论著

文章编号:1000-5404(2010)07-0688-04

人胃癌组织中 gp78 和 KAI1 表达水平及其临床意义

许福源[1],李 楠[1],柴 进[1],张艳梅[1],唐 波[2],牛嫣阳[2],彭志红[1],陈文生[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院:全军消化病研究所[1],普通外科[2])

[摘要] 目的 检测人正常胃黏膜及胃癌组织中 gp78 和 KAI1 表达水平并探讨两者在胃癌发生过程中的临床意义。**方法** 分别应用 Western blot 和免疫组织化学方法检测 18 例正常胃黏膜和 65 例胃癌组织中 gp78 和 KAI1 的表达情况。**结果** Western blot 结果表明,65 例胃癌组织中有 25 例(38.5%)gp78 水平升高,27 例(41.5%)KAI1 水平降低,其中 13 例(20.0%)既出现 gp78 水平升高又出现 KAI1 水平降低。与正常胃黏膜组织比较,胃癌组织中 gp78 的表达水平明显升高($P<0.01$),而 KAI1 的表达水平明显下调($P<0.01$)。免疫组织化学提示,65 例胃癌组织中 21 例(32.3%)gp78 阳性表达率升高,22 例(33.8%)KAI1 阳性表达率降低,其中 10 例(15.4%)既出现 gp78 阳性表达率升高又出现 KAI1 阳性表达率降低。Spearman 相关性分析表明,胃癌组织中 gp78 和 KAI1 表达水平呈现明显的负相关($r=-0.908$, $P<0.05$)。同时,随着淋巴转移、肿瘤浸润以及脉管浸润程度加重,胃癌组织中 gp78 表达水平明显升高,而 KAI1 表达水平显著降低。而在年龄、性别等因素上 gp78 和 KAI1 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** gp78 和 KAI1 在胃癌的发生、发展过程中起着重要的作用。gp78 的过表达导致抑癌基因 KAI1 的降解增多可能是胃癌浸润、转移的机制之一。

[关键词] 胃肿瘤;泛素蛋白连接酶类;肿瘤抑制蛋白质类;印迹法,蛋白质;免疫组织化学

[中图法分类号] R735.2; R394.2; R730.23 **[文献标志码]** A

Expressions of gp78 and KAI1 in human gastric carcinoma tissue and their clinical significance: report of 65 cases

Xu Fuyuan[1], Li Nan[1], Chai Jin[1], Zhang Yanmei[1], Tang Bo[2], Niu Yanyang[2], Peng Zhihong[1], Chen Wensheng[1] ([1]Gastroenterology Research Center, [2]Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] Objective To determine the expression levels of gp78 and KAI1 in human gastric carcinoma tissue and investigate their clinical significance in the development of gastric carcinoma. **Methods** Western blot analysis and immunohistochemical staining were employed to assay gp78 and KAI1 expressions in 18 samples of normal gastric mucosa and 65 samples of gastric carcinoma tissue. **Results** Western blotting results indicated that gp78 protein level was increased in 25 cases (38.5%) and KAI1 protein level was decreased in 27 cases (41.5%). Meanwhile, simultaneous increased gp78 and decreased KAI1 levels were detected in 13 cases (20.0%). Immunohistochemical results showed that gp78 level was up-regulated in 21 cases (32.3%), and KAI1 level was down-regulated in 22 cases (33.8%). Further, simultaneous increased gp78 and decreased KAI1 levels were found in 10 (15.4%) out of 65 cases. Spearman correlation assay suggested there was a significant negative correlation between gp78 and KAI1 expression ($r=-0.908$, $P<0.05$). Respectively, the expression level of gp78 and KAI1 was significantly enhanced and reduced along with the aggravation of lymphatic metastasis, tumor infiltration, and vessel infiltration. However, no statistical difference was seen in age and sex between groups ($P>0.05$). **Conclusion** Gp78 and KAI1 play important roles in the genesis and development of gastric carcinoma. Compared with the normal gastric mucosa tissue, the expressions of gp78 and KAI1 are remarkably up-regulated and down-regulated, respectively. In fact, overexpression of gp78 results in more degradation of KAI1, which might be responsible for infiltration and metastasis of gastric carcinoma.

