基础研究 文章编号:0253-3626(2010)09-1313-04

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

杨雅莹,李艳青,易永芬,何婷婷,肖 钟
(重庆医科大学基础学院病理学教研室、分子医学与肿瘤研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨胃癌高尔基体 α-甘露糖苷酶Ⅱ(Golgi α-mannosidase Ⅱ,GMⅡ)、E-cadherin、Galectin-3 的表达及其与胃癌发生发展的关系。方法:应用免疫组化 SP 法检测 65 例胃癌,20 例正常胃黏膜组织中 GMⅡ、E-cadherin、Galectin-3 的表达情况。结果:65 例胃癌中 GMⅡ、E-cadherin、Galectin-3 的阳性表达率分别为 85%(55/65)、40%(26/65)、74%(48/65)。20 例胃正常切缘中 GMⅡ、E-cadherin、Galectin-3 的阳性表达率分别为 50%(10/20)、100%(20/20)、40%(8/20)。GMⅡ、Galectin-3 在浸润程度深及有淋巴结转移的胃癌组织中表达明显高于浸润程度浅及无淋巴结转移的胃癌组织($P<0.05$)。而 E-cadherin 则在分化程度低,浸润程度深及有淋巴结转移的胃癌组织中表达明显低于分化程度高,浸润程度浅及无淋巴结转移的胃癌组织($P<0.05$)。统计学分析 GMⅡ与 E-cadherin 之间呈负相关($P<0.05$),与 Galectin-3 无相关性($P>0.05$)。结论:GMⅡ、Galectin-3 在胃癌中高表达,且与癌组织的浸润和转移明显相关。同时 GMⅡ与 E-cadherin 呈负相关,提示 GMⅡ可能通过下调 E-cadherin 的表达来促进胃癌的发展。

【关键词】胃癌高尔基体 α-甘露糖苷酶Ⅱ;E-cadherin;Galectin-3;胃癌;免疫组化
【中国图书分类法分类号】R361 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-26

Significance of golgi α-mannosidase Ⅱ, E-Cadherin, Galectin-3 expression and their correlation in human gastric carcinoma

YANG Ya-ying, et al
(*Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of GM Ⅱ, E-cadherin, and Galectin-3, and their roles in tumorigenesis and progression of gastric cancer. *Methods*: Immunohistochemistry SP method was used to determine expression of GM Ⅱ, E-cadherin, and Galectin-3 in gastric carcinoma (n=65) and normal gastric mucosa (n=20). *Results*: The positive rates of GM Ⅱ, E-cadherin, and Galectin-3 were respectively 85%(55/65), 40%(26/65), and 74%(48/65) in gastric cancer; their were respectively 50%(10/20), 100%(20/20), and 40%(8/20) in normal gastric mucosa. The expressions of GM Ⅱ, E-cadherin, and Galectin-3 were significantly different between tissues from carcinoma and those from normal mucosa ($P<0.05$). The expressions of GM Ⅱ and E-cadherin were significantly related to poor differentiation, deep invasion and lymph node metastasis. GM Ⅱ expression had a negative correlation with E-cadherin ($P<0.05$), but no correlation with galectin-3($P>0.05$). The expression of galectin-3 was markedly related to the depth of invasion, lymph node metastasis, but not to tumor differentiation. *Conclusion*: Up-regulated expression of GM Ⅱ, Galectin-3 play important roles in the invasion and metastasis of gastric carcinoma. There is a significant negative correlation between GM Ⅱ and E-cadherin, suggesting that GM Ⅱ may promote the development of gastric carcinoma through down-regulating expression of E-cadherin.

