



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.02.016  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.02.016  
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(2):252-256.

· 基础研究 ·

## 域含蛋白 7A 在肝细胞癌中的表达及其与预后的关系

陈婧, 刘挺, 武步强, 崔猛胜, 杨洁泉, 陈广斌

(长治医学院附属和平医院 普通外科, 山西 长治 046000)

### 摘要

**目的:** 探讨域含蛋白 7A (THSD7A) 基因在肝细胞癌 (HCC) 中的表达情况及临床意义。

**方法:** 分别用 RT-PCR 与免疫组化法检测 30 例新鲜 HCC 及癌旁组织标本中 THSD7A mRNA 表达及 75 例 HCC 及癌旁组织石蜡标本中 THSD7A 蛋白的表达, 分析其与 HCC 患者临床病理因素及预后的关系。

**结果:** 与癌旁组织比较, 在 HCC 组织中 THSD7A mRNA 表达下调 ( $P < 0.05$ ); THSD7A 在 HCC 组织中的阳性表达率明显低于癌旁组织 (24.0% vs. 87.0%,  $P < 0.05$ )。THSD7A 蛋白的表达与患者结节数目 ( $P = 0.011$ )、Edmondson-Steiner 分级 ( $P = 0.013$ )、BCLC 分期 ( $P = 0.048$ ) 有关。THSD7A 蛋白低表达患者总体生存率 ( $P = 0.016$ ) 与无瘤生存率 ( $P = 0.013$ ) 均明显低于 THSD7A 高表达患者。

**结论:** THSD7A 在 HCC 中可能发挥抑癌基因的作用, THSD7A 表达降低患者预后不良。

### 关键词

癌, 肝细胞; 域含蛋白 7A; 预后

中图分类号: R735.7

## Expression of domain containing 7A in hepatocellular carcinoma and its prognostic significance

CHEN Jing, LIU Ting, WU Buqiang, CUI Mengsheng, YANG Jiequan, CHEN Guangbin

(Department of Surgery, the Affiliated Heping Hospital, Changzhi Medical College, Changzhi, Shanxi 046000, China)

### Abstract

**Objective:** To investigate the domain containing 7A (THSD7A) expression in human hepatocellular carcinoma (HCC) and its clinical significance.

**Methods:** The THSD7A mRNA expression in 30 fresh specimens of HCC with paired and adjacent tissues, and protein expression in 75 paraffin embedded specimens of HCC with paired adjacent tissues were detected by RT-PCR and immunohistochemical staining, respectively. The relations of THSD7A protein expression with clinicopathologic parameters and prognosis of HCC patients were analyzed.

**Results:** The THSD7A mRNA expression in HCC tissue was significantly down-regulated compared with adjacent tissue ( $P < 0.05$ ), and the positive expression rate of THSD7A protein in HCC tissue was significantly lower than that in adjacent tissue (24.0% vs. 87.0%,  $P < 0.05$ ). The THSD7A protein expression was significantly related to the tumor numbers ( $P = 0.011$ ), Edmondson-Steiner grade ( $P = 0.013$ ) and BCLC stage ( $P = 0.048$ ) of the patients. Both overall survival and disease-free survival in patients with low THSD7A expression were significantly lower than those in patients with high THSD7A expression ( $P = 0.016$ ,  $P = 0.013$ ).

**Conclusion:** THSD7A may play a tumor-suppressor role in HCC, and those with decreased THSD7A expression

收稿日期: 2015-12-04; 修订日期: 2016-01-19。

作者简介: 陈婧, 长治医学院附属和平医院住院医师, 主要从事肝癌基础与临床方面的研究。

通信作者: 陈广斌, Email: hpypc2006@sohu.com

have a relatively poor prognosis.

