

摘要

目的:

探讨 ARSB (Arylsulfatase B) 在胃癌 (Gastric Cancer, GC) 组织中的表达水平及其与胃癌患者预后的关系, 初步明确 ARSB 对胃癌细胞增殖、迁移和凋亡的影响及可能机制, 为胃癌的早期诊断和治疗提供新的理论依据。

方法:

1、通过生物信息学分析, 从基因表达综合数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO; GSE29998、GSE54129、GSE51575) 和癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas; TCGA) 数据库中下载胃癌患者的 mRNA 数据及临床数据, 使用 R 软件的“limma”包采用 Wilcoxon 秩和检验来分析 ARSB 在胃癌患者中的表达差异水平; 绘制 ROC 曲线评价精准度及灵敏度。采用“survival”R 包和 Kaplan-Meier Plotter 在线网站进行生存率分析; 应用卡方检验对 ARSB 与胃癌患者的临床指标进行相关性分析, Cox 比例风险模型进行总体生存率的单因素和多因素分析 ARSB 在胃癌预后中的临床价值。

2、体外细胞实验, 采用蛋白质印迹法 (Western blot) 检测四种胃癌细胞系 AGS、HGC-27、MGC 803 和 MKN45 中 ARSB 蛋白水平的表达, 选取 ARSB 表达量相对较高的两种胃癌细胞系 (AGS、HGC-27) 利用小干扰 RNA (siRNA) 进行转染敲低 ARSB 的表达, 利用 Western blot 检测转染效率; 通过 CCK-8 细胞增殖实验检测 ARSB 敲低后胃癌细胞的增殖能力; 细胞划痕实验评估 ARSB 敲低后胃癌细胞的迁移能力; 流式细胞术测定 ARSB 敲低后胃癌细胞的凋亡情况; 并利用 Western blot 验证 ARSB 调控 WNT 通路下游基因的表达。

3、Wnt/ β -catenin 通路抑制剂 XAV939 对胃癌细胞生物学特性行为影响的实验。AGS 和 HGC-27 两种胃癌细胞各分为 4 组: ①空白对照组: XAV939 (-) 与 ARSB siRNA (-); ②单独干扰组: ARSB siRNA (+) 与 XAV939 (-); ③单独抑制剂组: XAV939 (+) 与 ARSB siRNA (-); ④干扰联合抑制剂组: ARSB siRNA (+) 与 XAV939 (+)。通过 Western blot 检测经 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制剂 XAV939 对胃癌细胞处理后 ARSB 蛋白表达的影响; 探讨直接干扰 Wnt 信号通路是否会影响胃癌细胞系的功能; 利用 CCK-8 细胞增殖实验与细胞划痕实验分别检测各组胃癌细胞增殖与迁移的情况。

结果:

1、通过分析 GEO、TCGA 数据库结果表明, ARSB 在非配对胃癌组织中相较于正常组织呈高表达 ($P < 0.05$); 同样, 在配对组织中相较癌旁正常组织, ARSB 也表现出在胃癌组织高表达的特点 ($P < 0.001$); ROC 曲线显示 ARSB 对预测胃癌发生具有较高的准确性; 生存分析结果表明: ARSB 高表达患者其总生存期、无进展生存期、进展生存期相较于低表达患者均明显缩短; 临床病理相关性分析提示 ARSB 与胃癌患者的临床指标 T 分期相关; Cox 回归分析结果表明 ARSB 可作为影响胃癌患者预后的一个独立危险因素。

2、Western blot 结果提示 ARSB 在 AGS 和 HGC-27 两株细胞中表达较为显著, 选用其用于后续的细胞功能实验。CCK-8 细胞增殖实验结果显示, 敲低 ARSB 对胃癌细胞增殖能力有明显抑制作用; 细胞划痕实验结果表明敲低 ARSB 后胃癌细胞迁移能力显著减弱; 流式细胞术检测结果表明敲低 ARSB 能促进胃癌细胞的凋亡; Western blot 实验结果证明敲低 ARSB 可抑制 WNT 信号通路中 β -catenin 和 c-Myc 相关基因的表达。

