

GOLPH3、VEGF 在胃癌组织中的表达及其相互关系

产世鑫, 孟翔凌, 吴文涌

摘要 目的 通过检测胃癌组织中高尔基体磷酸化蛋白 3 (GOLPH3) 与血管内皮生长因子 (VEGF) 表达水平, 探讨二者在胃癌进展中的相互关系。方法 通过免疫组织化学 SP 法检测 55 例经手术切除的胃癌组织及相应癌旁组织中 GOLPH3 和 VEGF 蛋白的表达情况。GOLPH3 与 VEGF 在胃癌组织中表达相关性采用 Pearson 相关性分析。结果 GOLPH3 及 VEGF 在胃癌组织中的阳性表达率分别为 67.27%、58.18%, 显著高于相应癌旁组织的 18.18%、23.64%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。GOLPH3、VEGF 在胃癌组织中的表达与患者性别、年龄、肿瘤大小等均无显著相关性, 与浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期有显著相关性 ($P < 0.05$)。免疫组织化学结果显示在 GOLPH3 阳性表达组的胃癌组织中, VEGF 阳性表达率为 75.68%, 明显高于 GOLPH3 阴性表达组的 22.22%, 胃癌组织中 GOLPH3 表达与 VEGF 的表达呈正相关性 ($r = 0.508, P < 0.01$)。结论 GOLPH3 过表达可能通过上调 VEGF 的表达调节胃癌血管生成, 从而影响胃癌的浸润和转移。

关键词 胃癌; 高尔基体磷酸化蛋白 3; 血管内皮生长因子; 血管生成

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)01-0086-04

胃癌严重危害着人类健康和生命, 其发病率占全球恶性肿瘤的第 4 位, 因胃癌导致的肿瘤相关死亡率仅次于肺癌, 在世界上排第 2 位^[1]。尽管胃癌的手术治疗、化学治疗、放射治疗以及相关靶向治疗近些年取得了巨大进展, 但是胃癌患者的预后仍然较差, 这可能与胃癌的早期症状不明显、患者的就诊率低、缺乏有效便利的普查筛选手段, 从而导致胃癌患者发现时大部分即为进展期有很大的关系。因此提高胃癌的早期诊断率、明确胃癌的发生发展机制以及采取相应的治疗措施对胃癌患者的诊治有着重

要意义。高尔基体磷酸化蛋白 3 (Golgi phosphoprotein 3, GOLPH3) 是对高尔基体进行蛋白质组学分析时发现的, 是一种从酵母到人类都高度保守的蛋白质^[2]。2009 年 Scott et al^[3] 通过 RNAi 基因敲除和 cDNA 过表达的研究发现 GOLPH3 是一个具有转化和激活能力的癌基因。Hu et al^[4] 研究发现胃癌组织中 GOLPH3 的相对表达量与胃癌的浸润深度、淋巴结转移、远处转移、临床预后等相关。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是目前已知的肿瘤血管生成过程中特异性最强的促血管生长因子, 其表达与胃癌的发展及预后密切相关^[5]。然而针对 GOLPH3 与 VEGF 在胃癌组织内表达关系的研究国内外报道罕见。该研究通过免疫组织化学方法检测胃癌组织中 GOLPH3 与 VEGF 蛋白表达情况, 探讨两者在胃癌组织中表达相关性, 从而为胃癌的病理诊断及治疗提供理论依据和新思路。

1 材料与方法

1.1 病例资料 随机选取 2012 年 1 月~12 月安徽医科大学第一附属医院普通外科行胃癌根治性切除手术患者胃癌组织及相应癌旁正常组织各 55 例。所有患者术前均未行放化疗及其他治疗, 术前及术后均行组织病理学检查确诊及明确临床病理分期。男 43 例, 女 12 例; 年龄 17~80 岁 (58.84 ± 11.16) 岁, 其中 ≥ 60 岁 22 例, < 60 岁 33 例; 肿瘤最大直径 ≥ 5 cm 者 29 例, < 5 cm 者 26 例; 分化程度: 高、中分化共 22 例, 低分化共 33 例; 浸润深度: 侵犯浆膜者 37 例, 未侵犯浆膜者 18 例; 淋巴结转移情况: 发生淋巴结转移 39 例, 未发生淋巴结转移 16 例; 临床病理分期根据 2010 年国际抗癌联盟 (UICC) 和美国癌症联合会 (AJCC) 共同公布的胃癌 TNM 分期: 其中 I/II 期患者 24 例, III/IV 期患者 31 例。患者临床病理资料均完整。

