

• 论 著 •

胃癌组织 SERPINH1 基因表达水平与其病理及预后关系研究

瞿 兵, 陈鹏飞, 李希平[△]

(湖北省恩施土家族苗族自治州中心医院中医部消化内科, 湖北恩施 445000)

摘要:目的 探讨胃癌组织 SERPINH1 基因表达水平与其病理及预后的关系;探讨 SERPINH1 在胃癌中的作用机制。方法 收集 TCGA 和 GEO 公共数据库的胃癌数据,对胃癌组织样本的 SERPINH1 基因表达数据及其对应的临床信息进行病理指标的回顾性分析和生存分析;利用基因集富集分析(GSEA)方法分析与 SERPINH1 表达相关的功能性基因集合,探究 SERPINH1 的作用机制。结果 421 例胃癌样本中, SERPINH1 高表达组与低表达组之间肿瘤分级、N 分期、转移无显著性差异($P>0.05$),但 SERPINH1 高表达与肿瘤浸润深度(T 分期)显著相关($P=0.049$),表达水平越高,浸润深度越大。生存分析中, SERPINH1 高表达患者的预后明显差于低表达患者 [$P<0.001$, $HR(95\%CI):1.97(1.61\sim2.41)$]。基因集富集分析发现, SERPINH1 高表达的样本中富集了肿瘤信号通路、肿瘤微环境等相关基因集。69 例胃癌及癌旁组织的基因表达芯片数据也提示, SERPINH1 在胃癌组织中的表达明显升高($P<0.0001$),且具有较大诊断价值($AUC=0.9881$)。结论 SERPINH1 基因高表达与胃癌的发生、发展相关,具有较大的临床意义。

关键词:胃癌; SERPINH1; 病理; 预后

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.16.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)16-2216-04

Association between SERPINH1 gene expression level in gastric cancer tissue with pathology and prognosis

QU Bing, CHEN Pengfei, LI Xiping[△]

(Department of Gastroenterology, Traditional Chinese Medicine, System Central Hospital of Enshi Tujia Autonomous Prefecture, Enshi, Hubei 445000, China)

Abstract:Objective To investigate the association between SERPINH1 gene expression in gastric cancer tissue with the pathology and prognosis and its action mechanism in gastric cancer. **Methods** The gastric cancer data in the TCGA and GEO public databases were collected, and the retrospective analysis and survival analysis were conducted on the SERPINH1 expression data of the tumor tissue samples and related clinical information; the gene set enrichment analysis(GSEA) was used to analyze the SERPINH1 expression related functional gene sets and to investigate the SERPINH1 action mechanism. **Results** In 421 cases of gastric cancer sample, the SERPINH1 expression level had no significant differences with the tumor grade, N stage and metastasis. However, its high expression was significantly correlated with the tumor invasion depth(T stage) ($P=0.049$). The higher the expression level, the preater the invasion depth. In the survival analysis, the patients with high SERPINH1 expression showed a poorer prognosis than those with low SERPINH1 expression [$P<0.001$, $HR(95\%CI):1.97(1.61-2.41)$]. The gene set enrichment analysis found that the related gene sets such as tumor signal pathway and tumor microenvironment were enriched in the SERPINH1 high expression samples. The gene expression chip data in 69 cases of gastric cancer and paracancerous tissue also suggested that SERPINH1 was highly expressed in gastric cancer ($P<0.0001$) with a greater diagnostic value ($AUC=0.9881$). **Conclusion** High expression of SERPINH1 is correlated with the occurrence and development of gastric cancer, and has a greater clinical significance.

