

GSK3 β 和 CyclinD1 在胃癌组织中的表达及临床意义

丁 矢¹, 郭玉凤², 杜 维³

(1.常德职业技术学院医学系, 湖南 常德 415000; 2.湖南文理学院体育学院, 湖南 常德 415000; 3.常德市第一人民医院, 湖南 常德 415000)

摘 要: [目的] 探讨胃癌组织中 GSK3 β 和 CyclinD1 的表达及其临床意义。[方法] 采用免疫组织化学染色方法, 检测胃组织芯片中 (包括 48 例胃癌和对应正常胃组织及 24 例癌旁组织) GSK3 β 和 CyclinD1 蛋白的表达。[结果] GSK3 β 和 CyclinD1 在胃癌组织中的表达率分别为 35.4% 和 45.8%; GSK3 β 在癌组织中的阳性表达率明显低于正常胃组织和癌旁组织 ($P < 0.05$), 并与分化程度、组织学类型和淋巴结转移有关 ($P < 0.05$); CyclinD1 在胃癌组织中的阳性表达率则明显高于正常胃组织和癌旁组织, 差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 20.664, P < 0.05$); CyclinD1 的表达则与 TNM 分期和淋巴结转移相关 ($P < 0.05$)。GSK3 β 与 CyclinD1 蛋白的表达呈负相关性 ($r = -0.331, P < 0.05$)。[结论] GSK3 β 和 CyclinD1 在胃癌的进展、分化、浸润和转移中起重要作用, 是判断胃癌生物学行为的良好指标。

主题词: 胃肿瘤; GSK3 β ; CyclinD1; 组织微阵列; 免疫组织化学

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)07-0577-04
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.07.B010

Expressions of Glycogen Synthase Kinase 3 Beta and CyclinD1 in Gastric Cancer and Their Clinical Significance

DING Shi¹, GUO Yu-feng², DU Wei³

(1. Department of Medicine, Changde Vocational Technical College, Changde 415000, China;
2. School of Physical Education, Hunan University of Arts and Science, Changde 415000, China;
3. The First People's Hospital of Changde City, Changde 415000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expressions of glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) and CyclinD1 proteins in gastric cancer and their clinical significance. [Methods] The expression of GSK3 β and CyclinD1 proteins in gastric tissue array of 48 samples with gastric cancer, their corresponding normal gastric mucosa, 24 samples of cancer adjacent tissues were detected immunohistochemically. [Results] The positive expression rates of GSK3 β and CyclinD1 in gastric cancer were 35.4% and 45.8% respectively. The positive expression rate of GSK3 β in cancer tissues was lower than that in normal tissues and cancer adjacent tissues ($P < 0.05$), and it was correlated with differential grade, histological type and lymph node metastasis ($P < 0.05$). The positive expression rate of CyclinD1 protein in cancer tissues was higher than that in normal tissues and cancer adjacent tissues ($P < 0.05$), and it was correlated with TNM stage and lymph node metastasis ($P < 0.05$). There was a negative correlation between the expressions of GSK3 β and CyclinD1 in gastric cancer ($r = -0.331, P < 0.05$). [Conclusion] GSK3 β and CyclinD1 might play important roles in the progression, differentiation, invasion, lymph node metastasis of gastric cancer, and might be indicators for evaluating biologic behavior of gastric cancer.

Subject words: gastric neoplasms; GSK3 β ; CyclinD1; microtissue array; immunohistochemistry

胃癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一, 因其具有较强的局部侵袭能力和易于转移而位于癌症致死原因的前列^[1]。胃癌的发病机制复杂, 是多因素、多

基因、多阶段共同参与的结果, 其中细胞信号通路转导对其发生、发展起着至关重要的作用。Wnt 经典信号通路已经被广泛认同是肿瘤发生发展的重要信号通路之一。本实验拟运用免疫组织化学方法, 通过组织微阵列就 Wnt 经典信号通路中两个重要成员 GSK3 β 和 CyclinD1 在胃癌组织中的异常表达进行相关性研究, 并分析其与临床病理特征之间的关系, 进

基金项目: 湖南医药卫生科技计划项目 (B2013148); 湖南省教育厅高校科研项目 (14C0141)

通讯作者: 杜维, 副主任医师, 硕士; 湖南省常德市第一人民医院病理科, 湖南省常德市人民东路 388 号 (415000); E-mail: dw417@sina.com

