

THBS2 在胃癌组织中的表达与预后的关系

孙若川 李永翔

摘要 目的 探讨胃癌中血小板反应蛋白 2 (THBS2) 的表达及其临床意义。方法 在 14 对配对胃癌样本及其正常对照中,使用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测 THBS2 mRNA 和蛋白表达水平。使用 129 例胃癌样本构成的组织芯片评价 THBS2 的临床意义。生存分析使用 Kaplan-Meier 法和 Cox 比例风险模型。结果 THBS2 mRNA 和蛋白表达在 14 对样本中有 12 例胃癌样本中都显著低于其正常对照。与 Western blot 结果一致,组织芯片中胃癌 THBS2 表达明显低于正常对照 ($P=0.031$)。高表达的 THBS2 与患者的良好预后密切相关 ($P=0.002$),并且 THBS2 表达越低胃癌的组织分化程度越低 ($P=0.005$)。结论 与正常胃组织相比 THBS2 在胃癌组织中表达下调,可能在胃癌的发生发展中起到重要的作用,并且可作为一个潜在的胃癌临床预后因子。

关键词 THBS2; 胃癌; 预后因子

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)07-0995-05

血小板反应蛋白(thrombospondins, THBSs)是一个最少拥有五个成员的蛋白家族,其拥有多个结构域并且是一类细胞膜表面钙结合糖蛋白。通过结合多种靶蛋白,THBSs 参与了多种生物进程如:血管生成、细胞运动、凋亡、细胞骨架构成,并且可以成为细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的反应平台^[1-2]。在血小板反应蛋白家族中 THBS1 和 THBS2 是两个比较特殊的成员。由于拥有其余成员所没有的 I 型结构域,故其主要的功能是作为血管生成的抑制剂^[3]。另外,THBS2 只有少量的序列与 THBS1 的前胶原蛋白区域相同,但与其 I 型结构域也称血小板反应蛋白结构域或备解素样结构域却表现出高度的一致性。因此,已经在体外实验中证实的 THBS2 抗血管生成作用^[2],普遍推测定位在 I 型结构域上^[4]。THBS2 可以与多种细胞受体、生长因子、ECM 蛋白相互作用,并且可以调节细胞凋亡、增

殖和黏附的能力^[5]。研究^[6-7]显示在肺腺癌中 THBS2 可以作为潜在的预后因子,该研究主要检测 THBS2 在胃癌组织与相应的正常组织中的表达,同时了解 THBS2 表达与胃癌患者的临床病理特征和预后的联系,探讨 THBS2 表达与胃癌临床特征间的关系。

1 材料与方法

1.1 病例和组织样本 第 1 组样本包含 129 例福尔马林固定后石蜡包埋的胃癌组织和 24 例随机挑选的正常胃组织。选取 2006 年 11 月~2008 年 5 月安徽医科大学第一附属医院普通外科样本,将样本整合到组织芯片中,用免疫组化染色。该组样本的组织病理由两名病理医师确认。TNM 分期参照 2010 年美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)标准进行。第 2 组样本来自于安徽医科大学第一附属医院普通外科八病区接受手术治疗的 14 例患者,手术中切下的新鲜胃癌组织样本和对应的正常胃黏膜组织(距肿瘤边缘最少 5 cm)立即放入液氮中迅速冷冻,接着放入 -80°C 冰箱存放用做实时荧光定量 PCR 和 Western blot 实验。两组患者术前均未接受放疗或化疗治疗,均签署知情同意书,所有标本根据伦理道德标准均匿名处理。本实验得到了医院伦理委员会的认可。

1.2 主要试剂和仪器 TRIzol 美国 Invitrogen 公司产品; RT-PCR 试剂盒、SYBR-Green 荧光染料,日本 TOYOBO 公司产品; 7900HT 序列分析仪,美国 Applied Biosystems 公司产品; RIPA 溶液、BCA 蛋白定量试剂盒、兔二抗,碧云天公司产品; PVDF 膜,美国 Millipore 公司产品; THBS2 抗体,美国 Novus 公司产品; GAPDH 抗体,美国 Aogma 公司产品; EnVisionTM + /HRP 兔二抗,日本 DAKO 公司产品

