

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.31.012

## iASPP 基因在卵巢癌中的表达及其临床意义\*

高燕芳,蒋丽霞<sup>△</sup>,张 铭

(南京医科大学附属常州市妇幼保健院检验科 213003)

**[摘要]** 目的 检测 iASPP 在卵巢癌中的表达,探索其在卵巢癌中的致病机制。方法 收集 2013 年 5 月至 2014 年 12 月于常州市妇幼保健院行卵巢肿瘤切除术的患者的癌组织及对应癌旁组织标本共 32 份,用实时荧光定量聚合酶链反应法检测 iASPP mRNA 相对表达水平并分析它与卵巢癌临床病理特征的关系。结果 卵巢癌组织中 iASPP mRNA 水平明显高于癌旁组织( $P=0.001$ ),并且与卵巢癌病理分期相关( $P<0.05$ ),iASPP 表达水平与患者年龄、是否绝经、组织学类型、术前后有无化疗、有无淋巴结转移、糖类蛋白 125 及糖类蛋白 153 表达情况无相关性,其差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 iASPP mRNA 在卵巢癌组织中高表达显示其在肿瘤发生过程中发挥重要作用。

**[关键词]** 卵巢肿瘤;iASPP;p53**[中图分类号]** R737.31**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)31-4357-03Expression of iASPP gene in ovarian cancer and its clinical significance<sup>†</sup>Gao Yanfang, Jiang Lixia<sup>△</sup>, Zhang Ming

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Changzhou Municipal Maternal and Child Health Care Hospital, Nanjing Medical University, Changzhou, Jiangsu 213003, China)

**[Abstract]** **Objective** To detect the expressions of iASPP in ovarian cancer and to investigate its pathogenic mechanism in ovarian cancer. **Methods** Totally 32 pair samples of ovarian cancer tissues and corresponding paracancerous tissues were collected in our hospital from May 2013 to December 2014. The iASPP mRNA relative expression level was detected using real-time PCR (RT-PCR). Its relation with the clinicopathological characteristics of ovarian cancer was analyzed. **Results** The iASPP mRNA level in ovarian cancer tissues was significantly higher than that in the paracancerous tissues ( $P=0.001$ ) and which was associated with the pathological stage( $P<0.05$ ). The iASPP expression had no correlation with the age, menopause, histological subtype, preoperative chemotherapy, lymph node metastasis and expression level of CA125 and CA153, the differences were not statistically significant. **Conclusion** The high expression of iASPP in ovarian cancer tissues reveals its important role in the tumor occurrence process.

**[Key words]** ovarian neoplasms; iASPP; p53

卵巢癌是严重威胁妇女生命的女性生殖系统肿瘤之一,由于它极高的恶性程度及逐年上升的发病率,其致死率已居于妇科恶性肿瘤首位。众所周知,肿瘤的发生涉及多种基因,这些基因在不同阶段相继发挥作用,而细胞凋亡是这个过程中至关重要的一个环节,它对肿瘤的发生发展过程都具有十分重要的意义。现在许多肿瘤学研究都致力于细胞凋亡功能如何被调控及其发生异常的原因,目前已发现多种调控细胞凋亡的基因,找出这些基因在卵巢癌发生过程中的作用机制,将对卵巢癌的诊断与治疗有极其重要的意义。

p53 凋亡刺激蛋白(apoptosis-stimulating protein of p53, ASPP)家族因为具有特异调控 p53 的功能而被命名,是最近发现的一个蛋白家族。ASPP1、ASPP2 和 iASPP (inhibitory member of the ASPP family)是这个家族的主要成员。该家族的特征性结构是 SH3 结构域,C-末端的锚蛋白重复序列以及富含脯氨酸的结构域<sup>[1]</sup>。虽然 3 个家族成员的结构相似,但他们的功能却截然不同,其中 ASPP1、ASPP2 主要是与 p53 结合从而促进 p53 诱导的细胞凋亡;而 iASPP 则相反,它可以竞争

性的与 ASPP1、ASPP2 结合 p53 蛋白来抑制 p53 的促细胞凋亡功能,因此具有癌基因的性质<sup>[1]</sup>。p53 基因是一种较为重要的抑癌基因,研究显示它在卵巢癌的发生发展过程中发挥重要作用。由此可推测,iASPP 有可能通过调节 p53 基因的表达,从而在卵巢癌中发挥重要作用。本研究用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)法检测卵巢癌组织中 iASPP 的表达情况,分析它在卵巢癌发生发展中的作用。

