

消化系统肿瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000333

高尔基体基质蛋白 130、14-3-3 ζ 、整合素 $\alpha 3$
在中、低分化胃癌组织的表达及意义

陈 婕,牟 玲,易永芬

(重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

【摘要】目的:检测高尔基体基质蛋白 130(Golgi matrix protein 130,GM130)、14-3-3 zeta(14-3-3 ζ)、整合素 $\alpha 3$ (integrin $\alpha 3$) 在正常胃组织和中、低分化胃癌组织中的表达,并由此探讨其与胃癌的关系。**方法:**运用免疫组织化学检测(strept avidin-biotin complex,SABC)法分别检测临床收集的 84 例胃癌患者的胃癌组织和正常胃组织(距癌肿边缘 5 cm 以上的胃组织)GM130、14-3-3 ζ 、Integrin $\alpha 3$ 的表达情况,并结合临床病理资料进行分析;用 RT-PCR 和 Western blot 分别检测 42 例胃癌(低分化胃癌 24 例,中分化胃癌 18 例)和 42 例正常胃组织 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin $\alpha 3$ 的 mRNA 和蛋白表达情况。**结果:**(1)GM130、14-3-3 ζ 、Integrin $\alpha 3$ 在胃癌组织中的表达阳性率分别为 88.1%、90.5%、95.2%,明显高于上述各指标在正常胃组织上的阳性表达率(52.4%、27.4%、42.9%);低分化胃癌组上述 3 个指标的表达较中分化胃癌组高,且 2 组间差异有统计学意义($P_1=0.000$ 、 $P_2=0.007$ 、 $P_3=0.000$)。Spearman 等级相关性分析显示,胃癌中 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin $\alpha 3$ 之间表达呈两两正相关($P<0.05$)。(2)GM130、14-3-3 ζ 、Integrin $\alpha 3$ 的表达均与年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤直径、肿瘤浸润深度、有无淋巴结转移无关($P>0.05$);而与肿瘤病理组织学分级及临床分期有关($P<0.05$)。(3)RT-PCR 及 Western blot 结果显示 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin $\alpha 3$ mRNA 和蛋白质的表达在胃癌组较正常胃组织组高,低分化胃癌组较中分化胃癌组高,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**GM130 的异常表达可能在胃癌的发生发展中发挥重要作用。

【关键词】胃癌;高尔基体基质蛋白 130;14-3-3 ζ 蛋白;整合素 $\alpha 3$

【中图分类号】R365

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-11-11

Expression and significance of GM130, 14-3-3 ζ and integrin $\alpha 3$ in moderately differentiated and poorly differentiated gastric cancer tissues

Chen Jie, Mou Ling, Yi Yongfen

(Teaching and Research Section of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To detect the different expressions of GM130, 14-3-3 ζ and integrin $\alpha 3$ in normal gastric tissues, moderately differentiated gastric cancer tissues and poorly differentiated gastric cancer tissues thus to explore its relationship with gastric cancer. **Methods:** The expression of GM130, 14-3-3 ζ and integrin $\alpha 3$ in gastric carcinoma tissues of 84 patients with gastric cancer and the 84 samples of normal gastric tissues (from 5 cm above the edge of the gastric tumor tissues) were detected by SABC immunohistochemistry. The expression of proteins and the clinical pathological data were analyzed. The expression of mRNA and protein of GM130, 14-3-3 ζ and integrin $\alpha 3$ were detected by RT-PCR and Western blot. **Results:** The positive expression rates of GM130, 14-3-3 ζ and integrin $\alpha 3$ (88.1%, 90.5%, 95.2%) were significantly higher in gastric cancer tissues than those in normal gastric tissues (52.4%, 27.4%, 42.9%); the expression of the above three indicators in poorly differentiated gastric cancer group were higher than those in moderately differentiated gastric cancer group, with statistically significant differences ($P_1=0.000$, $P_2=0.007$, $P_3=0.000$). Spearman correlation analysis showed that positive correlation were observed in GM130, 14-3-3 ζ and integrin $\alpha 3$ in gastric cancer ($P<0.05$). The expression of GM130, 14-3-3 ζ and integrin $\alpha 3$ in gastric cancer was obviously related with pathological differentiation and clinical stage ($P<0.05$), but its correlation with age, gender, tumor location, tumor size infiltration depth or whether the lymph node metastasis was not found ($P>0.05$). The levels of mRNA and proteins were higher in gastric cancer group than in normal gastric tissue group, higher in poorly differentiated gastric cancer than in moderately differentiated gastric cancer, with statistically significant

作者介绍:陈 婕, Email: 280952884@qq.com,

研究方向:肿瘤病理学。

通信作者:易永芬, Email: yiyongfen1953@aliyun.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30672431);高等学校

博士学科点专项科研基金资助项目(编号:20060631006)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000333.html>

differences between the two groups ($P<0.05$). **Conclusion:** The abnormal expression of GM130 may play an important role in the occurrence and development of gastric cancer.