3、Western blot 结果提示经 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂 XAV939 处理后两种胃癌细胞中 ARSB 蛋白表达水平明显下调; 敲低 ARSB 联合 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂 XAV939 能进一步抑制 β -catenin 和 c-Myc 的表达; CCK-8 实验结果显示单独干扰组或单独抑制剂组均较空白对照组细胞的增殖能力降低 ($P < 0.01$), 干扰联合抑制剂组细胞的增殖能力与空白对照组相比增殖能力降低更显著 ($P < 0.001$); 细胞划痕实验结果提示单独干扰组或单独抑制剂组迁移能力较空白对照组降低 ($P < 0.01$), 干扰联合抑制剂组细胞的迁移能力较空白对照组降低更显著 ($P < 0.001$)。

结论:

ARSB 显著高表达的胃癌患者其生存时间更短; 该基因是胃癌的一个预后独立危险因素。ARSB 敲低能够抑制胃癌细胞 AGS、HGC-27 的增殖、迁移并促进胃癌细胞凋亡; ARSB 通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路促进胃癌细胞的恶性生物学行为。以上结果提示 ARSB 在胃癌的发生发展过程中发挥着重要作用。

关键词: ARSB, 胃癌, 预后, Wnt/ β -catenin, XAV939

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	III
中英文缩略词表.....	IX
第一部分 基于公共数据库分析 ARSB 基因在胃癌中的表达.....	1
1 引言.....	1
2 材料与方法.....	3
2.1 实验材料.....	3
2.2 实验方法.....	3
3 结果.....	5
3.1 基于 GEO 胃癌数据集分析 ARSB mRNA 的表达.....	5
3.2 基于 TCGA 数据库分析 ARSB mRNA 在 GC 中的表达.....	5
3.3 基于数据库分析 ARSB 表达与胃癌的预后相关性.....	6
4 讨论.....	9
5 结论.....	11
参考文献.....	13
第二部分 ARSB 基因对胃癌细胞生物学行为的影响.....	17
1 引言.....	17
2 材料和方法.....	19
2.1 胃癌细胞系.....	19
2.2 主要仪器设备.....	19
2.3 实验试剂.....	20
2.4 细胞培养.....	21
2.5 蛋白免疫印迹实验（Western Blot）.....	22
2.6 siRNA-ARSB 瞬时转染实验.....	25
2.7 CKK-8 增殖实验.....	25
2.8 细胞划痕实验.....	26

2.9 流式细胞仪检测细胞凋亡	26
2.10 统计学方法	27
3 结果	29
3.1 ARSB 蛋白在胃癌细胞系中的表达	29
3.2 ARSB 敲低对胃癌细胞增殖能力的影响	30
3.3 ARSB 敲低对胃癌细胞迁移能力的影响	30
3.4 ARSB 敲低对胃癌细胞凋亡能力的影响	31
3.5 ARSB 敲低对 Wnt/ β -catenin 信号通路中相关蛋白的表达	31
3.6 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂 XAV939 对 AGS、HGC-27 胃癌细胞 Wnt/ β -catenin 通路相关因子蛋白的影响	32
3.7 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂 XAV-939 对 ARSB 敲低的胃癌细胞 AGS 和 HGC-27 增殖与迁移的影响	33
4 讨论	35
5 结论	39
参考文献	41
综 述	45
参考文献	49
致 谢	53
攻读学位期间发表的学术论文目录	55

