

学校编码: 10384

密级\_\_\_\_\_

学号: 24520131153498

# 厦门大学

## 硕士学位论文

### TNFAIP8 家族在胃癌及心脏移植中的作用

#### The role of TNFAIP8 family in gastric cancer and heart transplantation

洪诗福

指导教师姓名: 齐忠权 教授

庄国洪 副教授

专业名称: 外科学

论文提交日期: 2016年5月

论文答辩日期: 2016年5月

2016年5月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):  
年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

## 摘要

**目的:**TIPE 及 TIPE2 是 TNFAIP8(Tumor necrosis factor- $\alpha$  induced protein-8, TIPE, TNFAIP8) 家族的重要成员, TIPE 是调控凋亡进程的重要分子, 本研究之一是应用 TIPE 不同表达的 BGC823 细胞株建立胃癌裸鼠移植瘤模型, 观察 TIPE 对移植瘤生长的影响; 同时收集并检测胃癌临床标本 TIPE 的表达特点, 分析 TIPE 与胃癌临床病理特征的关系, 明确 TIPE 与胃癌生物学行为的关系及对胃癌生长的影响。

TIPE2 为免疫负性调控因子, 对免疫稳态的维持起重要作用。本研究之二为构建异种心脏移植模型, 在移植后的不同时间点收集移植物和脾脏组织, 检测 TIPE2 蛋白及 mRNA 水平表达特点, 同时检测细胞因子的变化及免疫细胞的浸润, 分析三者之间的联系, 探讨 TIPE2 在异种移植中的可能作用。

**方法:**第一部分: 利用实时荧光定量 PCR 法检测 16 例胃癌组织及癌旁正常组织中 TIPE mRNA 的表达, 分析不同组织 TIPE mRNA 的表达情况。结合临床资料, 分析 TIPE 在胃癌发生、发展以及浸润、转移的关系。

第二部分: 应用 TIPE 表达差异的 BGC823 细胞株, 接种于裸鼠建立裸鼠胃癌移植瘤模型, 每天应用伊立替康治疗并测量裸鼠体重及肿瘤大小, 治疗两周后取肿瘤称重, 肿瘤组织经 HE 染色明确肿瘤坏死程度, 分析 TIPE 对胃癌生长的影响。

第三部分: 将仓鼠的心脏异位移植到大鼠颈部, 建立异种心脏移植模型。实验分为 3 天来氟米特干预组(来氟米特组)和不给药组, 并将不给药组根据检测时间不同分为 1 天组和 3 天组, 通过 PCR 检测 TIPE2 在移植心、脾脏、淋巴结中的表达, 同时通过 ELISA 检测受体大鼠外周血里细胞因子的变化, HE 检测移植心病理变化, 分析三者间的联系。

**结果:**胃癌组织 TIPE mRNA 的表达明显高于癌旁组织 ( $P<0.05$ ), 两者差异显著, 具有统计学意义, TIPE mRNA 表达量与淋巴结转移、TNM 相关( $P<0.05$ ), 与性别、年龄无关 ( $P>0.05$ )。

体内实验观察到, 伊立替康作用不同 TIPE 表达的胃癌细胞建立的肿瘤模型, 干扰组 14 天肿瘤质量与体积分别为 ( $0.012\pm 0.002\text{g}$ ,  $137.95\pm 16.78\text{mm}^3$ ), 对照组

裸鼠肿瘤质量与体积分别为 ( $0.021\pm 0.003\text{g}$ ,  $178.13\pm 26.95\text{mm}^3$ ), 组间差异显著, 具有统计学意义。

来氟米特显著的抑制移植后的急性排斥反应, 减少炎性细胞的浸润, 延长了异种移植的生存期。TIPE2 在心脏移植物中的表达随着排斥进展而升高, 在来氟米特组的表达低于3天组, 差别具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。TIPE2 在脾脏、淋巴结的表达随着排斥进展而升高, 在来氟米特组的表达高于于3天组, 差别具有统计学意义 ( $P<0.05$ )

**结论:** TIPE能够促进胃癌细胞的增殖, 干扰TIPE的表达, 可以增强胃癌细胞的凋亡敏感性。提示TIPE 可能参与了胃癌的发生、发展。TIPE 可能为进一步研究胃癌的发病机制提出一种新的思路。

TIPE2 表达量随着免疫排斥程度不同而呈现不同变化。提示 TIPE2 可能参与了免疫排斥反应, 进一步探索 TIPE2 在移植免疫当中的可能机制, 为寻找免疫抑制新策略提供了曙光。