[Key words] stomach neoplasms; ubiquitin-protein ligases; tumor suppressor proteins; blotting, western; immunohistochemistry

Corresponding author: Chen Wensheng, Tel: 86-23-68765183, E-mail: wenshengchen@hotmail.com

胃癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一,在我国其病死率位列恶性肿瘤之首,浸润转移则是其致死性的重要机制之一。肿瘤的浸润转移涉及众多癌基因和抑癌基因之间的平衡和相关转移基因的改变等,其转移过程包括肿瘤细胞的运动、黏附、新生血管的形成以及对基质的降解等。近来,大量研究表明,某些泛素连接

[通信作者] 陈文生,电话:(023) 68765183, E-mail: wenshengchen@hotmail.com

酶和肿瘤发生、发展以及转移过程密切相关[1-3]。KAI1是跨膜四超家庭(TM4SF)成员之一,研究表明KAI1通过影响细胞-细胞、细胞基质之间的相互作用,从而影响肿瘤细胞的转移和浸润和转移潜能[4]。Tsai等[3]研究发现,泛素连接酶gp78可靶向性作用于KAI1,增加KAI1的降解,从而减少KAI1的表达,增加肉瘤细胞系的转移潜能。

在本研究中,我们检测了泛素连接酶gp78及其靶向蛋白KAI1在不同胃组织中的表达水平,并探讨了两者在胃癌组织中的表达与相关临床病理参数的相关性,以期为临床胃癌的预防和判断提供有诊断意义的标记分子和胃癌浸润、转移治疗潜在的靶点。

1 资料与方法

1.1 临床资料

以2008年6月至2009年6月第三军医大学西南医院普通外科收治入院的65例胃癌患者为研究对象,外科手术切除标本,同时取离肿瘤组织>5 cm处的18例胃黏膜作为正常黏膜组织,所有标本经0.9%的生理盐水冲洗干净后置于液氮罐中保存备用。其中,胃癌组包括男性患者45例,女性患者20例,年龄(53±13)岁。所有胃癌患者术前未接受放疗和化疗处理。采用WHO组织学分型,高分化腺癌11例,中分化腺癌23例,低分化腺癌8例,黏液腺癌7例,印戒细胞癌6例;其中存在淋巴结转移39例,无淋巴结转移26例。

1.2 主要试剂和仪器

兔抗人gp78和KAI1多克隆抗体(Santa Cruz, USA),生物素标记羊抗兔IgG购自中杉金桥生物有限公司;凝胶成像系统、电泳仪、半干转膜仪(Bio-Rad,USA),CM-1900冰冻切片机、EM-1160包埋仪、DMLA显微镜、Win Stander V2.3全自动图像分析系统(Leica,德国)。

1.3 Western blot检测

取约150 mg样本组织置于玻璃匀浆器内,立即加入150 μl预冷的蛋白裂解液,玻璃匀浆棒磨碎,4 ℃、20 000×g离心15 min。采用BCA法对蛋白质进行定量,将提取液的蛋白浓度调整一致。随后各取50 μg蛋白经12%十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,采用半干电转法(20 V, 10 min)将目的蛋白转移至ECL膜上。

转膜结束后用含5%脱脂奶粉封闭2 h,TBS洗膜3次,每次5 min。随后分别加入兔抗人gp78多克隆抗体(78×10^3, 1∶3 000)、KAI1多克隆抗体(30×10^3,1∶2 000)、GAPDH单克隆抗体(40×10^3,1∶3 000)、β-actin单克隆抗体(43×10^3, 1∶2 000),4 ℃孵育12 h。TBS洗膜2次,每次5 min。随后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(1∶3 000),4 ℃孵育2 h,TBS洗膜4次,每次20 min,化学发光试剂盒显色,曝光,对gp78或KAI1表达情况进行检测。GAPDH、β-actin分别作为内参照。