【Key words】GMⅡ; E-cadherin; Galectin-3; Gastric carcinoma; Immunohistochemistry

蛋白质的 N-糖基化是一种重要的翻译后修饰过程,对真核生物的生长发育是必不可少的,高尔基体 α-甘露糖苷酶Ⅱ(Golgi alpha-mannosidase Ⅱ,GMⅡ)是 N-聚糖加工过程中的关键酶,特异的剪切 GlcNAcMan5GlcNAc2 上 α-1,3、α-1,6 连接的甘露糖[1]。经报道在乳腺,结肠及皮肤癌中,细胞表面复合糖结构的改变与癌症的恶化,转移,预后不良有关,而这种改变是与异常的 N-聚糖途径相关,所以推测 GMⅡ将成为抗癌治疗的一个目标[2]。前期研究工作中还发现高

作者单位:杨雅莹(1979-),女,讲师,硕士,研究方向:消化道肿瘤病理。
通讯作者:易永芬,女,教授,E-mail:yiyongfen1953@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金(编号:30672431);教育部博士点基金(编号:20060631006)。

分泌水解酶的、易发生浸润转移的胃癌中电镜下见到高尔基体丰富，而 GMⅡ是高尔基体的标志酶，推测 GMⅡ可能与胃癌的发生发展有关。故本研究运用免疫组化 SP 法检测高尔基体标志酶 GMⅡ在胃癌组织中的表达情况，以及它与糖蛋白分子 E-cadherin，Galectin-3 之间的关系。初步探讨高尔基体在胃癌发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 临床资料

收集 2008 年 1 月份至 2009 年 1 月份重庆医科大学附属第一医院普外科接受胃癌根治手术（术前未接受化放疗）的组织标本 65 例，男性 30 例，女性 35 例；年龄 25~80 岁，平均年龄 52 岁；胃癌中肿块直径≥4 cm 36 例，<4 cm 29 例；侵及黏膜及黏膜下层者 10 例，侵及肌层及浆膜层者 55 例；有局部淋巴结转移者 34 例，无淋巴结转移者 31 例；术后病理学类型分析，高中分化 30 例，低分化 35 例。正常胃黏膜组织 20 例取自胃癌手术切除标本的正常切缘，经组织学证实无癌组织浸润。

1.2 主要试剂

兔抗人 E-cadherin，Galectin-3 单克隆抗体均购自北京中杉生物公司；羊抗人 MAN2A1（人 GMⅡ基因）多克隆抗体购自 santa cruz 公司；SP 及 DAB 试剂盒购自北京中杉生物公司。

1.3 方法

收集标本用 10%甲醛固定 24 h，常规石蜡包埋，连续切片（厚 4 μm），做免疫组化染色，免疫组织化学染色依照 SP 试剂盒说明书操作，PBS 代替一抗做阴性对照。具体操作步骤如下：①石蜡切片用二甲苯脱蜡，梯度酒精脱水；②蒸馏水冲洗，PBS 冲洗 3 次；③抗原修复：将切片浸于枸橼酸盐缓冲液（pH 6.0），置微波炉中高火加热 5 min，再中高火 10 min，放至室温自然冷却，后用蒸馏水冲洗，PBS 冲洗 3 次；④3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶，室温孵育 10 min；⑤蒸馏水冲洗，PBS 冲洗 3 次；⑥滴加正常血清，室温孵育 20 min；⑦倾去血清（勿洗）滴加适当比例稀释的一抗或一抗工作液，37℃孵育 2 h；⑧蒸馏水冲洗，PBS 冲洗 3 次；⑨滴加生物素标记的二抗工作液，37℃孵育 20 min；⑩PBS 冲洗 3 次；⑪滴加链霉菌抗生素－过氧化酶溶液，37℃孵育 20 min；⑫PBS 冲洗 3 次；⑬DAB 显色（显微镜下观察染色结果）；⑭自来水充分冲洗，苏木精复染；⑮脱水，透明，封片。

1.4 判断标准

结果判定采用二级记分法，400 倍光学显微镜下每张切片至少观察 5 个视野，计算阳性细胞百分率，取其平均值记分：<5% 为 0 分，5%～24% 为 1 分，25%～49% 为 2 分，50%～74% 为 3 分，≥75% 为 4 分；染色强度记分方法为：无着色为 0 分，淡黄色为 1 分，黄色或深黄色为 2 分，褐色或深褐色为 3 分，再按这 2 项指标的积分相加将结果分为 4 级：0 分为“-”；1～2 分为“+”；3～4 分为“++”；5～6 分为“+++”，其中“++”“+++”为强阳性表达。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 11.0 软件进行分析，采用 χ^2 检验和列联表分析，以 $P<0.05$ 判定差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 GMⅡ，E-cadherin，Galectin-3 蛋白在胃癌组织和正常胃黏膜组织中的表达