**关键词:** 胃癌; TIPE; 异种移植; TIPE2

## ABSTRACT

**Objective:** As is known, TIPE and TIPE2 are important members of TNFAIP8 (Tumor necrosis factor- $\alpha$  induced protein-8, TIPE, TNFAIP8) family. Since TIPE is a recently discovered antiapoptotic molecule, part of this study focuses on constructing a nude-mouse transplanted tumor model with the BGC823 cell strain--different expression of TIPE, and observing the influences TIPE has on the growth of the transplanted tumor, in the course of which expressions of TIPE in the clinical sample of gastric cancer are collected and detected so as to analyze their relationship with clinical pathological characteristics of gastric cancer, as well as to explore TIPE's relationship with gastric cancer biological behavior and to figure out its effects on the development of gastric cancer.

TIPE2 is an immune negative regulator, which plays an important part in balancing immune status. Another part of this study deals with building a heart xenotransplantation model and collecting graft and spleen tissues at different time after transplantation so as to figure out the characteristics of TIPE2 protein and mRNA expression and the changes of cytokines, as well as to analyze their connections and to explore the possible functions of TIPE2 in the course of xenotransplantation.

**Method:** Part 1: Q-PCR method was used to detect and analyze TIPE mRNA expressions in 16 cases of gastric cancer tissues and normal adjacent tissues. The results were combined with clinical pathological data to analyze the links between TIPE and gastric cancer occurrence and development.

Part 2: By transplanting BGC823 cell strain with different TIPE expressions to the right armpit of nude mice, we constructed a nude-mouse transplanted tumor model. Weight of mice and tumor size were measured every day after treating the mice with irinotecan. After two weeks of treatment, the nude mice tumor was taken out for weighing. HE staining for the tumor tissue was performed to detect apoptosis and then analyze TIPE's effects on the development of gastric cancer.

Part 3: Experiments model were performed that hearts from hamsters were transplanted to Lewis rats recipients heterotopically. The experiments were divided into two groups: one with Leflunomide intervention for 3 days and another without medicinal administration. The latter was further divided into two small groups

depending on the different time of detection: one- day and three-day. PRC was used to detect the expressions of TIPE2 in the transplanted heart, spleen and lymph gland. ELISA was applied to detect the changes of cytokines in PB of Lewis rats recipients HE staining was performed to detect the pathologic changes of transplanted heart. Then data were collected to analyze the connections of the above three findings.

**Result:** Part 1 Our test shows that TIPE mRNA was expressed more in gastric cancer tissue than in adjacent tissues ( $P<0.05$ ), and the difference is so striking that it is of statistical significance. TIPE mRNA expression is related to lymphatic metastasis and TNM ( $P<0.05$ ) but irrelevant to gender and age ( $P>0.05$ ).

Part 2 It was observed in vivo experiments that in terms of weight and size, nude-mouse transplanted tumor model treated with irinotecan after 14 days ( $0.012\pm 0.002\text{g}$ ,  $137.95\pm 16.78\text{mm}^3$ ) was significantly smaller than tumor without treatment ( $0.021\pm 0.003\text{g}$ ,  $178.13\pm 26.95\text{mm}^3$ ), which is of statistical significance.

Part 3 The acute rejection of Leflunomide after transplantation can effectively reduce the infiltration of inflammatory cells and prolong the survival time of the xenograft. The expression of TIPE2 in graft was increased with the prolongation of graft survival time, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ).

**Conclusion:** It is found that TIPE can promote the proliferation of gastric cancer cell, so interference of TIPE can obviously up-regulate the apoptosis index of cancer cells. It's indicated that TIPE is likely to get involved with the gastric cancer occurrence and development. Therefore, TIPE gene in gastric cancer treatment may become a new target.

The result that TIPE2 expression varies with the degree of immune rejection indicates that TIPE2 may be related to immunological rejection. This shows that further insight into the possible mechanism of the function of TIPE2 in the transplantation immunity will provide us with new strategies for immunosuppression.