中英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
ARSB	Arylsulfatase B	芳基硫酸酯酶 B
GC	Gastric Cancer	胃癌
GEO	Gene Expression Omnibus	基因表达综合数据库
TCGA	The Cancer Genome Atlas	癌症基因组图谱
OS	Overall Survival	总生存期
PFS	Progression-Free-Survival	无进展生存期
PPS	Post-Progression Survival	进展生存期
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
WB	Western Blot	蛋白质印迹法
siRNA	small interfer RNA	小干扰 RNA
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
PVDF	Polyvinylidene Fluoride	聚偏二氟乙烯
BCA	Bicinchoninic Acid	二喹啉甲酸
CI	Confidence Interval	置信区间
HR	Hazard Ratio	危险比
OD	Optical Density	光密度
CCK-8	Cell Counting Kit-8	细胞计数试剂盒
FBS	Foetal Bovine Serum	胎牛血清
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	十二烷基硫酸钠
ECL	Enhanced Chemi-Luminescence	增强化学发光
TEMED	Tetramethylethylenediamine	四甲基二乙胺
PMSF	Polyvinylidene fluoride membrane	聚偏二氟乙烯氟化物膜
APS	Ammonium Persulfate	过硫酸铵

第一部分 基于公共数据库分析 ARSB 基因在胃癌中的表达

1 引言

胃癌（Gastric Cancer, GC）为全球范围内最常见的恶性肿瘤之一，我国胃癌的发病率和死亡率位居第三位^[1]，严重威胁着人类健康。近年胃癌诊疗技术水平虽然有了一定提高，然而整体胃癌病人临床疗效和远期预后结果的提高是有限的。它和胃癌的发病隐匿，前期不容易觉察有关系，大多数胃癌患者就诊时，已经是病情局部进展期或者晚期，致使疗效受限。因此，加强对胃癌发病机制的研究显得尤为重要。另外，转移、复发等也是造成胃癌患者疗效不佳、死亡率高的主要因素^[2]。胃癌侵袭与转移经历了一个错综复杂的序列过程，涉及基因和方式等许多环节。近年来，越来越多的研究表明基因的突变或表达异常与胃癌的发生发展密不可分，主要表现为癌基因的激活与抑癌基因的失活^[3,4]。因此积极发现新的治疗靶点，为提高胃癌患者治疗效果与生存预后提供重要科学意义与临床价值。

芳香基硫酸酯酶（Arylsulfatase or Arylsulphatase, ARS），别名硫酸脑苷脂硫酸酯酶（Sulfatidate Sulfatase），该体系称为芳香基-硫酸盐硫酸解酶（Aryl-Sulphate Sulfohydrolase），属水解酶类。人类芳香基硫酸酯酶 ARS 几乎分布于全身各组织和器官中^[5]，迄今为止已被报道的芳香基硫酸酯酶有 9 种^[6]。芳香基硫酸酯酶在人体中含量正常时，主要应用于解毒，目前 ARSA 及 ARSB 已有大量报道^[7]。大量研究显示，当炎症、恶性疾病及其他生理、病理条件发生变化时，ARS 酶活力均会发生变化^[8]，特别是皮肤癌、膀胱癌、肺癌、乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌、结肠癌原发、继发性肿瘤组织中，ARSA 和 ARSB 酶活力均明显升高^[9]。

芳香族硫酸酯酶 ARSA 及 ARSB 因其在医学上的重要作用及其与某些肿瘤诊断及预后之间的密切关系而成为近年来研究的热点，受到国内外高度重视。多年来，有关肿瘤及其他恶性疾病与病人尿中 ARS 活性之间的相关性研究资料不断积累，并应用临床。王明训^[10]等人对 28 例造血系统肿瘤和 56 例非肿瘤性血液病患者尿 ARS 酶活力与正常人作了比较，证实了 ARSA 和 ARSB 在造血系统肿瘤病例中活力异常增强，而在非肿瘤性血液病患者中，酶的活力正常。Dzialiszynski^[11]等人发现膀胱癌患者尿中 ARS 异常高