GMⅡ阳性染色位于胞浆，为均匀一致的棕黄色颗粒（见图 1、2），65 例胃癌组织中阳性染色为 55 例（85%），20 例正常胃黏膜组织中阳性染色为 10 例（50%）。E-cadherin 阳性染色在正常上皮细胞位于细胞膜上，而在癌组织中则胞浆胞膜均有表达，为棕黄色颗粒（见图 3、4），65 例胃癌组织中阳性染色为 26 例（40%），20 例正常胃黏膜组织中阳性染色为 20 例（100%）。Galectin-3 阳性染色主要在上皮细胞的胞浆，在癌组织也可见胞核阳性，为棕黄色颗粒（见图 5、6），65 例胃癌组织中阳性染色为 48 例（74%），20 例正常胃黏膜组织中阳性染色为 8 例（40%）。

经 χ^2 检验，胃癌组和正常组年龄、性别具有可比性。胃癌组织中 GMⅡ，E-cadherin，Galectin-3 蛋白的表达与正常胃黏膜组织中的表达差异具有统计学意义（$P<0.05$），见表 1。

由表 2 可知 GMⅡ和 Galectin-3 在 T3~T4 期胃癌组织的表达明显高于 T1~T2 期胃癌组（$P<0.05$），在有淋巴结转移组表达明显高于无淋巴结转移组（$P<0.05$），且 GMⅡ在低分化胃癌组织的表达要明显高于中高分化胃癌组（$P<0.05$），而 Galectin-3 在不同分化胃癌组织中的表达无明显差异（$P>0.05$）。E-cadherin 在低分化胃癌组织的表达要明显低于中高分化胃癌组（$P<0.05$），在 T3~T4 期胃癌组织的表达明显低于 T1~T2 期胃癌组（$P<0.05$），在有淋巴结转移组表达明显低于无



图 1 GMⅡ在胃中低分化腺癌中的强阳性表达（SP×400）

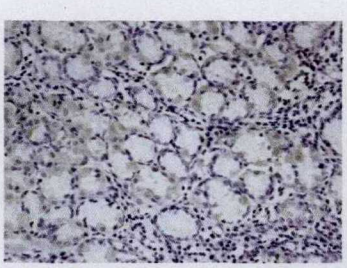


图 2 GMⅡ在正常胃黏膜中的弱阳性表达（SP×400）



图 3 E-cadherin 在胃低分化腺癌中的弱阳性表达（SP×400）

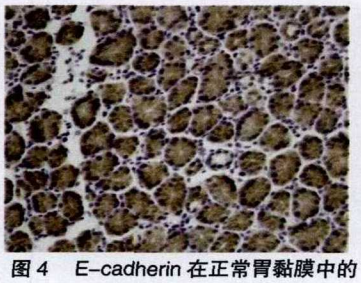


图 4 E-cadherin 在正常胃黏膜中的阳性表达（SP ×400）



图 5 Galectin-3 在胃低分化腺癌中的强阳性表达（SP ×400）

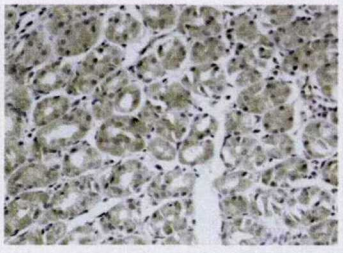


图 6 Galectin-3 在正常胃黏膜中的阳性表达（SP ×400）

表 1 胃癌组和正常组均衡检验及 GM Ⅱ、E-cadherin、Galectin-3 蛋白的表达差异分析

指标		胃癌组	正常组	P 值
性别	男	30	8	0.628
	女	35	12	
年龄	<60	32	7	0.264
	≥60	33	13	
GM Ⅱ	阳性	55	10	0.005
	阴性	10	10	
E-cadherin	阳性	26	20	0.000
	阴性	39	0	
Galectin-3	阳性	48	8	0.008
	阴性	17	12	