1.3 RNA 提取及实时荧光定量 PCR 第 2 组的 14 对样本总 RNA 提取使用 TRIzol 试剂按照制造商的说明书操作。cDNA 使用两步法 RT-PCR 合成。用于扩增 THBS2 的引物:正向引物 5'-CGTGGA-CAATGACCTTGTTG-3',反向引物 5'-GCCATCGTT-GTCATCATCAG-3'。GAPDH 作为同一个定量 PCR 反应中的内参,其引物:正向引物 5'-AGCCA-

2014-04-18 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:30871207)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院普通外科八病区,合肥 230022

作者简介:孙若川,男,硕士研究生;

李永翔,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: yongxiangli_1@hotmail.com

CATCGCTCAGACAC-3', 反向引物 5'-GCCCAAT-ACGACCAAATCC-3'。反应使用 SYBR-Green 荧光染料在 7900HT 序列分析仪上进行。反应条件包括一个变性阶段(95 °C 5 min) 和 40 个循环的扩增定量阶段(95 °C 15 s; 60 °C 45 s)。每个样本的实验重复 3 次, 其特异性由分析溶解曲线来检验。使用 THBS2 与 GAPDH 的 CT 比值来表示 THBS2 的 mRNA 表达水平。

1.4 蛋白提取及 Western blot 实验 第 2 组的 14 对样本总蛋白提取使用 RIPA 法(全过程在冰上操作), 蛋白定量使用 BCA 蛋白定量试剂盒。裂解产物 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液加热至 100 °C 5 min 使蛋白变性。加入 3 × Loading Buffer 后分别点样在 SDS-PAGE 胶上电泳, 随后将蛋白转至 PVDF 膜上。PVDF 膜在 5% 脱脂牛奶配制的 TBST 中室温封闭 1 h 后, 孵育 THBS2 抗体(1 : 1 500) 12 h, 清洗过后使用兔二抗孵育 1 h, 清洗过后使用增强化学发光法显影, 内参使用 GAPDH(1 : 4 000)。

1.5 免疫组化和组织芯片分析 第 1 组样本被制成组织芯片, HE 染色观察肿瘤组织中最典型的部位, 使用取样器进行取材。4 μm 厚的芯片放入 63 °C 烘箱, 烘蜡 1 h, 全自动染色机中脱蜡, 纯水清洗后柠檬酸抗原修复, 放入内源性过氧化物酶阻断剂进行阻断, 加入 THBS2 一抗(1 : 2 000) 过夜, 加入 En-Vision™ + /HRP 兔二抗, DAB 显色, 苏木精复染后封片。使用兔血清作为一抗的阴性对照。最终染色的评估根据染色强度和染色范围由两名完全不知道切片信息的病理医师分别进行, 范围评分划分标准为: 未着色 0 分, < 25% 1 分, 25% ~ 75% 2 分, > 75% 3 分。染色强度同样分为 0 ~ 3 分。最终根据评分为染色强度评分和染色范围评分的乘积, 将样本划分为表达阴性组(0 ~ 2 分), 表达阳性组(3 ~ 9 分)。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 15.0 统计软件分析。THBS2 蛋白表达水平与临床病理之间的关系统计采用 Fisher 精确或 Pearson 卡方检验, 组织芯片中 THBS2 在胃癌中和正常组织中表达差异使用两独立样本 Mann-Whitney U 检验。生存曲线计算和总体生存期曲线绘制使用 Kaplan-Meier 方法, Log-Rank 检验用于比较组间分布。多因素 Cox 风险模型用于比较临床病理变量以及 THBS2 蛋白表达水平在生存期中所发挥的作用。

