

*DOK2*对胃癌细胞生物学行为的影响及其与胃癌预后的关系

焦金霞¹ 王永飞^{1*} 李明¹ 杨洋¹ 张宁² 邢象斌³ 马三梅^{1*}

(¹暨南大学生物工程系, 广州 510632; ²广州医学院生理学教研室, 广州 510182;

³中山大学附属第一医院消化科, 广州 510080)

摘要 构建重组质粒pcDNA3.1-*DOK2*并转染胃癌细胞BGC823, 采用平板集落形成、CCK8法和软琼脂克隆形成实验检测过表达*DOK2*基因对BGC823生物学行为的影响, 并采用免疫组织化学法检测116例胃癌组织中*DOK2*蛋白的表达, 分析其与胃癌临床病理学特征及预后的关系。结果显示, 过表达的*DOK2*基因对BGC823细胞增殖有显著抑制作用。在所有胃癌组织中, *DOK2*蛋白低表达占62.93%, 且其与胃癌浸润深度、淋巴结转移以及分化程度密切相关; *DOK2*蛋白的表达、胃癌浸润深度、淋巴结转移、远处转移以及分化程度是影响患者预后生存时间的重要因素。

关键词 胃癌; *DOK2*; BGC823; 生物学行为; 预后

The Influence of *DOK2* on the Biological Behavior of Gastric Cancer Cells and Its Relationship with the Prognosis of Gastric Cancer

Jiao Jinxia¹, Wang Yongfei^{1*}, Li Ming¹, Yang Yang¹, Zhang Ning², Xing Xiangbin³, Ma Sanmei^{1*}

(¹Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; ²Physiology Institute, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China; ³Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract In this research, the recombinant plasmid pcDNA3.1-*DOK2* was constructed and transfected into BGC823 cells. We evaluated the influence of over-expression of *DOK2* on gastric cancer cells biological behavior by CCK8, soft agar and colony formation assay. The expression of *DOK2* protein was detected by immunohistochemistry in 116 cases of gastric carcinoma, and its relationship with clinicopathological characteristics and prognosis of gastric cancer was analyzed. The results showed that over-expression of *DOK2* significantly inhibited the growth, proliferation and colony of BGC823 cells. Immunohistochemistry showed the low expression of *DOK2* protein in gastric cancer accounted for 62.93%, and *DOK2* protein expression had a significant inverse correlation with depth of tumor invasion, lymph node metastasis and tumor differentiation degree; *DOK2* protein expression, depth of tumor invasion, lymph node metastasis, distant metastasis and tumor differentiation degree were important factors affecting the prognosis of patients survival.

Keywords gastric cancer; *DOK2*; BGC823; biological behavior; prognosis

胃癌是常见的一种恶性肿瘤, 在全球范围内居恶性肿瘤死亡率第二位^[1]。超过70%的新发病例和

死亡发生在发展中国家, 一半发生在东亚国家(主要是中国)^[2]。近年来, 80%以上的胃癌诊断发生在疾

收稿日期: 2014-12-17 接受日期: 2015-02-12

国家自然科学基金(批准号: 81000887)资助的课题

*通讯作者。Tel: 020-32742408, E-mail: wyfmsm@163.com; Tel: 020-38897606, E-mail: msmwdw@163.com

Received: December 17, 2014 Accepted: February 12, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81000887)

*Corresponding authors. Tel: +86-20-32742408, E-mail: wyfmsm@163.com; Tel: +86-20-38897606, E-mail: msmwdw@163.com

网络出版时间: 2015-04-23 15:37

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150423.1537.006.html>

病的中晚期阶段^[3], 尽管医疗科研人员一直致力于改善胃癌的预防、诊断和治疗, 但是患者的总生存期进展不佳, 术后5年生存率仅为30%左右^[4]。因此, 新疗法的开发是有效控制胃癌的关键。新的研究表明, 表观遗传学的改变, 特别是肿瘤相关基因的改变, 在肿瘤的发生发展过程中起到非常重要的作用^[5]。

酪氨酸蛋白激酶下游分子(downstream of tyrosine kinase, DOK)属于酪氨酸残基磷酸化蛋白质, 其家族成员有6个。*DOK2*是一种肿瘤抑制基因, 位于人类染色体8P21.3^[6], 负责编码412个氨基酸^[7], 在人的胸腺、脾、肾脏中都有表达。目前, *DOK2*作为一种抑癌基因, 在卵巢癌、肺腺癌、大肠癌中均有发现^[8-10]。本研究探讨*DOK2*基因对胃癌细胞生物学行为的影响, 结合临床病例, 可能为改善晚期胃癌患者预后提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和组织来源 人胃癌细胞株AGS、BGC823、SGC7901、MKN28、N87、MKN45、SNU1来自Riken细胞库(Tsukuba, Japan)和ATCC细胞库(Rockville, USA), 其中SNU1为悬浮生长细胞, 其他均为贴壁生长细胞。116例胃癌组织、18例癌旁组织标本及正常胃黏膜组织来源于中山大学附属第一医院手术病例。其中, 男96例, 女20例。胃癌TNM分期: T1+T2 19例, T3+T4 97例; N0+N1 37例, N3+N4 79例(T: 浸润深度, N: 淋巴结转移); 无远处转移67例, 有远处转移49例。病理分型: 高-中分化腺癌45例, 低分化腺癌71例。所有病例术前均未接受放、化疗。

