

网络出版时间: 2021-6-11 16:17 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210611.0929.026.html>

SPNS2 在肝细胞性肝癌中的表达及其与上皮间质转化的关系

张鹤松¹, 张传海¹, 马金良², 英卫东², 余继海²

摘要 目的 探讨鞘氨醇-1-磷酸转运体(SPNS2)在肝细胞肝癌(HCC)中的表达及其与上皮细胞间质转化(EMT)之间的相关性。方法 收集10例HCC新鲜临床标本和70例HCC手术标本石蜡切片(包括癌组织和对应癌旁组织)及其临床相关病理资料,检测SPNS2及EMT的两个主要标志物N-钙黏蛋白(N-cadherin)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)在癌及癌旁组织中的表达量,统计分析SPNS2与临床病理特征及EMT之间的相关性。结果 SPNS2、N-cadherin在癌组织的表达水平高于癌旁组织($P < 0.01$),而E-cadherin表达低于癌旁组织($P < 0.01$)。分析得出,SPNS2与N-cadherin呈正相关性,与E-cadherin呈负相关性。SPNS2在HCC的表达与患者年龄、性别、分化程度无相关性,而与TNM分期和血管侵犯密切相关。结论 SPNS2在HCC中存在差异性表达,同时可能通过调控EMT的转录因子促进HCC发生。SPNS2与TNM分期和微血管侵犯密切相关,可用于临床预后评估。

关键词 Spinsin 同源蛋白2; 肝细胞肝癌; 上皮间质转化

中图分类号 R 392.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)07-1143-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.07.026

肿瘤细胞的转移是肝癌患者预后不佳最主要的特征,该过程涉及很多内外因素。肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的肝癌形式,占所有原发性肝癌的85%~90%^[1]。最新数据^[2]显示全球肝癌年新发及死亡病例数分别居于恶性肿瘤第6位和第2位。高发病率及病死率说明现有的手段无法对肿瘤细胞转移患者根治,基于此,该研究希望寻找一个新的药物靶点治愈远处转移的病灶,为后期根治性切除提供契机。鞘氨醇-1-磷酸转运体(sphingosine-1-phosphate transporter 2, SPNS2)是目前肿瘤研究的一个热点,它是鞘氨醇-1-磷酸(S1P)转运体之一,具有504个氨基酸残基组成的跨膜蛋白^[3]。多项研究^[4-5]表明斑马鱼SPNS2缺失造成心裂的作用,后续研究^[6-8]表明其参与淋巴

调节、血管形成和免疫调节等功能。近年来,有研究^[9-11]表明SPNS2的表达异常和肿瘤的进展相关,在肺癌、胃癌、结肠癌等中相继开展了一系列与肿瘤相关研究,其中在胃癌研究上,有学者提出SPNS2与上皮细胞间质转化(epithelial mesenchymal transformation, EMT)相关,但在HCC进展过程中,SPNS2与EMT相关的研究较少。因此,该研究探讨SPNS2在HCC上表达情况与EMT之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 病例资料 2018年1月—2019年12月,收集了10例在安徽医科大学附属省立医院肝脏外科行手术切除的HCC患者新鲜癌及癌旁组织(距离癌组织1 cm以上),同时选取存放在安徽医科大学附属省立医院病理科行肝癌手术的70例组织标本,年龄在24~87(58.10 ± 11.43)岁,其中男性44例,女性26例。术前均未接受抗肿瘤治疗,并且与患者或家属进行了充分沟通和签署了实验知情同意书。

1.2 试剂 RNA提取试剂盒、反转录试剂盒(美国Thermo Fisher公司); RT-PCR试剂盒(北京宝日生物技术有限公司); β -Actin、山羊抗小鼠IgG、山羊抗兔IgG、E-钙黏蛋白(E-cadherin)(中国Zs-BIO公司); SPNS2(英国Abcam公司); N-钙黏蛋白(N-cadherin)(上海Santa Cruz公司)。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化 手术中取下的标本切片厚5 μm , 3次依次过二甲苯脱蜡、浓度梯度乙醇水化洗去乙醇,在抗原高压修复后,3%过氧化氢室温下孵育20 min,磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤3次,加一抗(浓度分别为E-cadherin, 1:100; N-cadherin, 1:100; SPNS2, 1:200), 37℃孵育60 min, PBS洗涤3次。加二抗, 37℃孵育20 min; PBS洗涤,甩干,加DAB显色剂,显微镜下控制显色时间(有阳性终止显色),苏木精复染1 min, 1%盐酸乙醇分化数秒,水洗,碳酸锂蓝化1 min,水洗,常规脱水、透明、封片、镜检。

