8): 904-910.

(2022-11-05 收稿)