1.1.2 质粒与菌种 *DOK2*表达质粒pcDNA3.1和pcDNA3.1空载体(氨苄抗性)购自北京泛基诺科技有限公司。感受态大肠杆菌DH5 α 购自TaKaRa公司。

1.1.3 主要试剂及工具酶 LipofectamineTM 2000转染试剂、RNA提取试剂盒、新霉素(G418)、Opti-MEM[®]、免疫组化试剂盒购自Invitrogen公司。质粒提取试剂盒(Endotoxin-free Plasmid DNA Purification)购自MACHEREY-NAGEL公司。PCR试剂盒购自TaKaRa公司。逆转录试剂盒购自Fermentas公司。CCK8试剂购自广州奕源生物公司。引物由英潍捷基公司合成。BCA蛋白定量试剂盒购自凯基公司。一抗、二抗购自Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 pcDNA3.1-*DOK2*质粒DNA的制备 按照转化说明书, 将制备好的菌液涂布于含有氨苄青霉素的LB固体培养基上, 37 °C过夜倒置培养。挑取阳性单克隆菌落置于含Amp的LB液体培养基中进行扩大培养, 37 °C、190 r/min培养16~20 h, 用质粒DNA提取试剂盒提取质粒DNA。使用紫外分光计测定质粒DNA浓度和 D_{260}/D_{280} 比值。

1.2.2 细胞培养 所有细胞均置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。细胞株AGS的培养基为DMEM/F12(Hyclone)培养基, 其他细胞株均用RPMI 1640(Hyclone)培养基加10%胎牛血清(Hyclone)。贴壁细胞用0.25%的胰蛋白酶消化, 每2~3 d传代1次。悬浮生长的细胞株离心弃上清液, 更换培养基, 每2~3 d传代1次。

1.2.3 RT-PCR检测*DOK2*基因的mRNA表达 把提取的人胃癌细胞系和正常胃组织的总RNA逆转录成cDNA, 进行RT-PCR扩增。上游引物: 5'-ACC AGT GTC GTT TAA GGA AC-3', 下游引物: 5'-GAC CTC TCC CGT TGA AAC TC-3', 目的片段为232 bp。RT-PCR的整体反应体系为25 μ L, 反应条件为: 95 °C热启动5 min; 95 °C变性1 min, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸40 s, 循环35个周期; 72 °C延伸7 min。*S12*作为内参(上游引物: 5'-GCA TTG CTG CTG GAG GTG TAA T-3', 下游引物: 5'-CTG CAA CCA ACC ACT TTA CGG-3'), 用3%琼脂糖凝胶电泳检测产物。

1.2.4 细胞转染 将对数期的BGC823细胞计数后接种于六孔培养板, 每孔铺 3×10^5 个细胞, 待细胞密度长至80%~90%时, 按照试剂LipofectaminTM 2000说明书进行操作, 分别用pcDNA3.1空载体和pcDNA3.1-*DOK2*表达载体转染细胞。48 h后提取总RNA和总蛋白, 通过RT-PCR和Western blot检测转染水平。

1.2.5 Western blot实验 制备10%的分离胶和5%的浓缩胶。用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 取等量样品, 加入 $5 \times$ 蛋白上样缓冲液, 100 °C煮沸10 min变性。每孔上样20 μ L, 并添加5 μ L蛋白marker。恒压80 V, 蛋白跑至浓缩胶和分离胶界面处时改为120 V, 指示剂在分离胶下缘时停止。取下凝胶置于转膜夹中, 加满 $1 \times$ 转膜液, 200 mA恒流转膜1.5 h。 $1 \times$ TBST缓冲液冲洗5 min \times 3次后, 将膜放入5%脱脂奶粉中封闭1 h。TBST缓冲液洗膜, 5 min \times 3次,

之后一抗4 °C孵育过夜。TBST缓冲液洗膜, 5 min×3次, 二抗室温孵育1 h。TBST缓冲液洗膜, 5 min×3次, 添加发光液, 荧光化学发光成像分析系统分析图像。

1.2.6 细胞增殖能力检测 设置*DOK2*基因细胞组(BGC-*dok2*)和空载体组(BGC-vector), 将两组分别以 3×10^4 /mL的细胞浓度接种于96孔板(共四板), 每孔100 μ L, 置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养, 在24, 48, 72, 96 h时每板每孔加10 μ L CCK8, 培养箱中孵育2 h后用酶标仪检测波长450 nm的吸光度值。每组细胞设置5个复孔, 实验重复3次, 绘制细胞生长曲线。