【Key words】gastric cancer; Golgi matrix protein 130; 14-3-3 ζ protein; integrin $\alpha 3$

胃癌是威胁人类健康的十大肿瘤之一,近年来发病率逐渐升高,由于早期无明显症状及体征,往往难于早期诊断,到发现时多为晚期,治疗亦棘手。有文献报道:高尔基体基质蛋白 130(Golgi matrix protein 130,GM130)与宫颈癌^[1]、前列腺癌^[2]、肺腺癌^[3]等腺癌的发生发展密切相关,GM130 在上述肿瘤组织中的异常表达率明显高于正常组织;其且与 14-3-3 ζ 、整合素家族、P115 等相互影响而发挥作用^[4]。国外研究发现 GM130^[5-6]、14-3-3 ζ ^[7]、整合素 α 3(integrin α 3, Integrin α 3)^[8-9]在多种肿瘤的发生发展中起作用;但对上述 3 个指标在胃癌中的表达情况及关系尚不清。本研究运用免疫组织化学检测 SABC 法、RT-PCR 法、Western blot 法及检测从临床收集的 84 例(RT-PCR 和 Western blot 各为 42 例)胃癌肿瘤患者手术切下的胃癌组织与正常胃组织中 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin α 3 的表达是否存在差异,及上述 3 个指标表达情况是否存在相关性。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集 2012 年至 2013 年在重庆医科大学附属第一医院胃肠外科进行胃癌根治术的 84 例患者的胃癌组织及距离癌肿边缘至少 5 cm 的正常胃组织,甲醛固定后在重庆医科大学病理教研室进行石蜡包埋及切片;42 例新鲜标本用灭酶冻存管保存于重庆医科大学基础医学院分子医学与肿瘤实验研究平台的液氮罐内,并及时提取 RNA 和蛋白质。所有患者术前均未接受放化疗等特殊治疗,术后均由病理学确诊。

1.2 主要试剂

免疫组织化学检测试剂盒 DAB 染色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术公司。TRIzol 和逆转录试剂盒及 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin α 3 引物均购自大连宝生物工程有限公司。兔抗人 GM130 多克隆抗体购自 Abcam 公司。兔抗人 14-3-3 ζ 多克隆抗体和兔抗人 Integrin α 3 多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学(strept avidin-biotin complex, SABC)法

检测胃癌及正常胃组织中 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin α 3 的表达 将准备好的石蜡切片(切片厚度 4 μ m)置于 60 $^{\circ}$ C 恒温烤箱中烘烤 1 h 烤干,严格按照免疫组化试剂盒说明书上的操作步骤操作,以 PBS 分别代替兔抗人 GM130、兔抗人 14-3-3 ζ 及兔抗人 Integrin α 3(一抗)作为阴性对照,以阳性对照片(分别为 Abcam 公司和北京博奥森生物技术有限公司产品)作为阳性对照。GM130 抗体(一抗)按 1:100 的比例稀释;14-3-3 ζ 、Integrin α 3 抗体(一抗)按 1:60 的比例稀释。二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色后用苏木精作对比染色,切片分别依次经 70%、75%、85%、95%、无水乙醇脱水 5 min,二甲苯透明 10 min 后用中性树胶封片,干燥后切片置于光学显微镜下观察。

结果判断:GM130、14-3-3 ζ 、Integrin α 3 均在胃癌细胞和胃黏膜上皮细胞的细胞质中表达,光学显微镜下观察应为均匀的棕黄色颗粒。每张切片于 400 倍光学显微镜下随机观察 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞。按阳性细胞所占百分比的平均值进行评分:阳性细胞所占百分比<5%计 0 分,5%~24%计 1 分,25%~49%计 2 分,50%~74%计 3 分, $\geq$ 75%计 4 分;按染色强度进行评分:无着色计 0 分,着淡黄色计 1 分,着黄色或棕黄色计 2 分,着褐色或棕褐色计 3 分。以上述 2 项指标的分值之和作为最后评判,3~7 分为蛋白表达阳性。

1.3.2 RT-PCR 检测 42 例胃癌患者癌组织及正常胃黏膜组织中 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin α 3 的 mRNA 表达 Integrin α 3 将临床收集后保存于液氮中的新鲜组织取出,严格按 TRIzol 试剂盒说明书的操作步骤,分别提取各例组织得总 RNA,测定浓度后,按反转录试剂盒说明书介绍的操作步骤,将总的 RNA 逆转录成为 cDNA,将逆转录的 cDNA 作为模板,进行 PCR 反应。PCR 所需引物由大连宝生物工程有限公司合成,以 β -actin 作为内参照,各引物序列见表 1。PCR 反应条件:第 1 步,94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;第 2 步,94 $^{\circ}$ C 30 s、退火(温度见表 1)30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min,共 35 个循环;最后,72 $^{\circ}$ C 5 min。取 PCR 反应产物 3 μ l 进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳,采用 Quantity One 软件分析电泳条带的灰度值,以目的条带灰度值与内参条带灰度值的比值表示 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin α 3 的 mRNA 的相对表达量。各组实验均重复 3 次。

