

TPD52L1在胃癌中的表达及其临床意义

汤小杰¹, 曲海霞^{2*}

¹青岛大学医学部, 山东 青岛

²康复大学青岛医院(青岛市市立医院)消化内科, 山东 青岛

收稿日期: 2023年4月9日; 录用日期: 2023年5月3日; 发布日期: 2023年5月12日

摘要

目的: 探究肿瘤蛋白家族D52 (TPD52)的成员TPD52L1 (TPD53)蛋白在胃癌及胃癌细胞中的表达, 并分析其表达与胃癌患者临床病理特征的相关性。方法: 收集2020年01月至2022年06月期间青岛市市立医院普外科经手术完整切除的胃癌及癌旁(距肿瘤组织5 cm以上, 病理证实无癌组织浸润)标本总共33例。采用免疫组织化学法检测TPD52L1在33例胃癌组织中的表达, 分析TPD52L1表达水平与胃癌病例特征的相关性。通过RT-qPCR检测TPD52L1在胃癌细胞系及人胃粘膜上皮细胞系中的表达水平。结果: 在胃癌组织中TPD52L1的蛋白表达水平明显高于癌旁组织。此外, 在胃癌细胞中, TPD52L1的蛋白表达水平同样高于正常人胃粘膜上皮细胞。结论: TPD52L1在胃癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织, 其表达水平与胃癌患者的性别、淋巴结转移情况有关。此外, 在胃癌细胞中, TPD52L1的表达同样高于正常人胃粘膜上皮细胞。

关键词

TPD52L1, 胃癌, 临床病例特征

Expression of TPD52L1 in Gastric Cancer and Its Clinical Significance

Xiaojie Tang¹, Haixia Qu^{2*}

¹Medical Department, Qingdao University, Qingdao Shandong

²Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of University of Health and Rehabilitation Sciences (Qingdao Municipal Hospital), Qingdao Shandong

*通讯作者。

Abstract

Objective: To investigate the expression of TPD52L1 (TPD53) protein, a member of the tumor protein family D52 (TPD52), in gastric cancer and gastric cancer cells, and to analyze the correlation between its expression and clinicopathological characteristics in patients with gastric cancer. **Methods:** From January 2020 to June 2022, a total of 33 specimens of gastric cancer and its adjacent tissues (more than 5 cm away from the tumor tissue, pathologically confirmed without invasion of cancer tissue) were collected from the General Surgery Department of Qingdao Municipal Hospital. Immunohistochemical method was used to detect the expression of TPD52L1 in 33 cases of gastric cancer, and the correlation between the expression level of TPD52L1 and the characteristics of gastric cancer cases was analyzed. The expression level of TPD52L1 in gastric cancer cell lines and human gastric mucosal epithelial cell lines was detected by RT-qPCR. **Results:** The protein expression level of TPD52L1 in gastric cancer tissue was significantly higher than that in adjacent tissues. In addition, the protein expression level of TPD52L1 in gastric cancer cells is also higher than that in normal human gastric mucosal epithelial cells. **Conclusion:** The expression level of TPD52L1 in gastric cancer tissue is significantly higher than that in adjacent tissues, and its expression level is related to the gender and lymph node metastasis of gastric cancer patients. In addition, the expression of TPD52L1 in gastric cancer cells is also higher than that in normal human gastric mucosal epithelial cells.

Keywords

TPD52L1, Gastric Cancer, Clinical Case Characteristics

Copyright © 2023 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. 引言

根据国际癌症研究机构发布的 GLOBOCAN2020 中的报告[1] [2]提示,恶性肿瘤的发病率及死亡率依然处于持续增长的状态。而胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,它的全球新发病例数占所有恶性肿瘤新发病例数的 5.6%,达到 108.9 万,全球死亡例数约占所有恶性肿瘤死亡例数的 7.7%,约 76.9 万。在我国,随着医疗水平的不断提高以及居民医疗健康意识的提升,我国早期胃癌的诊断率逐渐提升,但是不能忽视的是我国胃癌还是以中晚期胃癌为主,2020 年我国新发胃癌病例数达 47.8 万,死亡病例数约 37.3 万,均居所有癌种第 3 位[3],带来较大的医疗负担。胃癌的预后评估和潜在治疗靶点的探索对胃癌患者及临床研究意义重大。

