

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.06.001  
文章编号: 1005-8982 (2021) 06-0001-04

胃癌专题·论著

## Siva-1在胃癌组织中的表达及其临床意义\*

孔凡彪<sup>1</sup>, 邓洪强<sup>1</sup>, 徐胜<sup>1</sup>, 王晓通<sup>2</sup>, 麦威<sup>2</sup>, 庞黎明<sup>1</sup>

(广西壮族自治区人民医院 1. 结直肠肛门外科, 2. 胃肠疝肠痿外科, 广西 南宁 530023)

**摘要:** **目的** 探讨Siva-1在胃癌组织中的表达及其与细胞凋亡的关系。**方法** 选取2016年1月—2018年12月广西壮族自治区人民医院经手术切除的胃癌组织及癌旁组织各54例。采用qRT-PCR和SP法检测Siva-1 mRNA及蛋白的表达水平, 分析Siva-1在胃癌组织中的表达及与临床病理特征的关系。**结果** 胃癌组织中Siva-1阳性表达率较低 ( $P < 0.05$ ), Siva-1 mRNA相对表达量较低 ( $P < 0.05$ )。不同肿瘤直径、肿瘤分期患者Siva-1阳性表达率比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。经Pearson相关性分析, Siva-1 mRNA表达量与肿瘤直径呈负相关 ( $r = -0.376, P < 0.05$ )。**结论** Siva-1在胃癌组织中低表达, 且与肿瘤的发生、发展有关, 可作为诊断胃癌的潜在标志物。

**关键词:** 胃肿瘤; Siva-1/凋亡诱导因子; 肿瘤标记, 生物学

**中图分类号:** R735.2

**文献标识码:** A

## Expression and clinical significance of Siva-1 in gastric cancer\*

Fan-biao Kong<sup>1</sup>, Hong-qiang Deng<sup>1</sup>, Sheng Xu<sup>1</sup>, Xiao-tong Wang<sup>2</sup>, Wei Mai<sup>2</sup>, Li-ming Pang<sup>1</sup>

(1. Department of Colorectal and Anal Surgery, People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530023, China; 2. Department of Surgical Treatment of Gastrointestinal Hernia and Fistula, People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530023, China)

**Abstract:** **Objective** To detect the expression of Siva-1 in gastric cancer tissue, and to investigate the relationship between Siva-1 expression level and the clinical characteristics of gastric cancer. **Methods** We selected the gastric cancer tissues and adjacent normal tissues surgically removed in our hospital from January 2016 to December 2018, each with 54 cases. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and immunohistochemistry were used to detect the mRNA and protein expression of Siva-1 in the gastric cancer and corresponding adjacent normal tissues. The relationship between the expression of Siva-1 and the clinicopathological features was analyzed. **Results** The expression level of Siva-1 in gastric cancer tissues was significantly lower than that in adjacent normal tissues ( $P < 0.05$ ). The positive rate of Siva-1 differed in tissues with different tumor diameter and stage ( $P < 0.05$ ). The correlation analysis further suggested Siva-1 expression negatively correlated with tumor size and pathological grade ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Siva-1 is lowly expressed in gastric cancer tissues, and is negatively associated with tumor size and pathological grade, indicating that Siva-1 may play a role in suppressing gastric cancer as a potential biomarker.

**Keywords:** gastric cancer; Siva-1/apoptosis inducing factor; biomarker

收稿日期: 2020-09-17

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81660416); 广西卫生健康委自筹课题 (No: Z20180739); 广西壮族自治区人民医院青年基金 (No: QN2018-22)

[通信作者] 王晓通, E-mail: 008.wxt@163.com

胃癌是我国常见的消化道肿瘤之一，每年新发病例约41万<sup>[1]</sup>，严重威胁我国人民的生命健康。随着分子生物学研究的深入，分子靶点及分子标志物的相关研究逐渐成为肿瘤研究的热点。凋亡诱导因子Siva-1已被证实在多种肿瘤中发挥抑制肿瘤细胞生长的功能<sup>[2-4]</sup>，而其与胃癌相关的报道甚少。因此中笔者通过分析Siva-1在胃癌组织中的表达，为探讨Siva-1在胃癌发生、发展中的作用提供理论依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取2016年1月—2018年12月广西壮族自治区人民医院经手术切除的胃癌组织及癌旁组织各54例。其中，男性37例，女性17例；年龄24~76岁，中位年龄60岁。胃癌临床分期参照美国肿瘤联合委员会（AJCC）第7版指南标准<sup>[5]</sup>，患者均未接受术前放疗、化疗。鼠抗人Siva-1抗体购于美国Proteintech公司，免疫组织化学试剂盒购自福州迈新技术开发有限公司。Trizol试剂、引物及PCR试剂盒购自上海吉凯基因化学技术有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 检测Siva-1表达** 采用SP法检测Siva-1的表达。将石蜡标本进行包埋并连续切片，每片厚度约4 μm，利用二甲苯I、II脱蜡，酒精脱水，3%双氧水灭活，并在枸橼酸钠缓冲液中进行抗原修复。然后根据SP法对石蜡标本进行一抗（鼠抗人Siva-1抗体）、二抗孵育，染色后在光镜下观察计数。磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照。