**Key words** Carcinoma, Hepatocellular; Domain Containing 7A; Prognosis

**CLC number:** R735.7

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球第5大恶性肿瘤,病死率高居男性恶性肿瘤第2位,女性恶性肿瘤第6位,每年的新发病例数与死亡人数接近1:1,其中我国因HCC死亡人数约占全球的一半<sup>[1]</sup>。近些年来由于肝癌手术切除率的显著提高,术后并发症与病死率明显降低,以Sorafenib为代表的肝癌综合治疗手段也有明显的进步<sup>[2-3]</sup>。然而,目前来说HCC的总体疗效仍难以令人满意,术后5年的复发转移率达70%,而术后5年生存率仅为30%~50%,甚至更低<sup>[4]</sup>,严重制约了HCC总体治疗水平的提高。因此,阐明HCC侵袭转移的机制已成为现今HCC研究邻域中的一个重要科学问题<sup>[5]</sup>。最近有学者<sup>[6]</sup>认为肿瘤的转移是一种可遗传的基因特征,其与肿瘤的特性有关,如侵袭转移,血管生成等。域含蛋白7A (domain containing 7A, THSD7A) 被报道与血管生成和侵袭转移有关<sup>[7-8]</sup>。所以本研究将探讨THSD7A基因在HCC中的表达与作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本及临床资料收集

本组采集资料分为两批。一批为30例新鲜的HCC组织标本,均有癌组织和相对应的癌旁组织(距癌组织1 cm的非癌组织),取自长治医学院附属和平医院2008年8月—2011年6月手术切除的HCC患者。标本手术离体后立即以液氮保存,然后储存到-80℃低温冰箱保存。另一批为石蜡组织标本,取自1999年1月—2007年12月手术切除的HCC患者,选取癌组织和配对的癌旁组织,且随访资料完整的HCC患者,共75例。上述所有患者乙型肝炎表面抗原均为阳性,且术前均未接受其他治疗。

### 1.2 主要试剂及仪器

RNA实时定量PCR反应试剂盒购自北京天根生化公司。RNA提取试剂TRIzol购自美国Gibco公司。THSD7A引物序列由上海生工生物工程有

限公司合成。引物设计如下: THSD7A基因的上游序列为5'-TGG GTT TAC GGT GTA GCA GC-3', THSD7A基因的下游序列为5'-CGG CAT CTC CAT CAT AGG CT-3'。内参GAPDH引物序列上游为5'-AGA AGG CCG GGG CTC ATT TG-3',内参GAPDH引物序列的下游: 5'-AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC-3'。THSD7A抗体是兔抗人多克隆抗体(Santa Cruz),工作浓度为1:500。

### 1.3 RT-PCR

首先根据TRIzol试剂盒说明书提取总的RNA。然后按照逆转录试剂盒说明书进行cDNA合成。最后进行PCR扩增,条件为95℃预变性10 min; 95℃变性15 s, 60℃延伸1 min,共40个循环;并进行定量和溶解曲线分析。结果采用相对定量法;通过软件获得各样本待测基因的Ct (Cycle threshold, 循环阈值)值,与同样本中的GAPDH的Ct值相减,便获得该样本待测基因的Ct值。采用 $2^{-Ct}$ 方法计算各种样本中THSD7A mRNA量的差异。

### 1.4 免疫组化检测及结果判定

石蜡切片作THSD7A免疫组化染色。采用SP(过氧化物酶标记的链酶卵白素)法,染色步骤按试剂盒说明进行。THSD7A染色判定标准参考Shimizu方法<sup>[9]</sup>。

### 1.5 随访

建立75例HCC手术患者的随访库,从手术切除日计算患者的总体和无瘤生存时间。详细记录患者的住院号、病理切片号、联系方式等。定时回访复查B超或CT结果、AFP水平测定等确定有无临床复发转移。随访采取复查、电话、信访等。随访终止点为患者因HCC导致死亡或复发转移;若随访截止时未出现HCC导致的死亡或复发转移的,记为删失数据。

### 1.6 统计学处理

应用SPSS 10.0统计软件包。两组计量资料比较采用t检验。两组等级资料比较采用非参数检验中的Mann-Whitney U检验。生存曲线采用Kaplan-Meier方法分析,Log-rank法比较存活率之间的差异。

## 2 结果

### 2.1 THSD7A mRNA 在癌组织中的表达

经过实时定量PCR的检测, 比较THSD7A与GAPDH之间的Ct值, 获得各组织样本的Ct值(图1)。将邻近非肿瘤肝组织中THSD7A mRNA表达水平设定为1, 则相应的HCC组织中THSD7A mRNA的表达水平中位值为0.3225(0.0197~1.213)。THSD7A在HCC组织中表达水平明显低于相应的邻近非肿瘤肝组织( $P<0.05$ )。