结果判断:以gp78的灰度值与GAPDH的灰度值的比值表示gp78蛋白相对表达水平;以KAI1的灰度值与β-actin的灰度值的比值表示KAI1蛋白相对表达水平。

1.4 免疫组织化学检测

对胃癌组织标本行冰冻切片后,行常规石蜡包埋,制成4 μm厚切片,二甲苯脱蜡水化后,3% H_2O_2灭活内源性酶。PBS洗3次,30 s/次。分别与一抗(兔抗人gp78、KAI1多克隆抗体,1∶1 000)、二抗(生物素标记羊抗兔IgG,1∶500)及辣根过氧化物酶标记的链霉素亲和素复合物(1∶400)孵育。PBS洗33次,1 min/次,随后苏木精复染10 min,水洗、分化、蓝化、脱水、透明并固定于普通光学显微镜下观察。

结果判定标准参见文献[5]:gp78、KAI1蛋白主要定位于细胞膜和部分细胞质内,gp78、KAI1阳性为细胞膜和胞质内出现棕褐色颗粒,于高倍镜(×400)下随机观察3个视野,以阳性细胞百分率和染色强度为判定标准。深棕色,阳性细胞数占50%以上为(+++);棕色颗粒较深,阳性细胞占26%~50%为(++);阳性细胞占10%~25%为(+);阳性细胞数少于10%为阴性。

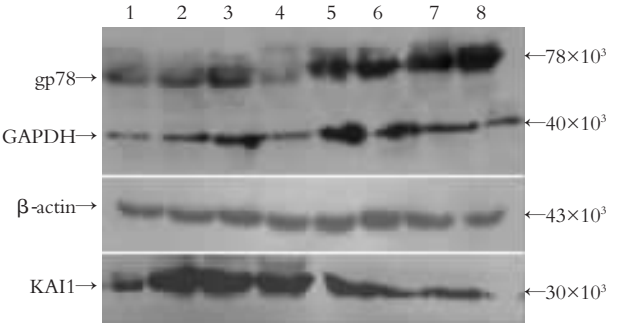
1.5 统计学处理

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件进行数据分析,2组间比较采用t检验,率的比较采用χ^2检验,并采用Spearman相关性分析。

2 结果

2.1 Western blot检测不同胃组织中gp78、KAI1蛋白表达水平

结果提示,65例胃癌组织中25例(38.6%)gp78水平升高,27例(41.3%)KAI1水平降低,13例(20.0%)既出现gp78水平升高又出现KAI1水平降低。相对于正常胃黏膜组织,胃癌组织中gp78蛋白表达水平明显升高($P<0.01$),而KAI1蛋白表达水平明显降低($P<0.01$)。见图1,表1。



1~4:正常对照组;5~8:胃癌组

图1 Western blot检测不同胃组织中gp78、KAI1蛋白表达水平

表1 不同胃组织中gp78、KAI1蛋白相对表达水平

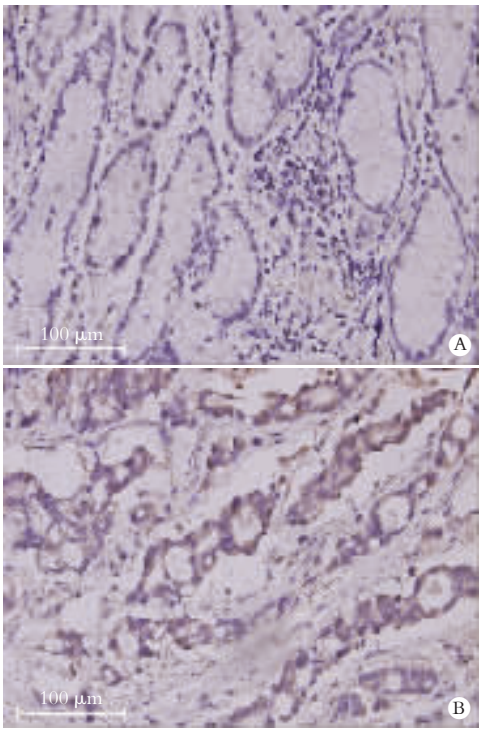
组织	n	gp78/GAPDH	KAI1/β-actin
正常胃黏膜组织	18	1.563±0.435	2.252±0.365
胃癌组织	65	3.014±0.678[a]	0.876±0.028[a]