1.3.2 RT-PCR 组织样品加入TRIzol匀浆后参照RNA提取试剂盒说明书提取总RNA,定量根据逆转录试剂盒反转录。反转录程序: 65℃, 5 min; 42

2021-04-11 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1608085MH198)

作者单位: ¹ 安徽医科大学附属省立医院普外科, 合肥 230001

² 中国科学技术大学附属第一医院普外科, 合肥 230001

作者简介: 张鹤松, 男, 硕士研究生;

张传海, 男, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zch2002@126.com

℃, 60 min; 70 ℃, 5 min。反应产物即为 cDNA, -20 ℃ 保存备用。以上述反应产物为模板, ABI 7500 型 RT-PCR 循环条件如下: 95 ℃, 5 s; 60 ℃, 34 s, 设置循环数为 40, 检测各目的基因 Ct 值。以 GAPDH 作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析各基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因名称	引物名称	引物序列(5'-3')
SPNS2	上游	ACTGCGCTCTTCTTCGTCAG
	下游	CAATGGCACCACCTCAGACT
GAPDH	上游	TCCGAGTCAACGGATTGCT
	下游	TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC

1.3.3 Western blot 实验 每 100 mg 组织加入 RI-PA(强) 细胞裂解液 1 ml 进行冰上匀浆操作, 提取组织总蛋白, 按照 1:4 加入 5× SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 沸水浴加热 10 min, 冷却后样品直接上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内, 每孔 30 μg 样本。浓缩胶所用电压为 80 V, 时间为 30 min; 分离胶所用电压为 120 V, 时间为 1 h。蛋白 300 mA 恒流转膜; 转膜结束后, 应用浓度为 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, TBST 洗膜 3 min。分别参考抗体说明书进行抗体稀释, 4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。相应二抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; ECL 发光、显影, 以 β-Actin 为内参, 分析各指标的相对表达量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 26.0 软件进行分析, 肝癌及癌旁组织表达情况及病理特征采用 χ^2 检验, 癌及对应癌旁组织 mRNA 和蛋白水平差异采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌及癌旁组织 HE 染色情况

在 400 倍的视野下肝癌组织较对应癌旁组织细胞异型性明显, 核大深染, 易见异型核分裂像, 间质血管丰富(图 1)。

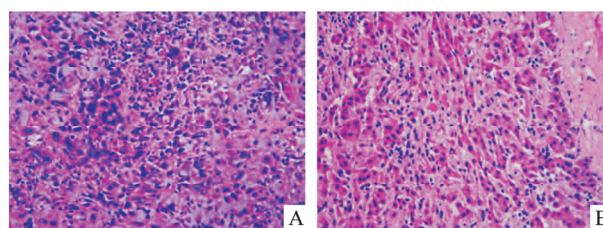


图 1 HE 染色结果 ×400

A: 肝癌组织; B: 癌旁组织

2.2 SPNS2、N-cadherin、E-cadherin 蛋白癌及癌旁组织的表达情况 根据免疫组化结果, SPNS2 蛋白阳性信号主要定位于细胞膜, 通过 DAB 显色后, 将细胞膜呈现棕黄色判为阳性表达。SPNS2、N-cadherin、E-cadherin 在癌及对应癌旁组织差异有统计学意义, 其中 SPNS2 在癌组织中阳性率(60%, 42/70), 而在癌旁组织中阳性率为(27.1%, 19/70), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2 和图 2。

表 2 SPNS2、E-cadherin、N-cadherin 在肝癌组织和癌旁组织表达情况

项目	癌组织(例)	癌旁组织(例)	χ^2 值	P 值
SPNS2			15.37	<0.05
阳性	42	19		
阴性	28	51		
E-cadherin			17.95	<0.05
阳性	20	45		
阴性	50	25		
N-cadherin			29.47	<0.05
阳性	48	16		
阴性	22	54		

