

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.05.006

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.05.006>

PES1 高表达与胃癌的进展和预后的关系

袁春艳¹, 吴艳²

(1. 复旦大学附属闵行医院病理科, 上海 201100; 2. 湖北医药学院生理学教研室, 湖北 十堰 442000)

[摘要] **目的:** 探讨胃癌患者肿瘤组织内核糖体生物合成因子1(peccadillo ibosomal biogenesis factor 1, PES1)表达与胃癌的进展和预后的关系。**方法:** 收集2012年1月至2013年1月在复旦大学附属闵行医院接受胃癌切除根治术的89例胃癌患者。在胃癌组织中通过免疫组织化学染色和蛋白质印迹法检测PES1的表达情况, 并与配对的非肿瘤胃组织表达水平进行对比; 将肿瘤标本中PES1的表达情况与临床病理特征进行相关性分析以研究PES1表达与胃癌进展的关系; 通过单变量分析PES1表达与患者预后之间的关系。**结果:** PES1在胃癌组织中高表达, 且其高度表达与胃癌的浸润深度、淋巴结转移和T分期呈正相关(均 $P < 0.05$)。PES1表达可作为TNM I期患者总生存率和无进展生存率的独立预后标志物。**结论:** PES1高表达与胃癌进展正相关, 且可用作预后监测的靶标分子。

[关键词] 核糖体生物合成因子1; 胃癌; 预后

Relationship between high expression of PES1 and progress and prognosis of gastric cancer

YUAN Chunyan¹, WU Yan²

(1. Department of Pathology, Minhang Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201100; 2. Department of Physiology, Hubei University of Medicine, Shiyan Hubei 442000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the relationship of the expression of peccadillo ibosomal biogenesis factor 1 (PES1) in tumor tissues of patients with gastric cancer between the development and prognosis of gastric cancer. **Methods:** A total of 89 gastric cancer patients who received radical gastrectomy in Minhang Hospital Affiliated to Fudan University from January 2012 to January 2013 were collected. The expression of PES1 in gastric cancer tissues was detected by immunohistochemical staining and Western blot, and the expression level of PES1 was compared with that of matched adjacent non-tumor gastric tissues. The correlation between PES1 expression in tumor specimens and clinicopathological characteristics was analyzed to study the relationship between PES1 expression and gastric cancer progression. The relationship between PES1 expression and patients outcomes was analyzed by univariate analysis. **Results:** PES1 is highly expressed in gastric cancer tissues, and its high expression

收稿日期 (Date of reception): 2019-06-28

通信作者 (Corresponding author): 吴艳, Email: Wuyan9811092@163.com

基金项目 (Foundation item): 湖北省教育厅科学研究计划项目 (B2017488)。This work was supported by the Scientific Research Project of Hubei Provincial Education Department, China (B2017488).

is positively correlated with the depth of invasion, lymph node metastasis and T stage of gastric cancer (all $P < 0.05$). PES1 expression may be an independent prognostic marker of overall survival (OS) and progression-free survival (RFS) in patients with TNM stage I. **Conclusion:** The high expression of PES1 is positively correlated with the progress of gastric cancer and can be used as a target molecule for prognosis monitoring.

Keywords peccadillo ibosomal biogenesis factor 1; gastric cancer; prognosis

胃癌是最常见的具有高发病率和高病死率的恶性肿瘤之一。且我国和一些东南亚国家的胃癌发病率已经远远高于美国或者欧洲国家^[1]。胃癌切除术后辅以化学药物治疗(以下简称化疗)是治疗胃癌的首选治疗方案。由于胃癌早期症状不典型,超过80%的胃癌患者在晚期才被确诊,而这些患者通常预后不良^[2]。此外,不论是接受手术治疗还是保守治疗的胃癌患者,化疗的效果都不太理想^[3]。因此,迫切需要发现新的胃癌相关分子标志物,以辅助临床胃癌诊断、预后预测和确定治疗方案。核糖体生物合成因子1(peccadillo ibosomal biogenesis factor 1, PES1)在甲状腺癌、卵巢癌、肝癌和胃癌等多种肿瘤细胞中表达上调,敲低PES1的表达可以有效抑制上述癌细胞的增殖^[4-7]。而关于PES1的表达与胃癌进展和预后的研究尚少。本研究的目的是探讨PES1表达与胃癌临床病理特征和预后的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

