

# PTEN及Villin与早期胃癌诊疗的相关性研究

廖春丽<sup>1\*</sup>, 付肖岩<sup>1</sup>, 林建龙<sup>2</sup>, 王 薇<sup>1</sup>

<sup>1</sup>福建中医药大学附属第二人民医院脾胃科, 福建 福州

<sup>2</sup>福建中医药大学附属第二人民医院病理科, 福建 福州

收稿日期: 2021年9月29日; 录用日期: 2021年10月19日; 发布日期: 2021年10月29日

## 摘 要

目的: 胃腺癌作为常见癌症之一, 虽然目前其诊疗方案日趋成熟, 但其早期诊断及预后判断仍待完善。方法: 本实验利用TCGA数据库筛选出胃腺癌潜在致病基因, 并筛选相关hub基因, 并做生存曲线。最后利用组织样本对上述结果进行验证。结果: 利用TCGA数据库共筛选出29个潜在胃腺癌致病靶点, 并筛选出10个关键基因。对关键基因进行数据分析, 发现PTEN低表达及Villin高表达与胃癌患者生存率下降相关, 最后利用免疫组化对现有标本进行验证。结论: PTEN低表达及Villin高表达可作为早期胃腺癌诊断的重要参考, 其可能影响胃腺癌患者的预后。

## 关键词

早期胃癌, 拷贝数变异, PTEN, Villin, TCGA

# Correlation between PTEN or Villin and Early Gastric Cancer Diagnosis

Chunli Liao<sup>1\*</sup>, Xiaoyan Fu<sup>1</sup>, Jianlong Lin<sup>2</sup>, Wei Wang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian

<sup>2</sup>Department of Pathology, The Second Affiliated Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian

Received: Sep. 29<sup>th</sup>, 2021; accepted: Oct. 19<sup>th</sup>, 2021; published: Oct. 29<sup>th</sup>, 2021

## Abstract

**Objective:** Stomach adenocarcinoma is one of common cancer. Although its diagnosis and treatment plan is increasing, its early diagnosis and prognosis judgment remain treated. **Methods:** This

\*通讯作者。

experiment utilizes TCGA database to screen a potential pathogenic gene of gastric adenocarcinoma and screen the related HUB genes, and do survival curves. Finally, the above results are verified by tissue samples. Results: 29 potential gastric adenocarcinomas were screened using TCGA databases, and ten key genes were screened. Data analysis of key genes found that PTEN low expression and Villin high expression were related to the decrease in the survival rate of patients with gastric cancer. Finally, the existing specimens were verified using immunohistochemistry. Conclusion: PTEN low expression and Villin high expression can be an important reference for the diagnosis of early gastric adenocarcinoma, which may affect the prognosis of patients with gastric adenocarcinoma.

## Keywords

Early Gastric Cancer, Copy Number Variation, PTEN, Villin, TCGA

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 前言

根据统计数据,胃腺癌(Stomach adenocarcinoma, STAD)被列为全球第五大最常见的癌症,且排在癌症相关死亡病因的第三位[1]。据估计,2015年中国新增病例67.91万例,死亡49.8万人,大约90%~95%的胃癌是腺癌。根据肿瘤位于胃-食管交界处(贲门)的位置,胃癌被细分为贲门癌和非贲门癌[2]。在世界范围内,亚洲是STAD的发病率最高的区域。而在所有亚洲国家中,中国的STAD发病率最高,占全球STAD病例的49.9%。在欧洲国家,5年存活率从10%到30%不等,在中国,从30.2%到35.9%不等。胃癌的预后与肿瘤的分期密切相关,早期胃癌的五年生存率高达95%以上[3]。但早期胃癌多无明显症状和体征,我国早期胃癌的诊断率不足20%。为提高胃癌患者的预后,早期诊断尤为关键[4]。

为了更好地了解肿瘤遗传构成对临床预后影响,科研人员已经建立了全基因组的基因表达谱,如癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)等,以研究肿瘤基因表达与患者表型、生存率之间的关系。虽然胃腺癌相关发生机制已经进行了广泛的研究,但胃腺癌的发生、发展、病原学仍有待阐明。考虑到胃腺癌的高发病率和死亡率,利用现有癌症相关公共数据库进行数据分析有助于胃癌的早期诊断及治疗,并可在一定程度上判断患者的预后。过去十年来基因组技术的快速发展揭示了CNV对人类基因组遗传变异的重要贡献,并在越来越多的人类疾病中发挥作用,如自闭症、精神分裂症、抑郁症、癫痫等。拷贝数变异(Copy number variation, CNV)指的是一种拷贝数异常变化的结构变异,涉及的DNA片段通常长于1 kb,并导致基因组的获得(复制或插入换位)、丢失(缺失)或复杂的重排。平均而言,每个人的基因组中有超过1000个CNV,大约400万bp。CNV可涉及一个或多个基因,其可通过干扰编码区或改变基因的拷贝数从而影响等位基因。