Key words:gastric cancer; SERPINH1; pathology; prognosis

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,其病死率占恶性肿瘤病死率的第 2 位^[1]。胃癌早期症状缺乏特异性,诊断较难,多数患者确诊时已属于中晚期,5 年生存率很低。其浸润深度、分化程度与转移是影响其预后的重要因素,肿瘤细胞的某些基因及其表达产物在这些病理过程中发挥着重要作用。因此,从分子水平探析胃癌病理机制对改善患者预后至关重要。

SERPINH1 是丝氨酸蛋白酶抑制剂 H 亚家族成员,参与了胶原蛋白合成、内肽酶活性调节等生物过程^[2]。目前,对 SERPINH1 研究相对较少,主要集中在对分子功能的探究,其在胃癌中的作用报道较少。因此,明确 SERPINH1 基因表达与胃癌病理特征及预后的关系,对阐明 SERPINH1 参与胃癌发生、发展的作用机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 数据资料收集 在癌症基因组图谱计划(TCGA)数据库

中下载 421 例胃癌组织样本的 RNA 测序数据及相关临床数据。所有胃癌样本均在手术切除后经病理确诊,且切除后的样本(以及相应临床信息)由专门机构进行采集和处理,之后,再采用 Illumina Hiseq 技术进行基因测序。最后,测序数据经过严格的质量控制和标准化后,转换成基因表达数据,供分析使用。本研究所用 SERPINH1 基因表达数据即为标准化后的数据。

1.2 SERPINH1 与临床病理学参数的相关性研究 本研究中,胃癌的分级按照分化程度分为 3 级:低级(G1)、中级(G2)、高级(G3),分级越高,癌细胞生长越快,恶性程度越高。胃癌的分期采用 TNM 分期,其中 T 分期与肿瘤浸润深度相关,分期越高,浸润深度约大;N 分期与淋巴结转移情况相关,分期越高,转移淋巴结约多;M 分期与肿瘤远处转移相关。421 例胃癌 RNA 测序数据中仅保留包含临床参数的病例。根据基因

表达谱数据,对样本 SERPINH1 的表达进行由高到低的排序,前 50% 的样本作为高表达组,后 50% 的样本作为低表达组。

1.3 SERPINH1 与预后的相关性研究 利用在线工具 Kaplan-Meier Plotter (<http://kmplot.com/analysis/>) 分析胃癌组织 SERPINH1 表达水平与其预后的关系。Kaplan-Meier Plotter 中收集了 GEO (Gene Expression Omnibus) 数据库中 6 个胃癌相关的研究 (研究号为: GSE14210、GSE15459、GSE22377、GSE29272、GSE51105、GSE62254), 共包括 1 051 例胃癌组织样本的基因表达数据。本研究将基因芯片检测后进行随访的样本,根据其胃癌组织中 SERPINH1 的表达水平分为高表达组和低表达组,分析两组患者在生存时间上的差异。

1.4 基因富集分析(GSEA) 采用 GSEA 2.2.2 版软件进行分析。根据 SERPINH1 的表达水平分成高表达组和低表达组。利用 GSEA 网站 MSigDB 数据库中的 c2_cp.kegg.v5.1.symbols.gmt 数据集作为功能基因集,按缺省加权富集统计的方法,设置随机组合次数为 1 000 次,分析 SERPINH1 表达水平对各种生物通路基因集的影响。

1.5 SERPINH1 与胃癌发生的相关性研究 在 GEO 数据库中下载 69 例胃癌组织及癌旁组织的基因表达谱芯片检测数据 (研究号为 GSE13911)。该数据集共包括 38 例胃癌组织样本和 31 癌旁组织样本。该数据集使用了 Affymetrix 公司的 Human Genome U133 Plus 2.0 表达谱芯片。该芯片包含 54 675 个探针,其中 207714_s_at 为 SERPINH1 的特异性探针。将 SERPINH1 的表达数据提取出来,分析其在胃癌组织及癌旁组织中的表达差异,以及该基因在鉴别诊断中的价值。