TPD52L1 是肿瘤蛋白家族 D52 (tumor protein D52, TPD52)的成员。TPD52L1 目前被认为是一种乳腺癌的治疗靶点[4],并在卵巢癌[5]、鼻咽癌[6]、膀胱癌[7]等多种肿瘤中高表达。但其在胃癌中的表达水平及生理作用未见报道。本研究通过使用免疫组织化学法及半定量免疫反应评分(IRS 评分)来量化 TPD52L1 在胃癌中的表达,评估其与临床病理特征之间的相关性,并在胃癌细胞系中验证其表达情况。

2. 材料与方法

2.1. 免疫组织化学染色

2.1.1. 组织标本收集

收集 2020 年 1 月至 2022 年 06 月期间青岛市市立医院普外科收治的胃癌患者临床资料。纳入标准: 1) 术前均未行放疗、化疗或其他辅助治疗; 2) 术后病理明确为胃癌患者; 3) 临床病历资料完整。排除标准: 1) 继发于其他部位的胃癌; 2) 合并其他肿瘤; 3) 术前已接受放化疗; 4) 临床病历资料不全。其中男性 21 例, 女性 12 例, 年龄 36~84 岁, 中位年龄为 65 岁, 此外我们记录了该 33 例胃癌患者的年龄、性别、肿瘤大小、分化程度、TNM 分期、有无淋巴结转移及浸润深度等临床病例资料。本研究已通过伦理委员会审批, 所有患者均知情同意, 标本按照道德规范和法律标准处理并匿名。调用其患者病理蜡块制作切片型免疫组织化学分析。

2.1.2. 主要实验试剂及仪器

胃癌患者组织切片由青岛市市立医院病理科统一制作。一抗使用艾博抗(上海)贸易有限公司的 TPD52L1 抗体, DAB 工作液使用福州迈新生物技术开发有限公司的 DAB 显色试剂盒。显微镜及照相系统使用日本 OLYMPUS 公司生产的 BX-50 电光源多头显微镜及 BX-50 全自动显微照相系统。

2.1.3. 实验方法

胃癌及癌旁组织石蜡切片经脱蜡和水化后使用 EDTA 缓冲液进行抗原修复。加入适量的内源性过氧化物酶阻断剂, 室温孵育 10 分钟。根据组织大小, 滴加 50 μL 一抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 分钟。滴加 100 μL 或适量的反应增强液, 室温孵育 20 分钟滴加 100 μL 或适量的增强酶标羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物, 室温孵育 20 分钟。在小试管中先加入 0.85 mL 蒸馏水, 再按试剂 A、B、C 顺序加入试剂各 50 μL , 混匀即成 DAB 显色液, 配制好的溶液避光存放。加入适量新鲜配制的 DAB 显色液, 室温孵育 30 秒, 在显微镜下根据颜色的发展情况掌握染色时间。自来水冲洗, 苏木素染色液孵育 20 秒; 分化、冲洗返蓝。脱水、透明、封片。

2.1.4. 结果判定

由高年资病理科医师使用半定量免疫反应评分(IRS 评分)对所有免疫组织化学染色结果进行评分, 分别依照 A 染色强度: 不着色: 0 分, 淡黄色: 1 分, 棕黄色: 2 分, 棕褐色: 3 分; 及 B 阳性细胞百分率: $\leq 5\%$: 0 分, 6%~25%: 1 分, 26%~50%: 2 分, 51%~75%: 3 分, $\geq 76\%$: 4 分进行评分, 并相乘得出 IRS 分值(0~12)。

2.2. 实时荧光定量 PCR

2.2.1. 细胞培养

人胃癌细胞系 HGC-27、SNU-1 及人胃黏膜上皮细胞 GES-1 均购于 BNCC; SGC-7901 为青岛大学医学部所赠。GES-1 使用 DMEM 高糖培养基(5%胎牛血清), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 5% CO_2 的培养箱中培养。SGC-7901、SNU-1 使用 RPMI-1640 培养基(5%胎牛血清), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 5% CO_2 的培养箱中培养。HGC-27 使用 RPMI-1640 培养基(10%胎牛血清), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 5% CO_2 的培养箱中培养。