2 结果

2.1 患者临床预后 最终 129 例患者纳入此研究, 其中男 101 例, 女 28 例, 年龄 29 ~ 80 岁, 中位年龄 61 岁。

在随访过程中, 有 65 例死亡。中位总体生存期为 57 个月, 平均总体生存期 44.01 月(95% CI 39.78 ~ 49.24 个月)。

2.2 THBS2 mRNA 在胃癌与相应的正常组织中表达 THBS2 在 12 例胃癌中的 mRNA 表达水平明显低于其正常对照, 但有 2 对样本结果相反, 见图 1。

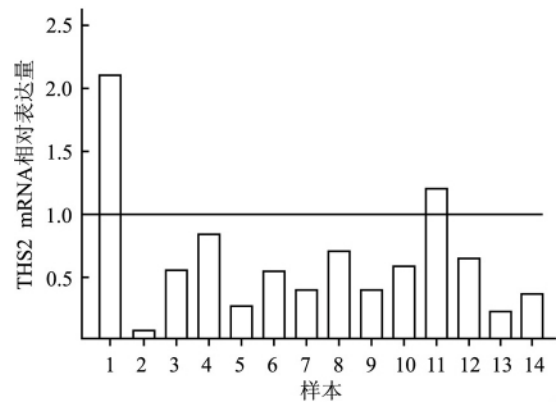


图 1 14 对胃癌组织与其相对应的正常胃组织中 THBS2 mRNA 的表达, 正常组织表达标准化为 1

2.3 THBS2 的蛋白表达 12 对样本胃癌中 THBS2 蛋白表达低于正常组织, 5 号样本和 11 号样本结果相反, 见图 2。为了验证以上结果, 在组织芯片中观察 THBS2 的染色强度和范围, 发现 THBS2 蛋白主要表达于细胞的胞质中, 见图 3, 与 Western blot 结果相一致, THBS2 在胃癌组织中的表达显著低于正常对照($Z = -2.158, P = 0.031$), 见图 3。

2.4 THBS2 蛋白表达与临床病理的联系 为了进一步明确 THBS2 的临床重要性, 本研究分析 THBS2 高低表达组与临床特征, 包括: 年龄、性别、分化程度、肿瘤位置、浸润深度、淋巴结转移、TNM 分期之间的关系。THBS2 表达与胃癌分化程度密切相关($P = 0.005$), 与其他特征无显著相关性, 见表 1。

2.5 生存期分析 如表 1 所示, 分化程度、浸润深度、淋巴结转移以及 TNM 分期在单因素 Cox 风险回归模型中与生存期密切相关。由于 TNM 分期包含浸润深度和淋巴结转移的信息, 故进一步使用多因素分析来校正分化程度与 TNM 分期, 结果显示 TNM 分期和 THBS2 表达水平均是胃癌患者独立预后因素。高级别的 TNM 分期是长生存期的风险因

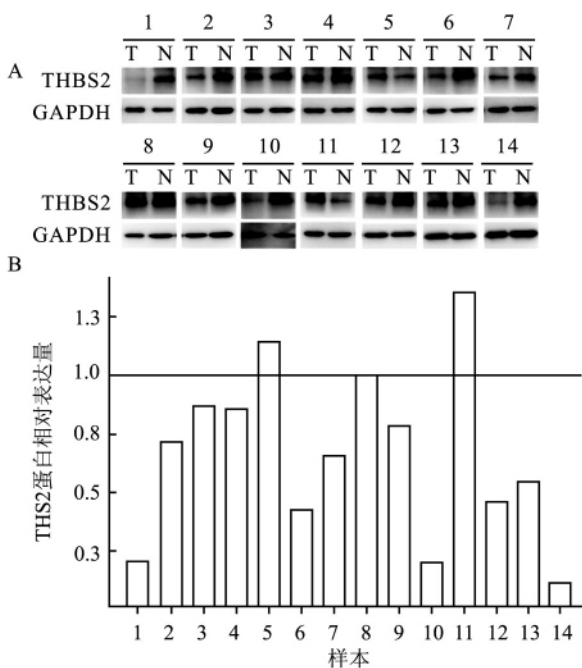


图2 Western blot 法检测 14 组配对胃癌及正常胃黏膜组织 THBS2 蛋白表达

A: 14 对胃癌组织与其相对应的正常胃组织的 Western blot 条带; B: 用 Image J 计算 THBS2 与 GAPDH Western blot 条带灰度值的比值, 正常组织标准化为 1; T: 胃癌组织; N: 正常胃组织