收稿日期: 2014-05-10; **修回日期:** 2014-07-18

而为胃癌早期诊断和治疗提供新的理论依据和线索。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集于 2011 年 1 月~2011 年 10 月期间常德市第一人民医院未经化疗行胃癌根治手术的 48 例患者,其中男性 28 例,女性 20 例,年龄 41~85 岁,平均年龄 (60.02±9.95) 岁,≤60 岁 24 例, >60 岁 24 例;肿瘤大小: ≤3cm 28 例, >3cm 20 例;高~中分化 13 例,低分化 35 例,其中乳头状腺癌 3 例,管状腺癌 35 例,印戒细胞癌 8 例,黏液腺癌 2 例;有淋巴结转移 31 例,无淋巴结转移 17 例;按照 2001 年国际抗癌联合会(UICC) 修订的 TNM 分期标准分期: I + II 期 15 例; III + IV 期 33 例。同时收集对应的 48 例远端切缘正常胃组织(距肿块 5cm 以上)及 24 例癌旁组织(距肿块 2.5cm 处)作为对照组。

1.2 实验试剂及方法

兔抗人 GSK3β 单克隆抗体(SC-9166)购自美国 Santa cruz 生物技术公司, CyclinD1 单克隆抗体(CRM-049G3) 购自上海太阳生物有限公司, No-volink™ 聚合物检测试剂盒和 DAB 底物酶显色剂购自珠海泉晖企业有限公司。标本经 10% 中性福尔马林固定,常规脱水包埋, 4μm 厚连续切片;石蜡切片常规 HE 染色进行组织学认定后,选择具有代表性的病变部位,制作组织芯片;免疫组化检测 GSK3β 和 CyclinD1 蛋白在组织芯片中的表达。参照 No-volink™ 检测试剂盒说明操作,关键步骤如下:①将切片经二甲苯和梯度酒精脱蜡水化;②高压锅煮沸后抗原修复 3min;③滴加过氧化物酶阻断剂,室温湿盒内孵育 5min;④滴加蛋白阻断剂,室温湿盒内孵育 5min;⑤分别滴加一抗 GSK3β 和 CyclinD1 (稀释浓度均为 1:100),室温湿盒内分别孵育 90min 和 60min;⑥滴加一抗后封闭剂,室温湿盒内孵育 30min;⑦然后加入二抗,室温湿盒内孵育 30min;⑧滴加 DAB 显色液,进行显色 5min;以上每步间隔均用 PBS 冲洗 3min×3 次;⑨苏木素复染色 3min,蒸馏水冲洗,温水返蓝 3min,梯度酒精脱水,二甲苯透明 3min,然后中性树胶封片。选用 PBS 代替一抗为阴性对照。

1.3 免疫组织化学结果判定

所有免疫组织化学结果均由两位资深的病理医

师证实诊断,保证实验结果的准确可靠。GSK3β 蛋白阳性信号定位于细胞质, CyclinD1 阳性信号定位于细胞核。根据阳性细胞染色程度及着色细胞百分率进行计分:0 分不着色,1 分浅棕色,2 分深棕色;着色细胞 <5% 为 0 分, 5%~25% 为 1 分, 26%~50% 为 2 分; >50% 为 3 分。两种分值相加,0 分为(-);1 分为(+);2~3 分为(++);4~6 分为(+++)。(++)~(+++) 判为阳性, (-)~(+) 判为阴性。

1.4 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理和分析,计量资料采用 *t* 检验;计数资料采用 χ^2 检验;组间相关性分析采用 Spearman 等级相关进行比较; *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 GSK3β 和 CyclinD1 蛋白在各种类型胃组织的表达

GSK3β 在正常胃黏膜组织和癌旁组织中的表达率分别为 83.3%、79.2%,差异无统计学意义 (*P* > 0.05),而在胃癌组织中的表达率明显下调,仅为 35.4%,与正常胃黏膜组织和癌旁组织比较差异均有显著统计学意义 (*P* < 0.01)。CyclinD1 在正常胃黏膜组织和癌旁组织中的阳性表达率分别为 8.3%、12.5%,差异无统计学意义 (*P* > 0.05),而在胃癌组织中的阳性表达率则明显增高达 45.8%,与正常胃黏膜组织和癌旁组织比较,差异均有统计学意义 (*P* < 0.01; *P* < 0.05) (Figure 1, 2; Table 1)。