本研究基于TCGA数据库对胃腺癌患者基因进行分析,筛选出影响预后的CNV相关基因,并使用现有的临床数据进行验证,以明确胃腺癌患者预后的相关预测指标。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 利用 TCGA 数据库筛选基因目标基因

从TCGA数据库下载胃腺癌患者的RNA序列数据(<https://TCGA-data.nci.nih.gov/TCGA/>)。利用R语

言包对下载数据进行分析。以  $p < 0.05$  为标准, 根据 TCGA 数据库中患者的预后结果对各基因的 CNV 进行筛选。

## 2.2. 筛选 hub 基因并进行生存分析

获得与临床预后数据相关的基因的 CNV 后, 利用 cytoscape (版本 3.7.1) 软件中 cytoHubba 插件对相关 CNV 中各基因进行 hub 基因的筛选。并筛选出排名前 10 的 hub 基因。分别对 10 个基因做生存分析。

## 2.3. 利用组织标本对筛选基因进行验证

收集自 2019.1 月~2021.4 月就诊于我院进行胃镜检查及病理活检或行内镜下粘膜下剥离术(ESD)治疗患者 118 例进行分析调查。其中男性 68 例, 女性 50 例, 年龄 31~72 岁, 平均年龄( $46.12 \pm 4.43$ )岁。根据病理结果将患者分为实验组(ESD 术后病理诊断证实为早期胃癌)及对照组(经胃镜检查及病理活检证实正常胃粘膜者), 其中实验组 42 例, 对照组 76 例。对各样本行免疫组化标记目标蛋白。所有患者均无其他消化道肿瘤, 无心、肾、肝功能衰竭。该研究经过我院伦理委员会的批准, 所有患者均签署知情同意书。

## 2.4. 免疫组化

PTEN 蛋白表达定位于细胞核, 阳性表达根据显色程度, 以细胞核出现褐色颗粒为判断标准, 胞核无褐色, 背景一致, 为阴性(-), 细胞核呈褐色, 定位清晰为阳性(+) [5]。Villin 染色结果判定: 光镜下观察吸收细胞膜纹状缘及或胞浆弥漫或颗粒状被染成棕黄色为阳性细胞, 在 400 倍高倍镜下, 每张切片随机取 5 个视野计算阳性细胞数, 取其平均数, 并根据阳性细胞数的多少进行半定量分级, 参照 Barnes 半定量法即分别对每张切片的阳性细胞数及阳性细胞着色程度进行分级记分, 结果以两项乘积表示。染色强度分数标准: 无色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 黄色为 2 分, 棕黄色为 3 分。同样物镜观察阳性细胞数, 高倍视野阳性细胞数  $< 5\%$  为阴性记 0 分,  $5\% \sim 25\%$  记为 1 分,  $26\% \sim 50\%$  为 2 分,  $51\% \sim 75\%$  记为 3 分,  $> 75\%$  为 4 分; 两者相乘 1~4 分为弱阳性(+), 5~8 分为中等阳性(++), 9~12 分为强阳性(+++) [6]。

## 2.5. 统计

采用 SPSS23.0 进行统计学分析。计量资料符合正态分布的, 使用 t 检验进行统计。计数资料使用卡方检验进行分析。以  $p < 0.05$  表示为有统计学意义。

## 3. 结果

### 3.1. 利用 TCGA 数据库筛选与预后相关的 CNV

利用 TCGA 数据中 CNV 数据库对 STAD 患者进行分析, 使用 R 对数据进行批量处理, 我们发现共有 29 个基因拷贝数(CNV)与胃腺癌发生存在可能相关(详见表 1)。

**Table 1.** CNV related genes

**表 1.** CNV 相关基因

Gene Symbol	SYMBOL	Gene Symbol	SYMBOL
ENSG00000134982.15	APC	ENSG00000143353.10	LYPLAL1
ENSG00000174059.15	CD34	ENSG00000196660.9	SLC30A10
ENSG00000117335.17	CD46	ENSG00000136628.16	EPRS1