收集2012年1月至2013年1月间在复旦大学附属闵行医院就诊并接受胃癌根治性切除术治疗的89例患者的胃癌组织石蜡包埋样本和配对相邻的非肿瘤胃组织样本。所有纳入患者为复旦大学附属闵行医院首次确诊,且术前均未接受化疗或者放射治疗。本研究依据美国癌症联合委员会的标准制定的临床病理学分类和分期对胃癌进行病理分级和分期。本实验获得所有受试者的知情同意以及复旦大学附属闵行医院医学伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测

将各样本的石蜡组织,切成5 μm 厚度的切片。样品在55 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤1 h进行抗原修复,二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、3%过氧化氢处理10 min以消除内源性过氧化物酶活性、山羊血清孵育30 min以防止非特异性染色。一抗PES1(1:200;美国

Santa Cruz公司)在4 $^{\circ}\text{C}$ 加湿容器孵育过夜, PBS洗15 min, 共3次, 二抗再次孵育2 h, DAB溶液显色5 min, 苏木精复染5 min, 用生物素辣根过氧化物酶检测系统处理组织切片。分析数据时考虑免疫染色的强度和程度两个因素: 随机选10个200倍镜下视野, 每个视野计100个细胞, 染色强度评分0~3; 染色程度评分为0~100%。依据染色强度评分(0~3分)和阳性细胞百分数(0~100%)进行综合评分。免疫染色综合评分=染色强度评分 \times 阳性细胞百分数。综合评分为0为阴性; 综合评分 >0 且 ≤ 1 为低表达; 综合评分 >1 , 为高表达。

1.2.2 脱蜡提取蛋白质

从样品中任取12对胃癌组织和配对的癌旁组织的石蜡包埋的样本。样本加入1 mL辛烷静置后涡旋10 s, 再次加入0.075 mL甲醇静置并再次涡旋50 s, 离心后吸去上层清液(其中包含辛烷和甲醇), 残余物干燥2~3 min, 加入含有2% SDS的20 mmol/L Tris-HCl(pH=9), 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热20 min后, 60 $^{\circ}\text{C}$ 在孵化器加热2 h。

1.2.3 蛋白质印迹法检测

取上述样本萃取的蛋白质, 经蛋白质定量后, 进行SDS-PAGE电泳分离。然后将经电泳分离的蛋白质经电转至PVDF膜。PVDF膜在室温下经封闭液封闭2 h后, 采用室温孵育一抗PES1(1:1 000)2 h, TBST洗15 min, 共3次后, 室温孵育辣根过氧化物酶标记的二抗孵育2 h。TBST洗15 min, 共3次后, 经ECL化学发光法进行显影。以 β -actin为PES1的内部参照, 分析PES1的相对表达。

1.2.4 随访

随访日期截至2018年10月, 若患者死亡, 则以死亡时间为随访终点。患者在胃切除术后前3年内, 每6个月进行1次随访并接受CT或MRI以确认是否复发及患者存活情况。之后每1年进行1次随访。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0软件进行数据分析。计数资料采用 χ^2 检验; 计量资料采用 t 检验。使用Kaplan-Meier方法制作生存曲线。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PES1 表达与胃癌临床病理特征的相关性

免疫组织化学染色显示: PES1在胃癌组织和癌旁非癌组织均有表达, 且PES1主要表达在胃癌组织(图1A)。胃癌组织中发现47例PES1高表达(52.81%), 而癌旁组织中发现14例(15.73%), 差异具有统计学意义($\chi^2=27.16$, $P<0.01$)。通过蛋白质印迹法检测胃癌组织与癌旁组织内PES1蛋白表达情况, 结果显示, PES1在胃癌组织中表达水平高于癌旁非肿瘤组织(图1B, 图示12例)。进一步分析PES1表达与胃癌病理的关系发现: PES1的高表达与胃癌的浸润深度、淋巴结转移和疾病分期呈正相关(均 $P<0.01$, 表1)。