a:$P<0.01$,与正常胃黏膜组织比较

2.2 免疫组织化学检测不同胃组织中阳性gp78、KAI1蛋白表达情况

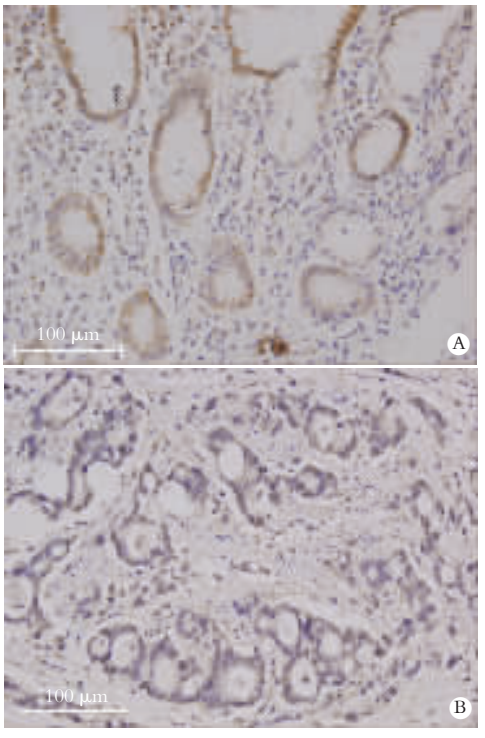
65例胃癌组织中21例(32.3%)gp78阳性表达率升高,22例(33.8%)KAI1阳性表达率降低,其中10例(15.4%)既出现gp78阳性表达率升高又出现KAI1阳性表达率降低。阳性表达的gp78主要为胃腺上皮细胞膜出现棕黄色颗粒沉着,同时在

少数细胞质内也可见到棕黄色颗粒。在正常胃黏膜组织中，gp78阳性表达率较低（图2A），而在胃癌组织中，gp78呈现强阳性表达（图2B）；阳性表达的KAI1也主要为腺上皮细胞膜出现棕黄色颗粒，在部分胞质中也可见棕黄色颗粒。在正常胃黏膜组织中，KAI1阳性表达率较高（图3A），而胃癌组织中KAI1表达率则明显减少（图3B）。



A：正常胃黏膜组织；B：胃癌组织

图2 免疫组织化学检测不同胃组织中gp78蛋白表达 （SABC）



A：正常胃黏膜组织；B：胃癌组织

图3 免疫组织化学检测不同胃组织中KAI1蛋白表达 （SABC）

2.3 胃癌组织中gp78、KAI1蛋白表达与相关临床参数的相关性

胃癌组织中gp78、KAI1蛋白表达与淋巴转移、肿瘤浸润程度以及脉管浸润存在着密切关系（表2），而与年龄、性别无关（表2）；Spearman相关性分析表明，胃癌组织中gp78和KAI1表达水平呈现明显的负相关（$r = -0.908$，$P < 0.05$），即gp78的过表达导致KAI1降解增多，表达减少。

表2 胃癌组织中gp78、KAI1蛋白表达与相关临床参数的相关性［例数（%）］

临床参数	n	gp78		KAI1	
		阴性	阳性	阴性	阳性
年龄（岁）					
< 50	31	22(71.0)	9(29.0)	21(67.7)	10(32.3)
≥ 50	34	23(67.6)	11(32.4)	22(64.7)	12(35.3)
性别					
男性	45	29(64.4)	16(35.6)	30(66.7)	15(33.3)
女性	20	14(70.0)	6(30.0)	13(65.0)	7(35.0)
淋巴结转移					
无	38	27(71.1)	11(28.9)[a]	17(45.7)	21(55.3)[b]
有	27	17(63.0)	10(37.0)	21(77.8)	6(22.2)
浸润程度					
浆膜层	20	14(70.0)	6(30.0)[c]	11(55.0)	9(45.0)[c]
肌层	22	15(69.2)	7(31.8)[c]	12(59.1)	9(40.9)[c]
黏膜层	23	13(56.5)	10(43.5)	18(77.3)	5(22.7)
脉管侵犯					
无	41	32(78.0)	9(22.0)[d]	25(61.0)	16(39.0)[d]
有	24	16(59.3)	10(41.7)	19(79.2)	5(20.8)

a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与有淋巴结转移比较；c：$P < 0.01$，与黏膜层比较；d：$P < 0.01$，与有脉管侵犯比较