## Continued

ENSG00000136636.11	KCTD3	ENSG00000162813.16	BPNT1
ENSG00000197721.15	CRIL	ENSG00000092978.9	GPATCH2
ENSG00000171862.11	PTEN	ENSG00000162772.15	ATF3
ENSG00000082482.12	KCNK2	ENSG00000136059.6	Villin
ENSG00000067533.5	RRP15	ENSG00000117707.14	PROX1
ENSG00000092969.10	TGFB2	ENSG00000263961.5	RHEX
ENSG00000196482.15	ESRRG	ENSG00000008118.8	CAMK1G
ENSG00000117691.8	NENF	ENSG00000196878.11	LAMB3
ENSG00000203705.9	TATDN3	ENSG00000123689.5	G0S2
ENSG00000185523.6	SPATA45	ENSG00000117594.8	HSD11B1
ENSG00000162769.11	FLVCR1	ENSG00000152092.14	ASTN1
ENSG00000117697.13	NSL1		

### 3.2. 筛选 hub 基因

利用 cytoscape 软件中的 cytoHubba 插件对结果 1 中胃腺癌相关基因进行 hub 基因筛选, 可得到排名前 10 的 hub 基因(详见表 2)。

**Table 2.** CNV related ranking hub gene

**表 2.** CNV 相关排名 hub 基因

序号	SYMBOL
1	KCTD3
2	CD34
3	PROX1
4	PTEN
5	RRP15
6	BPNT1
7	EPRS
8	Villin
9	G0S2
10	LAMB3

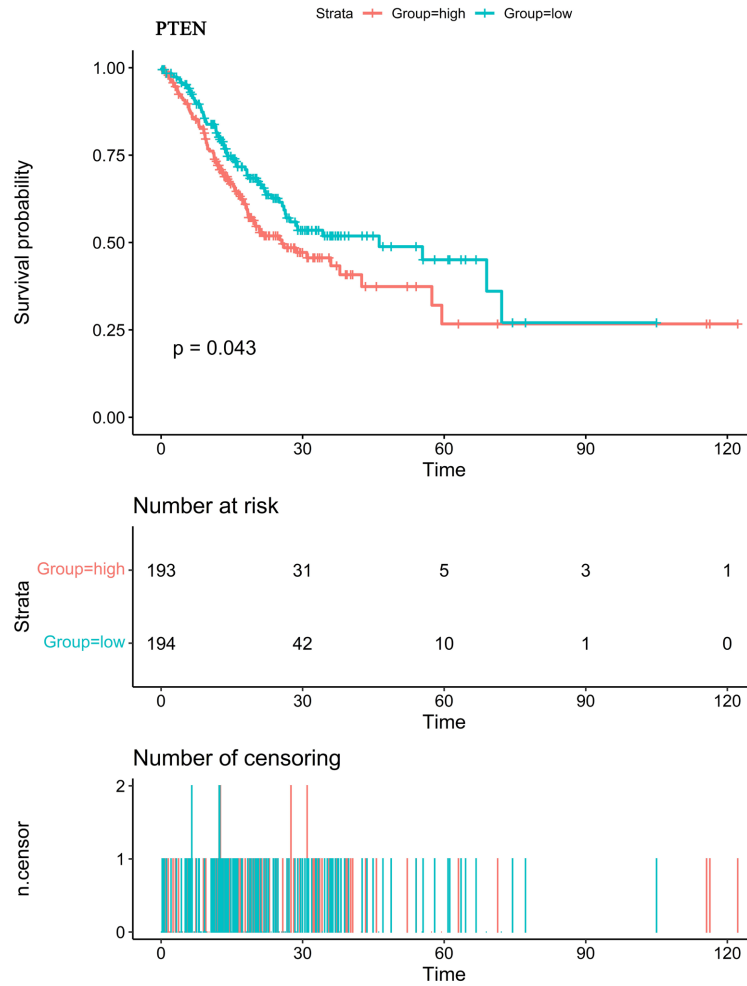
### 3.3. 利用 hub 基因做生存曲线

利用筛选出的 hub 基因做生存曲线, 发现 PTEN 及 Villin 的表达量与患者预后存在相关性(图 1, 图 2)。PTEN 低表达患者的生存率低于高表达患者, Villin 高表达患者的生存率均低于低表达患者( $p < 0.05$ )。