2.2 PES1 的高表达胃癌预后不良有关

单变量分析分析临床病理参数与患者预后

之间的相关性, 结果显示: 肿瘤大小、浸润深度、淋巴结转移和PES1表达水平($P<0.05$)均是影响OS的独立因素(表2); 而较大的肿瘤尺寸、偏上的肿瘤位置、突出的浆膜浸润、淋巴结转移和PES1($P<0.05$)是RFS的不利预测因素。此外, PES1高表达的患者比PES1低表达的患者更易复发; 数据显示: 相较于T1/T2与N0组, T3/T4和N1~3组的PES1表达水平更高。

2.3 PES1 表达在早期胃癌患者诊断中的预后价值

共有34名TNM I期患者具有完整的随访资料, 此34例TNM I期患者的PES1表达与OS(图2A), RFS(图2B)存在显著的相关性($P=0.013$; $P=0.008$)。在调整预后特征的多变量模型中, PES1表达水平上调均是TNM I期患者OS和RFS的独立预后标志物(表2)。

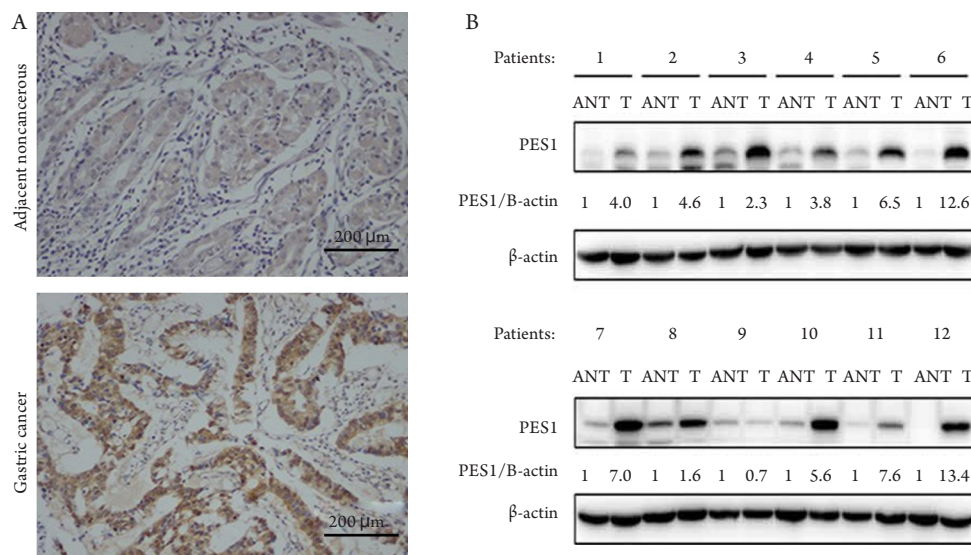


图1 癌症患者的癌体组织中PES1的表达

Figure 1 High PES1 expression in gastric cancer tissues

(A)免疫组织化学检测胃癌组织和配对的癌旁非肿瘤组织中PES1的表达($\times 200$); (B)蛋白质印迹法检测胃癌组织和配对的癌旁非肿瘤组织中PES1的表达。用光密度定量和归一化为 β -actin水平的PES1水平在相同的样本中显示在蛋白质印迹法结果下面。

(A) Expression of PES1 in gastric cancer tissues and matched adjacent noncancerous tissues was detected by IHC staining ($\times 200$);

(B) Expression of PES1 in gastric cancer tissues (T) and matched adjacent noncancerous tissues (ANT) was detected by Western blotting.

Levels of PES1 quantified by optical density and normalized to β -actin levels in the same samples are shown below the Western blotting results.