**1 资料与方法**

**1.1 一般资料** 本试验标本取自 2013 年 5 月至 2014 年 12 月于常州市妇幼保健院行卵巢肿瘤切除术的患者,术后标本均通过病理检查,最终证实为卵巢癌,共 32 例,组织学分类包括:22 例浆液性腺癌,9 例黏液性腺癌,1 例透明细胞癌,患者平均年龄 51 岁(29~71 岁)。癌组织及对应癌旁组织均于术中选取,肉眼下正常组织作为癌旁组织。术后新鲜组织用生理盐水冲洗 2~3 遍,继而剪碎保存于组织冻存管中放在 -80℃ 冰箱。

**1.2 主要试剂** RNA 分离及提取试剂购自美国 Invitrogen

\* 基金项目:常州市卫生计生委指导性科技项目(WZ201515)。

作者简介:高燕芳(1985-),硕士,住院医师,从事肿瘤标志物方面研究。

<sup>△</sup> 通讯作者,E-mail:jlx60003@163.com。

公司,实时荧光定量 PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司,反转录-PCR 试剂盒购自美国 Fermentas 公司,iASPP 和  $\beta$ -actin 引物购自上海生工公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 组织标本中总 mRNA 的提取** 将 50~100 mg 组织用匀浆机打碎,加入 Trizol 裂解并提取 mRNA。用紫外分光光度计检测 RNA 浓度和纯度,分析所提取 mRNA 质量,选取纯度较高者继续进行 RT-PCR 反应。

**1.3.2 第 1 链 cDNA 的合成** 参照反转录 PCR 试剂盒说明书进行第 1 链 cDNA 的合成。逆转录反应体系为 20  $\mu$ L,分别为 DEPC 9  $\mu$ L,5 $\times$ 逆转录缓冲液 4  $\mu$ L,随机引物 Oligo 1  $\mu$ L,dNTP 2  $\mu$ L,逆转录酶 1  $\mu$ L,RNA 模板 3  $\mu$ L。最后转到 PCR 扩增仪(Thermo)上 25  $^{\circ}$ C 10 min,50  $^{\circ}$ C 15 min,85  $^{\circ}$ C 5 min。储存第 1 链 cDNA 于 4  $^{\circ}$ C 冰箱或立即行 PCR。

**1.3.3 引物设计和合成** 根据 Genbank 的基因序列,设计引物并对其特异性进行比较。iASPP 引物序列为:上游 5'-GGC GGT GAA GGA GAT GAA C-3';下游 5'-TGA TGA GGA AAT CCA CGA TAG AG-3'。 $\beta$ -actin 内参基因引物序列为:上游 5'-GGC GGC ACC ACC ATG TAC CCT-3';下游 5'-AGG GGC CGG ACT CGT CAT ACT-3' 实时荧光定量 PCR 在荧光定量 PCR 仪 Light Cycler1.5(Roche)上检测,反应体系为 20  $\mu$ L,分别为:第 1 链 cDNA 2  $\mu$ L,2 $\times$ SYBR Green Mix 10  $\mu$ L,10  $\mu$ mol/L 上下游引物各 0.5  $\mu$ L,去离子水 7.0  $\mu$ L。反应条件为 95  $^{\circ}$ C 30 s,95  $^{\circ}$ C 5 s,55  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,收集荧光,40 个循环。溶解曲线反应条件:95  $^{\circ}$ C 10 s,60  $^{\circ}$ C 1 min,95  $^{\circ}$ C 10 s。产物经 2% 琼脂糖电泳分离,判断扩增产物特异性。

**1.4 统计学处理** 实验数据用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析。卵巢癌组织与癌旁组织间 iASPP mRNA 表达水平的差异用秩和检验进行分析;Mann-Whitney U-test 分析 iASPP mRNA 相对表达量与卵巢癌临床特征是否相关, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 扩增特异性** iASPP 和  $\beta$ -actin 两种扩增产物的溶解曲线呈单一峰,溶解温度与产物的预期溶解温度相符(图 1)。