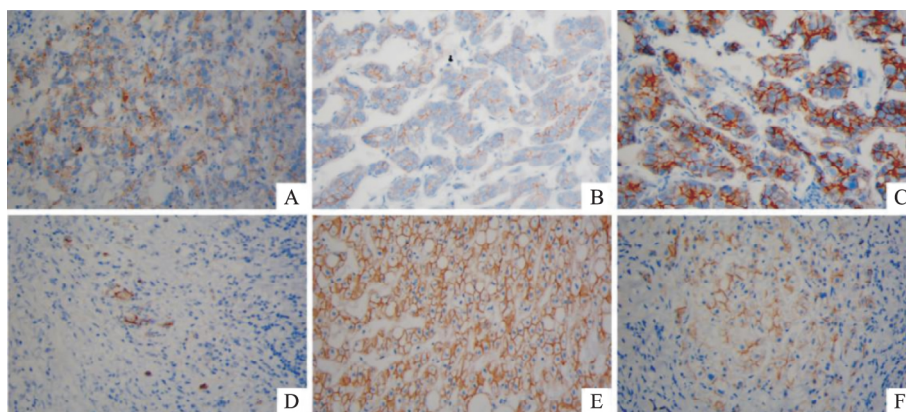


图 2 肝癌及癌旁组织中 SPNS2、E-cadherin 和 N-cadherin 的表达 SP×400

A、D: SPNS2 在肝癌及癌旁组织中的表达; B、E: E-cadherin 在肝癌及癌旁组织中的表达; C、F: N-cadherin 在肝癌及癌旁组织中的表达

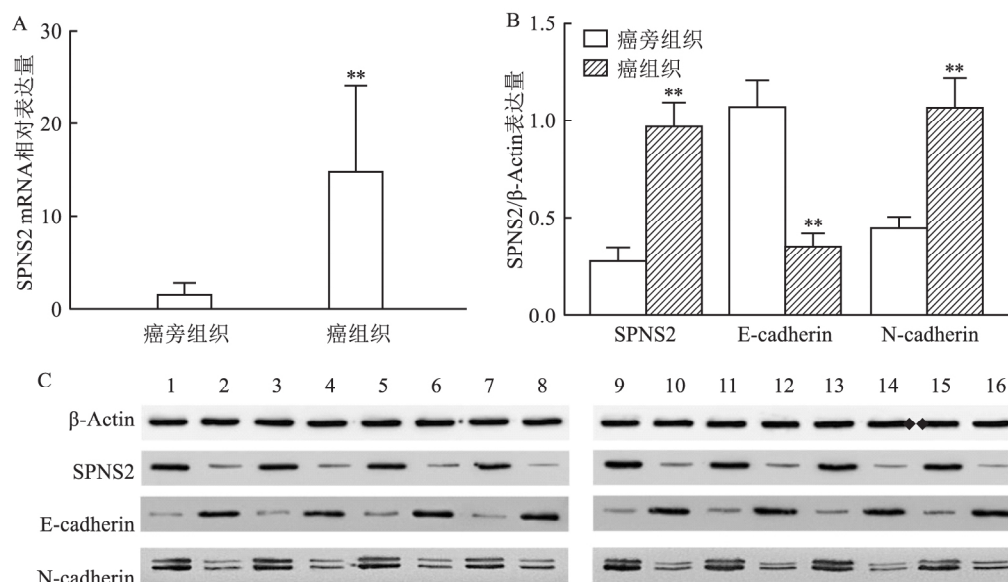


图3 SPNS2、N-cadherin、E-cadherin 的表达情况

A: RT-PCR 法检测 SPNS2 在肝癌及对应癌旁组织中的 mRNA 相对表达水平; B、C: Western blot 法检测 SPNS2、E-cadherin 和 N-cadherin 在肝癌及癌旁组织中的表达水平; 1、3、5、7、9、11、13、15: 癌组织; 2、4、6、8、10、12、14、16: 癌旁组织; 与癌旁组织比较: ** $P < 0.01$

2.3 SPNS2 与临床病理特征之间的关系 评估 SPNS2 与临床病理特征之间的关系,如表 3 所示, SPNS2 基因与年龄、性别、分化程度差异无统计学意义。而与肝癌 TNM 分期和微血管侵犯差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表3 SPNS2 与临床病理特征之间的关系