活力，经手术摘除癌组织后能恢复正常。而后续的研究显示 ARSB 在不同恶性肿瘤中的表达水平并不一致，在结直肠癌、泌尿生殖道恶性肿瘤、恶性黑色素瘤中表达降低，而在肺癌中 ARSA、ARSB 表达均增加^[9-12]。90 年代初，研究人员开始研究 ARSA 在胃肠道、乳腺、肺癌、中枢神经系统、肾脏和女性生殖道肿瘤中的表达。他们的发现表明，ARSA 和 ARSB 可能在肿瘤发生和肿瘤细胞转移潜能中发挥作用^[13]。已有研究表明雄激素诱导的 ARSB 和 DKK3 下降可能通过响应基质 Wnt3A 而持续激活前列腺上皮中的 Wnt 信号传导，从而导致前列腺癌变^[14]。ARSB 介导 Wnt/ β -catenin 信号转导途径参与结直肠癌发病，与结直肠癌的侵袭有关^[15]。但目前尚未有研究阐明 ARSB 在胃癌中的表达和预后的影响作用，因此，本部分从生物信息角度分析 ARSB 基因在胃癌中的表达及其与预后的相关性进行了初步的探究，并分析 ARSB 表达与胃癌患者的临床病理参数之间的相关性。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 GEO 数据库

Gene Expression Omnibus (GEO) 数据库是由美国国家生物技术信息中心建立和维护的, 数据库中包含基因芯片、基因测序以及其他数据集, 并可免费以各种形式下载使用。到目前为止, GEO 数据库已经包含了 4348 个数据集(datasets), 169838 个系列(series), 23060 个平台(platforms) 以及 4888785 个样本(samples) 而且直至今刻该数据库还在不断的更新和丰富数据信息中。

2.1.2 TCGA 数据库

癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA) 是由美国国家癌症研究所资助开展的, 对超过 20000 个原发性肿瘤和匹配的正常样本进行分子鉴定, 产生了包含 36 种癌症类型的超过 2.5 PB 的癌症基因、蛋白数据。

2.2 实验方法

2.2.1 基于 GEO 数据库的数据分析

我们通过 GEO 数据库下载 ARSB 基因表达谱及临床相关的数据, 采用 SPSS 统计分析胃癌组织与正常组织 mRNA 的表达和临床数据分析; 应用 Cox 比例风险模型分析 ARSB 对胃癌患者临床预后的影响。

从 GEO 数据库中搜索人类胃癌样本基因表达谱下载 GSE29998、GSE54129 和 GSE51575 数据集。Illumina HumanHT-12 V3.0 表达芯片 GSE29998 包含 49 个正常样本和 50 个肿瘤样本; Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 阵列 GSE54129 包含 21 个正常样本和 111 个肿瘤样本; Agilent-028004 SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray 阵列 GSE51575 包含 26 例配对肿瘤数据。Kaplan-Meier Plotter 在线分析 ARSB 基因在胃癌中的预后价值。

2.2.2 基于 TCGA 数据库的数据分析

进入 TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/repository>) 数据下载页面, 输入限定条件, 其余选项默认为系统设定, 共获取 Case: 407。依次下载 Manifest、Cart、Metadata 文

件。然后获得每个样品的原始数据及其相应的 mRNA 表达量，将 ARSB mRNA 表达数据与临床数据进行汇总，最终共获取 STAD 组织样本 407 例。

2.2.3 统计学方法

本实验采用统计学软件 SPSS 21.0 对数据进行分析，通过 t 检验分析癌组织与正常组织之间的差异， $P < 0.05$ 具有统计学意义。使用 R 软件对 TCGA 数据集中的胃癌总体生存率进行分析，利用 Kaplan-Meier Plotter 在线生存分析网站分析绘制 GEO 数据库中胃癌患者的生存曲线。

3 结果

3.1 基于 GEO 胃癌数据集分析 ARSB mRNA 的表达

通过对 GEO 数据库中 ARSB 在胃癌组织与癌旁正常组织中的 mRNA 表达水平进行分析, 结果显示, 在非配对胃癌组织和癌旁正常组织中, ARSB mRNA 在胃癌组织中显著上调 ($P < 0.001$, 图 1-1 a); 在配对癌组织与癌旁正常组织中, 其 mRNA 表达水平也得到了同样的证实 ($P < 0.001$, 图 1-1 b)。进一步 ROC 曲线显示 ARSB 在预测胃癌发生有较高的准确度 (图 1-1 c)。