1.2.7 平板集落形成实验 将pcDNA3.1空载体和pcDNA3.1-*DOK2*表达载体转染24 h后的BGC823细胞按照1:10或1:20稀释, 接种于6孔板中。在37 °C、5% CO₂培养条件下, 用500 μ g/mL的G418筛选2~3周, 当细胞集落所包含的细胞数大于50时终止培养。弃培养基, 用PBS清洗3次, 干燥后甲醇固定10~15 min, 最后用0.4%结晶紫染色10~15 min, 冲洗干净后计数。实验重复3次, 求平均值。

1.2.8 软琼脂集落形成实验 微波加热1.2%和2.0%的低熔点琼脂糖粉, 当温度降至37~40 °C时, 将其按照1:1的比例分别与2×RPMI 1640(含双倍FBS和双抗)混合成为上层培养基和下层培养基, 加2 mL下层培养基于6孔板凝固后, 将500 μ L约 1×10^4 个细胞与500 μ L上层培养基混合后加到已经凝固的下层培养基上, 凝固后加2 mL RPMI 1640。37 °C、5% CO₂培养2~3周, 观察集落形成情况, 大于50个细胞的为1个集落。实验重复3次, 并在显微镜下计数。

1.2.9 免疫组化实验 采用免疫组化SP法。组织切片经脱蜡水化, 微波抗原热修复, 滴加3%过氧化氢消除内源性过氧化酶, 一抗4 °C过夜, 二抗室温30 min, PBS漂洗3次, DAB显色, 苏木素复染, 脱水、封片、镜检。其中, PBS代替一抗作为阴性对照。

由2名研究人员在双盲情况下进行阅片。每张切片在显微镜下随机观察10个高倍视野(400×), 每个视野记数100个细胞, 共计数1 000个细胞。采用半定量积分法判定^[11]: 阳性细胞占计数细胞百分比: 0分(无着色)、1分(<10%)、2分(10%~50%)、3分(>50%)。染色强度无特异着色为0分, 淡黄色为1分, 棕黄色为2分, 黄褐色为3分。最终结果按染色强度和阳性细胞所占的百分比乘积得分。为便于统计, 4分以下为低表达, 4分以上为高表达。

1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0软件包进行统计学分析, 计量资料采用均值±标准差(mean±S.D.)表示, 计数资料采用构成比表示。两组计量资料采用*t*检验。生存分析采用Kaplan-Meier法, 进行Long-rank检验。*P*<0.05为差异显著, *P*<0.01为差异极显著。

2 结果

2.1 *DOK2* mRNA在胃癌细胞株及正常组织中的表达

用试剂盒抽提正常胃黏膜和胃癌细胞的总RNA, 以逆转录的cDNA为模板, 通过PCR扩增内参*S12*, 在306 bp处出现特异性条带, 表明cDNA质量好。加入*DOK2*引物后, 琼脂糖凝胶电泳结果显示, *DOK2*在正常胃黏膜中表达上调, 在7个胃癌细胞株中均有不同程度的表达下调或表达缺失(图1)。

2.2 *DOK2*转染水平的鉴定

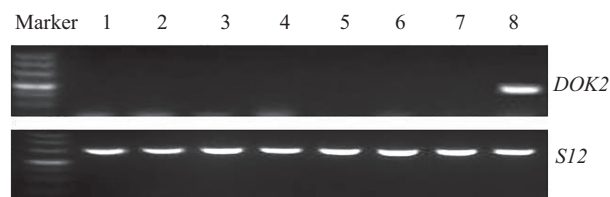
*DOK2*表达载体转染胃癌细胞株BGC823后, 应用RT-PCR和Western blot检测*DOK2* mRNA和*DOK2*蛋白水平的改变。结果显示, 在mRNA和蛋白水平上, *DOK2*基因细胞组(BGC-*dok2*)较空载体组(BGC-vector)的表达水平明显上调(图2和图3)。

2.3 增殖能力的检测

细胞生长曲线显示, 随着时间的增加, BGC-*dok2*组的细胞生长速度明显下降, 而BGC-vector组在4 d后呈持续增高趋势(*P*<0.05)。结果表明, 外源性*DOK2*对胃癌细胞株BGC823的增殖能力有抑制作用(图4)。