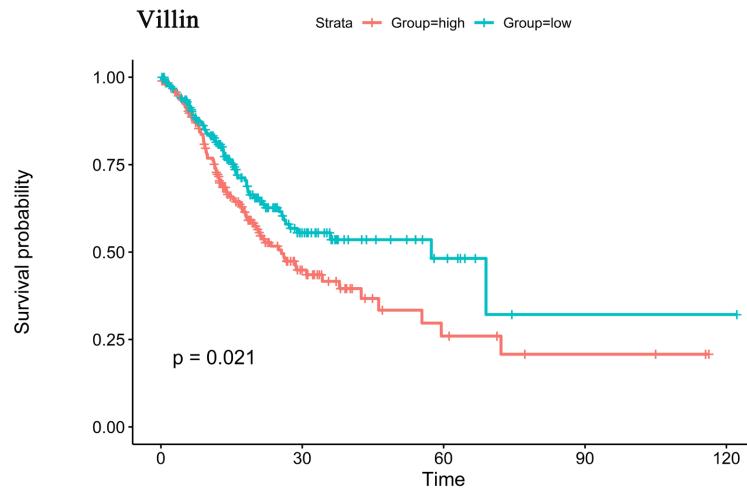
### 3.4. 两组患者标本 PTEN 及 Villin 表达比较

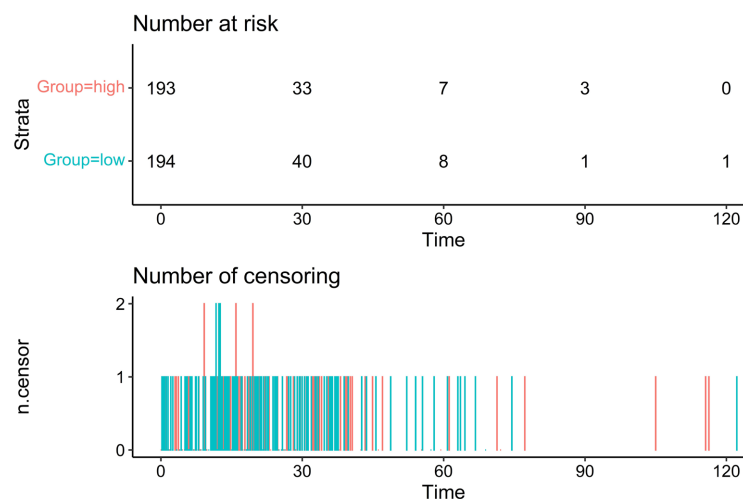
对患者的标本进行免疫组化标记目的蛋白 PTEN 及 Villin, 并根据结果比较对照组及实验组中两种蛋白表达的差异。由比较结果可知, 在实验组中, PTEN 的表达低于对照组, 而 Villin 的表达则高于对照组

(表 3, 表 4)。



**Figure 1.** The survival rate of patients with low PTEN expression in gastric adenocarcinoma patients was lower than that of patients with high expression,  $p < 0.05$   
**图 1.** 胃腺癌患者中 PTEN 低表达者生存率低于高表达患者,  $p < 0.05$





**Figure 2.** The survival rate of patients with high Villin expression in gastric adenocarcinoma patients was lower than that of patients with normal expression,  $p < 0.05$

**图 2.** 胃腺癌患者中 Villin 高表达者生存率低于正常表达患者,  $p < 0.05$

**Table 3.** PTEN expression of each sample

**表 3.** 各样本 PTEN 表达情况

	阴性	阳性	$X^2$	$p$
对照组	12	64	54.811	<0.05
实验组	36	6		

**Table 4.** Villin expression of each sample

**表 4.** 各样本 Villin 表达情况

	弱阳性	阳性	强阳性	$X^2$	$p$
对照组	62	12	2	57.953	<0.05
实验组	6	14	22		

## 4. 讨论

在本研究中, 通过生物信息学分析, 我们通过比较基因拷贝数变异筛选出了与胃腺癌发生相关的潜在基因。为了进一步明确这些基因在胃腺癌发生中的权重, 我们利用 cytoscape 软件中的 cytoHubba 插件对筛选出的潜在基因进行权重的排序, 并得出排名前 10 的基因。接下来利用生存分析曲线明确了 10 个基因中与预后相关的基因, 即 PTEN 和 Villin, 上述 PTEN 的低表达和 Villin 的高表达与胃腺癌患者的生存率呈负相关。为了进一步明确利用上述生物信息学方法做出的推断, 我们利用临床样本进行免疫组化染色, 并比较在非胃腺癌患者及胃腺癌患者中 PTEN 及 Villin 的表达情况。免疫组化的结果与生物信息学分析的结果一致, 即 PTEN 在胃腺癌患者中的表达量减少, 而 Villin 在胃腺癌患者癌组织中表达量增加。