1.6 统计学处理 计量资料采用 GraphPad Prism 5 软件进行 *t* 检验和作图。计数资料使用 SPSS21.0 软件进行 χ^2 检验。生存分析采用 Kaplan-Meier 和 Log-rank 检验法。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。在 GSEA 分析中, $P<0.05$ 及错误发现率 (FDR) <0.1 的基因集作为显著富集基因集。

表 1 SERPINH1 表达与胃癌临床病理特征的相关性分析

因素	<i>n</i>	SERPINH1 表达水平		χ^2	<i>P</i>
		高表达(%)	低表达(%)		
年龄(岁)					
<60	124	64 (51.6)	60 (48.4)	0.315	0.575
≥60	284	138 (48.6)	146 (51.4)		
性别					
男性	267	135 (50.6)	132 (49.4)	0.012	0.913
女性	146	73 (50.0)	73 (50.0)		
肿瘤分级					
G1	10	7 (70.0)	3 (30.0)	2.427	0.297
G2	150	79 (52.7)	71 (47.3)		
G3	244	117 (48.0)	127 (52.0)		
T 分期					
T1	23	5 (21.7)	18 (78.3)	7.858	0.049
T2	87	45 (51.7)	42 (48.3)		
T3	188	96 (51.1)	92 (48.9)		
T4	112	59 (52.7)	53 (47.3)		
N 分期					

续表 1 SERPINH1 表达与胃癌临床病理特征的相关性分析

因素	<i>n</i>	SERPINH1 表达水平		χ^2	<i>P</i>
		高表达(%)	低表达(%)		
N0	131	65 (49.6)	66 (50.4)	0.838	0.840
N1	113	58 (51.3)	55 (48.7)		
N2	84	39 (46.4)	45 (53.6)		
N3	77	41 (53.2)	36 (46.8)		
转移					
是	21	10 (47.6)	11 (52.4)	0.095	0.758
否	374	191 (51.1)	183 (48.9)		

2 结 果

2.1 SERPINH1 与临床病理学参数的相关性研究 421 例胃癌 RNA 测序数据中, SERPINH1 表达水平与年龄 ($P=0.575$)、性别 ($P=0.913$)、肿瘤分级 ($P=0.297$)、N 分期 ($P=0.840$)、转移 ($P=0.758$) 均无明显关系,提示 SERPINH1 高表达与胃癌细胞分化程度、淋巴结转移及远处转移无显著关系。但是, SERPINH1 表达水平与胃癌 T 分期显著相关 ($P=0.049$), 表达水平越高, 浸润深度越大, 见表 1。

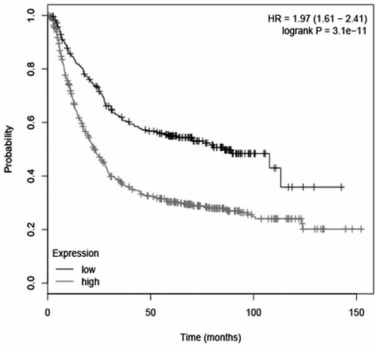


图 1 SERPINH1 基因表达水平与胃癌患者预后的关系

2.2 SERPINH1 与预后的相关性研究 Kaplan-Meier Plotter 在线数据分析发现, 1 051 例患者进行胃癌组织的基因表达谱芯片检测后, SERPINH1 基因高表达组中, 有 168 例进行了随访, 低表达组中, 有 130 例进行了随访。生存分析中, Kaplan-Meier 和 Log-rank 检验均提示 SERPINH1 高表达患者的预后明显差于低表达患者 ($P=3.1\times10^{-11}$), 风险比 (HR) 及其 95% 可信区间 (CI) 为 1.97 (1.61~2.41)。该结果更进一步提示, SERPINH1 是预后不良因素, 见图 1。