2.4 集落形成实验

与空载体组(BGC-vector)(105.00±11.14)相比, *DOK2*基因细胞组(BGC-*dok2*)(31.00±5.00)形成的集落

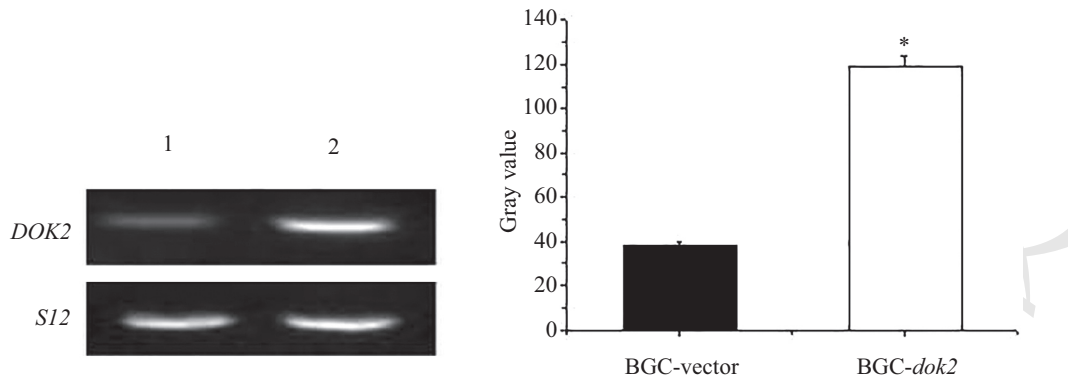


RT-PCR检测显示, 所有胃癌细胞株中*DOK2*表达沉默或下调。1~7: 胃癌细胞株AGS、BGC823、SGC7901、MKN28、N87、MKN45、SUN1; 8: 正常胃组织。

DOK2 was silenced or downregulated in all gastric cancer (GC) cell lines in RT-PCR assay. 1~7: AGS, BGC823, SGC7901, MKN28, N87, MKN45, SUN1; 8: normal gastric tissues.

图1 RT-PCR检测*DOK2* mRNA的表达

Fig.1 The expression of *DOK2* mRNA detected by RT-PCR

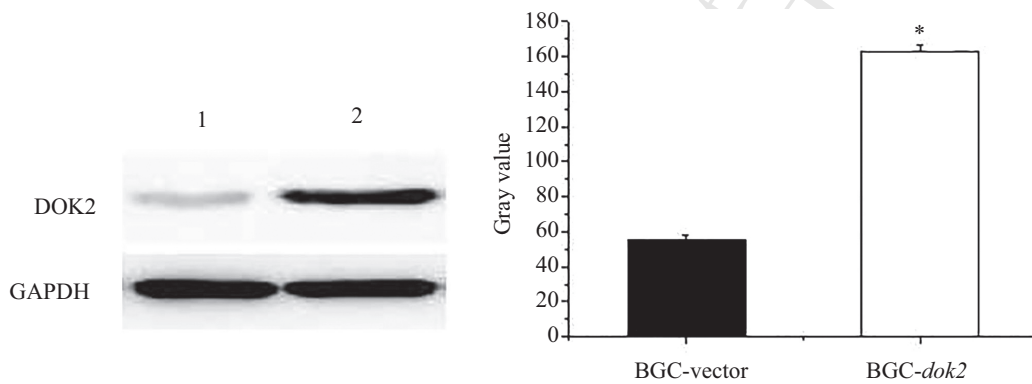


1: 空载体组(BGC-vector); 2: *DOK2*基因细胞组(BGC-*dok2*)。转染pcDNA3.1-*DOK2*的细胞中*DOK2*表达明显上调(* $P<0.05$, 与空载体组相比)。

1: control group (BGC-vector); 2: *DOK2* gene cell group (BGC-*dok2*). The *DOK2* expression was obviously up-regulated in cells transfected with pcDNA3.1-*DOK2* (* $P<0.05$ compared with BGC-vector group).

图2 RT-PCR检测转染后*DOK2* mRNA水平的变化

Fig.2 The mRNA expression changes of *DOK2* detected by RT-PCR

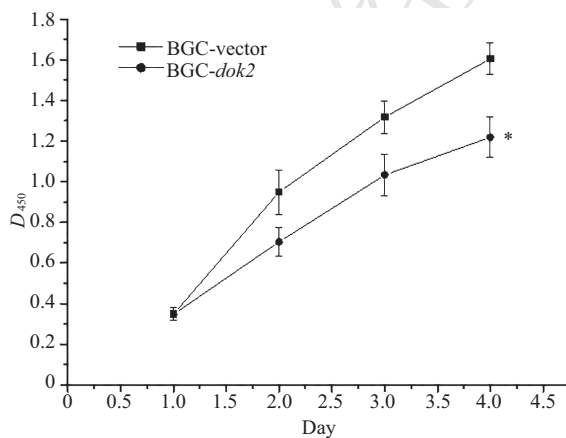


1: 空载体组(BGC-vector) 2: *DOK2*基因细胞组(BGC-*dok2*)。转染pcDNA3.1-*DOK2*的细胞中*DOK2*蛋白表达明显上调(* $P<0.05$, 与空载体组相比)。

1: control group (BGC-vector); 2: *DOK2* gene cell group (BGC-*dok2*). The *DOK2* protein expression was evidently up-regulated in cells transfected with pcDNA3.1-*DOK2* (* $P<0.05$ compared with BGC-vector group).