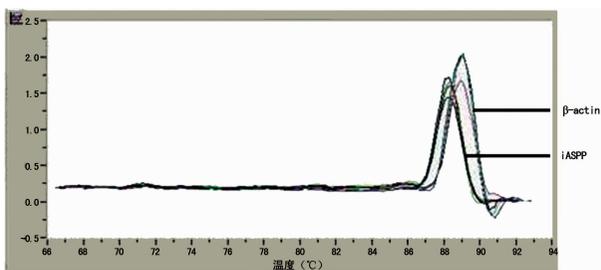


图 1 iASPP 与  $\beta$ -actin 扩增产物溶解曲线

**2.2 iASPP 在卵巢癌及对应癌旁组织中的表达** 与癌旁组织相比,iASPP mRNA 在卵巢癌组织中的表达量明显偏高,差异有统计学意义( $P=0.001$ ),见图 2。

**2.3 iASPP mRNA 表达与卵巢癌临床病理特征的关系** 统计分析显示,iASPP mRNA 卵巢癌不同临床分期中的表达,I 期与 II、III 期相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。iASPP mRNA 与卵巢癌患者的年龄、是否绝经、肿瘤组织学类型、术

前有无化疗、有无淋巴结转移、CA125 及 CA153 水平的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

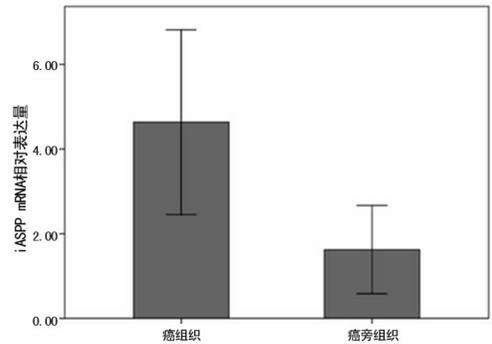


图 2 iASPP mRNA 在卵巢癌组织中的相对表达水平

表 1 iASPP mRNA 的差异表达与卵巢癌临床病理特征的关系

特征		n	P
年龄	<51 岁	17	0.710
	$\geq$ 51 岁	15	
绝经	否	19	0.426
	是	13	
组织学类型	浆液性腺癌	22	0.375
	囊液性腺癌	9	
	透明细胞癌	1	
临床分期	I 期	12	0.002
	II~III 期	20	
淋巴结转移	无	20	0.924
	有	12	
术前化疗	否	20	0.893
	是	12	
CA125	阴性	5	0.285
	阳性	27	
CA153	阴性	16	0.468
	阳性	16	

## 3 讨论

细胞凋亡是细胞为维持内环境稳态而自主进行的有序死亡的过程,肿瘤形成和发展的一个重要原因就是细胞凋亡功能异常进而导致细胞过度增生。p53 是一个重要抑癌基因,细胞受到 DNA 损伤、辐射等一系列物理或化学刺激后,p53 基因就会被激活,继而作用于其下游基因引起一系列反应:首先,DNA 损伤后 p53 表达迅速上升,诱导 p21 转录水平提高,将细胞周期抑制在 G1 期,这样细胞在进入 S 期之前通过 DNA 损伤修复系统修复损伤的 DNA 就有了足够的时间;其次,若损伤太大导致无法修复时,p53 会通过诱导 Bax 等凋亡基因的表达使其加速细胞凋亡过程,从而抑制广泛性 DNA 损伤的细胞通过克隆性生长引发肿瘤。

iASPP 由人类 PPP1R13L 基因编码<sup>[1]</sup>。全长的 iASPP 由 828 个氨基酸构成,细胞质和细胞核中均有表达<sup>[2]</sup>。一系列研

究均已证实 iASPP 对 p53 具有负性调节功能。近年来,随着对 iASPP 研究的不断深入,已发现 iASPP 在宫颈癌<sup>[3]</sup>、神经胶质瘤<sup>[4]</sup>、大肠癌<sup>[5]</sup>、口腔鳞状细胞癌<sup>[6]</sup>、前列腺癌<sup>[7]</sup>等多种肿瘤组织中表达偏高。本研究用实时荧光定量 PCR 技术分析卵巢癌组织及相应的癌旁组织中 iASPP mRNA 的相对水平,结果显示:卵巢癌组织中的 iASPP 表达量相比癌旁组织明显升高;iASPP 在卵巢癌组织中的表达量与卵巢癌临床分期有关。Cao 等<sup>[8]</sup>研究还发现子宫颈癌中 iASPP 表达水平升高还与肿瘤化疗抵抗相关。Liu 等<sup>[9]</sup>等指出 iASPP 表达升高与头颈肿瘤预后差相关。这些都表明 iASPP 在肿瘤的发生过程发挥了重要作用。