2.3 SERPINH1 高表达相关的基因集富集分析 GSEA 分析结果提示 SERPINH1 高表达样本中富集得到了 7 个 KEGG 通路 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 相关基因集, 分别是前列腺癌 (Bladder cancer, FDR=0.062)、TGF- β 信号通路 (TGF- β signaling pathway, FDR=0.073)、细胞外基质受体相互作用 (ECM receptor interaction, FDR=0.078)、黏着斑 (Focal adhesion, FDR=0.069)、黏多糖合成硫酸软骨素 (Glycosaminoglycan biosynthesis chondroitin sulfate, FDR=0.059)、肿瘤通路 (Pathways in cancer, FDR=0.052)、剪接体 (Spliceosome, FDR=0.097) 等相关基因集, 见图 2。同时, 在 SERPINH1 低表达样本富集得到脂肪酸代谢 (Fatty acid metabolism, FDR=0.065) 相关基因集。

2.4 SERPINH1 与胃癌发生的相关性研究 GSE13911 数据

集中,与癌旁组织($n=31$)相比,SERPINH1 在胃癌组织($n=38$)中表达明显增高($P<0.0001$),见图 3。同时,SERPINH1

在癌组织和癌旁组织的鉴别诊断中具有较高的诊断价值,其受试者工作曲线下面积(AUC)达到了 0.988 1。

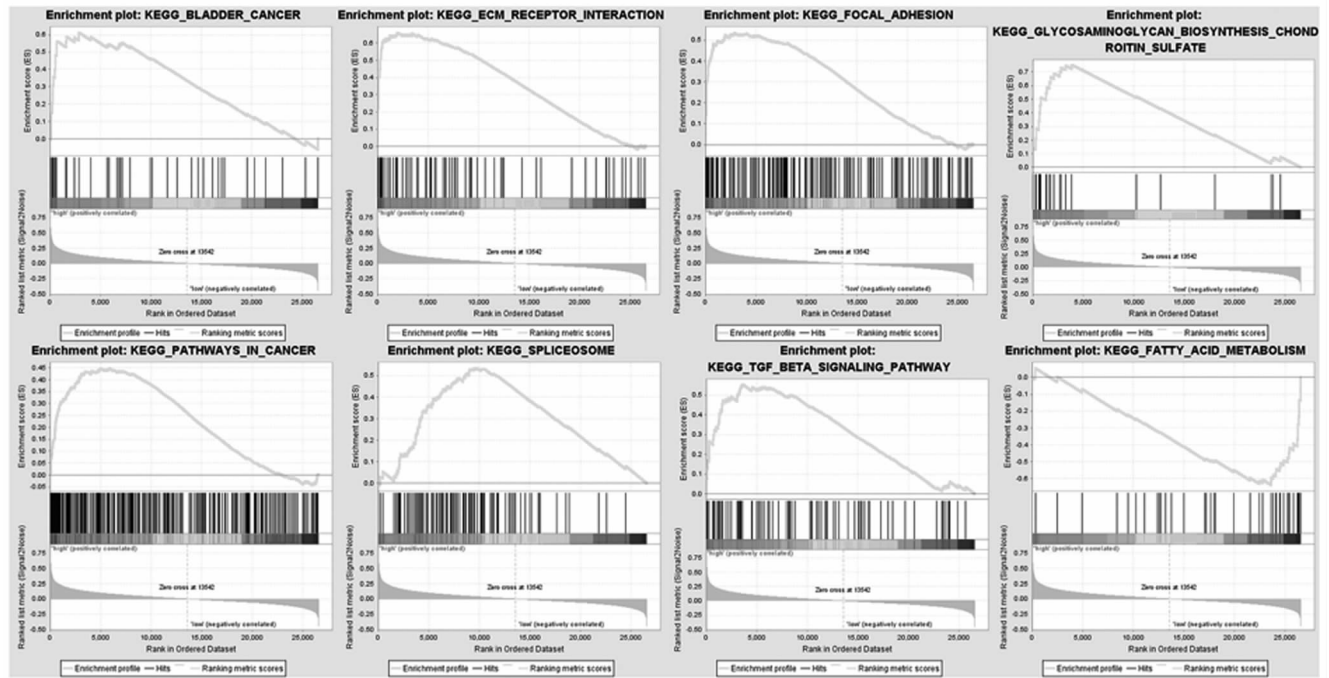


图 2 GSEA 分析 SERPINH1 基因表达相关富集基因集

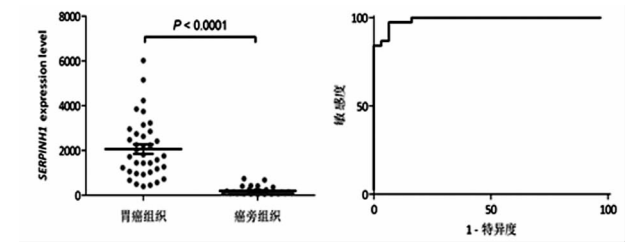


图 3 SERPINH1 基因与胃癌发生的相关性及其在胃癌诊断中的价值

3 讨 论

SERPINH1 基因,又称作 HPS47,即热休克蛋白 47,编码基因位于人第 11 号染色体 11q13.5 区域,由 7 个外显子构成,翻译的蛋白质由 418 个氨基酸构成。基因本体(GO)分析发现,SERPINH1 基因主要有胶原、mRNA 结合、丝氨酸内肽酶抑制剂活性、非折叠蛋白质结合等功能,参与了软骨内软骨细胞骨形成、胶原蛋白生物合成、胶原原纤维构建、内肽酶活性负调节、蛋白质成熟、非折叠蛋白反应等生物过程。有研究发现,SERPINH1 与多种纤维化疾病,以及硬皮病、炎症性肠病等自身免疫性疾病的发病相关,但其作用机制还不明确^[3-5]。肿瘤性疾病中,有研究报道 SERPINH1 与神经胶质瘤和宫颈癌的发生、发展相关,是可能的治疗靶点^[6-7]。