### 2.2 THSD7A 蛋白在癌组织中的表达

采用免疫组化检测75例HCC组织石蜡切片标本中THSD7A的表达水平。结果显示THSD7A主要分布于胞浆中(图2)。在75例HCC组织中仅有18例(24.0%) THSD7A呈阳性表达, 其余57例HCC组织的THSD7A蛋白呈阴性表达。而75例

相应的邻近非肿瘤肝组织中则有65例(86.6%) THSD7A呈阳性表达, THSD7A在HCC组织中的阳性表达率明显低于相应的邻近非肿瘤肝组织( $P<0.05$ )。

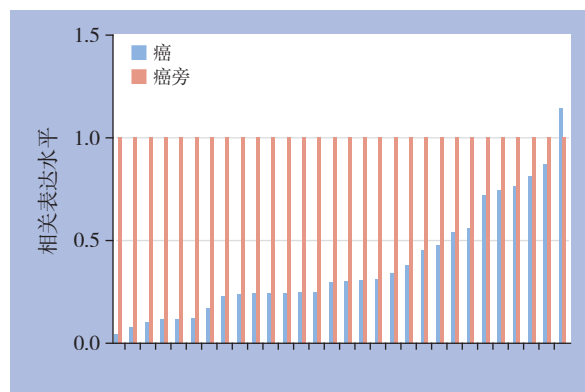


图1 30对新鲜HCC及癌旁组织中THSD7A mRNA表达情况

Figure 1 THSD7A mRNA expressions in the 30 paired fresh HCC and adjacent tissues

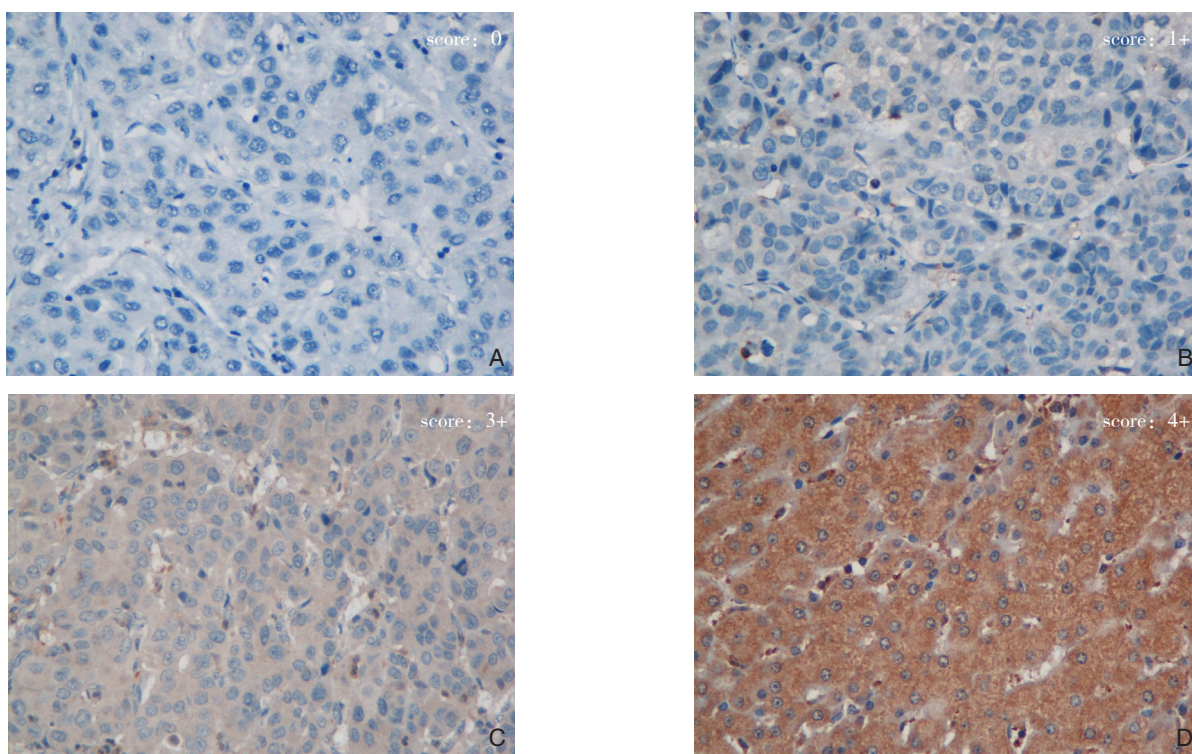


图2 免疫组化检测THSD7A在组织石蜡标本中的表达( $\times 400$ ) A-C: HCC组织; D: 癌旁组织

Figure 2 Immunohistochemical staining for THSD7A expression in the paraffin embedded specimens ( $\times 400$ ) A-C: HCC tissue; D: Adjacent tissue

### 2.3 THSD7A 的低表达水平与 HCC 临床病理特征密切相关

通过对THSD7A蛋白免疫染色与75例HCC患者临床病理指标的统计分析发现: THSD7A的表达水平与肿瘤结节数目( $P=0.011$ )、Edmondson-

Steiner分级( $P=0.013$ )、BCLC分期( $P=0.048$ )密切相关; 而与性别、年龄、乙肝表面抗原、肝硬化、甲胎蛋白、肿瘤大小、包膜形成、Child-Pugh分级、TNM分级无关(均 $P>0.05$ )(表1)。



表 1 THSD7A 蛋白表达水平与 HCC 临床病理特征的关系 [n (%)]

Table 1 Relations of THSD7A protein expression level with clinicopathologic features of HCC [n (%)]

临床病理特征	n	THSD7A		P	临床病理特征	n	THSD7A		P
		低表达组	高表达组				低表达组	高表达组	
性别					肿瘤结节数目				