图3 Western blot检测转染后*DOK2*蛋白水平的变化

Fig.3 The *DOK2* protein expression changes analyzed by Western blot



* $P<0.05$, 与空载体组相比。

* $P<0.05$ compared with BGC-vector group.

图4 转染*DOK2*基因对胃癌细胞增殖能力的影响(CCK8法)

Fig.4 Effects of *DOK2* gene transfection on the growth of gastric cancer cells (CCK8 method)

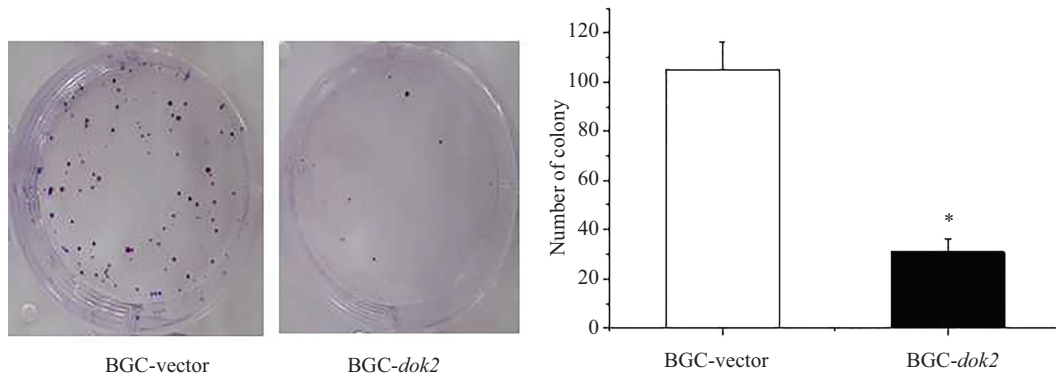
数目明显减少, 且集落的体积也明显变小($P<0.05$)。因此, 过表达的*DOK2*基因可抑制胃癌细胞株BGC823的集落形成率(图5)。

2.5 悬浮非依赖能力的检测

与空载体组(BGC-vector)(58.00 ± 3.61)相比, *DOK2*基因细胞组(BGC-*dok2*)(22.00 ± 1.53)所形成的细胞团体积较小, 同时数目也相对减少($P<0.05$)。结果显示, 过表达的*DOK2*基因对胃癌细胞株BGC823的悬浮非依赖能力有抑制作用(图6)。

2.6 *DOK2*蛋白在胃癌组织中的表达

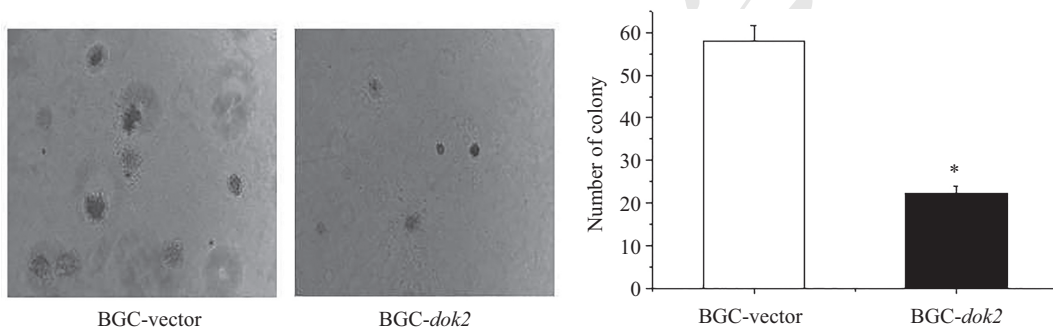
*DOK2*蛋白主要表达于胞质, 以黄色、黄褐色着色为主。在癌旁正常组织中, 有丰富的*DOK2*蛋白表达, 其胞质染色为黄褐色较多, 而胃癌组织中*DOK2*蛋白表达较弱, 染色结果以淡黄色为主(图7)。



平板克隆实验进一步验证*DOK2*对癌细胞增殖能力的影响。左图为pcDNA3.1-*DOK2*或pcDNA3.1空载体转染胃癌细胞后所得代表性的克隆图片。右图为克隆数目的量化分析。* $P < 0.05$, 与空载体组相比。

The effect of *DOK2* on cancer cell growth was further confirmed by colony formation assay. The left panel showed the representative images of the colony formation in gastric cancer cells transfected with pcDNA3.1-*DOK2* or empty vector (pcDNA3.1). Quantitative analysis of colony number was shown in the right panel. * $P < 0.05$ compared with BGC-vector group.