**1.2.2 Siva-1阳性结果判断** Siva-1蛋白主要表达于胃癌细胞质中，当细胞质里出现棕黄色或棕褐色颗粒，即说明Siva-1在该细胞中阳性表达。采用双盲法在显微镜下对染色的细胞进行观察和计数。根据细胞的染色程度进行评分：未染色计0分，淡黄色计1分，棕黄色计2分，棕褐色计3分。另根据染色细胞占视野细胞总数的百分比进行评分，阳性细胞<1%计0分，1%~<25%计1分，25%~<50%计2分，50%~<75%计3分，75%~100%计4分。阳性细胞强度得分与阳性细胞百分比得分的乘积即为SP法总分，其中0分为阴性，1~4分为弱阳性，5~

8分为中阳性，9分以上为强阳性。本实验将中阳性以上定义为细胞染色阳性表达。

**1.2.3 qRT-PCR** 采用qRT-PCR检测胃癌及癌旁组织中Siva-1 mRNA相对表达量。在液氮中研磨组织，按Trizol说明书提取组织总RNA后，利用Thermo BioMate 3S紫外/可见光分光光度仪测定RNA纯度（OD值）和蛋白质浓度。OD260/OD280范围为1.8~2.1。按qRT-PCR试剂盒说明书进行逆转录，得到cDNA。反应参数为：16℃、30 min，42℃、30 min，90℃、5 min。反应结束后短暂离心，置于冰上冷却。然后进行RT-PCR扩增反应，95℃预变性10 min，95℃变性15 s，60℃退火1 min，70℃延伸30 s，共40个循环。PCR引物设计合成由上海吉凯基因公司完成（见表1）。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法测定目标基因mRNA相对表达量，用Data Assist（V3.01）软件进行结果分析。

表1 PCR引物序列

名称	序列	长度/bp
Siva-1	正向:5'-GTCGTTCACCTGCCAGAGTCCC-3'	80
	反向:5'-GGTCCAATCAGCATCTGCCAC-3'	
GAPDH	正向:5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3'	121
	反向:5'-CACCCCTGTTGCTGTAGCCAAA-3'	

### 1.3 统计学方法

数据分析采用SPSS 19.0统计软件。计数资料以构成比表示，比较用 $\chi^2$ 检验，相关性分析用Pearson法， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 胃癌及癌旁组织中Siva-1的阳性表达

Siva-1在胃癌组织中的阳性表达率为25.93%（14/54），癌旁组织为94.44%（51/54），经 $\chi^2$ 检验，差异有统计学意义（ $\chi^2=52.900$ ， $P=0.000$ ），胃癌组织中Siva-1的阳性表达低于癌旁组织。见图1。

### 2.2 胃癌组织与癌旁组织中Siva-1 mRNA表达水平

Siva-1 mRNA在胃癌组织中相对表达量为（6.97 ± 1.32），癌旁组织为（78.06 ± 2.98），经 $t$ 检验，差异有统计学意义（ $t=-362.450$ ， $P=0.000$ ），Siva-1 mRNA在胃癌组织中低表达。

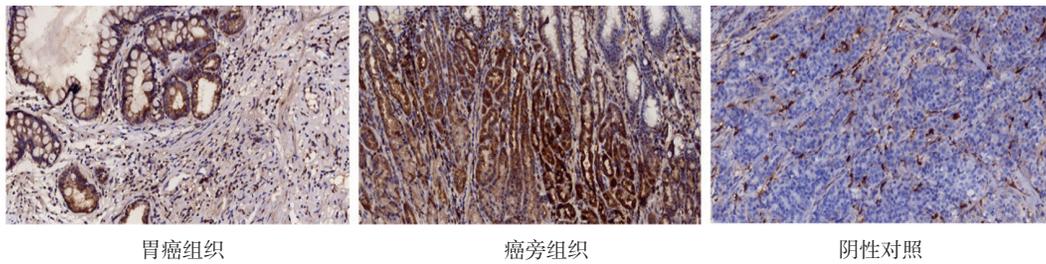


图 1 Siva-1 蛋白在各组织中的表达 (免疫组织化学法 × 400)