注：$P<0.05$ 为差异有统计学意义

表 2 胃癌 GM Ⅱ，E-cadherin，Galectin-3 的表达与临床参数的关系

病理参数	n	GM Ⅱ			E-cadherin			Galectin-3		
性别										
男	30	24	6	0.542	12	18	0.800	22	8	0.931
女	35	31	4		14	21		26	9	
年龄（岁）										
<60	32	27	5	0.771	13	19	0.879	24	8	0.835
≥60	33	28	5		13	20		24	9	
癌大小										
<4 cm	29	25	4	0.979	10	19	0.576	20	9	0.422
≥4 cm	36	30	6		16	20		28	8	
分化程度										
高中分化	32	23	9	0.014	20	12	0.001	21	11	0.137
低分化	33	32	1		6	27		27	6	
浸润深度										
T1+T2	10	4	6	0.000	9	1	0.002	3	7	0.002
T3+T4	55	51	4		17	38		45	10	
淋巴结转移										
无转移	29	21	8	0.036	18	11	0.003	13	16	0.000
转移	36	34	2		8	28		35	1	

注：$P<0.05$ 为差异有统计学意义

表 3 GMⅡ、E-cadherin、Galectin-3 在胃组织中表达的相关性分析

项目	GMⅡ		Gamma 系数	P 值
	阳性	阴性		
E-cadherin				
阳性	28	18	-0.845	0.000
阴性	37	2		
Galectin-3				
阳性	45	11	0.296	0.261
阴性	20	9		

注:$P<0.05$ 为差异有统计学意义

淋巴结转移组($P<0.05$)。同时 3 种蛋白在不同年龄,不同性别及不同癌组织大小的胃癌组织中表达差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 GMⅡ,E-cadherin,Galectin-3 之间的相关性

列联表分析显示,GMⅡ 与 E-cadherin 之间存在相关性($P<0.05$),Gamma 系数为 -0.845,说明二者之间呈负相关。GMⅡ 与 Galectin-3 之间则无明显相关性($P>0.05$),见表 3。

3 讨 论

α-甘露糖苷酶是蛋白质 N-糖基化修饰中关键性糖苷酶,它通过剪切 N-糖链甘露糖残基而在聚糖从高甘露糖型转化成复杂型结构中起着重要的作用。迄今为止,已克隆的 α-甘露糖苷酶 cDNA 有二十多种,其中来自人类的有 6 种。GMⅡ在哺乳动物组织中分布广泛,它位于高尔基体的反面和中间体,分子量约为 132 kD,其 cDNA 与鼠科动物的相近,位于 5 号染色体。GMⅡ分子中含有糖基水解酶家族 38(Glycosylhydrolase family 38)的保守序列,因此能特异性的剪切 GlcNAcMan5GlcNAc2 上 α-1,3 和 α-1,6 连接的甘露糖残基[3,4]。细胞表面的许多糖蛋白分子的修饰都与此酶有关,可被其特异性抑制剂苦马豆素抑制。在对晚期癌症病人的初步临床试验中,给病人口服苦马豆素后,明显的抑制了肿瘤的生长和转移[5-7],由此提示 GMⅡ可能与癌症的发生发展有关,而抑制 GMⅡ也可能成为抗肿瘤治疗的新靶点。但 GMⅡ在胃癌侵袭和转移中的作用机制目前鲜见报道。故本实验检测 GMⅡ在胃癌中的表达及其与 E-cadherin 和 Galectin-3 的关系,拟初步探讨其在胃癌发生发展中的作用及机制。其实验结果显示 GMⅡ在胃癌中明显高于正常胃黏膜组织,分化程度越低表达量越高,而且有淋巴结转移的比没有转移的表达要高,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。这说明 GMⅡ在胃癌的发生发展、浸润转移中可能扮演着重要的角色。