表1 癌症患者的临床病理特征和胃癌细胞中PES1的表达

Table 1 Clinicopathological characteristics of patients and expression of PES1 in gastric cancer

临床特征	n	PES1 表达 / [例 (%)]		P
		低表达	高表达	
性别				0.156
男	54	23 (42.59)	31 (57.41)	
女	35	19 (54.29)	16 (45.71)	
年龄 / 岁				0.332
≤ 60	58	26 (44.83)	32 (55.17)	
>60	31	16 (51.61)	15 (48.39)	
肿瘤尺寸 / cm				0.691
≤ 5.0	59	28 (47.46)	31 (52.54)	
>5.0	30	14 (46.67)	16 (53.33)	
肿瘤位置				0.848
上部	40	19 (47.50)	21 (52.50)	
中部 / 下部	49	23 (46.94)	26 (53.06)	
分化				0.078
高分化 / 中分化	42	17 (40.48)	25 (59.52)	
低分化	47	25 (53.19)	22 (46.81)	
浸润深度				0.004
T1/T2	34	24 (70.58)	10 (29.42)	
T3/T4	55	18 (32.73)	37 (67.27)	
淋巴结转移				0.000
阴性	24	17 (70.83)	7 (29.17)	
阳性	65	25 (38.46)	40 (61.54)	
T 分期				0.008
I/II	43	27 (62.79)	16 (37.21)	
III	46	15 (32.61)	31 (67.39)	

表2 单变量及多变量分析PES1与患者存活和复发的相关性

Table 2 Univariate and multivariate analysis of PES1 associated with survival and recurrence in gastric cancer patients

临床特征	总生存率			无进展生存率		
	单变量分析	多变量分析		单变量分析	多变量分析	
	P	OR	95% CI	P	OR	95% CI
性别 (女 vs 男)	0.473	—	—	0.314	—	—
年龄 (≤ 60 岁 vs >60 岁)	0.214	—	—	0.136	—	—
肿瘤尺寸 (≤ 5.0 cm vs >5.0 cm)	0.001	1.478	1.037~2.113	0.025	1.508	1.052~2.162
肿瘤位置 (上部 vs 中部 / 下部)	0.215	—	—	0.063	1.304	1.152~2.315
分化 (高分化 / 中分化 vs 低分化)	0.104	—	—	0.089	—	—
浸润深度 (T1/T2 vs T3/T4)	0.001	2.468	1.418~4.294	0.001	2.449	1.431~4.191
淋巴结转移 (阴性 vs 阳性)	0.018	2.332	1.156~4.963	0.007	2.567	1.299~5.073
PES1 表达 (低表达 vs 高表达)	0.000	3.257	2.201~4.873	0.000	3.077	2.089~4.532

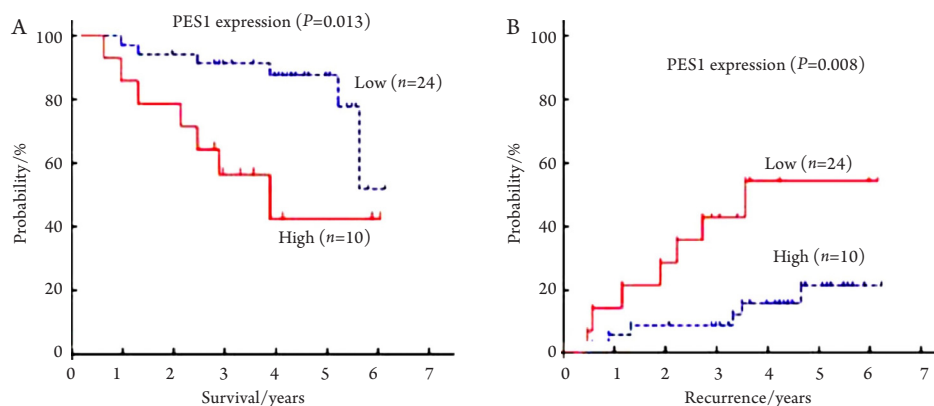


图2 TNM I期患者PES1过表达提示患者预后不良, 根据34例TNM I期患者的PES1蛋白表达情况, 绘制总生存率(A)和无进展生存率(B)曲线

Figure 2 PES1 overexpression indicates poor prognosis in TNM stage I gastric cancer patients, overall survival (A) and recurrence-free survival (B) curves were generated based on the PES1 protein expression statuses in 34 TNM stage I patients

3 讨论

胃癌是全球癌症死亡的主要原因之一, 然而, 促进胃癌发展的精确分子机制尚不清楚。近几年有研究^[7]表明: 在胃癌细胞(AGS和N87)中抑制PES1表达导致细胞周期停滞G₁期。这都提示PES1低表达能抑制细胞生长。但是在胃癌的相关研究中, PES1尚未引起重视, 其表达在胃癌的临床诊断和预后中的意义都尚不清楚。