**Keywords:** Gastric cancer; TIPE; xenotransplantation; TIPE2

目 录

摘 要	I
Abstract	III
目 录	V
Contents	VIII
第一章 前言	1
1.1 胃癌概述	1
1.1.1 胃癌的发病原因及发病机制	1
1.1.2 病理	3
1.1.3 临床表现	5
1.1.4 诊断	6
1.1.5 治疗	7
1.2 器官移植和异种移植	8
1.2.1 异种移植分类	8
1.2.2 异种移植走进临床的四大障碍	9
1.2.3 实验室异种移植进展	10
1.3 TNFAIP8 家族概述	10
1.3.1 TNFAIP8 家族及成员	10
1.3.2 TNFAIP8 家族的分布	11
1.3.3 TNFAIP8 家族的生物学功能	12
1.4 RNA 干扰技术	14
1.5 来氟米特	15
1.6 研究目标、研究内容	16
1.6.1 研究目标	16
1.6.2 研究内容	16
第二章 胃癌组织中 TIPE mRNA 的表达及临床相关分析	17



<b>2.1 材料和方法</b> .....	<b>17</b>
2.1.1 材料.....	17
2.1.2 质粒提取.....	20
2.1.3 统计学方法处理实验数据.....	20
<b>2.2 结果与分析</b> .....	<b>20</b>
2.2.1 通过 PCR 方法检测胃癌患者肿瘤组织中 TIPE 表达情况.....	20
<b>2.3 讨论</b> .....	<b>21</b>
<b>第三章 TIPE shRNA 干扰的抑瘤作用</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1 材料和方法</b> .....	<b>24</b>
3.1.1 材料.....	24
3.1.2 方法.....	25
<b>3.2 结果与分析</b> .....	<b>27</b>
3.2.1 各时期的裸鼠体重变化.....	27
3.2.2 移植瘤的生长情况.....	27
3.2.3 HE 染色.....	29
<b>3.3 讨论</b> .....	<b>30</b>
<b>第四章 TIPE2 在异种心脏移植中作用</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1 材料和方法</b> .....	<b>31</b>
4.1.1 实验动物.....	31
4.1.2 实验器材及手术器械.....	31
4.1.3 实验仪器与耗材.....	31
4.1.4 实验药剂.....	32
4.1.5 实验方法.....	32
<b>4.2 结果与分析</b> .....	<b>39</b>
4.2.1 各组的异种心脏移植存活时间.....	39
4.2.2 TIPE2 在受体大鼠中的表达情况.....	40
4.2.3 受体大鼠血液中的细胞因子表达情况.....	41
4.2.4 来氟米特组和 3 天组中各淋巴细胞群的表达.....	42

4.2.5 移植物的病理变化.....	42
4.3 讨论 .....	44
全文总结 .....	46
参考文献 .....	47
发表学术论文 .....	50
致谢 .....	51

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## Contents

<b>Abstract In Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract In English</b> .....	<b>III</b>
<b>Chapter I Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Inical typing of gastric cancer</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Pathogenesis .....	1
1.1.2 Pathology.....	3
1.1.3 Clinical pathologic.....	5
1.1.4 Diagnosis.....	6
1.1.5 Therapies .....	6
1.1.6 Prognosis .....	8
<b>1.2 Organ transplantation and xenotransplantation</b> .....	<b>8</b>
1.2.1 Classification of xenograft.....	8
1.2.2 The four barriers of Xenotransplantation .....	8
1.2.3 The progress of Xenotransplantation in laboratory.....	10
<b>1.3 Advances in tipe family</b> .....	<b>10</b>
1.3.1 TNFAIP8 family.....	10
1.3.2 TNFAIP8 family distribution .....	11
1.3.3 TIPE biological function .....	12
<b>1.4 RNA in the treatment of gastric cancer</b> .....	<b>14</b>
<b>1.5 Leflunomide</b> .....	<b>15</b>
<b>1.6 The research targets and contents</b> .....	<b>16</b>
1.6.1 Targets .....	16
1.6.2 Contents .....	16
<b>Chapter II Analysis of expression of TIPE mRNA in patient` gastric cancer tissues</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Materials and methods</b> .....	<b>17</b>
2.1.1 The experimental materials .....	17
2.1.2 The experimental methods .....	20
2.1.3 Statistical method to deal with experimental datas .....	20
<b>2.2 Results and analysis</b> .....	<b>20</b>