目前,HSP27、HSP60、HSP90 等多个热休克蛋白亚型被报道与胃癌的发生、发展相关^[8-9]。但是,作为热休克蛋白的另外一个亚型,SERPINH1 在胃癌中的作用尚无研究报道。为此,本研究通过生物大数据探究了 SERPINH1 表达与胃癌病理及预后的关系,为后续相关机制研究提供了前期基础。本研究通过分析公共数据库中胃癌组织样本的测序表达数据,发现 SERPINH1 基因表达水平与胃癌 T 分期显著相关,表达水平越高,浸润深度越大,提示 SERPINH1 基因可能参与了胃癌的

进展。为此,本研究进一步利用以公共数据库中基因芯片数据为基础的在线工具,分析 SERPINH1 基因表达水平与胃癌预后的关系,发现 SERPINH1 高表达患者的预后明显差于低表达患者,提示 SERPINH1 可能通过影响胃癌组织浸润深度来影响患者的预后。以上两种分析方法中,样本量均较大,且分别从基因测序和基因芯片两种不同检测方法的生物大数据出发,同时发现 SERPINH1 基因可能参与了胃癌的进展,结果较为可靠。为了进一步探究 SERPINH1 基因在胃癌发生中的作用,本研究利用基因芯片数据发现,SERPINH1 基因在胃癌组织中明显高表达,且具有较高鉴别诊断价值,验证了之前的结论。

为了进一步探究 SERPINH1 在胃癌中可能的作用机制,本研究将 421 例胃癌样本根据 SERPINH1 基因表达水平分组后,进行了基因集富集分析。结果发现,SERPINH1 高表达的样本中,显著富集了肿瘤信号通路、肿瘤微环境等相关基因集,提示 SERPINH1 基因可能参与了多个肿瘤相关生物过程,在胃癌中具有较大生物学意义,值得进一步深入研究。

综上所述,本研究通过生物大数据分析,发现 SERPINH1 在胃癌中表达明显增高,且其高表达与肿瘤浸润深度、预后明显相关。同时,基因富集分析提示 SERPINH1 可能与肿瘤信号通路、肿瘤微环境等相关。

参考文献

[1] Rahman R, Asombang AW, Ibdah JA. Characteristics of gastric cancer in Asia[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20 (16): 4483-4490.