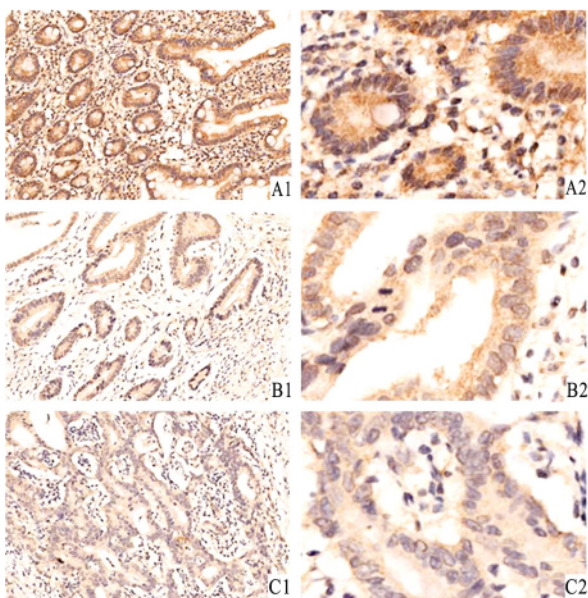


图3 胃癌组织和正常胃组织 THBS2 免疫组化照片

A: 正常胃组织; B: 胃中分化腺癌; C: 胃低分化腺癌; 1: $\times 100$; 2: $\times 400$

素 ($P < 0.01$, $HR = 7.23$, $95\% CI 3.55 \sim 14.69$) ,而 THBS2 表达增高却是长生存期的保护因素 ($P = 0.009$, $HR = 0.51$, $95\% CI 0.31 \sim 0.85$) 。

Kaplan-Meier 生存分析同样表明 THBS2 的高表

表1 胃癌患者临床病理特征与 THBS2 表达及总体生存期之间的关系

项目	表达阴性 [n(%)]	表达阳性 [n(%)]	总数	P^a 值	总体生存期	
					Log-Rank P^b 值	HR(95% CI)
年龄(岁)				0.112	0.743	
<61	24(38.1)	39(61.9)	63			1(-)
≥ 61	35(53.0)	31(47.0)	66			1.09(0.67~1.77)
性别				0.831	0.405	
男	47(46.5)	54(53.5)	101			1(-)
女	12(42.9)	16(57.1)	28			0.76(0.40~1.45)
分化程度				0.005	0.011	
高分化+中分化	24(33.8)	47(66.2)	71			1(-)
低分化+其他	35(60.3)	23(39.7)	58			1.89(1.16~3.09)
肿瘤位置				0.419	0.204	
上部	27(40.3)	40(59.7)	67			1(-)
中部	15(53.6)	13(46.4)	28			1.66(0.85~3.18)
下部	17(50.0)	17(50.0)	34			1.90(0.90~4.01)
浸润深度				0.271	0.001	
T1~T2	9(34.6)	17(65.4)	26			1(-)
T3~T4	50(48.5)	53(51.5)	103			11.6(2.83~47.45)
淋巴结转移				0.454	<0.01	
无	17(40.5)	25(59.5)	42			1(-)
有	42(48.3)	45(51.7)	87			5.16(2.46~10.84)
TNM分期				0.283	<0.01	
I~II	21(39.6)	32(60.4)	53			1(-)
III~IV	38(50.0)	38(50.0)	76			7.14(3.52~14.49)

^a临床病理特征与 THBS2 表达的 P 值; ^b临床病理特征与总体生存期的 P 值

达与较好的临床预后显著相关 ($P = 0.002$, $n = 129$) ,见图 4。THBS2 表达阴性组中位生存期 36 个月,平均 (40.07 ± 3.65) 个月,显著比表达阳性组中位生存期 59 个月,平均 (53.70 ± 2.95) 个月,生存期短。

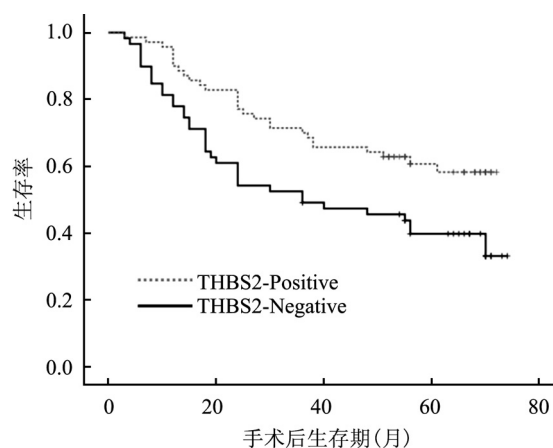


图4 Kaplan-Meier 生存分析曲线
分析 THBS2 表达与胃癌患者手术后生存期的关系

3 讨论

本研究通过实时荧光定量 PCR 和 Western blot

实验显示,胃癌中 THBS2 无论是 mRNA 和蛋白水平都明显低于相应的正常对照,在组织芯片样本中胃癌 THBS2 的表达明显低于正常对照。另外,与临床病理信息作对比时发现 THBS2 的表达与胃癌的分化程度密切相关。更重要的是,生存期分析的结果表明 THBS2 过表达是胃癌患者预后良好的独立预后因子。这些结果显示 THBS2 的下调导致胃癌患者生存期变短。

