

抑癌基因 GKN2 在胃癌中的表达及其临床意义

毛苇 陶力 赵心恺 孔灿灿 邝继孙 邱敏霞

【摘要】 目的 检测抑癌基因 GKN2 在人胃癌组织中的表达并探讨其临床意义。方法 选取 70 例胃癌组织及其相应的癌旁正常组织标本, 利用 RT-PCR 法检测 GKN2 的 mRNA 表达。另外选取 70 例胃癌组织和 70 例正常人胃组织标本, 利用免疫组织化学法检测 GKN2 的蛋白表达。结果 GKN2 mRNA 在癌旁正常胃组织中阳性表达率为 100%, 高于胃癌组织的 10% ($\chi^2 = 63.00, P < 0.001$)。GKN2 蛋白分布在正常胃黏膜上皮细胞的胞浆内, 在正常胃组织中 GKN2 蛋白表达阳性率为 100%, 高于胃癌组织的 7% ($\chi^2 = 121.33, P < 0.001$)。结论 抑癌基因 GKN2 在正常胃黏膜中高表达, 但是在胃癌中表达下调甚至缺失, 这可能是导致胃癌发生的重要因素。

【关键词】 胃癌; GKN2; 抑癌基因

Expression level and clinical significance of tumor suppressor gene GKN2 in gastric cancer Mao Wei, Tao Li, Zhao Xinkai, Kong Cancan, Kuang Jisun, Qiu Minxia. Department of Endoscopy Center, Hainan General Hospital, Haikou 570311, China

Corresponding author, Mao Wei, E-mail: weim@vip.163.com

【Abstract】 Objective To measure the expression level and investigate the clinical significance of tumor suppressor gene GKN2 in human gastric cancer tissues. **Methods** The expression level of GKN2 mRNA was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in the gastric cancer and adjacent normal tissues of 70 cases. The expression level of GKN2 protein in the gastric cancer of another 70 cases and normal gastric tissue of 70 cases was measured by immunohistochemistry. **Results** The positive rate of GKN2 mRNA expression in the adjacent normal gastric tissues was 100%, significantly higher compared with 10% in the gastric cancer tissues ($\chi^2 = 63.00, P < 0.001$). GKN2 protein was distributed in the cytoplasm of normal gastric mucosal epithelial cells. The positive rate of GKN2 protein expression in the normal human gastric tissues was 100%, significantly higher than 7% in the gastric cancer tissues ($\chi^2 = 121.33, P < 0.001$). **Conclusions** The tumor suppressor gene GKN2 is highly expressed in the normal gastric mucosa, whereas it is down-regulated or even absent in the gastric cancer, which is probably a pivotal factor leading to the incidence of gastric cancer.

【Key words】 Gastric cancer; GKN2; Tumor suppressor gene

胃癌是全球高发的恶性肿瘤, 居我国肿瘤发病率的第二位和肿瘤病死率的第三位^[1]。胃癌的发病机制目前尚不完全清楚, 但原癌基因的激活及抑癌基因的失活是其病变过程中的重要因素。现在已经发现多个特异性基因可能会在胃癌的发病过程中起到重要作用, 其中抑癌基因 Gastrokine 2 (GKN2) 最近受到较多关注。GKN2 属于 Gastrokine 家族, 其特点是家族成员编码的分泌蛋白中均含有一个保守的 BRICHOS 结构域^[2-3]。BRICHOS 结构域是一

个保守蛋白结构域, 它由约 100 个氨基酸组成, 其保守序列主要位于一对可形成二硫键并发挥蛋白折叠作用的半胱氨酸周围。目前发现含有 BRICHOS 结构域的蛋白与一系列重大的疾病相关, 如 BRI2 与家族性痴呆有关; ChM-1 与软骨肉瘤相关; SP-C 与呼吸窘迫综合征相关; GKN1 与胃癌相关^[4-5]。本研究旨在通过比较 GKN2 在人胃癌组织和正常胃组织中的表达情况, 探讨 GKN2 在胃癌发生过程中的表达调节, 为进一步研究 GKN2 在胃癌中的抑癌

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2018.07.006

基金项目: 广东省科技计划项目 (2012B061700077); 海南省自然科学基金 (817303)