1.2 主要试剂 兔抗人 GOLPH3 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司; 兔抗人 VEGF 单克隆抗体、生物素标记的羊抗兔 IgG 抗体、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶 (SP) 免疫组化试剂盒、二氨基联苯

2015-10-13 接收

基金项目: 安徽省科技攻关项目 (编号: 07010300196); 安徽省高等学校博士学科点专项科研基金联合资助项目 (编号: 20133420120006)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院普通外科, 合肥 230022

作者简介: 产世鑫, 男, 硕士研究生;

孟翔凌, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: xianglingm@medmail.com.cn

(DAB) 显色剂等购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 实验方法 将石蜡包埋的组织行连续切片,切片厚度 $4\ \mu\text{m}$ 。所有切片经二甲苯脱蜡,梯度浓度乙醇水化,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,微波法行抗原修复;3% 过氧化氢溶液浸泡 30 min 灭活组织内源性过氧化物酶,滴加非免疫性动物血清封闭,置切片于 $37\ ^\circ\text{C}$ 湿箱内孵育 30 min,滴加一抗,即抗 GOLPH3 抗体或 VEGF 抗体,置于 $4\ ^\circ\text{C}$ 湿箱内孵育过夜;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,滴加辣根过氧化物酶标记的二抗覆盖组织, $37\ ^\circ\text{C}$ 湿箱内孵育 30 min;滴加新配置的 DAB 显色液,显微镜下观察最佳显色时间,自来水冲洗后行苏木精细胞核复染,0.1% 盐酸酒精浸泡 3 min,自来水冲洗,PBS 返蓝;脱水干燥,中性树脂封片,显微镜观察结果。

1.4 染色结果判断 双盲情况下,由两名病理科医师分别对每张标本切片进行染色强度和细胞阳性率进行双评分。细胞质或细胞核染色深度:基本不着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕色为 3 分。每例随机观察 5 个高倍镜($\times 400$)视野,阳性表达细胞比例:基本不着色为 0 分, $<10\%$ 为 1 分, $10\% \sim 35\%$ 为 2 分, $36\% \sim 70\%$ 为 3 分, $>70\%$ 为 4 分。两者得分相乘, >4 分为阳性表达, ≤ 4 分为阴性表达。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件进行分析。GOLPH3 及 VEGF 在胃癌组织及癌旁组织表达的关系、GOLPH3 及 VEGF 与胃癌各临床病理特征之间的关系采用 χ^2 检验,胃癌组织中 GOLPH3 表达与 VEGF 表达的相关分析采用 Pearson 相关性分析。

2 结果

2.1 胃癌组织及相应癌旁组织中 GOLPH3、VEGF 的表达情况 GOLPH3 主要定位于细胞质,呈棕黄色颗粒(图 1A1),在胃癌组织中阳性表达率 67.27%,明显高于癌旁组织的 18.18%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。VEGF 主要定位于细胞质,呈棕黄色颗粒(图 1B1),在胃癌组织中阳性表达率 58.18%,明显高于癌旁组织的 23.64%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 GOLPH3 与 VEGF 在胃癌及癌旁组织的表达情况(n)

项目	n	GOLPH3		χ^2 值	P 值	VEGF		χ^2 值	P 值
		+	-			+	-		
癌组织	55	37	18	27.082	<0.05	32	23	13.576	<0.05
癌旁组织	55	10	45			13	42		