THBS2 被认为是一种强大的血管生成抑制因子和组织创伤后重塑过程的调节因子^[8-12]。近来陆续有研究^[13-15]显示 THBS2 在肿瘤中发挥重要作用。Tokunaga et al^[13]发现在结肠癌患者中有一半以上表达 THBS2,而且这些患者肝转移的几率明显低于 THBS2 表达阴性。然而,THBS1 却没有类似的联系。De Fraipont et al^[14]认为在大多数肿瘤中 THBS2 的表达与其恶性程度相关。Koch et al^[15]对乳腺癌的体内实验中发现 THBS2 可以抑制乳腺癌细胞的生长和转移。

本研究着重于 THBS2 在胃癌中的临床预后的意义,并没有涉及到其发挥作用分子机制的研究。在世界范围内,THBS2 在肿瘤发生发展中作用的研究十分有限,有待更进一步的研究。在本研究中 1 号样本胃癌中 THBS2 mRNA 的表达高于正常对照,然而蛋白表达却低于正常对照,5 号样本同样呈现相反的结果。由此推测,在翻译过程中存在未知的调控机制参与,而揭示这些机制同样需要未来进一步的研究。

综上所述,THBS2 的表达与胃癌的恶性程度负相关,更重要的是 THBS2 高表达与胃癌患者的良好预后密切相关。这些研究提示 THBS2 在胃癌的发生发展中可能发挥着潜在的重要作用,随着进一步深入研究,THBS2 可能会成为胃癌患者重要的预后指标。

参考文献

[1] Stenina O I, Topol E J, Plow E F. Thrombospondins, their polymorphisms, and cardiovascular disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, 27(9): 1886-94.

[2] Adams J C, Lawler J. The thrombospondins [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3(10): a009712.

[3] Iruela-rispe M L, Luque A, Lee N. Thrombospondin modules and angiogenesis [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(6): 1070-8.

[4] Lynch J M, Maillet M, Vanhoutte D, et al. A thrombospondin-dependent pathway for a protective ER stress response [J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1257-68.

[5] Bornstein P, Armstrong L C, Hankenson K D, et al. Thrombospondin 2, a matricellular protein with diverse functions [J]. *Matrix Biol* 2000, 19(7): 557-68.

[6] Oshika Y, Masuda K, Tokunaga T, et al. Thrombospondin 2 gene expression is correlated with decreased vascularity in non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(7): 1785-8.

[7] Chijiwa T, Abe Y, Inoue Y, et al. Cancerous, but not stromal, thrombospondin-2 contributes prognosis in pulmonary adenocarcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2009, 22(2): 279-83.

[8] Bornstein P, Agah A, Kyriakides T R. The role of thrombospondins 1 and 2 in the regulation of cell-matrix interactions, collagen fibril formation, and the response to injury [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(6): 1115-25.

[9] Krady M M, Zeng J, Yu J, et al. Thrombospondin-2 modulates extracellular matrix remodeling during physiological angiogenesis [J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(3): 879-91.

[10] MacLauchlan S, Yu J, Parrish M, et al. Endothelial nitric oxide synthase controls the expression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin 2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(46): E1137-45.

[11] Abu El-Asrar A M, Nawaz M I, Ola M S, et al. Expression of thrombospondin-2 as a marker in proliferative diabetic retinopathy [J]. *Acta Ophthalmol* 2013, 91(3): e169-77.

[12] Reinecke H, Robey T E, Mignone J L, et al. Lack of thrombospondin-2 reduces fibrosis and increases vascularity around cardiac cell grafts [J]. *Cardiovasc Pathol* 2013, 22(1): 91-5.

[13] Tokunaga T, Nakamura M, Oshika Y, et al. Thrombospondin 2 expression is correlated with inhibition of angiogenesis and metastasis of colon cancer [J]. *Bri J Cancer*, 1999, 79(2): 354-9.

[14] De Fraipont F, Nicholson A C, Feige J J, et al. Thrombospondins and tumor angiogenesis [J]. *Trends Mol Med*, 2001, 7(9): 401-7.

[15] Koch M, Hussein F, Woeste A, et al. CD36-mediated activation of endothelial cell apoptosis by an N-terminal recombinant fragment of thrombospondin-2 inhibits breast cancer growth and metastasis *in vivo* [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 128(2): 337-46.