作者单位: 570311 海口, 海南省人民医院内镜中心 (毛苇, 赵心恺, 孔灿灿, 邝继孙, 邱敏霞); 510630 广州, 中山大学附属第三医院消化内科 (陶力)

通讯作者, 毛苇, E-mail: weim@vip.163.com

机制提供基础。

材料与amp;方法

一、材料

1. 组织标本

1.1 实时定量 PCR (RT-PCR) 标本

选取 2013 年 1 月至 2014 年 12 月由中山大学附属第三医院外科提供的 70 例胃癌组织及其相应的癌旁正常组织, 所有标本均取自胃癌手术患者并通过组织病理学检查确认。其中男 62 例、女 8 例, 年龄(59.4 ± 7.6)岁。

1.2 组织芯片标本

另外选取 70 例来源于中山大学附属第三医院的胃癌病灶手术标本用于组织芯片, 其中男 59 例、女 11 例, 年龄(61.6 ± 6.6)岁, 所有胃癌患者术前均未接受化学治疗和放射治疗。同时选取 70 例来源于内镜中心的正常胃黏膜标本, 男 59 例、女 11 例, 年龄(61.0 ± 6.0)岁。2 组性别构成、年龄比较差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。

本研究获得医院医学伦理委员会批准, 患者均签署知情同意书。

2. 主要试剂

GKN2 兔抗人单克隆抗体购自 Abnova 公司; β -actin 鼠抗人单克隆抗体 (BA2305) 购自博士德公司; 二步法抗兔/鼠通用型免疫组化检测试剂盒购自 DAKO 公司; RNeasy Mini Kit 购自 Quiagen 公司; ReverTra Ace- α -TM-RT-PCR Kit 购自 TOYOBO 公司。

二、实验方法

1. PCR 法

1.1 总 RNA 提取

使用 RNeasy Mini Kit, 根据说明书操作。液氮冷冻条件下将组织研磨成粉末状, 将其移入预先准备好的含 350 μ l RLT 液的离心管中, 用组织分散机分散组织粉末, 5 ml 一次性注射器反复抽打 10 次, 4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 转/分离心 5 min, 将上清液移入 1.5 ml 离心管。加入同等体积 (约 350 μ l) 70% 乙醇液, 充分混匀后, 全部移入吸附柱中, 12 000 转/分离心 15 s, 倒掉收集管内的液体。加入 700 μ l 的 RW1 液, 12 000 转/分离心 15 s, 倒掉收集管内的液体。先后两次加 RPE 液入吸附柱内, 12 000 转/分分别离心 15 s 和 2 min, 均弃去收集管内的液体。将吸附柱移入一新的 2 ml 收集管内, 12 000 转/分离心 2 min。将吸附柱移入一新的 1.5

ml 收集管内, 加入 50 μ l RNase-free 水, 12 000 转/分离心 1 min。经紫外分光光度计测定判断后将所得 RNA 存储于 -80° C 备用。

1.2 逆转录合成 cDNA

使用 ReverTra Ace- α -TM-RT-PCR Kit, 根据说明书操作。在 0.5 ml Eppendorf 管中加入中 RNA 1 μ g, 5 \times RT Buffer 4 μ l、Random Primer (25 pmol/ μ l) 1 μ l、10 μ mol/L dNTP 2 μ l、Rever Tra Ace 逆转录酶 1 μ l, 再用 RNase-Free H₂O 调整至总反应体系 20 μ l, 充分混匀。将离心管置于 PCR 仪, 设置程序如下: 30 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 20 min, 99 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 5 min。反应结束后将离心管瞬间离心, 所得 cDNA 储存于 -20° C 冰箱备用。

1.3 PCR 扩增

使用 Primer 5.0 软件设计引物: 正向引物 5'-GTGGCATT TTTGGTGGTG-3'; 反向引物 5'-CATTGT-TGCTTGGGCTGA-3', 交由 Invitrogen 公司合成^[6]。PCR 扩增根据说明书操作。反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C 5 min, 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 53 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 28 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。PCR 扩增完毕后, 取扩增产物 10 μ l 混合上样缓冲液 2 μ l 充分混匀, 用 1% 琼脂糖凝胶在 100 V 稳压下电泳 40 min, 电泳完毕后使用紫外线凝胶成像仪观察。