E-cadherin 是一类主要介导细胞间同质粘附的钙依赖性跨膜糖蛋白,是细胞粘附分子中的一种,参与形成和维护正常细胞间的连接。阳性表达有抑制肿瘤转移的功能[8]。当 E-cadherin 表达下降或缺失,细胞间的相互粘附力下降,造成细胞容易分散而向外周浸润性生长,近年来通过在乳腺癌、甲状腺乳头状癌、膀胱癌、前列腺癌、大肠癌及鼻咽癌等肿瘤的研究中证实,E-adherin 表达降低与癌的分化、侵袭和转移有显著的相关性[9]。本实验检测 20 例胃正常黏膜组织,全部阳性表达,而 65 例胃癌组织中有 39 例异常表达,从 E-cadherin 与胃癌临床病理特征资料分析,分化程度越差,表达量越低,而且有淋巴结转移的癌组织表达量更少,各组间差异均具有统计学意义。本实验通过软件对 GMⅡ与 E-cadherin 进行相关性分析得出二者呈负相关,差异具有统计学意义。朱立平等曾在对 6A8 α-甘露糖苷酶(人 α-甘露糖苷酶之一)的研究中发现,6A8 α-甘露糖苷酶抑制后,E-cadherin的表达明显增强,同时鼻咽癌细胞的转移能力降低。提示 GMⅡ可能是通过下调 E-cadherin 的表达促进胃癌浸润转移[10]。

Galectin-3 是一种可溶性的内源性凝集素,具有多种生物学功能,包括肿瘤细胞的粘附、增值、分化、凋亡以及癌症的浸润转移。Suzuki O 等报道 GMⅡ抑制后所引起的细胞表面糖蛋白 N-糖基化改变参与了由 galectin-3 诱导的弥漫大 B 细胞淋巴瘤的凋亡等。Galectin-3 主要表达于细胞质中,在许多癌细胞中胞核阳性者也常见[11-13]。本实验的免疫组化结果显示 Galectin-3 在胃癌组织中的表达明显高于胃正常粘膜组织;浸润程度深及发生淋巴结转移的组织中的表达明显高于浸润程度浅及未发生淋巴结转移的组织,差异具有统计学意义。

综上所述,胃癌细胞中高表达 GMⅡ和 Galectin-3 及 E-cadherin 表达降低与侵袭和转移有关。GMⅡ是糖蛋白翻译后修饰的重要酶类,经分析 GMⅡ与 E-cadherin 之间存在明显相关性,提示 GMⅡ可能通过下调 E-cadherin 的表达来促进胃癌的发展,但具体的分子机制待进一步深入的研究。

参 考 文 献

[1] Elsen J M H V D, Kuntz D A, Rose D R, et al. Structure of GMⅡ: a target for inhibition of growth and metastasis of cancer cells [J]. EMBO, 2001, 20(12): 3008-3017.

[2] Shah N, Kuntz D A, Rose D R, et al. Golgi alpha-mannosidase Ⅱ cleaves two sugars sequentially in the same catalytic site[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(28): 9570-9575.

[3] Kuntz D A, Tarling C A, Withers S G, et al. Structural analysis of Golgi alpha-mannos-idase Ⅱ inhibitors identified from a focused glycosi-

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)09-1317-04

FSHR 胞外区抗原的二级结构预测和 B 细胞表位预测

申子刚[1],阎 萍[2],何 畏[2],陈正琼[2],何海洋[1],张 记[1],杨 霞[1],吴玉章[1],梁志清[2],李晋涛[1]
(1.第三军医大学免疫学教研室;2.第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

【摘 要】目的:分析卵泡刺激素受体(Follicle stimulating hormone receptor,FSHR)胞外区蛋白的二级结构,在线预测 FSHR 胞外区潜在的 B 细胞表位。方法:利用 DNAStar Protein 软件对 FSHR 胞外区蛋白的二级结构和表面特性进行分析,联合在线 B 细胞表位预测,预测 FSHR 胞外区蛋白可能的抗原表位。合成预测的 B 细胞表位肽,对其抗原性进行鉴定。结果:FSHR 胞外区蛋白可能的抗原表位区域为 17~34、42~44、116~122、142~147、179~193、239~241、266~270、279~282、288~307。选择 4 个区域合成肽段表位区域能与免疫抗血清发生抗原特异性反应。结论:应用多参数成功预测了 FSHR 胞外区蛋白抗原的 B 细胞表位。