PTEN 是迄今为止发现的第一个具有双特异性磷酸酯酶活性的抑癌基因, 位于人染色体 10q23.3, 含 9 个外显子和 8 个内含子, 编码 403 个氨基酸组成的蛋白质[7]。PTEN 是一个高度保守的蛋白, 参与胚胎的正常发育, 抑制肿瘤血管的生成, 阻滞或诱导细胞凋亡, 抑制细胞生长、转化、粘附、铺展及迁移,

促进细胞调亡,对肿瘤生长、侵袭和转移具有负调控作用,并可通过与其它抑癌基因协同、上调抑癌因子及下调促癌因子的表达发挥抑癌作用[8] [9]。PTEN在胃癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、头颈部癌与口腔癌等多种肿瘤中表达缺失或低表达,与肿瘤的发生发展密切相关[10] [11]。罗文等研究发现PTEN蛋白在正常组织表达85.94% (55/64)明显高于癌前病变51.85% (28/54)与胃癌20.71% (29/140) ( $p < 0.05$ ),而癌前病变表达显著高于胃癌( $p < 0.05$ ) [12]。甘伟平等研究发现早期胃癌组织中PTEN阳性表达率(45.8%)显著低于癌旁组织(88.9%)与正常组织(100.0%),不同分化程度、分期、预后及有无淋巴结转移者癌组织中PTEN表达水平差异有统计学意义,提示PTEN不仅参与了胃癌的分化和预后,还参与了胃癌分期、淋巴结转移[13] [14]。目前普遍认为的PTEN抑癌机制有如下几条途径协同完成:1)通过使PIP3去磷酸化负调控PI3K/Akt途径调节细胞的增殖与调亡平衡;2)通过对局灶黏附激酶(FAK)的去磷酸化抑制细胞转移和侵袭;3)通过抑制促细胞分裂素激活的蛋白激酶(MAPK)细胞信号传导途径抑制细胞的生长和分化[11] [12]。

Villin基因存在于2号染色体q35-36区,由25,000个碱基组成[15]。Villin是一种钙离子依赖的具有捆绑、切割、带帽和成核等多种功能的肌动蛋白连接蛋白,它主要在拥有刷状缘结构的消化系统和泌尿系统等上皮有表达,在肿瘤组织中表达仅限于上皮性肿瘤,具有严格的组织特异性,因此,Villin是胃肠道肿瘤相对敏感的特异性标志[16]。王见璋等研究发现Villin在慢性胃病伴肠上皮化生、胃上皮内瘤变及胃癌组的阳性率分别为72.7% (16/22),72% (18/25),90.9% (20/22),明显高于慢性胃炎组的阳性率38.1% (8/21),其结果表明Villin在胃癌的发生、发展过程中起到了重要的作用[17]。

尽管胃癌的发病率和死亡率都在下降,而且针对胃癌的流行病学、病理学、分子机制及治疗选择和策略都有重大进展,但是胃癌的诊治仍是临床工作中的重大难题,也给患者和社会带来巨大负担。我们的研究表明PTEN及Villin可能与胃腺癌的发生及预后存在密切关系,故在进一步的研究中,我们将继续深入,阐明其在胃腺癌发生及发展中的具体机制,并明确其是否可以作为胃腺癌早期防治的生物标志。