2.2.1 Expression of TIPE mRNA in human gastric cancer detect.....	20
<b>2.3 Discussion</b> .....	<b>21</b>
<b>Chapter III The role of TIPE shRNA in nude mice model of gastric cancer mechanism</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1 Materials and methods</b> .....	<b>24</b>
3.1.1 The experimental materials.....	24
3.1.2 The experimental methods.....	25
<b>3.2 Results and analysis</b> .....	<b>27</b>
3.2.1 The nude mice weight.....	27
3.2.2 The nude mice tumor weight and volume.....	27
3.2.3 HE staining.....	29
<b>3.3 Discussion</b> .....	<b>30</b>
<b>Chapter IV The role of TNFAIP8 family in heart transplantation</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Materials and methods</b> .....	<b>31</b>
4.1.1 Animal.....	31
4.1.2 The experimental tools.....	31
4.1.3 The experimental materials.....	31
4.1.4 The experimental drugs.....	32
4.1.5 The experimental methods.....	32
<b>4.2 Results and analysis</b> .....	<b>39</b>
4.2.1 Graft survival time.....	39
4.2.2 TIPE2 expression.....	40
4.2.3 The exprssion of cytokines.....	41
4.2.4 Expression of lymphocyte groups.....	42
4.2.5 Pathological.....	42
<b>4.3 Discussion</b> .....	<b>44</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>46</b>
<b>References</b> .....	<b>47</b>
<b>Published Papers</b> .....	<b>50</b>
<b>Acknowledgments</b> .....	<b>51</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 第一章 前言

### 1.1 胃癌概述

胃癌是指胃粘膜上皮在环境或遗传等多种致癌因素作用下发生的严重恶性病变，是较为常见的恶性肿瘤之一，以 40-60 岁以上发病率居多，男性比女性更易发病，约 2 倍于女性，病死率居恶性肿瘤第 2 位<sup>[1]</sup>，虽然在全世界和我国均呈明显下降的趋势，已经从原来恶性肿瘤的第一位降到第二位，但在我国，每年因胃癌死亡约 16 万余人，占全部恶性肿瘤死亡的 23%左右<sup>[2]</sup>。胃癌早期，常无明显症状，或症状轻微，发病隐匿，不易使人发觉，且可发生在胃部任何部位。当临床症状清晰，患者就诊时，病变已达晚期，常伴有不同程度的其他脏器转移，预后较差，5 年生存率较低。因而，高危人群的定期筛查及体检，关注早期症状，对于胃癌的早发现、早治疗是非常必要的，有助于延长患者的生存期，降低死亡率<sup>[34]</sup>。

#### 1.1.1 胃癌的发病原因及发病机制

##### 1.1.1.1 发病原因

病因尚未完全明确。其致病过程与体内、外多种因素密切相关。体内因素包括种族、性别、年龄、遗传、血型、免疫状态、营养与精神状态等。而体外因素系指生活习惯与饮食习惯、职业、居住环境、社会经济状况等<sup>[1]</sup>。胃癌可发生于胃的任何部位，但多见于胃窦部，尤其是胃小弯侧。根据癌组织浸润胃部深度分为早期胃癌和进展期胃癌（中、晚期胃癌）。胃癌早期症状多不明显，如位置不确切的上腹不适、隐痛、泛酸、嗝气、食欲减退、轻度贫血等部分类似胃十二指肠溃疡或慢性胃炎的症状。有些病人服用抗溃疡药、止痛药或节食后疼痛减轻或缓解，因而往往被忽视而未做进一步检查。随着病情的进展，胃部症状渐转明显出现上腹部疼痛、食欲不振、消瘦、体重减轻和贫血等。后期常有癌肿转移、出现腹部肿块、左锁骨上淋巴结肿大、黑便、腹水及严重营养不良等。

### 1.1.1.2 地域环境因素

胃癌发病率有明显的地域性差别, 在我国的西北与东部沿海地区胃癌发病率比南方地区明显为高。不同国家与地区发病率的明显差别说明与环境因素有关。而环境因素导致的原因目前认为是不同环境的居民的不同饮食习惯。胃癌高发地区常常摄入过多的食盐、高盐的盐渍食品、熏制腌制食物。此类食物 N-亚硝基化合物含量较高, 这种物质目前被实验证明同胃癌发生具有密切关系, 可以诱发胃癌的产生。另外, 食物霉变后产生的真菌毒素、滑石粉、过度饮酒等因素, 都是导致胃癌发病的重要因素。