1.3.3 Western blot 检测 42 例胃癌患者癌组织及正常胃组织中 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin α 3 蛋白表达 提取组织蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,GM130、Integrin α 3 进行 6% SDS-PAGE,14-3-3 ζ 进行 10% SDS-PAGE,将电泳分离后的蛋白湿转至聚偏二氟乙烯膜上,用 10%脱脂奶粉封

表 1 RT-PCR 引物序列

Tab.1 Primer sequences for RT-PCR

基因名称	正向引物序列	反向引物序列	退火温度($^{\circ}$ C)	产物大小(bp)
GM130	ATCTTCTTACACAGAGAGGCAGC	AATAAACAGGAGTCGCATCACC	58.5	302
14-3-3 ζ	ATGTTGTAGGAGCCCGTAGGT	CTTGGTATGCTTGTGACTGA	56.5	303
Integrin α 3	CGTCATCAACATCGTCCACAA	GCATCCGCAAAGGTAAGAGTA	58	350
β -actin	CCTTCTACAATGAGCTGCGT	CCTGGATAGCAACGTACATG	54	147

闭非特异性结合位点,分别用抗 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin $\alpha 3$ 的一抗(浓度分别为 1:1 000, 1:500, 1:500),以 β -actin 抗体 (1:1 000)作为内参,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;TBST 洗涤 10 min $\times$ 3 次,活化辣根过氧化物酶(hydrogen-peroxide oxidoreductase, HRP)标记的羊抗兔 IgG(二抗)(1:1 000)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, ECL 化学发光显色,由 Bio-Rad 凝胶成像仪摄取图像, Quantity One 测定结果灰度值,用目的条带与 β -actin 灰度值的比值表示蛋白表达量。每项实验重复 3 次。

1.4 统计学方法

各组数据采用 SAS 9.1 软件对结果进行统计学分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;各组临床参数的比较用卡方检验,胃癌组织中 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin $\alpha 3$ 3 个蛋白表达阳性率两两之间关系用 Spearman 相关分析;免疫组织化学法结果中 3 个蛋白分别在胃癌与正常胃组织组的表达差异用 McNemar's 卡方检验;中分化胃癌、低分化胃癌与

正常胃组织之间的两两比较用 SNK- q 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin $\alpha 3$ 蛋白在胃癌组织与正常胃组织中的表达情况

GM130、14-3-3 ζ 、Integrin $\alpha 3$ 均定位于胃癌细胞和胃粘膜上皮细胞的细胞质,染色为棕黄色颗粒状,呈均匀分布。GM130、14-3-3 ζ 、Integrin $\alpha 3$ 在正常胃组织组阳性表达率较低,依次分别为 52.4%、27.4%、42.9%,在胃癌组阳性表达率依次分别为 88.1%、90.5%、95.2%;正常组与胃癌组相比,差异有统计学意义($\chi^2=25.000, P_1=0.000; \chi^2=53.000, P_2=0.000; \chi^2=42.087, P_3=0.000$)。见图 1~3、表 2(注:胃癌组织学分型采用 WHO 标准分为高、中、低分化,由于收集临床标本期间无高分化胃癌病例,故本研究仅作中、低分化胃癌的讨论)。

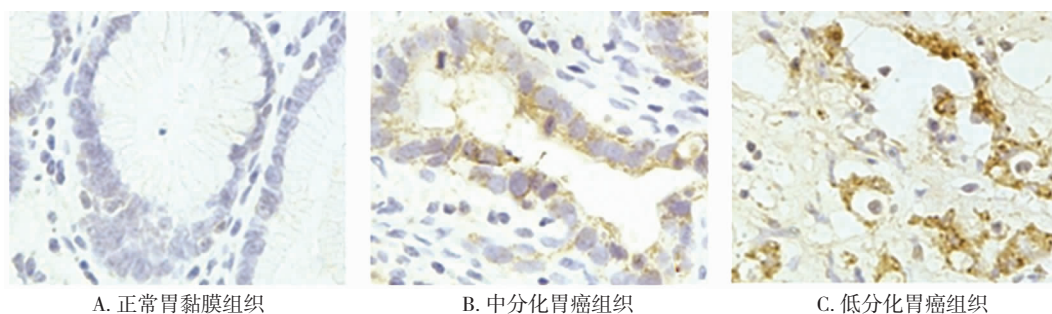


图 1 GM130 的表达 (400 $\times$)

Fig.1 Expression of GM130 (400 $\times$)