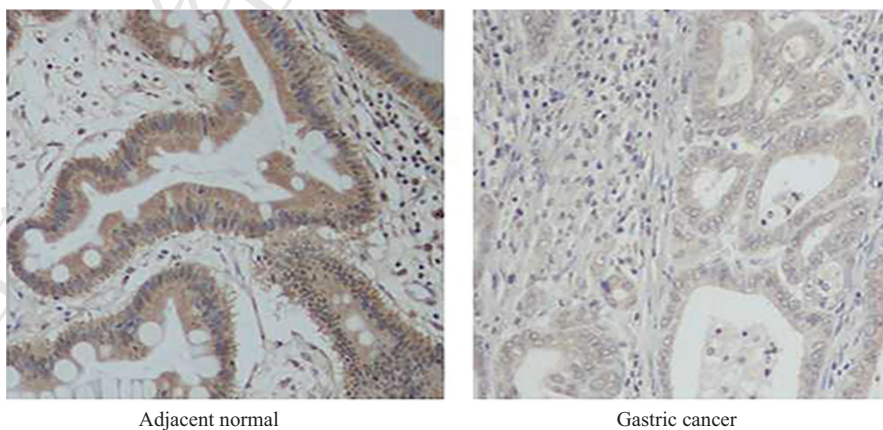
图5 *DOK2*基因对细胞集落形成能力的抑制
Fig.5 *DOK2* inhibited cell colony forming ability



软琼脂克隆实验进一步验证*DOK2*对癌细胞增殖能力的影响。左图为pcDNA3.1-*DOK2*或pcDNA3.1空载体转染胃癌细胞后所得代表性的克隆图片。右图为克隆数目的量化分析。* $P < 0.05$, 与空载体组相比。

The effect of *DOK2* on cancer cell growth was further confirmed by soft agar colony formation. The left panel showed the representative images of the soft colony formation in gastric cancer cells transfected with pcDNA3.1-*DOK2* or empty vector (pcDNA3.1). Quantitative analysis of soft colony number was shown in the right panel. * $P < 0.05$ compared with BGC-vector group.

图6 *DOK2*基因对细胞悬浮非依赖能力的抑制(40×)
Fig.6 *DOK2* inhibited cell independent suspension ability (40×)



图片为免疫组化实验检测*DOK2*蛋白在胃癌组织以及癌旁组织中的表达。与癌旁组织相比, 肿瘤样本中*DOK2*蛋白表达显著下调。

Representative images of *DOK2* protein expression in gastric cancer and their adjacent non-tumour tissues determined by immunohistochemistry (IHC). *DOK2* protein was downregulated significantly in primary tumour specimens compared with the adjacent non-tumour tissues by IHC.

图7 *DOK2*蛋白在癌旁正常组织和胃癌组织中的表达(400×)
Fig.7 *DOK2* protein expression in adjacent normal and gastric cancer tissue (400×)

2.7 DOK2蛋白表达与胃癌临床病理学特征的关系

116例胃癌病人中, DOK2低表达比例为62.9% (73/116)。DOK2的低表达与患者的浸润深度、淋巴结转移、分化程度均密切相关。DOK2低表达在T₁/T₂和T₃/T₄所占比例分别为21.1%(4/19)和71.1%(69/97), 说明DOK2低表达在两组中差异十分显著($P < 0.001$)。DOK2低表达在N₀/N₁所占比例为45.9%(17/37), 明显低于N₂/N₃患者70.9%(56/79), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。同时, DOK2低表达在出现高/中分化的患者中占24.4%(11/45), 而在低分化患者中所占比例为87.3%(62/71), 得出DOK2低表达在两类患者中差异特别显著($P < 0.001$)。此外,

DOK2的表达与患者的年龄、性别、远处转移无明显关系($P > 0.05$)(表1)。

2.8 DOK2蛋白表达与临床胃癌患者生存时间的关系

随访发现, 患者预后的生存时间与浸润深度、淋巴结转移、有否远处转移、分化程度以及DOK2的表达均相关。T₁/T₂和T₃/T₄期胃癌患者的平均生存时间分别是48.2±8.6和21.7±2.1月, 得出两组患者生存时间之间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。N₀/N₁期患者的平均生存时间是39.3±5.4月, 高于N₂/N₃期患者的平均生存时间(19.5±2.1月)($P < 0.05$)。无远处转移患者的生存时间是34.4±3.5月, 远高于有远处转移