【关键词】FSHR 胞外区;B 细胞表位;二级结构;抗原性
【中国图书分类法分类号】R34 【文献标记码】A 【收稿日期】2010-03-30

Prediction of the secondary structure and the B cell epitope of the extracellular domain of FSHR

SHEN Zi-gang, et al
(*Department of Immunology, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To predict the secondary structure and the B cell epitope for the extracellular domain of the follicle stimulating hormone receptor (FSHR). *Methods*: The secondary structure and surface properties of the extracellular domain of FSHR, such as physical and chemical properties, hydrophilicity, accessibility, antigenicity and plasticity, were analyzed by a variety of methods. The peptide of the epitopes was synthesized and used for coating streptavidin plate. The immunogenicity of the peptides was determined. *Results*: Many distinct antigenic epitopes in the extracellular domain of FSHR were identified by computation and online prediction, the possible location of which is in the regions of 17~34、42~44、116~122、142~147、179~193、239~241、266~270、279~282、288~307. Synthesized peptides have high specificity to the polyclonal antiboby. *Conclusion*: The B cell epitope for the extracellular domain of FSHR is successfully predicted.

【Key words】Follicle stimulating hormone receptor; B cell epitope; The secondary stuctuer; Antigentic

作者介绍:申子刚(1980-),男,硕士,研究方向:病毒免疫学。
通讯作者:李晋涛,女,教授,E-mail: ljtqms@yahoo.com.cn。
基金项目:国家科技支撑计划资助项(编号:2006BAI03B12),国家自然基金资助项目(编号:30400402, 30571708)。

dase inhibitor screen[J]. Biochemistry, 2008, 47(38): 10058-10068.
[4] Kuntz D A, Zhong W, Guo J, et al. The molecular basis of inhibition of Golgi alpha-mannosidase Ⅱ by mannostatin A[J]. Chembiochem, 2009, 10(2): 268-277.
[5] Crispin M, Chang V T, Harvey D J, et al. A human embryonic kidney 293T cell line mutated at the Golgi alpha-mannosidase Ⅱ locus[J]. J Biol Chem, 2009, 284(32): 21684-21695.
[6] Sun J Y, Yang H, Miao S, et al. Suppressive effects of swainsonine on C6 glioma cell in vitro and in vivo[J]. Phytomedicine, 2009, 16(11): 1070-1074.
[7] Hamaguchi J, Nakagawa H, Takahashi M, et al. Swainsonine reduces 5-fluorouracil tolerance in the multistage resistance of colorectal cancer cell lines[J]. Mol Cancer, 2007, 6: 58.
[8] Lazăr D, Tăban S, Ardeleanu C, et al. The immunohistochemical expression of E-cadherin in gastric cancer; correlations with clinicopathological factors and patients' survival[J]. Rom J Morphol Embryol, 2008, 49(4): 459-467.
[9] 冉俊涛,周永宁,唐承薇,等.塞来昔布术前干预对人胃癌组织 E 钙粘蛋白表达的影响[J].癌症, 2009, 28(4): 361-365.
[10] 陈双玲,时 岩,朱立平,等.6A8a-甘露糖苷酶表达减弱和表达正常鼻咽癌细胞间的差异基因表达[J].中国医学科学院学报, 2005, 27(3): 305-310.
[11] Wang Y, Nangia-Makker P, Tait L, et al. Regulation of prostate cancer progression by galectin-3[J]. Am J Pathol, 2009, 174(4): 1515-1523.
[12] 石 菲,彭贵勇,孙永刚,等.Galectin-3 在食管鳞癌中的表达及其临床意义[J].第三军医大学学报, 2008, 30(11): 1062-1065.
[13] Suzuki O, Abe M. Cell surface N-glycosylation and sialylation regulate galectin-3-induced apoptosis in human diffuse large B cell lymphoma[J]. Oncol Rep, 2008, 19(3): 743-748.

(责任编辑:冉明会)