在蛋白质组学研究^[8-9]中, 从甲醛固定后且经过石蜡包埋的样品中提取蛋白质十分困难。但鉴于大量的临床样本库的保存方式, 参考已有的研究^[10-11], 对石蜡样本进行蛋白质提取, 虽然效果与新鲜组织相比略有不足, 但是有助于临床方面癌症的转化研究。在本研究中, 通过免疫组织化学染色与蛋白质印迹法在样品中检测PES1表达, 数据显示: 与癌旁组织相比, PES1在胃癌组织样本中的表达水平更高。且PES1的表达与胃癌的侵袭程度、淋巴结转移TNM分期呈正相关。此外还分析了PES1表达水平与患者术后预后的相关性。结果显示: PES1过表达的患者生存率低于PES1高表达的患者。根据多变量分析的结果显示PES1过表达是胃癌患者OS和RFS低的独立影响因素。而TNM分期是影响胃癌患者预后的重要因素之一, 然而胃肠外科医师很难及时预测已接受根治性切除术的患者是否会复发。本研究结果显示PES1表达对TNM I期患者的OS和RFS具有预后意义。多变量分析显示PES1是TNM I期患者的独立影响因素。

综上, 本研究揭示了PES1表达与胃癌患者预后之间的相关性。PES1可能是较有希望的胃癌患者预后预测因子, 这将有助于选择合适的治疗方法, 然而, 需要进一步的研究来揭示PES1在胃癌中的潜在生物学功能。

参考文献

1. Sano T. Gastric cancer: Asia and the world [J]. *Gastric Cancer*, 2017, 20(Suppl 1): 1-2.
2. Liao G, Zhao Z, Khan M, et al. Comparative analysis of robotic gastrectomy and lapa-rosopic gastrectomy for gastric cancer in terms of their long-term oncological out-comes: a meta-analysis of 3410 gastric cancer patients [J]. *World J Surg Oncol*, 2019, 17(1): 86.
3. Harada K, Mizrak Kaya D, Shimodaira Y, et al. Global chemotherapy development for gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2017, 20(Suppl 1): 92-101.
4. Qiu YB, Liao LY, Jiang R, et al. PES1 promotes the occurrence and development of pa-pillary thyroid cancer by upregulating the ER α /ER β protein ratio[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 1032.
5. Li J, Zhuang Q, Lan X, et al. PES1 differentially regulates the expression of ER α and ER β in ovarian cancer[J]. *IUBMB Life*, 2013, 65(12): 1017-1025.
6. Fan P, Wang B, Meng Z, et al. PES1 is transcriptionally regulated by BRD4 and promotes cell proliferation and glycolysis in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 104: 1-8.
7. Li J, Zhou X, Lan X, et al. Repression of PES1 expression inhibits growth of gastric cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(3):3043-3049.

8. Swets M, Wouters A, Krijgsman D, et al. HLA-G protein expression in colorectal cancer evaluated by immunohistochemistry and western blot analysis: Its expression characteristics remain enigmatic[J]. Clin Immunol, 2018, 194: 80-86.
9. Conway TP, Daniels KJ, Park YN, et al. Generating a battery of monoclonal antibodies against firefly luciferase for Dot blot analysis, Western blot analysis, and immunostaining of cells in culture and paraffin sections[J]. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother, 2018, 37(1): 45-51.
10. Long G, Mo Y, Zhang Q, et al. Analysis of nanomaterial toxicity by Western blot[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1894: 161-169.
11. Springhorn A, Hoppe T. Western blot analysis of the autophagosomal membrane protein LGG-1/LC3 in *Caenorhabditis elegans*[J]. Methods Enzymol, 2019, 619: 319-336.

本文引用: 袁春艳, 吴艳. PES1高表达与胃癌的进展和预后的关系[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(5): 1108-1113. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.05.006

Cite this article as: YUAN Chunyan, WU Yan. Relationship between high expression of PES1 and progress and prognosis of gastric cancer[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2020, 40(5): 1108-1113. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.05.006