表1 116例胃癌病人中DOK2表达的临床病理特征

Table 1 Clinicopathological characteristics of DOK2 expression in 116 patients with gastric cancer

| 变量 Variables | DOK2的表达 DOK2 expression | | | | P值 P value |
|------------------|----------------------------|----------|--------------------|----------|---------------|
| | 低(73) Low (73) | 百分比 % | 高(43) High (43) | 百分比 % | |
| Age (years) | 57.4±12.0 | | 60.1±10.6 | | 0.232 |
| Gender | | | | | |
| Male | 60 | 62.5 | 36 | 37.5 | 0.833 |
| Female | 13 | 65.0 | 7 | 35.0 | |
| T | | | | | |
| 1/2 | 4 | 21.1 | 15 | 78.9 | <0.001** |
| 3/4 | 69 | 71.1 | 28 | 28.9 | |
| N | | | | | |
| 0/1 | 17 | 45.9 | 20 | 54.1 | 0.010* |
| 2/3 | 56 | 70.9 | 23 | 29.1 | |
| M | | | | | |
| 0 | 38 | 56.7 | 29 | 43.3 | 0.105 |
| 1 | 35 | 71.4 | 14 | 28.6 | |
| Grading | | | | | |
| Moderate or high | 11 | 24.4 | 34 | 75.6 | <0.001** |
| Low | 62 | 87.3 | 9 | 12.7 | |

表2 胃癌的临床病理特征和生存分析

Table 2 Clinicopathological characteristics and survival of gastric cancer

| 变量 Variables | 样本数 Cases | 生存例数 Events | 平均生存时间(月) Mean survival (months) | 标准差 SE | 时序检验(P值) Log-rank test (P value) |
|------------------|--------------|----------------|-------------------------------------|-----------|--|
| Age (years) | | | | | |
| >65 | 35 | 29 | 24.5 | 4.0 | 0.923 |
| ≤65 | 81 | 66 | 25.9 | 2.9 | |
| T | | | | | |
| 1/2 | 19 | 9 | 48.2 | 8.6 | 0.002** |
| 3/4 | 97 | 86 | 21.7 | 2.1 | |
| N | | | | | |
| 0/1 | 37 | 24 | 39.3 | 5.4 | 0.007** |
| 2/3 | 79 | 71 | 19.5 | 2.1 | |
| M | | | | | |
| 0 | 67 | 50 | 34.3 | 3.5 | <0.001** |
| 1 | 49 | 45 | 13.6 | 1.8 | |
| Grading | | | | | |
| Moderate or high | 45 | 32 | 33.5 | 4.9 | 0.022* |
| Low | 71 | 63 | 20.0 | 2.0 | |
| DOK2 expression | | | | | |
| Low | 73 | 66 | 21.0 | 2.1 | 0.034* |
| High | 43 | 29 | 34.0 | 5.2 | |

者的 13.6 ± 1.8 月, 差异十分显著($P<0.001$)。高/中分化患者生存时间是 33.5 ± 4.9 月, 明显高于低分化患者的 20.0 ± 2.0 月($P<0.05$)。DOK2低表达的患者生存时间是 21.0 ± 2.1 月, 明显低于高表达者的 34.0 ± 5.2 月, 差异有统计学意义($P<0.05$)。患者预后的生存时间与年龄无关($P>0.05$)(表2)。

3 讨论

胃癌一直是全球引发死亡的常见原因之一。在整个亚洲东部(包括中国在内), 胃癌死亡率高于世界平均水平, 且晚期胃癌患者的生存率令人堪忧^[12]。据2008年的全球癌症统计分析得出有738 000人死于胃癌, 且有989 600例胃癌新增病例, 死亡人数占新增胃癌病例总数的74.58%, 占全球癌症病例总数的8%, 占全球癌症总死亡人数的10%^[2]。虽然早期胃癌患者可以得到较为满意的治疗, 但中晚期患者的治疗效果不佳, 且预后较差。目前, 基因治疗已经成为探索治疗各种癌症的新策略, 已有科研人员进行临床试验。因此, 用基因方法来预防、诊断和治疗胃癌是国内外科研人员关注的方向。

我们的研究发现, *DOK2*在胃癌组织和正常胃组织中都有表达, 但在胃癌组织中表现出不同程度的表达下调或缺失的现象, 这与Miyagaki等^[13]的研究结果相一致。在这次实验中, 我们用基因重组的质粒PCDNA3.1-*DOK2*和空质粒PCDNA3.1转染胃癌细胞BGC823, 发现转染后BGC823细胞*DOK2*表达水平显著增强。同时, 应用CCK8实验、平板集落形成、软琼脂集落形成实验来验证*DOK2*过表达的BGC823细胞的生物学特性, 发现*DOK2*表达载体转染BGC823细胞后其增殖能力、克隆形成能力以及悬浮非依赖能力均显著下降。说明*DOK2*基因对胃癌细胞株BGC823的生物学行为有着显著的抑制作用, 可见与胃癌的预后有着非常密切的关系。有研究表明, *DOK2*作为一种抑癌基因, 对卵巢癌、肺腺癌、大肠癌均有抑制作用^[8-10]。同时, Carneiro等^[14]研究指出, *DOK2*表达水平越低, 胃癌的恶性程度越高, 患者预后越差; 但其表达上调后, 胃癌情况得到缓解或改善, 说明*DOK2*表达下调或缺失与胃癌的发生发展有关。