[2] Ito S, Nagata K. Biology of Hsp47 (Serpin H1), a collagen-specific molecular chaperone[J]. Semin Cell Dev Biol, 2016, 62: 142-151.

[3] Bellaye PS, Burgy O, Causse S, et al. Heat(下转第 2221 页)

产生的抗胎儿血型抗原的 IgG 类抗体经过胎盘进入胎儿机体血液循环中并结合红细胞上相应抗原导致单核-吞噬细胞系统激活破坏红细胞而引起血管外溶血^[7-8]。曾有研究报道,新生儿溶血患儿在出生时与正常产儿无明显差异,常存在轻中度皮肤黏膜黄染,无明显贫血症状,故常导致延误患儿诊断及治疗,严重影响患儿生命安全和预后情况,故及时发病危险影响新生儿溶血病发生的相关可能因素并予及时干预和治疗是提高新生儿溶血病患儿的关键措施^[9-11]。既往学者提出,新生儿溶血病患儿其 HGB 和胆红素的表达水平与正常产儿相比较均有明显差异^[12],且在新生儿出生 72 h 内,新生儿溶血病发生率较高,故考虑 HGB 和胆红素的表达水平可能与新生儿溶血病的发生与进展有着密切联系^[13-14]。在本文研究结果中,52 例母婴血型不合的新生儿中出现新生儿溶血病者 30 例,达 57.69%,由此表明,新生儿溶血病血清 3 项检测可作为母婴血型不合出生新生儿的常规检测,一定程度上可提高新生儿溶血病的诊断率^[15]。另一方面,通过非条件单因素 logistic 回归模型分析可知,新生儿溶血病患儿其体质量、身高、BMI 及 HGB 均小于正常产儿,而直接胆红素、间接胆红素和总胆红素和间接胆红素/总胆红素均明显高于正常产儿,符合既往研究报道^[16]。除此之外,在本研究中,通过非条件多因素 logistic 回归模型分析进一步证实得 HGB、直接胆红素、间接胆红素、总胆红素和间接胆红素/总胆红素比值及出生时间为新生儿溶血病发生的独立影响因素。故由此可见,除去常规新生儿溶血病血清 3 项的常规检查外,还可对母婴血型不合新生儿进一步行 HGB 和胆红素的检测,辅助溶血病血清 3 项提高新生儿溶血病的确诊率。

综上所述,母婴血型不合的新生儿溶血病发生率较高,患儿出生时间、HGB 浓度和相关胆红素的表达水平可为母婴血型不合的新生儿溶血病发生的可能影响因素。

参考文献

[1] Calkins K, Roy D, Molchan L, et al. Predictive value of cord blood bilirubin for hyperbilirubinemia in neonates at risk for maternal-fetal blood group incompatibility and hemolytic disease of the newborn[J]. J Neonatal Perinatal Med, 2015, 8(3): 243-250.

[2] 解金辉, 闫莉娜. RhD 血型的检测及其临床意义[J]. 解放军预防医学杂志, 2015, 33(3): 350-351.

[3] 鲁广建, 王侠, 张晨光, 等. CD144+ 内皮微粒标志物与母

婴血型不合新生儿溶血病患儿血管内皮损伤及功能障碍的相关性研究[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(16): 2528-2531.

[4] 宋继军, 李巍, 张咏芳. 采用 Rh(D) 阳性红细胞换血治疗抗-D 引起的新生儿溶血病 1 例[J]. 临床输血与检验, 2016, 18(6): 609-611.