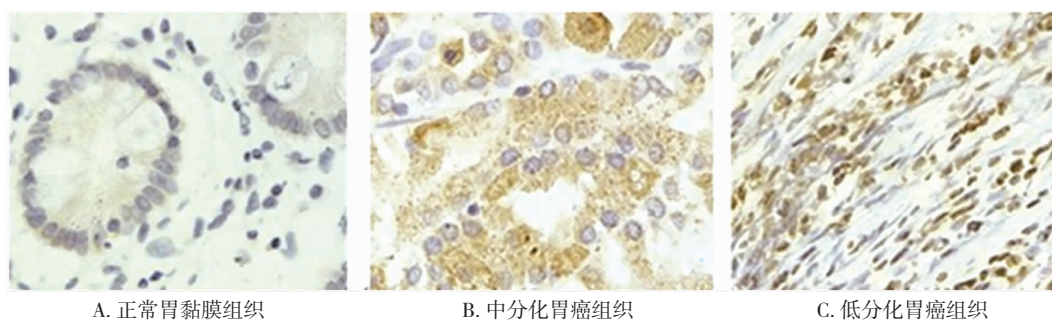


图 2 14-3-3 ζ 的表达 (400 $\times$)

Fig.2 Expression of 14-3-3 ζ (400 $\times$)

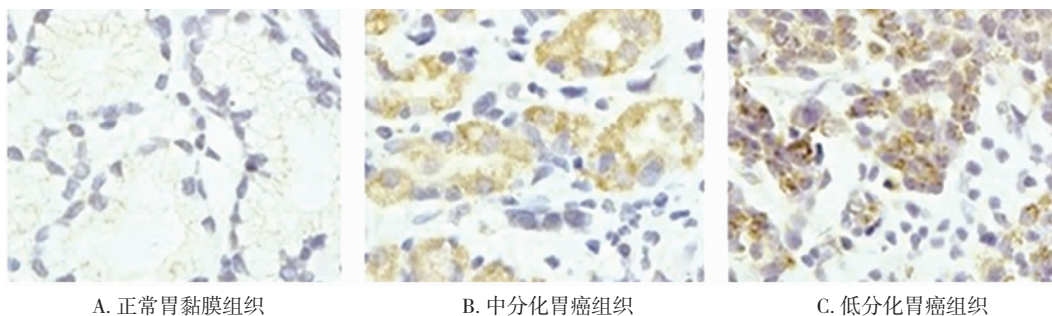


图 3 Integrin $\alpha 3$ 的表达 (400 $\times$)

Fig.3 Expression of integrin $\alpha 3$ (400 $\times$)

2.2 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin α 3 在胃癌组织中的表达与临床病理参数的关系

从表 3 看出,GM130、14-3-3 ζ 、Integrin α 3 的表达均与年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤直径、肿瘤浸润深度、有无淋巴结转移无关;而与肿瘤病理组织学分级及临床分期有关($P < 0.05$)。

2.3 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin α 3 在胃癌中表达的相关性分析

Spearman 等级相关性分析显示,胃癌中 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin α 3 之间表达呈两两正相关;即 GM130 与 14-3-3 ζ 正相关(免疫组化: $r_s=0.256, P=0.019$; RT-PCR: $r_s=0.357, P=0.020$; Western blot: $r_s=0.348, P=0.024$); 14-3-3 ζ 与 Integrin α 3 呈正相关(免疫组化: $r_s=0.308, P=0.004$; RT-PCR: $r_s=$

表 2 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin α 3 在胃癌组织与正常胃组织中的表达

Tab.2 Expression of GM130, 14-3-3 ζ , Integrin α 3 in gastric cancer tissues and normal gastric tissues

胃癌组	正常胃组织组					
	GM130		14-3-3 ζ		Integrin α 3	
	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性
阴性(n)	7	3	8	0	3	1
阳性(n)	33	41	53	23	45	35
χ^2 值	25.000		53.000		42.087	
P 值	0.000		0.000		0.000	

注:正常胃组织组 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin α 3 阳性表达率依次为:52.4%、27.4%、42.9%;胃癌组织组 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin α 3 阳性表达率依次为:88.1%、90.5%、95.2%

表 3 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin α 3 的表达与临床病理参数的关系

Tab.3 Relationship between the expression of GM130, 14-3-3 ζ , Integrin α 3 and pathogenic and clinic parameters of gastric cancer tissues

组别	例数 (n)	GM130				14-3-3 ζ				Integrin α 3			
		+	-	χ^2 值	P 值	+	-	χ^2 值	P 值	+	-	χ^2 值	P 值
年龄												2.036	0.154
≥50 岁	66	58	8	0.013	0.907	61	5	1.356	0.244	64	2		
<50 岁	18	16	2			15	3			16	2		
性别												0.305	0.581
男	52	46	6	0.017	0.895	49	3	0.388	0.533	49	3		
女	32	28	4			29	3			31	1		
肿瘤直径												0.026	0.871
≥5cm	24	20	4	0.726	0.394	22	2	0.055	0.814	23	1		
<5cm	60	54	6			54	6			57	3		
肿瘤部位												0.150	0.698
胃体	53	46	7	0.232	0.628	47	6	0.538	0.463	52	1		
胃窦	31	28	3			29	2			30	1		
病理分级												4.200	0.040
中分化	42	34	8	4.086	0.043	35	7	4.973	0.026	38	4		
低分化	42	40	2			41	1			42	0		
肿瘤浸润深度												5.250	0.154
黏膜内	6	4	2	5.902	0.116	5	1	4.075	0.253	6	0		
黏膜下层	14	14	0			12	2			12	2		
肌层	8	6	2			6	2			7	1		
浆膜层	56	50	6			53	3			55	1		
淋巴结转移												1.602	0.449
无淋巴结转移	38	32	6	1.696	0.428	36	2	3.374	0.185	35	3		
区域淋巴结转移	38	34	4			32	2			37	1		
远处淋巴结转移	8	8	0			8	0			8	0		
临床分期												7.560	0.006
I、II 期	30	22	8	9.696	0.002	24	6	5.943	0.015	26	4		
III、IV 期	54	52	2			32	2			54	0		