### 2.3 不同临床病理特征胃癌患者 Siva-1 阳性表达率比较

不同年龄、性别、肿瘤分化程度、淋巴转移、神经侵犯、脉管内癌栓患者 Siva-1 阳性表达率比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 不同肿瘤直径、肿瘤分期患者 Siva-1 阳性表达率比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 不同临床病理特征的胃癌患者 Siva-1 阳性表达率比较 例(%)

临床病理特征	n	阳性	$\chi^2$ 值	P值
<b>年龄</b>				
≤60岁	28	6(21.43)	0.612	0.540
>60岁	26	8(30.77)		
<b>性别</b>				
男	37	7(18.92)	3.005	0.103
女	17	7(41.18)		
<b>肿瘤直径</b>				
≤3 cm	21	9(42.86)	5.129	0.031
>3 cm	33	5(15.15)		
<b>分化程度</b>				
中分化	17	4(23.53)	0.074	1.000
低分化	37	10(27.03)		
<b>淋巴结转移</b>				
是	39	10(25.64)	0.006	1.000
否	15	4(26.67)		
<b>脉管内癌栓</b>				
有	28	5(17.86)	1.971	0.218
无	26	9(34.62)		
<b>神经侵犯</b>				
有	31	7(22.58)	0.424	0.546
无	23	7(30.43)		
<b>肿瘤分期</b>				
I、II期	20	6(30.00)	4.275	0.039
III、IV期	34	8(23.53)		

### 2.4 Siva-1 表达水平与肿瘤直径的相关性分析

经 Pearson 相关性分析, Siva-1 mRNA 相对表达量与肿瘤直径呈负相关 ( $r = -0.376$ ,  $P = 0.003$ )。

## 3 讨论

凋亡诱导因子 Siva-1 定位在染色体 14q (32-33) 上, 含有 175 个氨基酸, 在正常组织中均有表达。有研究表明 Siva-1 在乳腺癌和结直肠癌中的表达水平均低于癌旁正常组织, 与本研究结果一致<sup>[6-8]</sup>, 说明 Siva-1 作为凋亡因子, 可能在肿瘤中扮演着促进癌细胞凋亡的作用, 提示 Siva-1 在胃癌的发生、发展过程中起着抑制作用, 是一个抑癌基因。

本研究发现 Siva-1 阳性表达率在不同年龄、性别、肿瘤分化程度、淋巴转移、神经侵犯脉管内癌栓患者无差异, 在不同肿瘤直径及肿瘤分期患者有差异; 且 Siva-1 mRNA 相对表达量与肿瘤直径呈负相关。即肿瘤直径越大, mRNA 相对表达量越低。提示 Siva-1 存在作为胃癌临床病理分期标志物的可能。但 Siva-1 mRNA 相对表达量可能与胃癌细胞的侵犯能力无关。

细胞凋亡遵循自身的程序, 凋亡的调节对维持体内环境稳态及正常细胞形态至关重要, 肿瘤的发生一方面由于肿瘤的过度增生, 另一方面是由于细胞凋亡受阻。凋亡过程发生异常也可造成肿瘤增生<sup>[9]</sup>。近年来, 细胞凋亡已成为生物医学的研究热点之一。本研究结果显示: 相比癌旁组织, 胃癌组织中 Siva-1 阳性表达率降低, 其促凋亡作用减弱, 导致肿瘤细胞异常增生, 表现为肿瘤体积增大, 肿瘤分期级别增高。Siva-1 在体内外均能与抑癌基因读码框移位蛋白发生直接作用, 促进抑癌基因读码框移位蛋白的泛素化或降解, 从而影响 P53 的稳定性, 进而调节细胞周期进程和细胞增殖<sup>[10]</sup>。Siva-1 还可与多种受体结合, 通过其 N 末端