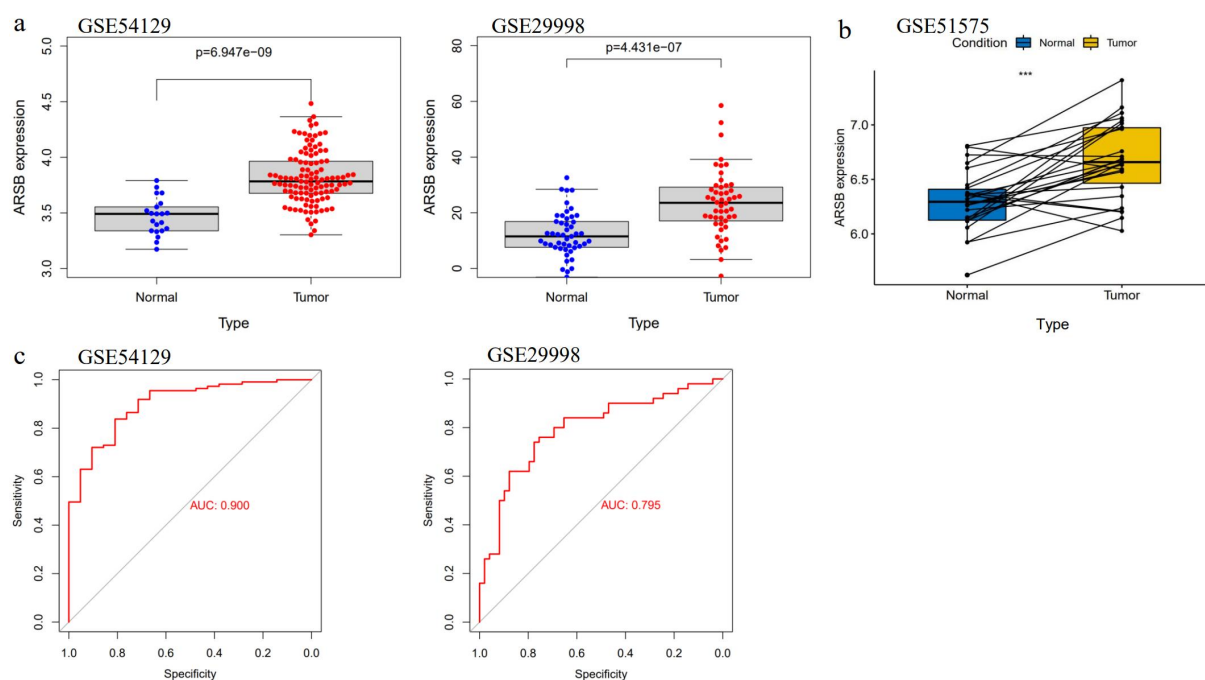


图 1-1 ARSB 在胃癌组织与胃正常组织之间的表达差异

注: a. ARSB mRNA 在非配对胃癌组织 (GSE54129、GSE29998) 中的表达水平; b. ARSB mRNA 在配对胃癌组织 (GSE51575) 中的表达水平; c. ROC 曲线表明 ARSB 在预测胃癌的发生具有很高的准确度 ($P < 0.05$ 时标记为 “*”, $P < 0.01$ 时标记为 “**”, $P < 0.001$ 时标记为 “***”)。

3.2 基于 TCGA 数据库分析 ARSB mRNA 在 GC 中的表达

对 TCGA 数据库中 32 例正常胃组织样本的 ARSB mRNA 表达量与 375 例胃癌组织样本的 ARSB mRNA 表达量进行分析, 结果表明胃癌组织中 ARSB mRNA 的表达量相较于正常胃组织明显上调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 见图 1-2)。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/286102122031011002>