表 4 胃癌组织与正常胃组织中 GM130、14-3-3ζ、Integrin α3 mRNA 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)					
Tab.4 Expression of GM130, 14-3-3ζ, Integrin α3 mRNA in gastric cancer tissues and normal gastric tissues ($\bar{x} \pm s$)					
指标	低分化胃癌组	中分化胃癌组	正常胃组织组	F 值	P 值
GM130	0.864 6 ± 0.116 1	0.768 6 ± 0.127 9	0.602 1 ± 0.118 5	153.40	0.000
14-3-3ζ	0.943 7 ± 0.174 0	0.788 5 ± 0.186 7	0.614 3 ± 0.124 3	35.79	0.000
Integrin α 3	0.893 4 ± 0.126 1	0.784 4 ± 0.125 0	0.596 9 ± 0.111 4	83.97	0.000

注:低分化胃癌组与中分化胃癌组比较,GM130: $P=0.000$;14-3-3ζ: $P=0.005$;Integrin α3: $P=0.000$;低分化胃癌组与正常胃组织组比较,GM130: $P=0.046$;14-3-3ζ: $P=0.000$;Integrin α3: $P=0.000$;中分化胃癌组与正常胃组织组比较,GM130: $P=0.000$;14-3-3ζ: $P=0.000$;Integrin α3: $P=0.000$

表 5 胃癌组织与正常胃组织中 GM130、14-3-3ζ、Integrin α3 蛋白的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)					
Tab.5 Expression of GM130, 14-3-3ζ, Integrin α3 proteins in gastric cancer tissues and normal gastric tissues ($\bar{x} \pm s$)					
指标	低分化胃癌组	中分化胃癌组	正常胃组织组	F 值	P 值
GM130	1.013 5 ± 0.199 3	0.904 5 ± 0.091 8	0.714 5 ± 0.093 8	41.69	0.000
14-3-3 ζ	0.998 1 ± 0.162 3	0.885 8 ± 0.100 4	0.678 8 ± 0.065 4	71.21	0.000
Integrin α 3	0.986 0 ± 0.130 2	0.878 1 ± 0.137 3	0.677 0 ± 0.065 6	98.55	0.000

注:低分化胃癌组与中分化胃癌组比较,GM130: $P=0.027$;14-3-3ζ: $P=0.004$;Integrin α3: $P=0.029$;低分化胃癌组与正常胃组织组比较,GM130: $P=0.000$;14-3-3ζ: $P=0.000$;Integrin α3: $P=0.000$;中分化胃癌组与正常胃组织组比较,GM130: $P=0.000$;14-3-3ζ: $P=0.000$;Integrin α3: $P=0.000$

0.489, $P=0.001$; Western blot; $r_s=0.527$, $P=0.000$); GM130 与 Integrin α3 正相关(免疫组化: $r_s=0.436$, $P=0.000$; RT-PCR: $r_s=0.390$, $P=0.011$; Western blot: $r_s=0.452$, $P=0.003$); 差异均具有统计学意义。

2.4 RT-PCR 检测 GM130、14-3-3ζ、Integrin α3 mRNA 表达
在临床收集的新鲜组织中,胃癌组 GM130、14-3-3ζ、Integrin α3 mRNA 的表达均明显高于正常胃组织 ($P<0.05$); 低分化胃癌表达高于中分化胃癌 ($P<0.05$) (图 4)。

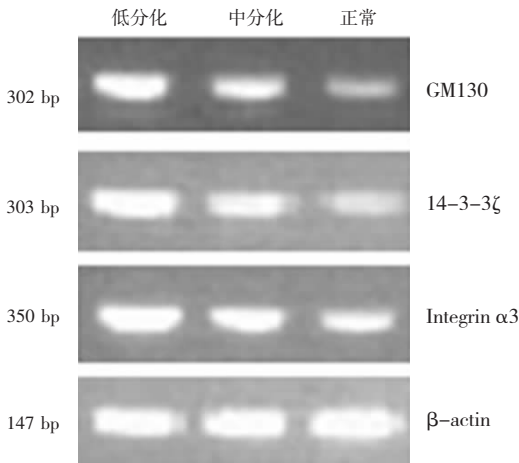


图 4 GM130、14-3-3ζ、Integrin α3 mRNA 在各组的表达
Fig.4 Expression of GM130, 14-3-3ζ, Integrin α3 mRNA in gastric cancer tissues and normal gastric tissues