3 讨论

KAI1基因定位于人染色体11p11.2，是一段全长2.4 kb的DNA片段，早先被证明是前列腺癌转移抑制基因。其编码一个相对分子质量为29 610的蛋白质——KAI1蛋白。事实上，人们研究发现，KAI1蛋白结构与CD82完全相同[6,7]。KAI1蛋白是TM4SF成员之一，其具有4个疏水跨膜区和一个较大的胞外亲水区，在胞外亲水区中则含有3个潜在的N端糖基化位点。

大量研究表明，KAI1蛋白参与细胞与细胞-细胞与细胞-外基质间的反应，并可与肿瘤细胞表面黏附受体的结合，通过封闭黏附受体、阻断肿瘤细胞黏附从而抑制肿瘤细胞的转移[6-8]。在本研究中我们发现，在胃癌组织中KAI1的表达水平较正常胃黏膜明显下调。同时，存在淋巴结转移的胃癌组织中KAI1蛋白的表达率显著低于无淋巴结转移者，均提示KAI1在胃癌淋巴结转移的发生、发展过程中起着十分重要的作用。此外，本研究还观察到随着浸润程度的升高，胃癌组织中KAI1表达水平越低，提示KAI1具有抑制胃

癌的浸润和转移的作用,同时低表达的 KAI1 可能通过促进肿瘤细胞的黏附和增加肿瘤细胞的运动性而参与胃癌的发展[9,10]。

事实上,我们的研究结果与 Hinoda 等[11]所报道的基本一致。Hinoda 等[11]研究发现,KAI1 阳性胃癌患者的肝转移率或淋巴转移率或较阴性患者低;而我们的结果却与 Lee 等[12]的结果存在着矛盾。Lee 等[12]运用 RT-PCR 检测鼠结肠腺癌的肺、肝转移时发现,转移组较野生型 KAI1 基因组表达明显增多,提示 KAI1 的表达与肿瘤的转移、浸润无关。分析其原因,我们推测翻译后修饰可能导致了该差异的产生。

gp78 也被称为肿瘤自分泌运动因子受体,它是一个跨膜蛋白。其表达水平与肿瘤的转移密切相关。研究表明[13],gp78 是内质网(ER)环指结构为基础的泛素蛋白连接酶(E3)。gp78 可特异性地募集 MmUBC7,而 MmUBC7 是一种泛素蛋白连接酶(E2),可通过指环的一个特定区域参与了内质网相关的降解。更为重要的是,gp78 也能介导 CD3δ 的降解,而 CD3δ 则是 ER 相关降解最具特征的底物。相反,当 gp78 缺少紧密的指环和多重的跨膜区域时,CD3δ 的稳定性大大提高。因此,gp78 被认为是泛素化、ER 降解以及肿瘤转移潜在的枢纽。

泛素只是一个 76 个氨基酸残基组成的小分子可溶性蛋白质,在多数真核细胞中以大量存在,细胞中一半的泛素多与蛋白质存在偶联。蛋白质泛素-蛋白酶体降解途径包括两个组成部分:首先是泛素与一系列关联酶协同作用,把目标蛋白质泛素化,使蛋白质变性并标记,使之为蛋白酶体所识别;随后是 26S 的蛋白酶体复合物降解泛素化的蛋白质,同时释放出游离的泛素,使之循环使用。