Miyagaki等^[13]研究表明, *DOK2*的表达与胃癌的分化程度密切相关; *DOK2*的表达、浸润深度以及淋巴结转移与患者预后生存率有着显著的相关性;

在正常胃组织的细胞质中有丰富的DOK2蛋白表达, 明显高于胃癌组织。此外, DOK2低表达的患者比DOK2高表达的患者有着更高的胃癌复发率和低存活率, DOK2可作为患者根治性切除胃癌后不良预后的一种指标。我们在研究中收集116例临床胃癌组织切片和18例癌旁组织标本, 采用免疫组织化学方法检测DOK2蛋白在胃癌组织中的表达, 发现DOK2低表达的病例数多于高表达的病例数。DOK2表达与胃癌浸润深度、淋巴结转移以及分化程度密切相关, 且相较于T₁/T₂和N₀/N₁以及高/中分化程度, T₃/T₄和N₂/N₃以及低分化程度对应的DOK2低表达有明显的上升趋势; DOK2的表达、胃癌浸润深度、淋巴结转移、是否远处转移以及分化程度是患者预后的重要因素, 其中DOK2低表达、T₃/T₄、N₂/N₃、有远处转移以及低的分化程度较它们对应的分期有着较差的预后。说明DOK2蛋白表达与胃癌的临床病理学特征密切相关, 可作为一个评估胃癌预后的新因素。

我们在研究中发现, 使胃癌细胞BGC823中*DOK2*基因过表达可以抑制胃癌细胞的生物学行为, *DOK2*表达减少或缺失与胃癌的发生发展密切相关, 有可能成为胃癌预防、诊断和治疗中的一个新靶点。同时, 通过免疫组化实验检测DOK2蛋白在胃癌组织和癌旁组织中的表达以及研究临床胃癌切片的病理学特征, 可作为评估胃癌预后的新因素。

参考文献 (References)

- 1 Gong Y, Guo MZ, Ye ZJ, Zhang XL, Zhao YL, Yang YS. Silence of HIN-1 expression through methylation of its gene promoter in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2011; 17(4): 526-33.
- 2 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
- 3 Liu HS, Xiao HS. MicroRNAs as potential biomarkers for gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20(34): 12007-17.
- 4 Hartgrink HH, van de Velde CJ. Status of extended lymph node dissection: Locoregional control is the only way to survive gastric cancer. *J Surg Oncol* 2005; 90(3): 153-65.
- 5 Choi IS, Wu TT. Epigenetic alterations in gastric carcinogenesis. *Cell Res* 2005; 15(4): 247-54.
- 6 Yasuda T, Bundo K, Hino A, Honda K, Inoue A, Shirakata M, et al. Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of T cell receptor signaling. *Int Immunol* 2007; 19(4): 487-94.
- 7 Di Cristofano A, Carpino N, Dunant N, Friedland G, Kobayashi R, Strife A, et al. Molecular cloning and characterization of p56dok-2 defines a new family of RasGAP-binding proteins. *J Biol Chem* 1998; 273(9): 4827-30.
- 8 Berger AH, Niki M, Morotti A, Taylor BS, Socci ND, Viale A, et

- al.* Identification of DOK genes as lung tumor suppressors. *Nat Genet* 2010; 42(3): 216-23.
- 9 An CH, Kim MS, Yoo NJ, Lee SH. Mutational and expressional analysis of a haploinsufficient tumor suppressor gene DOK2 in gastric and colorectal cancers. *APMIS* 2011; 119(8): 562-4.
- 10 Lum E, Vigliotti M, Banerjee N, Cutter N, Wrzeszczynski KO, Khan S, *et al.* Loss of DOK2 induces carboplatin resistance in ovarian cancer via suppression of apoptosis. *Gynecol Oncol* 2013; 130(2): 369-76.
- 11 Meng F, Li H, Shi H, Yang Q, Zhang F, Yang Y, *et al.* MACC1 down-regulation inhibits proliferation and tumorigenicity of nasopharyngeal carcinoma cells through Akt/ β -catenin signaling pathway. *PLoS One* 2013; 8(4): e60821.
- 12 Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Erratum: Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 83(1): 18-29.
- 13 Miyagaki H, Yamasaki M, Takahashi T, Kurokawa Y, Miyata H, Nakajima K, *et al.* DOK2 as a marker of poor prognosis of patients with gastric adenocarcinoma after curative resection. *Ann Surg Oncol* 2012; 19(5): 1560-7.
- 14 Carneiro F, Oliveira C, Leite M, Seruca R. Molecular targets and biological modifiers in gastric cancer. *Semin Diagn Pathol* 2008; 25(4): 274-87.

中国细胞生物学