2.4 Western blot 检测 GM130、14-3-3ζ、Integrin α3 蛋白的表达

在临床收集的新鲜组织中,胃癌组 GM130、14-3-3ζ、Integrin α3 蛋白的表达较正常胃组织组高 ($P<0.05$); 低分化胃癌组表达较中分化组高 ($P<0.05$) (图 5)。

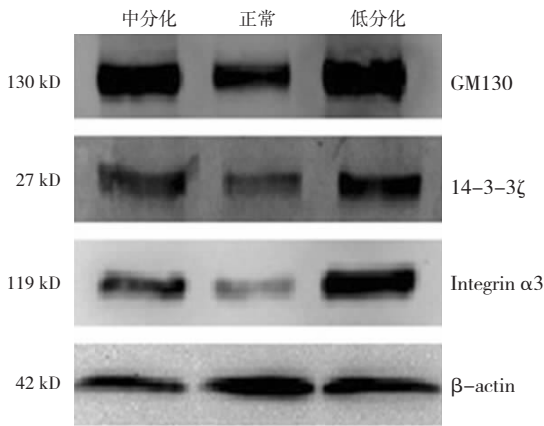


图 5 GM130、14-3-3ζ、Integrin α3 蛋白在各组的表达
Fig.5 Expression of GM130, 14-3-3ζ, Integrin α3 proteins in gastric cancer tissues and normal gastric tissues

3 讨论

高尔基体,又名高尔基复合体、高尔基器,是由数个扁平囊泡堆在一起形成的高度有极性的细胞器,普遍存在于真核细胞,主要功能是将内质网合成的蛋白质进行加工、分类、包装后送到细胞特定的部位或分泌到细胞外^[10]。有研究表明,高尔基体及其上的多种蛋白都参与了细胞分化及细胞间的信号传导,在细胞周期中扮演重要角色,与多种肿瘤的发生发展密切相关^[11-13],在胃肠癌的发生发展及生物学行为亦中起着重要作用^[14]。GM130 是定位于

高尔基体顺面并富含螺旋结构的外周膜蛋白^[15],它参与高尔基体结构的维持,在有丝分裂期间高尔基体的裂解和重组中起主要作用^[16-19];GM130 还参与糖基化的控制^[20]、细胞周期进程^[21]、细胞极化^[22]和趋化细胞的迁移^[23]。Chang 等^[5]的研究表明,下调 GM130 的表达,可使肺癌细胞侵袭力下降,抑制小鼠肺癌模型中肿瘤生长及肿瘤血管生成;Chen 和 Cho^[6]的研究证明,下调 SOK1 表达使 GM130 表达增加,导致乳腺癌细胞株 MCF-7 的迁移能力增强;此外,还有相关文献报道,GM130 的过表达,与宫颈癌^[1]、前列腺癌^[2]等肿瘤的浸润、转移亦有相关性。14-3-3 蛋白家族分子量在 28~33 kD 之间,是一组高度保守的酸性可溶性蛋白质,普遍存在于真核生物。14-3-3 蛋白家族能与含磷酸化丝氨酸或苏氨酸的肽段特异性结合,并参与多种信号转导途径。14-3-3 蛋白还参与包括细胞周期、增殖、凋亡、新陈代谢等多种细胞生命活动的调节,该蛋白家族的异常表达与多种疾病的发生发展密切相关^[24],与恶性肿瘤性疾病包括胃癌、肺癌、乳腺癌等的发生发展亦存在明显相关性^[3]。14-3-3 含 7 种亚基(β 、 ϵ 、 γ 、 η 、 θ 、 τ 、 ζ 和 σ)。Niemantsverdriet 等^[25]研究发现,14-3-3 ζ 蛋白可通过抑制 JNK 和 p38 活化,阻断细胞凋亡信号的传递,抑制细胞的凋亡;Danes 等^[7]研究发现,14-3-3 ζ 蛋白可通过 PI3K/Akt 依赖的 MDM2 磷酸化使 p53 降解,抑制 p53 诱导的细胞凋亡,促进肿瘤发生。整合素是由 α (120~185 kD)和 β (90~110 kD)2 个亚单位形成的异二聚体,为细胞黏附分子家族的重要成员之一,主要介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)之间的黏附,并介导细胞与 ECM 之间的双向信号传导。据报道,整合素 $\alpha 3$ 在乳腺癌^[8]、恶性胶质瘤^[9]、食管癌^[26]等肿瘤中均存在高表达,且与肿瘤浸润、转移等密切相关。