2. 免疫组织化学检查 (免疫组化)

2.1 组织芯片制备

从病理科调取原始标本石蜡块, 复习病理诊断及选取芯片打孔位置。比对带有打孔标记的切片, 在供体蜡块上的相应部位打孔采集组织芯片, 将组织芯片转移到受体蜡块的孔中, 将组织芯片快速连续切片 20 张, 每张约厚 4 μ m。

2.2 免疫组化染色

将所得组织芯片切片 60 $^{\circ}$ C 烤片, 二甲苯脱蜡 10 min \times 3 次, 梯度浓度乙醇 (100%, 95%, 85%, 75%, 70%) 脱水各 5 min, 蒸馏水洗 5 min \times 3 次。切片置于 10 mmol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 6.0) 中, 微波加热 (95 $^{\circ}$ C, 10 min) 修复抗原, 室温下自然冷却后磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 min \times 3 次。切片置于 0.3% 过氧化氢室温孵育 15 min 以阻断内源性过氧化物酶, 后 PBS 洗 5 min \times 3 次。正常山羊血清封闭液室温孵育 10 min。滴加一抗室温孵育 1 h (GKN2 一抗浓度 1:300)。滴加二抗 (HRP 标记的即用型二抗工作液) 室温孵育 30 min。DAB 显色, 苏木素复染, 中性树胶封片。

三、统计学处理

利用 SPSS 19.0 软件分析数据,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用独立样本 t 检验;计数资料以百分率表示,组间比较用 χ^2 检验或配对 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、胃癌组织和癌旁正常组织的 GKN2 mRNA 对比

RT-PCR 结果显示, GKN2 mRNA 在癌旁正常组织中全部高表达,阳性率为 100%; GKN2 mRNA 在胃癌组织中仅有 7 例表达但表达明显下调,其余表达缺失,阳性率为 10%。胃癌组织和癌旁正常组织 GKN2 mRNA 阳性表达率差异有统计学意义($\chi^2 = 63.00, P < 0.001$),见图 1。

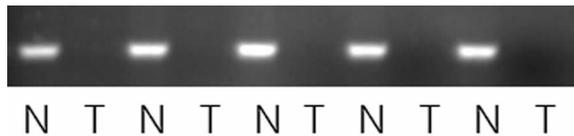


图 1 胃癌组织和癌旁正常组织中 GKN2 mRNA 的表达
N: 癌旁正常组织; T: 胃癌组织

二、胃癌组织和正常胃组织的 GKN2 蛋白表达对比

免疫组化结果显示, 70 例正常胃组织的 GKN2 呈强染色, 分布在正常胃黏膜上皮细胞的胞浆内, 阳性率为 100%。而 70 例胃癌组织标本中, 仅有 5 例呈弱阳性表达, 其余 65 例均表达缺失, 阳性率为 7%。胃癌组织和正常胃组织的 GKN2 蛋白阳性表达率差异有统计学意义($\chi^2 = 121.33, P < 0.001$), 见图 2。