2.2 胃癌组织中 GSK3β 和 CyclinD1 的表达与临床病理特征的关系

胃癌组织中 GSK3β 的表达与性别、年龄、肿块大小和 pTNM 分期无关 (*P* > 0.05),与分化程度、组织学类型和淋巴结转移相关 (*P* < 0.05); CyclinD1 的表达与性别、年龄、肿块大小、分化程度和组织学类型无关 (*P* > 0.05),与 TNM 分期和淋巴结转移相关 (*P* < 0.05, Table 2)。

2.3 胃癌中 GSK3β 和 CyclinD1 表达之间的相关性

17 例肿瘤细胞 GSK3β 阳性表达的胃癌组织中, CyclinD1 阳性表达 6 例。Spearman 等级相关分析显示胃癌中 GSK3β 的表达与 CyclinD1 的表达呈负相关 (*r* = -0.331, *P* = 0.034, Table 3)。

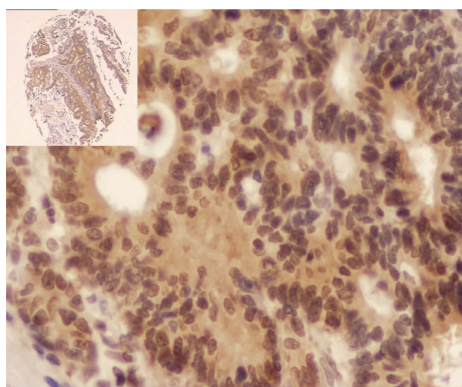


Figure 1 Positive expression of GSK3β in gastric cancer (×400)

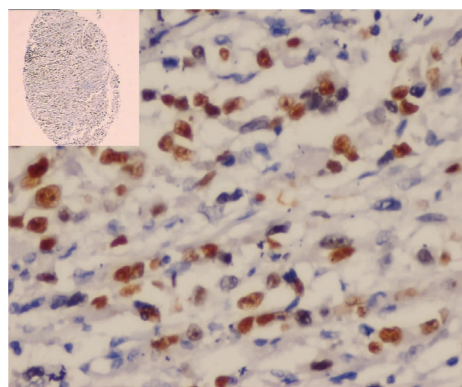


Figure 2 Positive expression of CyclinD1 in gastric cancer (×400)

Table 1 Expression of GSK3β and CyclinD1 in different gastric tissues

Groups	N	GSK3β expression			CyclinD1 expression		
		Positive case(%)	χ^2	P	Positive case(%)	χ^2	P
Normal gastric mucosa	48	40(83.3)	22.84	<0.01*	4(8.3)	15.24	<0.01*
Cancer adjacent tissues	24	19(79.2)	0.19	>0.05**	3(12.5)	0.02	>0.05**
Cancer tissues	48	17(35.4)	12.25	<0.01 [△]	22(45.8)	6.44	<0.05 [△]

Note:*,Compared with cancer tissues;**,Compared with normal gastric mucosa;[△]:Compared with cancer adjacent tissues.

Table 2 Correlation between the clinicopathological features and the expression of GSK3β and CyclinD1 in gastric cancer tissues

Parameters	N	GSK3β expression			CyclinD1 expression		
		Positive case(%)	χ^2	P	Positive case(%)	χ^2	P
Age(years old)							
>60	24	6(16.7)	2.277	0.131	11(45.8)	0.000	1.000
≤60	24	11(54.2)			11(45.8)		
Tumor size(cm)							
>3	20	9(45.0)	1.377	0.241	10(50.0)	0.240	0.624
≤3	28	8(28.6)			12(42.9)		
TNM stage							
I + II	15	7(46.7)	1.207	0.272	3(20.0)	5.865	0.015
III+IV	33	10(30.3)			19(57.6)		
Differentiation grade							
High/moderate	13	8(61.5)	3.868	0.049	4(30.8)	1.630	0.202
Poor	35	9(25.7)			18(51.4)		
Histological type							
Intestinal	16	9(56.3)	9.665	0.008	6(37.5)	0.832	0.660
Diffuse	23	3(13.0)			12(52.2)		
Mixed	9	5(55.6)			4(44.4)		
Lymph metastasis							
Yes	31	6(19.4)	9.872	0.002	18(58.1)	5.274	0.022
No	17	11(64.7)			4(23.5)		