Morito 等[14]与 Tsai 等[3]均研究证实,gp78 可通过泛素蛋白连接酶 E2 促进内质网降解,从而促进肿瘤的浸润和转移。在本研究中,我们发现,胃癌组织中 gp78 蛋白的表达水平较正常胃黏膜明显增加,且 gp78 蛋白的表达与淋巴结转移、浸润程度以及脉管侵犯存在明显正相关。更为重要的是,gp78 蛋白的表达与 KAI1 蛋白的表达存在着明显负性相关,即 gp78 蛋白表达得越多,则其靶向蛋白 KAI1 的降解也越多,KAI1 的表达也随之减少。KAI1 抑制效应的减弱导致使肿瘤细胞定位、黏附和运动能力得到恢复,从而加重了肿瘤的浸润和转移。事实上,对于 gp78 增加肿瘤的浸润和转移的具体机制,还有待于进一步扩大样本数进行调查。

综上所述,胃癌组织中 KAI1/gp78 在胃癌的发生及浸润转移中都发挥着十分重要的作用,检测胃癌组织中的 KAI1 以及 gp78 蛋白的表达水平对评估胃癌的侵袭、转移具有一定的临床意义。同时以 gp78 为靶点的策略,也为临床针对胃癌的浸润、转移的治疗提供一种有益尝试。

参考文献:

[1] Bromberg K D, Kluger H M, Delaunay A, *et al*. Increased expression of the E3 ubiquitin ligase RNF5 is associated with decreased survival in breast cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67(17): 8172-8179.

[2] Chen C, Sun X, Guo P, *et al*. Ubiquitin E3 ligase WWP1 as an oncogenic factor in human prostate cancer[J]. Oncogene, 2007, 26(16): 2386-2394.

[3] Tsai Y C, Mendoza A, Mariano J M, *et al*. The ubiquitin ligase gp78 promotes sarcoma metastasis by targeting KAI1 for degradation[J]. Nat Med, 2007, 13(12): 1504-1509.

[4] Uzawa K, Ono K, Suzuki H, *et al*. High prevalence of decreased expression of KAI1 Metastasis suppressor in human oral carcinogenesis [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(3): 828-835.

[5] Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer[J]. Am J Pathol, 1995, 147(1): 9-19.

[6] Malik F A, Sanders A J, Jiang W G. KAI-1/CD82, the molecule and clinical implication in cancer and cancer metastasis[J]. Histol Histopathol, 2009, 24(4): 519-530.

[7] Liu W M, Zhang X A. KAI1/CD82, a tumor metastasis suppressor [J]. Cancer Lett, 2006, 240(2): 183-194.

[8] Yu G Z, Chen Y, Ni C R, *et al*. Reduced protein expression of metastasis-related genes (nm23, KISS1, KAI1 and p53) in lymph node and liver metastases of gastric cancer[J]. Int J Exp Path, 2007, 88 (3): 175-183.

[9] Miranti C K. Controlling cell surface dynamics and signaling: how CD82/KAI1 suppresses metastasis[J]. Cell Signal, 2009, 21(2): 196-211.

[10] Sridhar S C, Miranti C K. Tetraspanin KAI1/CD82 suppresses invasion by inhibiting integrin-dependent crosstalk with c-Met receptor and Src kinases[J]. Oncogene, 2006, 25(16): 2367-2378.

[11] Hinoda Y, Adachi Y, Takaoka A, *et al*. Decreased expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in gastric cancer[J]. Cancer Lett, 1998, 129(2): 229-234.

[12] Lee J H, Seo Y W, Park S R, *et al*. Expression of a splice variant of KAI1, a tumor metastasis suppressor gene, influences tumor invasion and progression[J]. Cancer Res, 2003, 63(21): 7247-7255.

[13] Fang S, Ferrone M, Yang C, *et al*. The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(25): 14422-14427.

[14] Morito D, Hirao K, Oda Y, *et al*. Gp78 cooperates with RMA1 in endoplasmic reticulum-associated degradation of CFTRDeltaF508[J]. Mol Biol Cell, 2008, 19(4): 1328-1336.

(**收稿**:2009-10-10;**修回**:2009-11-27)

(编辑 张 维)