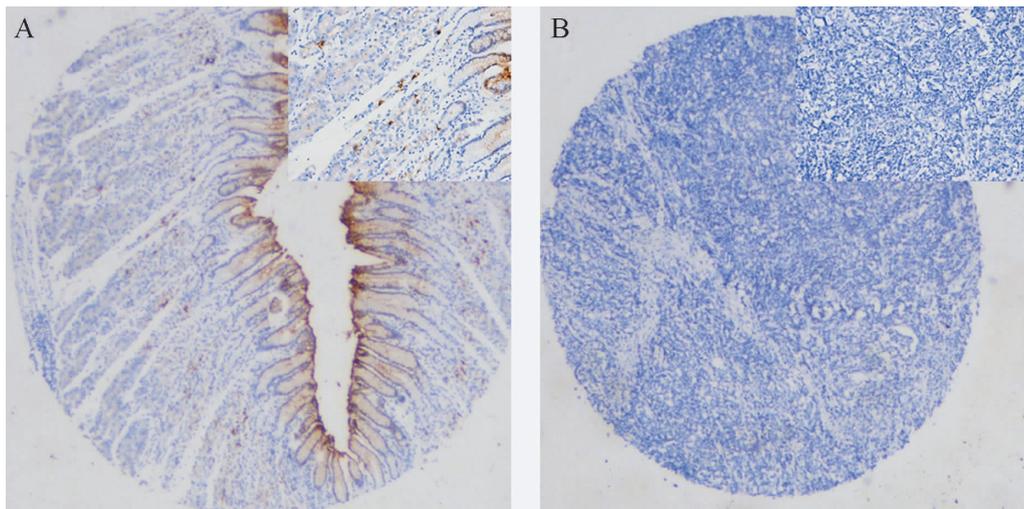


图 2 正常胃组织和胃癌组织的 GKN2 蛋白表达

A: GKN2 蛋白在正常胃组织中高表达(免疫组化, $\times 40$); B: GKN2 蛋白在胃癌组织中表达缺失(免疫组化, $\times 40$); 小图 $\times 100$

讨 论

GKN2 只特异性地表达于正常胃黏膜上皮细胞, 非胃上皮组织均无表达^[7]。本研究显示, GKN2 主要表达于腺体的中上部分, 以胃黏膜表面的上皮细胞最为明显, 越往深部其在腺体中的表达越弱。这与 GKN1 的表达分布十分相似, 我们推测 GKN2 也可能通过胞吐的方式分泌出去, 构成胃上皮黏液层的一部分抵御损害, 并促进受损胃黏膜的修复。有研究显示, 在胃黏膜炎性反应过程中, GKN2 起着胃黏膜保护作用, 能够抑制幽门螺杆菌对胃黏膜的炎性损害, 避免胃黏膜进入癌变过程^[8]。这提示 GKN2 能够维护胃黏膜上皮的完整性

并促进受损的胃黏膜进行修复。GKN2 还可与 TFF1 形成二聚体在正常胃黏膜中表达。而 TFF1 在胃中起着胃黏膜保护因子的作用, 能够增强胃黏膜上皮防御酸和食物诱发损伤的能力; 诱发细胞移行的信号传导途径, 促进细胞移行从而促进受损黏膜重建; 促进胃上皮细胞分化, 帮助细胞内蛋白的折叠^[9-10]。因此推测 GKN2 在胃中也扮演类似的黏膜保护作用。

本研究结果显示, GKN2 在正常胃黏膜细胞中高表达, 但是在胃癌组织中表达明显下调甚至缺失。有研究报道 GKN2 在胃癌细胞株、胃肠上皮化生组织和胃组织中表达明显下降或缺失^[11-12]。这与我们的结果相似, 提示 GKN2 的表达缺失可能是

胃癌发生的重要因素。Moss 等^[13]研究了 155 个远端胃腺癌中 GKN2 的表达趋势,发现 GKN2 在大多数胃癌组织中表达缺失或明显下降;而且 GKN2 的表达缺失在临床中可作为提示患者生存期缩短的一个独立预测指标。目前已经证实 GKN2 能够通过促进胃癌细胞的凋亡,抑制胃癌细胞的增殖和侵袭发挥,抑制上皮间质化等抑癌作用。其能够激活包括 JAK/STAT、PI3K/AKT/GSK3 β 、NF- κ B 等在内的信号通路发挥作用^[14]。GKN2 与 TFF1 形成的二聚体也在胃癌中表达下降^[15]。而 TFF1 已经被证实是在胃黏膜中具有抑癌作用,TFF1 通过调节经典的 cyclinD1-CDKs-CKIs-pRb-E2F 通路,延迟肿瘤细胞从 G1 到 S 期的转化,从而抑制肿瘤细胞增殖^[16]。因而 GKN2 与 TFF1 二聚体表达的缺失也可能是参与了胃癌发生的进程。