项目	SPNS2 蛋白		χ^2 值	P 值
	阳性表达数 (n = 42)	阴性表达数 (n = 28)		
年龄(岁)			0.63	0.43
≤55	19	10		
>55	23	18		
性别			0.50	0.48
男	25	19		
女	17	9		
分化程度			2.61	0.27
低	16	6		
中	22	20		
高	4	2		
TNM 分期			4.67	0.03
I ~ II	26	24		
III ~ IV	16	4		
微血管侵犯			13.02	<0.05
有	33	10		
无	9	18		

2.4 SPNS2 在肝癌组织及癌旁组织中 mRNA 和蛋白的表达水平 RT-PCR 和 Western blot 检测结果均表明,与癌旁组织比较,癌组织中 SPNS2 蛋白表达均显著升高,差异有统计学意义($t = 4.474$, $P <$

0.01 ; $t = 14.015$, $P < 0.01$) ,其中 Western blot 结果还显示在癌组织中 N-cadherin 水平升高, E-cadherin 水平降低,对应癌旁组织相反,差异有统计学意义($t = 10.783$, $P < 0.01$; $t = 13.200$, $P < 0.01$)。见图 3。

3 讨论

HCC 是肝癌最常见类型,在过去 30 年中, HCC 的发病率一直在上升^[12]。虽然外科手术是 HCC 的重要手段,但是肝细胞癌几乎总是在慢性炎症的肝脏中发展,因此,需要综合治疗^[13]。在研究 HCC 的机制时,鉴定新的有效的治疗靶点十分必要。

SPNS2 是一种重要的膜转运蛋白,利用细胞膜内外浓度差异造成的电化学势能来转运底物,并参与免疫调节、炎症诱导和血管生成。另外, SPNS2 在不同的肿瘤类别和微环境中,其作用也不一致。在小细胞肺癌中, SPNS2 基因敲减后促进肿瘤的远处定植^[9];在胃癌和结肠癌中, SPNS2 基因过表达能促进肿瘤细胞的增殖和转移^[10-11]。该研究中,通过 RT-PCR 和 Western blot 实验结果显示 SPNS2 在 HCC 癌组织中蛋白和 mRNA 表达水平较癌旁组织上升,提示 SPNS2 在 HCC 中可能是促癌基因。通过免疫组织化学法进一步研究显示 SPNS2 蛋白阳性信号主要定位于细胞膜,在 HCC 癌组织中的阳性率高达 60%,而在癌旁组织中的阳性率只有 27.1%,该结果显示 SPNS2 和 HCC 可能相关,还提示了 SPNS2 是个跨膜蛋白,其表达异常可能引起细胞形态改变或黏附能力下降。

研究^[14-15]表明 EMT 是肿瘤进展中的重要的一环,涉及多个转录因子参与,其中 E-cadherin 和 N-cadherin 是典型的细胞黏附分子,其表达下调或上升可使细胞的黏附能力发生改变。上述通过免疫定位提示 SPNS2 是膜蛋白,其表达异常可能使肿瘤细胞黏附能力下降,进一步推测 SPNS2 可能诱导 EMT 的发生从而促进 HCC 的进展。因而,选取了 E-cadherin 和 N-cadherin 两个典型的黏附分子,免疫组织化学和 Western blot 实验结果显示 HCC 癌组织中 E-cadherin 表达下降,N-cadherin 表达上升。两种实验结果改变方向均和 EMT 进程一致,使肿瘤细胞的黏附能力下降。

最后该课题结合临床样本数据,结果显示,年龄、性别、分化程度与 SPNS2 差异无统计学意义,与肿瘤 TNM 分期和血管侵犯等病理特征密切相关,差异有统计学意义。临床分期较晚和血管侵犯是评估 HCC 患者预后不良的关键因素,分析 SPNS2 与 HCC 患者病理数据之间的关系具有实际意义,为患者预后提供参考意见,也表明了 SPNS2 具有现实研究价值。

综上所述,该研究表明了 SPNS2 在 HCC 中存在差异性表达,并且和临床病理特征相关,可能通过调控 EMT 发生促进 HCC 进展而发挥促癌基因的作用。因此,后期该课题组将从细胞水平,进一步研究 SPNS2 影响 HCC 的 EMT 现象发生的相关机制。