2.2.2. 主要实验试剂及仪器

PCR 仪使用上海宏石医疗科技有限公司生产的 PCR 检测仪。使用赛默飞生产的紫外线分光光度仪。实验试剂购自宝日生物技术(北京)有限公司。

2.2.3. 实验方法

按照 qRT-PCR 试剂盒检测 TPD52L1 的表达。TPD52L1 的特异性引物序列为上游 TGAACCGTTGCAAGGAACAG, 下游为 TCATCAGGTTTCATGCCGAGT。反应条件: 预变性, 95℃ 持续 30 秒; PCR 反应, 95℃ 5 秒~60℃ 34 秒, 该反应持续 40 个循环。采用 ΔC_t 法进行相对定量分析。

2.3. 统计学处理

采用 SPSS20.0 进行统计分析和 GraphPad Prism 8 进行作图。数据以均数 \pm 标准差($\pm S$)表示。两组间比较采用 t 检验, AGMAT 表达水平与患者临床病理特征相关性采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. IRS 评分

通过 ROC 曲线将 IRS 评分分为高表达组和低表达组。分析结果提示最佳分界点为 2.5, 曲线下面积为 0.8200, P 小于 0.0001, 95% CI: 0.4662~0.7781, 定义评分大于最佳分界点 2.5 的为高表达组, 小于最佳分界点的为低表达组(图 1)。

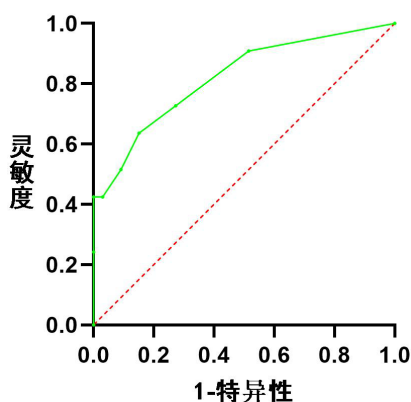


Figure 1. ROC diagram

图 1. ROC 曲线图

3.2. TPD52L1 在胃癌中的表达

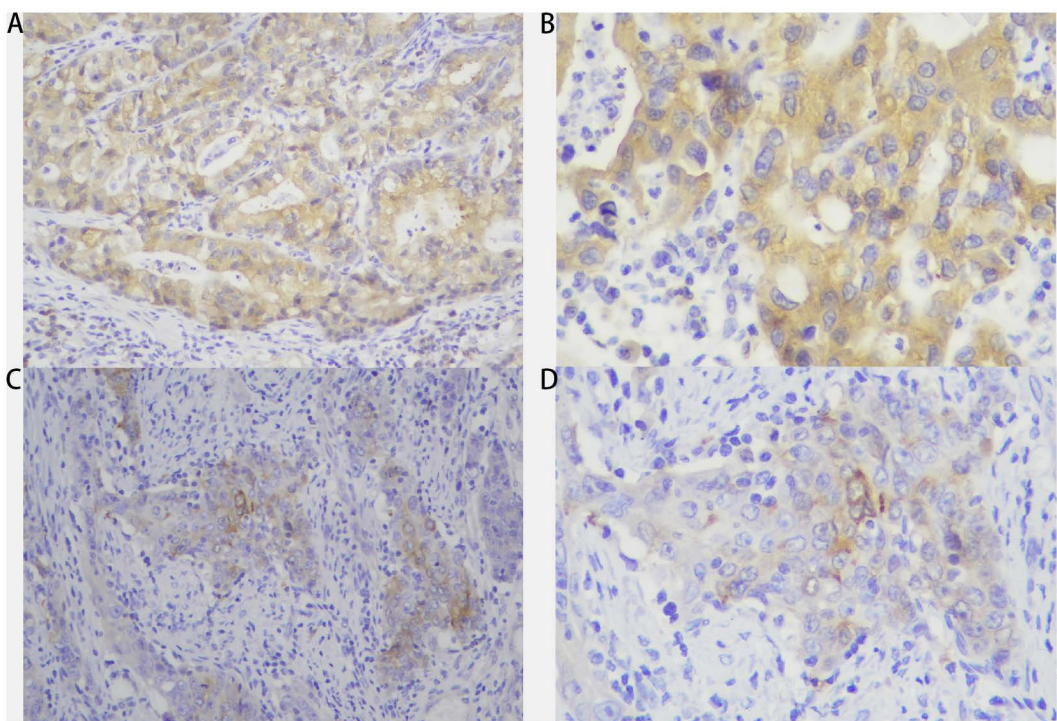
免疫组化结果提示 93.94% 的胃癌中 TPD52L1 表达阳性, 其中 IRS 评分大于 2.5 为高表达组, 小于 2.5 为低表达组(图 2)。