女	17	10 (58.8)	7 (41.2)	0.910	孤立	47	23 (48.9)	24 (51.1)	0.011
男	58	35 (60.3)	23 (39.7)		多个 (≥ 2)	28	22 (78.6)	6 (21.4)	
年龄 (岁)					包膜或假包膜形成				
≤ 60	52	33 (63.4)	19 (36.6)	0.358	无	35	23 (65.7)	12 (34.3)	0.345
> 60	23	12 (52.2)	11 (47.8)		有	40	22 (55.0)	18 (45.0)	
AFP (ng/mL)					Edmondson-Steiner 分级				
≤ 20	22	12 (54.5)	10 (45.5)	0.534	I/II	56	30 (53.6)	26 (46.4)	0.013
> 20	53	33 (62.3)	20 (37.7)		III/IV	19	15 (78.9)	4 (21.1)	
HBsAg					Child-Pugh 分级				
阴性	16	9 (56.3)	7 (43.7)	0.730	A	58	34 (58.6)	24 (41.4)	0.652
阳性	59	36 (61.0)	23 (39.0)		B	17	11 (64.7)	6 (35.3)	
肝硬化					TNM Stage				
无	25	12 (48.0)	13 (52.0)	0.338	I	31	16 (51.6)	15 (48.4)	0.213
有	50	30 (60.0)	20 (40.0)		II/III	44	29 (65.9)	15 (34.1)	
肿瘤大小 (cm)					BCLC 分期				
≤ 5	32	16 (50.0)	16 (50.0)	0.127	0/A	37	18 (48.6)	19 (51.4)	0.048
> 5	43	29 (67.4)	14 (32.6)		B/C	38	27 (71.1)	11 (28.9)	

2.4 THSD7A 低表达与 HCC 患者不良预后的关系

根据THSD7A蛋白在HCC中免疫组化Shimizu评分结果, 将全部75例HCC患者按表达情况分为高表达组 (+~+++ , 45例) 与低表达组 (-/± , 30例), 乘积极限生存曲线Kaplan-Meier统计方法分析THSD7A高表达组和低表达组患者的术后总体

生存率和术后无瘤生存率。结果显示, THSD7A低表达组的HCC患者总体生存率明显低于THSD7A高表达组的患者 (P=0.016), 同样THSD7A低表达组的HCC患者无瘤生存率明显低于THSD7A高表达组的患者 (P=0.013) (图3)。