## 基金项目

福建中医药大学校管课题,课题编号:X2019026-学科。

## 参考文献

- [1] Yao, Q., He, L., Gao, X., Tang, N., Lin, L., Yu, X., *et al.* (2021) The m6A Methyltransferase METTL14-Mediated N6-Methyladenosine Modification of PTEN mRNA Inhibits Tumor Growth and Metastasis in Stomach Adenocarcinoma. *Frontiers in Oncology*, **11**, Article ID: 699749. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.699749>
- [2] Yang, Y., Li, Y. and Du, X. (2021) Prognostic Analysis of Gastric Signet Ring Cell Carcinoma and Hepatoid Adenocarcinoma of the Stomach: A Propensity Score-Matched Study. *Frontiers in Oncology*, **11**, Article ID: 716962. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.716962>
- [3] Liu, Z., Wang, A., Pu, Y., Li, Z., Xue, R., Zhang, C., *et al.* (2021) Genomic and Transcriptomic Profiling of Hepatoid Adenocarcinoma of the Stomach. *Oncogene*, **40**, 5705-5717. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01976-2>
- [4] Han, S., Zhu, W., Yang, W., Guan, Q., Chen, C., He, Q., *et al.* (2021) A Prognostic Signature Constructed by *CTHRC1* and *LRFN4* in Stomach Adenocarcinoma. *Frontiers in Genetics*, **12**, Article ID: 646818. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.646818>
- [5] Hempel, L., De Oliveira, J.V., Gaumann, A., Milani, V., Schweneker, K., Schenck, K., *et al.* (2021) Landscape of Biomarkers and Actionable Gene Alterations in Adenocarcinoma of GEJ and Stomach-A Real World Data Analysis. *Cancers*, **13**, Article No. 4453. <https://doi.org/10.3390/cancers13174453>
- [6] Guo, Y., Zhou, K., Zhuang, X., Li, J. and Shen, X. (2021) CDCA7-Regulated Inflammatory Mechanism through TLR4/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway in Stomach Adenocarcinoma. *BioFactors*. <https://doi.org/10.1002/biof.1773>
- [7] 李玉龙, 柴宁莉, 令狐恩强, 等. 预测老年早期胃癌患者内镜黏膜下剥离术后复发风险的列线图模型[J]. 中华老年医学杂志, 2021, 40(2): 188-192. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0254-9026.2021.02.011>



- [8] 贾音, 孙婷婷, 刘海东, 等. 常规检验大数据在胃癌早期诊断中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(3): 197-203.
- [9] Wu, S., Cao, L., Ke, L., Yan, Y., Luo, H., Hu, X., *et al.* (2021) Knockdown of CENPK Inhibits Cell Growth and Facilitates Apoptosis via PTEN-PI3K-AKT Signalling Pathway in Gastric Cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **25**, 8890-8903. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16850>
- [10] Fan, J.P., Qian, J. and Zhao, Y.J. (2020) The Loss of PTEN Expression and Microsatellite Stability (MSS) Were Predictors of Unfavorable Prognosis in Gastric Cancer (GC). *Neoplasma*, **67**, 1359-1366. [https://doi.org/10.4149/neo\\_2020\\_200422N427](https://doi.org/10.4149/neo_2020_200422N427)
- [11] Langdon, C.G., Gadek, K.E., Garcia, M.R., Evans, M.K., Reed, K.B., Bush, M., *et al.* (2021) Synthetic Essentiality between PTEN and Core Dependency Factor PAX7 Dictates Rhabdomyosarcoma Identity. *Nature Communications*, **12**, Article No. 5520. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25829-4>
- [12] Hernandez-Llodra, S., Segales, L., Juanpere, N., Marta Lorenzo, T., Salido, M., Nonell, L., *et al.* (2021) SPOP and CHDI Alterations in Prostate Cancer: Relationship with PTEN Loss, Tumor Grade, Perineural Infiltration, and PSA Recurrence. *Prostate*. <https://doi.org/10.1002/pros.24218>
- [13] 罗文, 周娟, 夏红, 苏坚, 刘芳, 汤欢, 等. PTEN 蛋白在胃癌中的表达及临床病理意义[J]. 中南医学科学杂志, 2017, 45(2): 109-112, 144. <https://doi.org/10.15972/j.cnki.43-1509/r.2017.02.001>
- [14] 甘伟平, 罗陈飘, 陈喜志, 吴东海, 王立生. 抑癌基因 PTEN 和 p53 在胃癌中的表达及意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2016, 30(1): 68-70. <https://doi.org/10.13507/j.issn.1674-3474.2016.01.023>
- [15] Zhao, L., Liu, S.Y., Li, Y.M. and Xiong, Z.T. (2021) Villin Is a Biomarker for Reverse Polarity in Colorectal Micropapillary Carcinoma. *Oncology Letters*, **21**, Article No. 72. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12333>
- [16] Nasser, M.E.T., Abou Elleil, H.A., Abdel Mohsen, W.A., Ali Ezzat, M. and Mohamed Teama, N. (2021) Value of Plasmatic Villin-1 in the Prediction of Early Graft Dysfunction in Kidney Transplant Recipients: Diagnostic Accuracy Test. *Experimental and Clinical Transplantation*, **19**, 110-117. <https://doi.org/10.6002/ect.2020.0160>
- [17] 王见璋, 李炜霞, 何志明, 黄金凤. CDX2 和 Villin 在胃黏膜病变中的表达及其临床病理意义[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(9): 1821-1824. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.009>