3.3. TPD52L1 表达水平与胃癌临床病理特征的关系

使用 χ^2 检验对各组资料进行分析, 结果表明, TPD52L1 的表达水平与胃癌患者的性别($P = 0.027$)、淋巴结转移情况($P = 0.047$)有相关性, 而与患者的年龄($P = 0.198$)、肿瘤大小($P = 1$)、分化程度($P = 0.301$)、TNM 分期($P = 0.443$)及浸润深度($P = 0.125$)无明显相关性(表 1)。

3.4. TPD52L1 在胃癌细胞中的表达

通过 RT-qPCR 检测胃癌细胞系和胃粘膜上皮细胞系中 TPD52L1 mRNA 的表达水平, 发现在胃癌细胞中 TPD52L1 mRNA 达水平均高于胃粘膜上皮细胞 GES-1 (图 3)。



A、B 为高表达组的免疫组化染色情况(A 为×200, B 为×400); C、D 为低表达组的免疫组化染色情况(C 为×200, D 为×400)。

Figure 2. Expression of TPD52L1 in gastric cancer

图 2. TPD52L1 在胃癌中的表达

Table 1. Relationship between expression level of TPD52L1 and clinicopathological characteristics of gastric cancer [n(%)]

表 1. 胃癌组织中 TPD52L1 表达水平与胃癌临床病理特征的关系[n(%)]

变量	n	TPD52L1 表达		χ^2 值	P 值
		低表达	高表达		
年龄	<60	7	4 (57.14)	1.658	0.198
	≥60	26	8 (30.77)		
性别	男	24	6 (25)	4.911	0.027**
	女	9	6 (66.67)		
肿瘤大小	≥5	22	8 (36.36)	0	1
	<5	11	4 (36.36)		
分化程度	低	24	10 (41.67)	1.069	0.301
	高 + 中	9	2 (22.22)		
TNM 分期	III + IV	22	9 (40.91)	0.589	0.443
	I + II	11	3 (27.27)		
淋巴结转移	无	18	0 (0)	3.96	0.047**
	有	15	3 (20)		
浸润深度	已穿破浆膜	22	10 (45.45)	2.357	0.125
	未穿破浆膜	11	2 (22.22)		

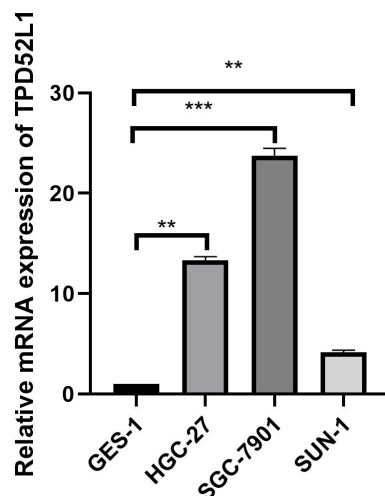


Figure 3. Relative expression of TPD52L1 in gastric cancer cell lines and gastric mucosal epithelial cell lines

图 3. TPD52L1 在胃癌细胞系及胃粘膜上皮细胞系中的相对表达

4. 讨论

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 胃癌的发病因素复杂, 可能与多种基因的正常表达有关[8]。胃癌的患病率和病死率较高。目前发展中国家的胃癌新发病例数占全世界胃癌新发病例数的 70% 以上, 其中东亚的胃癌新发病例数约占 50%, 这些新发病例主要集中在我国[9]。随着医疗水平的提高和患者健康意识的加强, 胃癌根治性治疗、放疗化疗结合的综合治疗方式改善了早期胃癌患者的预后, 但由于胃癌患者早期症状不明显, 导致多数患者明确胃癌诊断时已经处于癌症晚期, 他们的生存率较低, 仅 20% 左右 [10]。90% 的癌症患者中, 侵袭和转移是死亡的主要因素, 胃癌的转移和复发严重威胁着患者的生命, 与不良的预后关系密切[11]。因此评估胃癌的预后评估和潜在治疗靶点的探索对胃癌患者及临床研究意义重大。