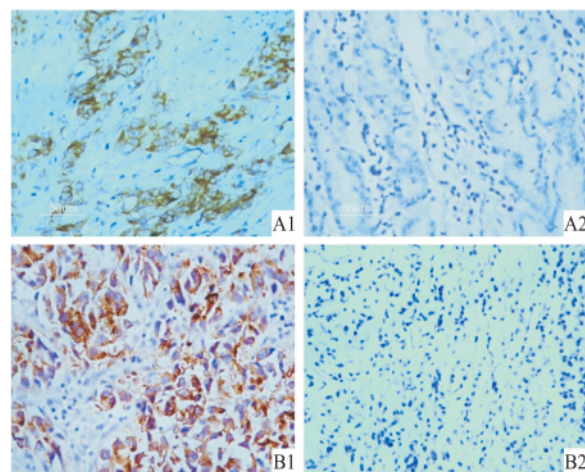


图 1 GOLPH3 与 VEGF 在胃癌组织中的表达 $\times 400$

A: GOLPH3; B: VEGF; 1: 阳性表达; 2: 阴性表达

2.2 GOLPH3、VEGF 表达分别与胃癌各临床病理特征之间的关系 胃癌组织中 GOLPH3、VEGF 的表达与患者的性别、年龄和肿瘤大小无相关性,而与胃癌的分化程度、浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期相关。GOLPH3、VEGF 在高、中分化胃癌组织阳性表达率分别为 78.79%、72.73%,明显高于低分化胃癌组织的 50.00%、33.33% ($P < 0.05$)。GOLPH3、VEGF 在侵犯浆膜的胃癌组织阳性表达率分别为 81.08%、70.27%,明显高于未侵犯浆膜的 38.89%、33.33% ($P < 0.05$); GOLPH3、VEGF 在有淋巴结转移的胃癌组织阳性表达率分别为 84.62%、74.36%,明显高于无淋巴结转移的 25.00%、18.75% ($P < 0.01$); TNM 分期 I / II 期、III / IV 期患者 GOLPH3 的阳性表达率分别为 37.50%、90.32% ($P < 0.01$),VEGF 在 TNM 分期 I / II 期、III / IV 期患者的阳性表达率分别为 25.00%、83.87% ($P < 0.01$)。见表 2。

2.3 GOLPH3 与 VEGF 在胃癌组织中表达的相关性 免疫组化结果显示,在 GOLPH3 阳性表达组的胃癌组织中,VEGF 阳性表达率为 75.68% (28/37),明显高于 GOLPH3 阴性表达组 22.22% (4/18)。采用 Pearson 相关性分析显示,GOLPH3 蛋白的表达与 VEGF 的表达呈正相关性 ($r = 0.508, P < 0.01$)。

3 讨论

研究^[8]显示,GOLPH3 参与执行高尔基体的蛋白质分选功能,在蛋白质的整合、受体循环以及蛋白质的糖基化过程中起重要作用。Scott et al^[9]对多

表2 GOLPH3、VEGF 表达与胃癌患者各临床病理特征之间的关系

指标	n	GOLPH3		χ^2 值	P 值	VEGF		χ^2 值	P 值
		+	-			+	-		
性别									
男	43	29	14	0.003	0.960	26	17	0.442	0.516
女	12	8	4			6	6		
年龄(岁)									
<60	33	21	12	0.495	0.481	18	15	0.448	0.503
≥60	22	16	6			14	8		
肿瘤大小(cm)									
<5	26	16	10	0.736	0.391	15	11	0.005	0.944
≥5	29	21	8			17	12		
分化程度									
中、高	22	11	11	4.969	0.040	8	14	7.174	<0.01
低	33	26	7			24	9		
浸润深度									
未侵犯浆膜	18	7	11	9.791	<0.01	6	12	6.790	0.018
侵犯浆膜	37	30	7			26	11		
淋巴结转移									
无	16	4	12	18.314	<0.01	3	13	14.420	<0.01
有	39	33	6			29	10		
TNM 分期									
I / II	24	9	15	17.144	<0.01	6	18	19.269	<0.01
III / IV	31	28	3			36	5		