p53 是一个重要的抑癌基因,在人类肿瘤中,有一部分肿瘤的 p53 基因发生突变,导致它促细胞凋亡功能异常而引发肿瘤;然而还有一部分肿瘤的 p53 基因结构是正常的,即野生型 p53,那么这些肿瘤中的 p53 为什么没有抑制癌症发生,研究证明,这些肿瘤细胞中存在着抑制 p53 的物质使 p53 的功能丧失。据统计,在卵巢癌中 p53 的突变率可达到 50%<sup>[10]</sup>,然而仍有一部分肿瘤表达野生型 p53,在这些肿瘤中,正常的 p53 抑癌功能被抑制从而导致肿瘤发生。iASPP 能特异性抑制 p53,若解除这种抑制作用,就有可能使肿瘤得到有效治疗。研究指出 MiR-124 能直接作用于 iASPP 从而抑制肿瘤的生长和侵袭,包括肠癌、恶性胶质瘤和前列腺癌<sup>[11-13]</sup>,但是在卵巢癌中也起作用有待进一步研究。除此之外,A34 可直接与 iASPP 结合并完全抑制 iASPP 对 p53 的作用<sup>[14]</sup>。随着医学水平的提高,基因诊断及基因治疗已成为肿瘤诊断与治疗过程中不可或缺的手段,本研究显示 iASPP 在卵巢中致病过程中发挥重要作用,可能为卵巢癌的诊断与治疗提供了一个新方向。

#### 参考文献

- [1] Bergamaschi D, Samuels Y, O'Neil NJ, et al. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human[J]. *Nat Genet*, 2003, 33(2):162-167.
- [2] Slee EA, Gillotin S, Bergamaschi D, et al. The N-terminus of a novel isoform of human iASPP is required for its cytoplasmic localization[J]. *Oncogene*, 2004, 23(56):9007-9016.
- [3] Kong F, Shi X, Li H, et al. Increased expression of iASPP correlates with poor prognosis in FIGO IA2-IIA cervical adenocarcinoma following a curative resection[J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(3):1217-1224.
- [4] Liu X, Kang J, Liu F, et al. Overexpression of iASPP-SV in glioma is associated with poor prognosis by promoting cell viability and antagonizing apoptosis[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(5):6323-6330.
- [5] Saebø M, Skjelbred CF, Nexø BA, et al. Vogel U, Kure EH. Increased mRNA expression levels of ERCC1, OGG1 and RAI in colorectal adenomas and carcinomas[J]. *BMC Cancer*, 2006(6):208-215.
- [6] Kim JW, Roh JL, Park Y, et al. Cytoplasmic iASPP expression as a novel prognostic indicator in oral cavity squamous cell carcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2015, 22(2):662-669.
- [7] Zhang B, Xiao HJ, Chen J, et al. Inhibitory member of the apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP) family promotes growth and tumorigenesis in human p53-deficient prostate cancer cells[J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2011, 14(3):219-224.
- [8] Cao L, Huang Q, He J, et al. Elevated expression of iASPP correlates with poor prognosis and chemoresistance/radioresistance in FIGO I b1-II a squamous cell cervical cancer [J]. *Cell Tissue Res*, 2013, 352(2):361-369.
- [9] Liu Z, Zhang X, Huang D, et al. Elevated expression of iASPP in head and neck squamous cell carcinoma and its clinical significance [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(5):3381-3388.
- [10] Alvarez AA, Axelrod JR, Whitaker RS, et al. Thrombospondin-1 expression in epithelial ovarian carcinoma: association with p53 status, tumor angiogenesis, and survival in platinum-treated patients [J]. *Gynecol Oncol*, 2001, 82(2):273-278.
- [11] Liu K, Zhao H, Yao H, et al. MicroRNA-124 regulates the proliferation of colorectal cancer cells by targeting iASPP[J]. *Biomed Res Int*, 2013;867537-867548.
- [12] Zhao WH, Wu SQ, Zhang YD. Downregulation of miR-124 promotes the growth and invasiveness of glioblastoma cells involving upregulation of PPP1R13L [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(1):101-107.
- [13] Chen J, Xiao H, Huang Z, et al. MicroRNA124 regulate cell growth of prostate cancer cells by targeting iASPP [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(5):2283-2290.
- [14] Qiu S, Cai Y, Gao X, et al. A small peptide derived from p53 linker region can resume the apoptotic activity of p53 by sequestering iASPP with p53[J]. *Cancer Lett*, 2014, 356(2):910-917.

(收稿日期:2016-02-26 修回日期:2016-04-14)

欢迎投稿

欢迎订阅