Preisinger 等^[4]研究发现,使 Hela 细胞 GM130 基因过表达导致其黏附和迁徙能力增加,这一结果与 GM130 对 14-3-3 ζ 及整合素的依次调控和其对于 P115、MST4 等的调控相关。因此,本研究采用免疫组化 SABC 法、RT-PCR、Western blot 分别检测中、低分化人胃癌组织及正常胃组织中 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin $\alpha 3$ 的蛋白及基因表达情况,初步探讨 GM130 在胃癌的发生发展中是否发挥作用及可能的作用机制。免疫组化结果显示三者在胃癌组织中的阳性表达率高于正常胃组织,在低分化胃癌组织

中表达较中分化胃癌组织强。经 Spearman 相关分析发现,GM130、14-3-3 ζ 、Integrin $\alpha 3$ 表达之间呈正相关。在 mRNA 的翻录水平发现,上述 3 个指标在胃癌组织中的表达高于正常胃组织,低分化胃癌组表达高于中分化胃癌组,与 Western blot 检测蛋白表达结果一致。

细胞内的信号分子结合到膜上受体,激活受体酪氨酸激酶,再激活下游的小 G 蛋白 Ras。Ras 参与 RAF-MEK-ERK 调节通路^[27]。被 Ras 激活的 RAF 激活下游的 MEK,MEK 进而激活 ERK,活化的 ERK 进入细胞核,磷酸化特定基因上的特定位点,调控转录。这一途径在细胞增殖、凋亡、分化等方面起着重要的作用。Rab1 为 Ras 家族成员之一,Rab1 与 GM130 相互作用,参与细胞内质网到高尔基体的物质运输^[28],维持正常的细胞周期。有研究表明^[29],在一些肿瘤细胞中 Rab1 与 GM130 均呈高表达;本研究发现胃癌组织 GM130 呈高表达,与文献报道相符;因此,GM130 的过表达使正常胃黏膜细胞细胞周期失控可能是胃癌细胞异常增殖的重要原因之一。细胞周期的调控,通过多种信号通路实现,其中丝氨酸侧链的磷酸化在细胞周期的调控中起重要作用。有文献报道^[30],14-3-3 ζ 与整合素家族存在相互作用,并通过此相互作用参与调控丝氨酸磷酸化途径,14-3-3 ζ 和整合素的过表达均可导致细胞异常增殖。Integrin $\alpha 3$ 为整合素家族成员之一。本研究检测到胃癌组织中 14-3-3 ζ 与 Integrin $\alpha 3$ 均呈高表达,且二者的表达呈正相关,因此,胃癌的发生发展可能与二者的过表达导致丝氨酸磷酸化途径异常有关。Chen 和 Cho 的研究^[6]发现,GM130 的过表达能导致 14-3-3 ζ 表达增高,使肿瘤细胞增殖、迁移能力增强。本研究发现胃癌组织中 GM130、14-3-3 ζ 和 Integrin $\alpha 3$ 均呈高表达,且三者呈正相关,提示 GM130 可能通过与 14-3-3 ζ 和 Integrin $\alpha 3$ 的相互作用来促进肿瘤细胞的增殖和迁移,但其相互作用的具体机制还有待进一步研究。许多研究报道 GM130^[1-2]、14-3-3 ζ ^[31]、Integrin $\alpha 3$ ^[8-9]与多种肿瘤的浸润转移有关,而本实验结果为与胃癌浸润深度及有无淋巴结转移无关,可能为样本量较小所致。

本实验通过研究 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin $\alpha 3$ 在胃癌和正常胃组织中的表达情况,初步认为 GM130、14-3-3 ζ 、Integrin $\alpha 3$ 的异常表达在肿瘤的发生发展中发挥作用,可为早期诊断和治疗胃癌及判断患者