肿瘤蛋白家族 D52 (tumor protein D52, TPD52), 包括 TPD52、TPD52L1、TPD52L2 和 TPD52L3 [12], 其相关研究证明 D52 家族的成员之间可以发生相互作用[13], 并在囊泡运输、细胞增殖和细胞凋亡中发挥作用。TPD52L1 最早在 1996 年被发现。它可与其他 TPD52 家族成员形成同源二聚体或异二聚体[13], 并参与细胞增殖和钙信号的传导。一项研究结果显示其在乳腺癌中高表达, 并被认为是乳腺癌细胞中的细胞周期调节蛋白[14] [15]。本研究采用胃癌进行试验, 通过免疫组织化学法检测 TPD52L1 在胃癌细胞中高表达, 之后应用 χ^2 检验分析各组资料提示 TPD52L1 的表达水平与胃癌患者的性别、淋巴结转移情况有相关性。之后又分别筛选三种胃癌细胞系(HGC-27、SGC-7901、SNU-1)和一种人胃黏膜上皮细胞 (GES-1), 通过 RT-qPCR 技术检验四种细胞系中的 TPD52L1 的表达水平, 由 PCR 结果提示, TPD52L1 在胃癌细胞系中的表达均高于胃粘膜上皮细胞系。

5. 总结

综上所述, 本研究显示胃癌组织中 TPD52L1 的表达明显高于癌旁组织, 其表达水平与胃癌患者的性别、淋巴结转移情况有关。此外, 在胃癌细胞中, TPD52L1 的表达同样高于正常人胃粘膜上皮细胞。但限于本实验的总样本量较小, 其临床作用仍需进一步验证。

参考文献

- [1] Sung, H., *et al.* (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide

- for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators (2020) Global Burden of 369 Diseases and Injuries in 204 Countries and Territories, 1990-2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, **396**, 1204-1222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9)
- [3] Rawla, P. and Barsouk, A. (2019) Epidemiology of Gastric Cancer: Global Trends, Risk Factors and Prevention. *Przełąd Gastroenterologiczny*, **14**, 26-38. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.80001>
- [4] Chemnitz, J.M., *et al.* (2004) SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *The Journal of Immunology*, **173**, 945-954. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.945>
- [5] Aggen, D.H. and Drake, C.G. (2017) Biomarkers for Immunotherapy in Bladder Cancer: A Moving Target. *The Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, **5**, 94. <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0299-1>
- [6] Rosenberg, J.E., *et al.* (2016) Atezolizumab in Patients with Locally Advanced and Metastatic Urothelial Carcinoma Who Have Progressed Following Treatment with Platinum-Based Chemotherapy: A Single-Arm, Multicentre, Phase 2 Trial. *The Lancet*, **387**, 1909-1920. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00561-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00561-4)
- [7] 戴维, 等. TPD52L1(D53)蛋白在膀胱尿路上皮癌中的表达和预后[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(4): 635-639.
- [8] 李雨濛, 任中海, 张敬伟, 胃癌患者血清白细胞介素-6 及 C-反应蛋白和血管内皮生长因子的表达及临床意义[J]. 医药论坛杂志, 2022, 43(5): 68-70+74.
- [9] 程时磊, 张发斌, 李斌. 中国人群胃癌发病影响因素 meta 分析[J]. 中国公共卫生, 2017, 33(12): 1775-1780.
- [10] 李健, 等. 胃癌影响因素研究进展[J]. 实用肿瘤学杂志, 2020, 34(5): 466-470.
- [11] 王晓玲. 辅助化疗治疗胃癌的疗效评价和影响胃癌预后的多因素分析[J]. 现代消化及介入诊疗, 2016, 21(2): 319-321.
- [12] Byrne, J.A., *et al.* (2014) Tumor Protein D52 (TPD52) and Cancer-Oncogene Understudy or Understudied Oncogene? *Tumor Biology*, **35**, 7369-7382. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2006-x>
- [13] Byrne, J.A., *et al.* (1998) Identification of Homo- and Heteromeric Interactions between Members of the Breast Carcinoma-Associated D52 Protein Family Using the Yeast Two-Hybrid System. *Oncogene*, **16**, 873-881. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201604>
- [14] Ross, D.T., *et al.* (2000) Systematic Variation in Gene Expression Patterns in Human Cancer Cell Lines. *Nature Genetics*, **24**, 227-235. <https://doi.org/10.1038/73432>
- [15] Boutros, R. and Byrne, J.A. (2005) D53 (TPD52L1) Is a Cell Cycle-Regulated Protein Maximally Expressed at the G2-M Transition in Breast Cancer Cells. *Experimental Cell Research*, **310**, 152-165. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.07.009>