### 1.1.1.3 幽门螺杆菌感染

我国胃癌高发区成人幽门螺杆菌感染率高达 60%以上。幽门螺杆菌感染被认为是胃癌的发病的重要影响因素之一。1994 年 WHO 已将其列为第一类胃癌危险因素。幽门螺杆菌能够将摄入的硝酸盐转化为亚硝酸盐及亚硝胺而促癌发生。同时, 幽门螺杆菌还能感染胃粘膜上皮, 促其过度增殖、畸变, 继而产生癌症。再次, 幽门螺杆菌的毒性产物 CagA、Vac 也可能具有致癌作用, 胃癌病人当中, 抗 CagA 抗体检出率高于一般人群。

### 1.1.1.4 癌前病变

胃癌癌前病变是一个临床概念, 系指患有这类疾病的患者发生胃癌的几率较高。这种病变如不予以处理, 有可能发展为胃癌。这是恶性肿瘤一个演变过程, 通常由于不同程度胃粘膜肠上皮化生及非典型增生所引起。

(1) 慢性胃溃疡: 胃溃疡本身并不是一个癌前期状态。但溃疡边缘的粘膜则容易发生肠上皮化生与恶变。

(2) 慢性萎缩性胃炎: 慢性萎缩性胃炎常伴有肠上皮化生, 慢性萎缩性胃炎与胃癌的发生率呈显著的正相关。

(3) 胃息肉: 胃息肉可分为增生性息肉与腺瘤样息肉, 后者发生癌变率较大。虽然所占胃息肉中的比例不高, 癌变率却为 15%~40%。直径大于 2cm 者癌变率更高。增生性息肉多见, 而癌变率仅 1%。

(4) 胃切除后残胃: 胃良性病变手术后残胃发生的癌称残胃癌。由于术后长期胆汁反流, 加重残胃或吻合口粘膜慢性炎症, 容易导致腺体异型增生。胃手术

后尤其在术后 10 年开始，发生率显著上升。

(5) 胃粘膜巨大皱襞症：此症的病理特点是胃粘膜中分泌粘液的细胞呈弥漫性增生，导致胃粘膜皱襞高度肥厚，形同脑回状，血清蛋白从巨大胃粘膜皱襞漏失，低蛋白血症与浮肿可见于临床，约 10%可癌变。

#### 1.1.1.5 遗传因素

经研究证明，如某人的一级亲属比如父母得过胃癌，他产生胃癌的发病率高出正常人群的三到四倍。一部分临床流行病学统计指出，A 型血比其他类血型得胃癌几率更高。胃癌的癌变是因素、步骤、阶段多方面相关并交叉影响的过程，基因学上涉及到癌基因、抑癌基因、凋亡相关基因与转移相关基因改变。而基因的改变方式也是种类繁多，也是目前众多研究的热点。

### 1.1.2 病理

#### 1.1.2.1 早期胃癌

早期胃癌是指无论癌肿体积大小，有无伴随淋巴结转移，浸润病变仅限于粘膜及粘膜下层的胃癌。可包括：微小胃癌、小胃癌。这个分型是在 1978 年 10 月由日本消化系疾病和消化道内镜联合学会首次提出并成为行业通用典范使用至今。学会规定：癌灶之最大径在 5mm 以下者称为“微小胃癌”，而 6~10mm 者为“小胃癌”，并认为小胃癌和微小胃癌的 5 年和 10 年生存率均为 100%。微小胃癌和小胃癌同属于特殊类型的早期胃癌。早期胃癌的大体分型可分为隆起型、浅表型、凹陷型。隆起型：癌肿突出周围正常粘膜约 0.5cm。浅表型：癌肿无明显隆起或凹陷，进一步可分为浅表隆起型、浅表平坦型、浅表凹陷型。凹陷型：癌肿较周围粘膜明显凹陷，但浸润深度未超过粘膜下层。

#### 1.1.2.2 进展期胃癌

进展期胃癌是指癌肿浸润到基层、浆膜层及浆膜外的胃癌，也称中晚期胃癌常伴有转移。进展期胃癌通常按 borrmann 来进行大体分型。分别为息肉型、溃疡型、溃疡浸润型、弥漫浸润型。息肉型又称蕈伞型，为突入癌腔生长的息肉型癌肿，溃疡型为癌肿呈现溃疡生长，边界隆起呈现围堤状，周围浸润不明显。溃疡浸润型为癌肿中央呈现溃疡型增长，并向周围浸润，边界欠清。弥漫浸润型为癌肿沿胃壁各层弥漫性浸润生长，累及广泛，整个胃僵硬的仿若皮革状，又称皮



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.