与 CD27、Bcl-2 或 Bcl-xl 的 C 末端相结合而发生相互作用，从而调控多条信号通路并促进细胞凋亡，在乳腺癌、结直肠癌等肿瘤细胞中，具有抑制肿瘤细胞生长及转移的作用<sup>[7]</sup>，同时还可以作为化疗药顺铂的增效剂，为肿瘤的靶向治疗提供新的思路<sup>[8-10]</sup>。通过慢病毒干扰人为下调 Siva-1 的表达后，胃癌细胞的增殖活性增强，并且胃癌细胞的对化疗药 DDP 的耐药性也得以提高，与本课题组前期体外实验结果一致<sup>[13-15]</sup>。Siva-1 阳性表达率在有无淋巴结转移患者中无差异，说明 Siva-1 阳性表达率与肿瘤的转移关系不密切，主要是与肿瘤凋亡关系相关，可作为临床分期标志物。

综上所述，本研究提示 Siva-1 的表达可能与胃癌细胞个体的生长及凋亡相关，而与细胞侵袭运动无关，其具体机制尚需进一步探索，但随着对 Siva-1 分子机制的深入研究，其作为潜在的靶向治疗靶点的应用前景非常广泛，尤其是其作为化疗药的增效剂将为肿瘤治疗提供新的思路。

#### 参 考 文 献：

- [1] CHEN W, SUN K, ZHENG R, et al. Cancer incidence and mortality in china, 2014[J]. *Chin J Cancer Res*, 2018, 30(1): 1-12.
- [2] LIU T, MA Y F, WANG Z L, et al. Siva 1 inhibits cervical cancer progression and its clinical prognosis significance[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 303-311.
- [3] PARK I K, BLUM W, BAKER S D, et al. E3 ubiquitin ligase Cbl-b activates the p53 pathway by targeting Siva1, a negative regulator of ARF, in FLT3 inhibitor-resistant acute myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 2017, 31(2): 502-505.
- [4] CHEN G H, XUE Q Q, LI J, et al. Anticancer activity of recombinant siva1 protein in human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2[J]. *Cancer Biomark*, 2015, 15(6): 833-841.
- [5] SOBIN L H, WITTEKIND C. TNM classification of malignant tumors[M]. 7th ed. New York: John Wiley & Sons, 2009: 73-77.
- [6] LI N, JIANG P, DU W J, et al. Siva1 suppresses epithelial-

mesenchymal transition and metastasis of tumor cells by inhibiting stathmin and stabilizing microtubules[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(31): 12851-12856.

- [7] PRASAD K V, AO Z, YOON Y, et al. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 6346-6351.
- [8] OKUNO K, YASUTOMI M, NISHIMURA N, et al. Gene expression analysis in colorectal cancer using practical DNA array filter[J]. *Dis Colon Rectum*, 2001, 44: 295-299.
- [9] 舒丹, 陶德定, 龚建平. 流式细胞术的亚 G<sub>1</sub> 峰法分析细胞凋亡的重新评价[J]. *中华实验外科杂志*, 2000, 17(1): 59-60.
- [10] WANG X W, ZHA M, ZHAO X C, et al. Siva1 inhibits p53 function by acting as an ARF E3 ubiquitin ligase[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1551.
- [11] KATAYAMA Y, SAKAI A, OUE N, et al. A possible role for the loss of CD27-CD70 interaction in myelomagenesis[J]. *Br J Haematol*, 2003, 120(2): 223-234.
- [12] BARKINGE J L, GUDI R, SARAH H, et al. The p53-induced Siva-1 plays a significant role in cisplatin-mediated apoptosis[J]. *J Carcinog*, 2009, 8: 2.
- [13] 王晓通, 吴锴, 李雷, 等. shRNA-SIVA1 慢病毒载体的构建及其对胃癌细胞耐药性的影响[J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(3): 282-287.
- [14] KONG F B, DENG Q M, DENG H Q, et al. Siva-1 regulates multidrug resistance of gastric cancer by targeting MDR1 and MRP1 via the NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2020, 22(2): 1558-1566.
- [15] WANG X T, LI L, KONG F B, et al. Lentivirus-mediated overexpression of Siva-1 reverses cisplatin resistance in gastric cancer in vitro[J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2020, 78(4): 455-463.

(李科 编辑)

本文引用格式：孔凡彪, 邓洪强, 徐胜, 等. Siva-1 在胃癌组织中的表达及其临床意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(6): 1-4.

Cite this article as: KONG F B, DENG H Q, XU S, et al. Expression and clinical significance of Siva-1 in gastric cancer[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2021, 31(6): 1-4.