The expression of THBS2 and its correlation with prognosis in gastric cancer

Sun Ruochuan, Li Yongxiang

(Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the expression of THBS2 and its clinical significance in gastric cancer. **Methods**

一颗粒状角膜营养不良家系 BIGH3 基因突变的研究

郑洁¹ 薛敏¹ 张棣¹ 周青² 汪渊² 李寿玲¹

摘要 目的 对一颗粒状角膜营养不良(GCD)家系进行 BIGH3 基因突变筛查,以确定其致病基因。方法 收集一常染色体显性遗传的 GCD 家系,提取该家系患者及正常者的 DNA,通过聚合酶链式反应(PCR)扩增 BIGH3 基因的目的片段,纯化后直接测序,用 DNASTar 软件分析测序结果,检测其 BIGH3 基因突变的类型。结果 该家系患者均检测出第 4 外显子的 R124H 突变(CGC > CAC),而家系中的正常者及 50 例正常对照者的 BIGH3 基因中均未发现该突变。家系成员都检测出第 11、12 外显子的同义单核苷酸多态性(SNP)。通过基因检测,确定该家系角膜营养不良的分型,即为 GCD II 型,又称 Avellino 角膜营养不良(ACD)。结论 BIGH3 基因突变导致了该家系角膜营养不良患者的角膜病变,突变类型为 R124H 杂合突变。

关键词 角膜营养不良; 基因突变; BIGH3 基因

中图分类号 R 772.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)07-0999-04

角膜为一透明组织,无血管,无色素,是眼的一个重要的屈光介质。角膜保持透明是视觉器官发挥正常生理功能的重要条件,在一些外伤、感染或基因

突变等因素的作用下,角膜的结构或功能受到损害,从而失去其透明及屈光性,继而导致视力下降甚至丧失。角膜营养不良就是一组双眼对称性的、遗传性的疾病,在某种基因异常的诱导下,角膜不同层次的组织中蛋白质非典型的聚合,逐渐形成沉淀物使角膜发生浑浊失去透明性,严重影响患者的视力及生活质量。人转化生长因子 β 诱导(transforming growth factor- β induce, TGFBI) 基因又称 BIGH3 基因,是首个被确定的角膜营养不良致病基因,超过 50% 的人角膜营养不良是由 BIGH3 的某些突变导致。根据文献^[1]报道, BIGH3 基因突变热点主要位于外显子 4、11、12。R124H 和 R555W 是两个最常见的突变位点。故该研究针对 BIGH3 基因的这几个外显子进行基因热点突变位点检测,以明确该家系是否存在 BIGH3 基因的突变、突变类型及突变位点。

1 材料与方法

1.1 研究对象 本研究中的颗粒状角膜营养不良(granular corneal dystrophy, GCD)家系来自安徽省合肥市,汉族,无近亲婚史。将该家系中首个在我院眼科门诊就诊并被诊断为 GCD 的患者作为先证者,详细询问其病史,确定该患者有家族史后进行遗传学调查并绘制该家系遗传图谱,见图 1。共调查连续 4 代,家系共 13 名成员,其中 4 例患者,9 例非患者。对所有可获得的家系成员进行全面的眼科检

2014-02-17 接收

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院眼科,合肥 230022

²安徽医科大学教育部“重要遗传病基因资源利用”重点实验室(省部共建),合肥 230032

作者简介:郑洁,女,硕士研究生;

李寿玲,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: shoulingli@126.com

The mRNA and protein expression levels of THBS2 were assessed in 14 paired of gastric cancer specimen and corresponding normal mucosa using quantitative real-time PCR and Western blot analysis. Immunohistochemistry of THBS2 on a population-based tissue microarray consisting of 129 gastric cancer cases was used for evaluating the THBS2 prognostic significance. Kaplan-Meier method and Cox's proportional hazards model were used in survival analysis. **Results** Both mRNA and protein expression of THBS2 in 12 gastric cancer tissues were remarkably lower than the corresponding normal tissues among total 14 pair tissues. Consistent with the results of our Western blot, THBS2 expression was significantly inhibited in gastric cancer tissues as that in the normal controls in TMA ($P = 0.031$). Overexpression of THBS2 had a significant correlation with favorable prognosis of gastric cancer patients ($P = 0.002$) and decreasing THBS2 expression was associated with the poor histological grade of gastric cancer histological grade ($P = 0.005$). **Conclusion** This study suggests THBS2 is down-regulation in gastric cancer tissue versus normal gastric tissue, and it may play a critical role in gastric cancer carcinogenesis and may be a potential prognosis predictor of gastric cancer.

Key words THBS2; gastric cancer; prognostic biomarker