预后提供一定理论依据。

参 考 文 献

- [1] Brandstaetter H, Kendrick Jones J, Buss F. Myo1c regulates lipid raft recycling to control cell spreading, migration and Salmonella invasion[J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 8): 1991–2003.
- [2] Friesland A, Zhao Y, Chen YH, et al. Small molecule targeting Cdc42–intersectin interaction disrupts Golgi organization and suppresses cell motility[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(4): 1261–1266.
- [3] Hermeking H. The 14–3–3 cancer connection[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(12): 931–943.
- [4] Preisinger C, Short B, De Corte V, et al. YSK1 is activated by the Golgi matrix protein GM130 and plays a role in cell migration through its substrate 14–3–3 zeta[J]. *J Cell Biol*, 2004, 164(7): 1009–1020.
- [5] Chang SH, Hong SH, Jiang HL, et al. GOLGA2/GM130, cis–Golgi matrix protein, is a novel target of anticancer gene therapy[J]. *Mol Ther*, 2012, 20(11): 2052–2063.
- [6] Chen XD, Cho CY. Downregulation of SOK1 promotes the migration of MCF–7 cells[R]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407(2): 389–392.
- [7] Danes CG, Wyszomierski SL, Lu J, et al. 14–3–3 zeta down-regulates p53 in mammary epithelial cells and confers luminal filling[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(6): 1760–1767.
- [8] Shirakihara T, Kawasaki T, Fukagawa A, et al. Identification of integrin $\alpha 3$ as a molecular marker of cells undergoing epithelial–mesenchymal transition and of cancer cells with aggressive phenotypes[J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(9): 1189–1197.
- [9] Makarov A, Yliviinka I, Nyman TA, et al. Ephrin–As, Eph receptors and integrin $\alpha 3$ interact and colocalise at membrane protrusions of U251MG glioblastoma cells[J]. *Cell Biol Int*, 2013, 37(10): 1080–1088.
- [10] Han HM, Bouchet–Marquis C, Huebinger J, et al. Golgi apparatus analyzed by cryo–electron microscopy[J]. *Histochem Cell Biol*, 2013, 140(4): 369–381.
- [11] Rabouille C, Jokitalo E. Golgi apparatus partitioning during cell division[J]. *Mol Membr Biol*, 2003, 20(2): 117–127.
- [12] Mukherjee S, Chiu R, Leung SM, et al. Fragmentation of the Golgi apparatus: an early apoptotic event independent of the cytoskeleton[J]. *Traffic*, 2007, 8(4): 369–378.
- [13] Jiang Y, Xie X, Zhang Y, et al. Regulation of G–protein signaling by RKTG via sequestration of the G beta gamma subunit to the Golgi apparatus[J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(1): 78–90.
- [14] 杨雅莹, 李艳青, 易永芬, 等. 高尔基体 α –甘露糖苷酶 II 在胃癌中的表达及其与 E–cadherin, Galectin–3 的关系[J]. *重庆医科大学学报*, 2010, 35(9): 1313–04.
- [15] Nakamura N. Emerging new roles of GM130, a cis–Golgi matrix protein, in higher order cell functions[J]. *J Pharmacol Sci*, 2010, 112(3): 255–264.
- [16] Lowe M. Structural organization of the Golgi apparatus[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2011, 23(1): 85–93.
- [17] Xiang Y, Wang Y. New components of the Golgi matrix[J]. *Cell Tissue Res*, 2011, 344(3): 365–379.
- [18] Kodani A, Kristensen I, Huang L, et al. GM130–dependent control of Cdc42 activity at the Golgi regulates centrosome organization[J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(4): 1192–1200.
- [19] Marra P, Salvatore L, Mironov A Jr, et al. The biogenesis of the Golgi ribbon: the roles of membrane input from the ER and of GM130[J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(5): 1595–1608.
- [20] Koreishi M, Gniadek TJ, Yu S, et al. The Golgin tether giantin regulates the secretory pathway by controlling stack organization within Golgi apparatus[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59821.
- [21] Maia AR, Zhu X, Miller P, et al. Modulation of Golgi–associated microtubule nucleation throughout the cell cycle[J]. *Cytoskeleton*, 2013, 70(1): 32–43.
- [22] Sun SC, Kim NH. GM130: new insights into oocyte asymmetric division[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(15): 2419.
- [23] Millarte V, Farhan H. The Golgi in cell migration: regulation by signal transduction and its implications for cancer cell metastasis[J]. *Scientific World Journal*, 2012(2012): 498278.
- [24] 孔令印, 张耀洲. 14–3–3 蛋白家族及其临床应用研究进展[J]. *生物工程学报*, 2007, 23(5): 781–788.
- [25] Niemantsverdriet M, Wag ner K, Vis ser M, et al. Cellular functions of 14–3–3 zeta in apoptosis and cell adhesion emphasize its oncogenic character[J]. *Oncogene*, 2008, 27(9): 1315–1319.
- [26] 朱小康, 朱自江, 陈学忠, 等. 整合素 $\alpha 3$ 和 Ki–67 在食管鳞状细胞癌中的表达及其与术后复发转移和预后的关系[J]. *蚌埠医学院学报*, 2012, 37(10): 1193–1197.
- [27] Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf–MEK–ERK mitogen–activated protein kinase cascade for the treatment of cancer[J]. *Oncogene*, 2007, 26(22): 3291–3310.
- [28] Wu G, Zhao G, He Y. Distinct pathways for the trafficking of angiotensin II and adrenergic receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface: Rab1–independent transport of a G protein–coupled receptor[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(47): 47062–47069.
- [29] Romero N, Dumur CI, Martinez H, et al. Rab1b overexpression modifies Golgi size and gene expression in HeLa cells and modulates the thyrotrophin response in thyroid cells in culture[J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(5): 617–632.
- [30] Bonet R, Vakonakis I, Campbell ID. Characterization of 14–3–3– ζ Interactions with Integrin Tails[J]. *J Mol Biol*, 2013, 425(17): 3060–3072.
- [31] Pan Y, Zhong LJ, Zhou H, et al. Roles of vimentin and 14–3–3 zeta/delta in the inhibitory effects of heparin on PC–3M cell proliferation and B16–F10–luc–G5 cells metastasis[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(6): 798–808.

(责任编辑: 唐宗顺)