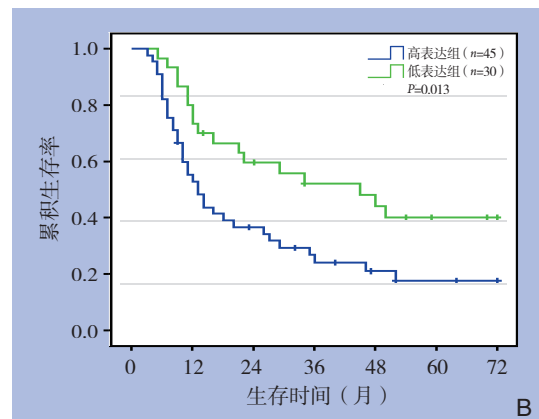
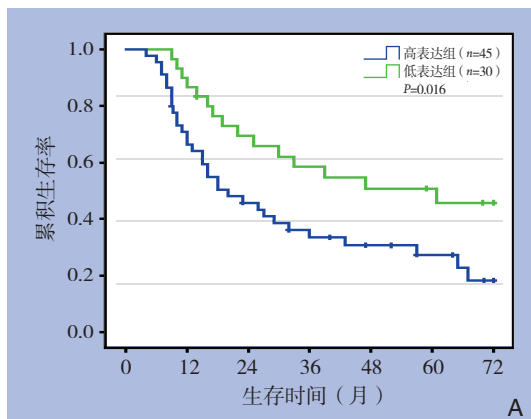


图 3 不同 THSD7A 表达状态与 HCC 患者的生存曲线  
高表达与低表达患者无瘤生存率比较

A: THSD7A 高表达与低表达患者总体生存率比较; B: THSD7A

Figure 3 Survival curves of HCC patients with different THSD7A expression levels A: Comparison of overall survival between patients with high and low THSD7A expression; B: Comparison of disease-free survival between patients with high and low THSD7A expression

3 讨 论

HCC的侵袭转移一直是国内外研究的热点, 近几年发现了许多参与HCC侵袭转移过程的重要基因, 如HSF1、ACK1、TMEM100、Egfl7、

RhoC、IFITM3、Numb<sup>[10-16]</sup>等, 不断加深和丰富了对HCC侵袭转移分子机制的研究。Bosco等<sup>[17]</sup>报道: THSD7A位于七号染色体短臂二区一代, 由1657个氨基酸组成。研究人员早期发现THSD7A与骨质疏松<sup>[18]</sup>、自发性膜性肾病<sup>[19]</sup>和肥胖<sup>[20]</sup>有

关。Kuo等<sup>[7-8]</sup>证实敲除斑马鱼胚胎中THSD7A后，将抑制内皮细胞的迁移，导致血管缺失。由于HCC组织中含有丰富血管，因此THSD7A可能也在HCC的血管生成中发挥着重要作用。

本研究结果发现：通过实时定量PCR与免疫组化显示THSD7A在癌旁呈高表达，而在相对应的癌中呈低表达。通过对免疫组化的数据分析显示，THSD7A低表达与HCC的临床病理特征和HCC患者的不良预后密切相关，THSD7A可能成为影响术后生存率的独立危险因素。众所周知，HCC的发生与发展是一个多阶段的过程，它涉及生长、侵袭和转移等多个步骤。迄今为止，许多学者就HCC侵袭转移的分子机制做了大量深入地研究。Isin等<sup>[21]</sup>研究发现，THSD7A与p53的表达是密切相关的，两个调节因子共同作用于慢性淋巴细胞白血病发挥抑癌基因的作用。如今，HCC临床预后标志物的研究已逐见被人重视。因此，如能找到一个标志物能够预测、鉴别出HCC患者的临床差异，将会大大提高HCC患者的治疗效果，避免过度治疗。所以笔者推测THSD7A可能在HCC侵袭转移中发挥巨大的作用。THSD7A可能成为帮助临床医生预测HCC患者肿瘤侵袭转移的一个重要指标。