参考文献

- [1] Altekruse S F, Devesa S S, Dickie L A, et al. Histological classification of liver and intrahepatic bile duct cancers in SEER registries[J]. *J Registry Manag* 2011 38(4): 201-5.
- [2] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: globocan sources and methods[J]. *Int J Cancer* 2019 144(8): 1941-53.
- [3] Nishi T, Kobayashi N, Hisano Y, et al. Molecular and physiological functions of sphingosine 1-phosphate transporters[J]. *Biochim Biophys Acta* 2014 1841(5): 759-65.
- [4] Osborne N, Brand-Arzamendi K, Ober E A, et al. The spinster homolog, two of hearts, is required for sphingosine 1-phosphate signaling in zebrafish[J]. *Curr Biol* 2008 18(23): 1882-8.
- [5] Kawahara A, Nishi T, Hisano Y, et al. The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors[J]. *Science* 2009 323(5913): 524-7.
- [6] Hirose Y, Nagahashi M, Katsuta E, et al. Generation of sphingosine-1-phosphate is enhanced in biliary tract cancer patients and is associated with lymphatic metastasis[J]. *Sci Rep* 2018 8(1): 10814.
- [7] Laurenzana A, Cencetti F, Serrati S, et al. Endothelial sphingosine kinase/SPNS2 axis is critical for vessel-like formation by human mesoangioblasts[J]. *J Mol Med (Berl)* 2015 93(10): 1145-57.
- [8] Nagahashi M, Kim E Y, Yamada A, et al. Spns2, a transporter of phosphorylated sphingoid bases, regulates their blood and lymph levels, and the lymphatic network[J]. *FASEB J* 2013 27(3): 1001-11.
- [9] Bradley E, Dasgupta S, Jiang X, et al. Critical role of Spns2, a sphingosine-1-phosphate transporter, in lung cancer cell survival and migration[J]. *PLoS One* 2014 9(10): e110-9.
- [10] 侯文彬. SPNS2 在 Borrmann 4 型胃癌中的调控作用及分子机制探究[D]. 沈阳: 中国医科大学 2019.
- [11] 金荣, 何新阳, 刘成业, 等. SPNS2 在结直肠癌组织中的表达及其临床意义[J]. *中国肿瘤临床* 2018 45(21): 1091-5.
- [12] Mak L Y, Cruz-Ramón V, Chinchilla-López P, et al. Global epidemiology, prevention, and management of hepatocellular carcinoma[J]. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2018 38: 262-79.
- [13] Eggert T, Greten T F. Current standard and future perspectives in non-surgical therapy for hepatocellular carcinoma[J]. *Digestion* 2017 96(1): 1-4.
- [14] 刘远光, 刘怀海. LncRNA HULC 通过 miR-372/CXCR4 轴来调控肝癌细胞的增殖、凋亡与上皮-间质转化[J]. *中国比较医学杂志* 2020 30(10): 44-55.
- [15] 张传海, 张鹤松, 桂阳, 等. miR-7 与肝细胞性肝癌 EMT 及临床病理特征之间的相关性研究[J]. *安徽医科大学学报* 2019 54(3): 429-32.

The expression of SPNS2 in hepatocellular carcinoma and its relationship with epithelial-mesenchyme transition

Zhang Hesong¹, Zhang Chuanhai¹, Ma Jinliang², et al

(¹Dept of General Surgery, Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001;

²The First Affiliated Hospital of USTC, Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the correlation between the expression of SPNS2 in hepatocellular carcinoma and its epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Methods** 10 fresh clinical specimens of HCC and 70 paraffin sections of HCC surgical specimens (including cancerous tissues and corresponding adjacent tissues) and clinical

网络出版时间: 2021-6-11 15:55 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210611.0929.027.html>