综上所述,GKN2 在正常胃黏膜中高表达,但是在胃癌中表达下调甚至缺失,这可能是导致胃癌发生的重要因素。

参 考 文 献

- [1] Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer*, 2001, 37 (Suppl 8): S4-S66.
- [2] Sanchez-Pulido L, Devos D, Valencia A. BRICHOS: a conserved domain in proteins associated with dementia, respiratory distress and cancer. *Trends Biochem Sci*, 2002, 27 (7): 329-332.
- [3] Menheniott TR, O' Connor L, Chionh YT, D? britz J, Scurr M, Rollo BN, Ng GZ, Jacobs S, Catubig A, Kurklu B, Mercer S, Minamoto T, Ong DE, Ferrero RL, Fox JG, Wang TC, Sutton P, Judd LM, Giraud AS. Loss of gastrokine-2 drives pre-malignant gastric inflammation and tumor progression. *J Clin Invest*, 2016, 126 (4): 1383-1400.
- [4] Mao W, Chen J, Peng TL, Yin XF, Chen LZ, Chen MH. Downregulation of gastrokine-1 in gastric cancer tissues and restoration of its expression induced gastric cancer cells to apoptosis. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31: 49.
- [5] Kim O, Yoon JH, Choi WS, Ashktorab H, Smoot DT, Nam SW, Lee JY, Park WS. Gastrokine 1 inhibits gastrin-induced cell proliferation. *Gastric Cancer*, 2016, 19 (2): 381-391.
- [6] Shi LS, Wang H, Wang F, Feng M, Wang M, Guan WX. Effects of gastrokine-2 expression on gastric cancer cell apoptosis by activation of extrinsic apoptotic pathways. *Mol Med Rep*, 2014, 10 (6): 2898-2904.
- [7] Baus-Loncar M, Lubka M, Pusch CM, Otto WR, Poulosom R,

- Blin N. Cytokine regulation of the trefoil factor family binding protein GKN2 (GDDR/TFIZ1/blottin) in human gastrointestinal epithelial cells. *Cell Physiol Biochem*, 2007, 20 (1-4): 193-204.
- [8] Otto WR, Patel K, McKinnell I, Evans MD, Lee CY, Frith D, Hanrahan S, Blight K, Blin N, Kayademir T, Poulosom R, Jeffery R, Hunt T, Wright NA, McGregor F, Oien KA. Identification of blottin: a novel gastric trefoil factor family-2 binding protein. *Proteomics*, 2006, 6 (15): 4235-4245.
- [9] Rodrigues S, Attoub S, Nguyen QD, Bruyneel E, Rodrigue CM, Westley BR, May FE, Thim L, Mareel M, Emami S, Gespach C. Selective abrogation of the proinvasive activity of the trefoil peptides pS2 and spasmodic polypeptide by disruption of the EGF receptor signaling pathways in kidney and colonic cancer cells. *Oncogene*, 2003, 22 (29): 4488-4497.
- [10] Ruchaud-Sparagano MH, Westley BR, May FE. The trefoil protein TFF1 is bound to MUC5AC in human gastric mucosa. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61 (15): 1946-1954.
- [11] Dai J, Zhang N, Wang J, Chen M, Chen J. Gastrokine-2 is downregulated in gastric cancer and its restoration suppresses gastric tumorigenesis and cancer metastasis. *Tumour Biol*, 2014, 35 (5): 4199-4207.
- [12] Antas VI, Brigden KW, Prudence AJ, Fraser ST. Gastrokine-2 is transiently expressed in the endodermal and endothelial cells of the maturing mouse yolk sac. *Gene Expr Patterns*, 2014, 16 (2): 69-74.
- [13] Moss SF, Lee JW, Sabo E, Rubin AK, Rommel J, Westley BR, May FE, Gao J, Meitner PA, Tavares R, Resnick MB. Decreased expression of gastrokine 1 and the trefoil factor interacting protein TFIZ1/GKN2 in gastric cancer: influence of tumor histology and relationship to prognosis. *Clin Cancer Res*, 2008, 14 (13): 4161-4167.
- [14] Dai J, Qian C, Su M, Chen M, Chen J. Gastrokine-2 suppresses epithelial mesenchymal transition through PI3K/AKT/GSK3 β signaling in gastric cancer. *Tumour Biol*, 2016, 37 (9): 12403-12410.
- [15] May FE, Griffin SM, Westley BR. The trefoil factor interacting protein TFIZ1 binds the trefoil protein TFF1 preferentially in normal gastric mucosal cells but the co-expression of these proteins is deregulated in gastric cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41 (3): 632-640.
- [16] Bossenmeyer-Pourie C, Kannan R, Ribieras S, Wendling C, Stoll I, Thim L, Tomasetto C, Rio MC. The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis. *J Cell Biol*, 2002, 157 (5): 761-770.

(收稿日期: 2018-03-04)

(本文编辑: 郑巧兰 杨江瑜)