#### 参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2):69-90.
- [2] Takayama T, Makuuchi M, Hirohashi S, et al. Early hepatocellular carcinoma as an entity with a high rate of surgical cure[J]. *Hepatology*, 1998, 28(5):1241-1246.
- [3] Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008[J]. *J Hepatol*, 2008, 48(Suppl 1):S20-37.
- [4] Yang LY, Fang F, Ou DP, et al. Solitary large hepatocellular carcinoma: a specific subtype of hepatocellular carcinoma with good outcome after hepatic resection[J]. *Ann Surg*, 2009, 249(1):118-123.
- [5] Pang RW, Joh JW, Johnson PJ, et al. Biology of hepatocellular carcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15(4):962-971.
- [6] Threadgill DW. Metastatic potential as a heritable trait[J]. *Nat Genet*, 2005, 37(10):1026-1027.
- [7] Kuo MW, Wang CH, Wu HC, et al. Soluble THSD7A is an N-glycoprotein that promotes endothelial cell migration and tube formation in angiogenesis[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(12):e29000. doi:10.1371/journal.pone.0029000
- [8] Wang CH, Su PT, Du XY, et al. Thrombospondin type I domain containing 7A (THSD7A) mediates endothelial cell migration and tube formation[J]. *J Cell Physiol*, 2010, 222(3):685-694.
- [9] Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissues[J]. *Hum Pathol*, 1990, 21(6):607-612.
- [10] Fang F, Chang R, Yang L. Heat shock factor 1 promotes invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo[J]. *Cancer*, 2012, 118(7):1782-1794.
- [11] Lei X, Li YF, Chen GD, et al. Ack1 overexpression promotes metastasis and indicates poor prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(38):40622-40641.
- [12] Ou Dipeng, Yang Hao, Hua Dong, et al. Novel roles of TMEM100: inhibition metastasis and proliferation of hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(19):17379-17390.
- [13] Wu F, Yang LY, Li YF, et al. Novel role for epidermal growth factor-like domain 7 in metastasis of human hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2009, 50(6):1839-1850.
- [14] Wang W, Yang LY, Yang ZL, et al. Expression and significance of RhoC gene in hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(9):1950-1953.
- [15] 吴荣寿, 邬林泉, 李科浩, 等. IFITM3在原发性肝癌中的表达及其对MMP-9调控效应[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(1):68-76. Wu RS, Wu LQ, Li Kh, et al. IFITM3 expression and its regulatory action over MMP-9 in hepatocellular carcinoma[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2016, 25(1):68-76.
- [16] 万健, 唐才喜, 冯斌, 等. 原发性肝癌中Numb和VEGF的表达及临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(1):39-44. Wan J, Tang CX, Feng B, et al. Expressions of numb and vegf in hepatocellular carcinoma and the clinical significance[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2015, 24(1):39-44.
- [17] Bosco N, Pelliccia F, Rocchi A. Characterization of FRA7B, a human common fragile site mapped at the 7p chromosome terminal region[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2010, 202(1):47-52.
- [18] Mori S, Kou I, Sato H, et al. Association of genetic variations of genes encoding thrombospondin, type 1, domain-containing 4 and 7A with low bone mineral density in Japanese women with osteoporosis[J]. *J Hum Genet*, 2008, 53(8):694-697.
- [19] Tomas NM, Beck LH Jr, Meyer-Schwesinger C, et al. Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(24):2277-2287.
- [20] Nizamuddin S, Govindaraj P, Saxena S, et al. A novel gene THSD7A is associated with obesity[J]. *Int J Obes (Lond)*, 2015, 39(11):1662-1665.
- [21] Isin M, Yenerel M, Aktan M, et al. Analysis of p53 tumor suppressor pathway genes in chronic lymphocytic leukemia[J]. *DNA Cell Biol*, 2012, 31(5):777-782.

( 本文编辑 姜晖 )

本文引用格式：陈婧, 刘挺, 武步强, 等. 域含蛋白7A在肝细胞癌中的表达及其与预后的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(2):252-256. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.02.016

Cite this article as: Chen J, Liu T, Wu BQ, et al. Expression of domain containing 7A in hepatocellular carcinoma and its prognostic significance[J]. *Chin J Gen Surg*, 2016, 25(2):252-256. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.02.016