生物标志物在特发性炎症性肌病相关间质性肺炎中的预后价值

金颖昭, 谢茂盛, 周滢波, 金莉, 马艳, 李向培, 汪国生, 厉小梅

摘要 目的 探讨中性粒细胞/淋巴细胞(NLR)、血小板/淋巴细胞(PLR)、单核细胞/淋巴细胞(MLR)、C反应蛋白/白蛋白(CAR)对特发性炎症性肌病相关间质性肺炎患者(IIM-ILD)预后的影响。方法 选取117例IIM-ILD患者,比较生存和死亡两组患者的临床和实验室指标,用受试者工作特征曲线(ROC)计算NLR、MLR、PLR和CAR预测累积生存率的最佳切点,Cox比例风险模型用于多变量分析,确定影响患者预后的相关因素。结果 117例IIM-ILD患者中,37例(31.62%)在随访期间死亡。多因素分析提示年龄、高激素用量、低蛋白血症、抗MDA5抗体阳性及高MLR值(>0.599)是患者预后不良的独立预测指标。结论 高MLR值可以与其他指标一起进行综合考虑,可能具有评估IIM-ILD患者预后的价值。

关键词 特发性炎症性肌病相关性间质性肺炎;抗MDA5抗体;中性粒细胞/淋巴细胞;血小板/淋巴细胞;单核细胞/淋巴细胞;C反应蛋白/白蛋白

中图分类号 R 593.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)07-1147-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.07.027

特发性炎症性肌病(idiopathic inflammatory myopathy, IIM)是一种全身性自身免疫性疾病,其亚型包括皮肌炎(dermatomyositis, DM)、多发性肌炎

(polymyositis, PM)、包涵体肌炎和免疫介导的坏死性肌炎。PM的特点是进行性对称性近端肌无力,当出现皮肤受累时称为DM。间质性肺炎(interstitial pneumonia, ILD)是IIM常见的肺部并发症,与预后恶化有关。近年来,有研究^[1-2]表明中性粒细胞/淋巴细胞值(NLR)、血小板/淋巴细胞值(PLR)、单核细胞/淋巴细胞值(MLR)和C反应蛋白/白蛋白值(CAR)在IIM的发生发展中有重要作用。然而,在特发性炎症性肌病相关间质性肺炎(idiopathic inflammatory myopathies associated interstitial pneumonia, IIM-ILD)患者中此类研究较少。因此,该研究探讨了NLR、PLR、MLR和CAR在预测IIM-ILD患者预后中的价值。

1 材料与方法

1.1 病例资料 回顾性分析2017年1月—2019年8月在安徽省立医院诊断为IIM的368例患者的临床资料。PM/DM符合Bohan和Peter1975年诊断标准^[3-4]。参考美国呼吸协会/欧洲呼吸协会制定的分类标准,ILD通过典型的HRCT表现诊断^[5]。HRCT典型的间质性改变表现包括实变、蜂窝、磨玻璃影等。排除139例无ILD的患者,112例患者因缺少有关特异性抗体的基线数据($n=76$)或存在恶性肿瘤($n=36$)而被排除在外。比较随访期间生存和死亡两组IIM-ILD患者的临床和实验室结果。医院医学伦理委员会已经通过该研究申请。

1.2 数据收集 收集的数据包括人口统计学资料、临床、实验室资料和糖皮质激素的最大用量。基线

2021-04-19 接收

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:81871271);安徽省重点研究与开发计划项目(编号:1804b06020354)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院风湿免疫科,合肥 230001

作者简介:金颖昭,女,硕士研究生;

厉小梅,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: lixiaomei@ustc.edu.cn

related pathological data were collected, and the two main markers of SPNS2 and EMT, N-cadherin (N-cadherin), E-cadherin (E-cadherin) expression in cancer and adjacent tissues were detected, and the correlation between SPNS2 and clinicopathological features and EMT was analyzed. **Results** The expression level of SPNS2, N-cadherin in cancer tissues were higher than those in adjacent tissues ($P < 0.01$), and the expression of E-cadherin was lower than that of adjacent tissues ($P < 0.01$). The analysis showed that SPNS2 was positively correlated with N-cadherin and negatively correlated with E-cadherin. The expression of SPNS2 in HCC was not associated with the patient's age, gender, and degree of differentiation, but was closely related to TNM grade and microvascular invasion. **Conclusion** SPNS2 is differentially expressed in HCC, and it may promote the occurrence of HCC by regulating EMT transcription factors. SPNS2 is closely related to TNM grade and microvascular invasion, and can be used for clinical prognosis assessment.

Key words spinster homolog2; hepatocellular carcinoma; epithelial-mesenchymal transition