种实体肿瘤的 5p13 基因拷贝数增加进行系统性分析,并通过基因敲除实验发现,GOLPH3 可能是新的致癌基因,影响肿瘤发生与发展。相关文献^[7-11]报道,GOLPH3 在食管癌、乳腺癌、结肠癌、神经胶质瘤及卵巢上皮细胞癌等多种恶性肿瘤中存在高表达现象。GOLPH3 在恶性肿瘤中的高表达产物与相关恶性肿瘤的浸润深度、淋巴结转移、远处转移、TNM 分期、预后等密切相关,也证实 GOLPH3 是一种致癌基因,且其表达产物在癌症的发生和进展过程中有重要作用,影响癌症患者预后。GOLPH3 的高表达通过调节高尔基体蛋白质糖基化转移酶的活性及功能,使肿瘤相关蛋白的分泌异常;蛋白质的糖基化结构与肿瘤的细胞生长、黏附、迁移和侵袭都密切相关,从而导致肿瘤细胞的侵袭性增强^[12-13]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是细胞内磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(AKT)/mTOR 信号通路的中心调控位点,已有研究^[14]证实此信号通路对细胞的增殖、凋亡有着重要的调控作用,mTOR 的异常激活参与了多种肿瘤的形成与进展。Scott et al^[5]通过比较基因组杂交分析发现 GOLPH3 与 retromer 复合体的重要组成部分 VPS35 存在密切相关性,从而通过这种方式将 GOLPH3 与 mTOR 联系起来,推测 GOLPH3 通过 mTOR 信号通路对恶性肿瘤的生长产生影响。本研究结果显示,GOLPH3

在胃癌组织中阳性表达率为 67.27%,明显高于相应癌旁组织的 18.18%,且 GOLPH3 的高表达与胃癌的浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期呈正相关性。

实体肿瘤无限制的侵袭性生长及转移都依赖肿瘤组织中新生血管的形成,而上调的肿瘤血管化作用以及增加的肿瘤促血管生成因子的表达已经证实与肿瘤的分级或者预后相关。VEGF 是已知的肿瘤血管生成过程中特异性最强的促血管生长因子,具有明显的促血管生成作用。VEGF 的表达受多因素的调控,最重要的因素是低氧。低氧可诱导低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)从而上调 VEGF 的表达。VEGF 的表达与癌症的转移、复发和预后等密切相关。本研究结果显示,VEGF 在胃癌组织的阳性表达率明显高于相应癌旁组织,并且 VEGF 高表达的胃癌患者与其组织学分级、浸润深度、淋巴结转移、TNM 分期密切相关,提示 VEGF 的高表达可能促进胃癌的浸润和转移。

本研究结果显示 GOLPH3 和 VEGF 均与胃癌的浸润深度、淋巴结转移以及 TNM 分期相关,提示二者可能对胃癌的进展存在某种协同作用。同时,经相关性分析显示,胃癌组织中 GOLPH3 的高表达与 VEGF 的表达呈明显正相关性,提示胃癌组织中过表达的 GOLPH3 可能通过诱导上调 VEGF 的表达,从而促进胃癌组织中新生血管的形成,进一步影响胃癌组织的生长和发展。其机制可能是 GOLPH3 通过激活细胞内的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,上调 HIF-1 α 的表达,从而促使 VEGF 的表达增加,使内皮细胞迁移形成新生血管增加肿瘤细胞的血供,促进肿瘤的生长^[15]。

综上所述,胃癌组织中 GOLPH3、VEGF 的阳性表达与胃癌的进展程度均密切相关,提示二者对胃癌进展的诊断有协同作用,并且胃癌组织中过表达的 GOLPH3 可能上调 VEGF 的表达,从而促进胃癌新生血管的形成,促进胃癌的生长及发展。针对肿瘤血管生成各环节的靶向治疗是近年来肿瘤研究热点,抗血管生成药物也逐渐运用于肿瘤的临床治疗。因此,联合检测 GOLPH3 和 VEGF 的表达,可能对胃癌病理诊断、临床预后的判断及丰富胃癌的临床治疗手段有一定的指导意义。

参考文献

- Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.