[5] 吕孟兴, 朱祥明. 少见型母婴 ABO 血型不合的新生儿溶血病一例[J]. 中国医药, 2015, 10(2): 208.

[6] 姚强. 新生儿 ABO 溶血病 43 例临床分析[J]. 中华危重症医学杂志: 电子版, 2015, 8(3): 385-387.

[7] 赵丽萍. 丙种球蛋白联合光疗治疗新生儿 ABO 溶血的护理[J]. 解放军预防医学杂志, 2016, 33(2): 362-364.

[8] 周雄飞, 郑君, 毛开新. ABO 新生儿溶血病与 O 型血孕妇孕中期血清 IgG 抗 A(B) 抗体效价的关系分析[J]. 实用临床医药杂志, 2015, 19(1): 85-88.

[9] 胡江, 方乐, 陈青. O 型血孕妇血清 IgG 抗 A(B) 血型抗体效价对新生儿溶血病发病的影响研究[J]. 国际输血及血液学杂志, 2015, 38(6): 472-476.

[10] 王婧, 潘家华. 母婴 Rh 血型不合溶血病的诊治进展[J]. 中国新生儿科杂志, 2016, 31(2): 152-155.

[11] Ivanova AV, Zakharova SY, Pestryaeva LA. Specific features of red blood cell morphology in hemolytic disease neonates undergoing intrauterine intravascular blood transfusion[J]. Hypertension, 2016, 61(1): 42-45.

[12] 武垚, 刘建, 徐晓伟, 等. 小剂量甲氧明联合麻黄碱用于剖宫产术对母婴影响分析[J]. 解放军预防医学杂志, 2016, 33(1): 171-172.

[13] 蔡晓红, 王学锋. 胎儿新生儿溶血病的实验诊断[J]. 诊断学理论与实践, 2015, 14(6): 507-510.

[14] 叶海辉, 皮佑珺, 胡华琼. 母婴血型不合新生儿溶血病肝生化指标测定及意义[J]. 肝脏, 2015, 22(8): 873-875.

[15] 蔡忠鹤, 遇红梅, 刘铁梅. 孕妇血型 IgG 抗体效价与新生儿溶血病发病率关系的分析[J]. 中国实验诊断学, 2015, 18(4): 629-631.

[16] 郭莹莹, 霍姿含, 王震, 等. 1 350 例新生儿溶血三项试验的血清学检测分析[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(9): 1357-1359, 1363.

(收稿日期: 2017-02-15 修回日期: 2017-04-22)

(上接第 2218 页)

shock proteins in fibrosis and wound healing: good or evil? [J]. Pharmacol Ther, 2014, 143(2): 119-132.

[4] Chu H, Wu T, Wu W, et al. Involvement of collagen-binding heat shock protein 47 in scleroderma-associated fibrosis[J]. Protein Cell, 2015, 6(5): 589-598.

[5] Honzawa Y, Nakase H, Shiokawa M, et al. Involvement of interleukin-17A-induced expression of heat shock protein 47 in intestinal fibrosis in Crohn's disease[J]. Gut, 2014, 63(12): 1902-1912.

[6] Wu ZB, Cai L, Lin SJ, et al. Heat shock protein 47 promotes glioma angiogenesis[J]. Brain Pathol, 2016, 26(1):

31-42.

[7] Yamamoto N, Kinoshita T, Nohata N, et al. Tumor-suppressive microRNA-29a inhibits cancer cell migration and invasion via targeting HSP47 in cervical squamous cell carcinoma[J]. Int J Oncol, 2013, 43(16): 1855-1863.

[8] 李双齐, 修娜, 刘丽娜. 结肠癌转移相关基因 1 和热休克蛋白 90 在胃癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(21): 2411-2413.

[9] 李桂青, 赵景润. 热休克蛋白 27/60 在胃癌中的表达及意义[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2012, 21(1): 31-33.

(收稿日期: 2017-02-10 修回日期: 2017-04-10)