- [2] Bell A W, Ward M A, Blackstock W P, et al. Proteomics characterization of abundant Golgi membrane proteins [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(7): 5152–65.
- [3] Scott K L, Kabbarah O, Liang M C, et al. GOLPH3 modulates mTOR signaling and rapamycin sensitivity in cancer [J]. *Nature*, 2009, 459(7250): 1085–90.
- [4] Hu B S, Hu H, Zhu C Y, et al. Overexpression of GOLPH3 is associated with poor clinical outcome in gastric cancer [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(1): 515–20.
- [5] 邹绍武, 江积瑞, 孟翔凌, 等. VEGF 表达和血管生成与胃癌浸润、转移及预后的关系 [J]. *安徽医科大学学报*, 2001, 36(4): 260–3.
- [6] Nagano-Ito M, Yoshikawa S, Tamura M, et al. Identification and characterization of a novel alternative splice variant of mouse GMx33alpha/GPP34 [J]. *Gene*, 2007, 400(1–2): 82–8.
- [7] Wang J H, Chen X T, Wen Z S, et al. High expression of GOLPH3 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e45622.
- [8] Zeng Z, Lin H, Zhao X, et al. Overexpression of GOLPH3 promotes proliferation and tumorigenicity in breast cancer *via* suppression of the FOXO1 transcription factor [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(15): 4059–69.
- [9] Wang Z, Jiang B, Chen L, et al. GOLPH3 predicts survival of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy [J]. *J Transl Med*, 2014, 12: 15.
- [10] Li X Y, Liu W, Chen S F, et al. Expression of Golgi phosphoprotein-3 gene in human gliomas: a pilot study [J]. *J Neurooncol*, 2011, 105(2): 159–63.
- [11] Ma Y, Wang X, Wu Y, et al. Overexpression of GOLPH3 is associated with worse prognosis in patients epithelial ovarian cancer [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(12): 11845–9.
- [12] Scott K L, Chin L. Signaling from the Golgi: mechanisms and models for Golgi phosphoprotein 3-mediated oncogenesis [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(8): 2229–34.
- [13] Zhao Y, Sato Y, Isaji T, et al. Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins [J]. *FEBS J*, 2008, 275(9): 1939–48.
- [14] Seeliger H, Guba M, Kleespies A, et al. Role of mTOR in solid tumor systems: a therapeutic target against primary tumor growth, metastases, and angiogenesis [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26(3–4): 611–21.
- [15] Nakamura J L, Garcia E, Pieper R O. S6K1 plays a key role in glial transformation [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(16): 6516–23.

Relationship between the expression of GOLPH3 with VEGF expression in gastric cancer

Chan Shixin, Meng Xiangling, Wu Wenyong

(Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the interrelationship between Golgi phosphoprotein 3 (GOLPH3) expression with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the progression of human gastric cancer by detecting the expression level of GOLPH3 and VEGF. **Methods** Immunohistochemistry (IHC) was used to detect the expression of GOLPH3 and VEGF in 55 cases of gastric cancerous and carcinoma-adjacent tissues. Pearson correlation analysis was used to discuss the association between GOLPH3 expression with VEGF expression. **Results** The immunohistochemical detection showed that the positive expression rates of GOLPH3 and VEGF were 67.27%, 58.18% respectively, which were significantly higher than the positive expression rates in carcinoma-adjacent tissues ($P < 0.05$). A statistical analysis revealed that the positive expression rate of GOLPH3 and VEGF in the gastric cancer tissues were strongly correlated with depth of invasion ($P < 0.05$), distant metastasis ($P < 0.01$) and TNM stages ($P < 0.01$), whereas it did not significantly correlate with age or gender or size of tumor. Compared with the negative for the GOLPH3 expression, the VEGF expression in gastric cancer tissues positive for the GOLPH3 expression was significantly higher. The protein level of GOLPH3 expression was positively correlated with VEGF expression ($r = 0.508, P < 0.01$). **Conclusion** GOLPH3 overexpression may regulate gastric angiogenesis by upregulating the expression of VEGF, which affects the invasion and metastasis of gastric cancer.

Key words gastric cancer; GOLPH3; VEGF; angiogenesis