3 讨 论

目前已有研究发现^[2],Wnt 经典信号传导通路在细胞增殖、分化以及迁移等方面起着重要的调控作用,包括胃癌在内的十几种高发恶性肿瘤与之密切相关。

GSK3β 是一种多功能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。最初研究认为 GSK3β 是参与糖代谢的主要限速酶之一,可使糖原合成酶磷酸化而抑制糖原合成。之后的研究发现,GSK3β 除参与糖代谢外,还参与细胞的分化、增殖和凋亡等其他重要生理过程^[3]。其作为 Wnt 经典信号通路中 APC/GSK3β/Ax-in/β-catenin 多聚蛋白复合物的重要分子,起着关键性的负向调节作用^[4],其主要功能

Table 3 Correlation between the positive expression of GSK3β and CyclinD1 in gastric cancer

CyclinD1	N	GSK3β		r	P
		-	+		
-	26	13	13	-0.331	0.034
+	22	18	4		
Total	48	31	17		

是磷酸化 β-catenin 氨基端的丝氨酸/苏氨酸残基,与 Axin 和 APC 构成降解复合物对 β-catenin 进行调控。有报道称在肾癌、结肠癌和胃癌^[5]等多种肿瘤组织中 GSK3β 呈阳性表达,提示 GSK3β 的抑制具有调节细胞活性及迁移的能力。Zheng 等^[6]和 Liu 等^[7]的研究结果均指出,磷酸化后的 GSK3β 在胃癌细胞迁移过程中发挥重要作用。冯锦辉等^[8]研究发现 GSK3β 在胃癌组织中表达明显减弱,可能参与胃癌细胞的增殖调控。本实验结果显示,GSK3β 蛋白在 83.3%的正常胃组织和 79.2%的癌旁组织中呈阳性表达,在肿瘤组织中表达明显降低,阳性率仅为 35.4%,三者之间存在显著性差异 ($P<0.05$),表明 GSK-3β 的低表达可能造成 β-catenin 不能被充分降解,进而激活下游靶基因,促进胃癌细胞的增殖,与胃癌的发生密切相关。同时,GSK-3β 蛋白的表达与胃癌的分化程度和淋巴结转移相关($P<0.05$),提示 GSK-3β 可能在胃癌细胞的侵袭和转移的过程中也起重要的抑制作用,推测其蛋白水平的低表达促进了癌细胞增殖和迁移能力的提高。

CyclinD1 为细胞周期调控因子,是 Wnt 经典信号通路重要的靶基因。Nag 等^[9]研究显示胃癌中 CyclinD1 过度表达;其在裸鼠的胃癌细胞内导入反义寡核苷酸探针后,发现 CyclinD1 受抑制后,癌细胞生长也明显受到控制,致瘤性消失。徐晓玲等^[10]用免疫组化法检测发现 CyclinD1 在胃癌组织中高表达,推测其在胃癌的恶性演变过程中发挥重要作用,是胃癌重要的促发因素。本实验结果发现 CyclinD1 在正常胃黏膜组织、癌旁组织中仅有少量表达,阳性率分别为 8.3%、12.5%,而在胃癌组织中的阳性表达率为 45.8%,明显高于正常胃黏膜和癌旁组织。研究结果同时显示随着 TNM 分期升高和从无转移到转移其表达量也增高,表明 CyclinD1 的高表达与胃癌组织的高侵袭性和易于转移的生物学行为密切相关,提示其在胃癌的发生、发展过程中起重要作用。

Spearman 相关分析显示,CyclinD1 表达与

GSK3β 表达呈负相关;考虑因 Wnt 经典信号通路异常激活,导致 GSK3β 在胃癌组织中的表达下调,进而促进 APC/Axin/ GSK-3β/β-catenin 多蛋白降解复合物的解聚,从而导致 β-catenin 在核内的积聚与活化,进而激活其下游靶基因 CyclinD1,促进胃癌的发生和浸润转移。有助于监测胃癌的临床进展。

综上所述,GSK-3β 和 CyclinD-1 在胃癌的发生、发展的过程中起重要作用,是胃癌侵袭转移机制中的关键生物标记。但是 Wnt 经典信号通路和胃癌的关系异常复杂,其机制尚未完全明了,通路中各种蛋白互相作用的分子基础仍未完全阐明。因此,我们今后仍需继续研究 Wnt 经典信号通路中各基因及表达蛋白的互相作用,深入探讨胃癌发生、发展的机制,为寻找新的胃癌标志物和治疗靶点提供理论基础。

参考文献:

[1] Saif MW,Makrilia N,Zalonis A,et al. Gastric cancer in the elderly:an overview[J]. Eur J Surg Oncol,2010,36(8): 709-717.

[2] Akiyama T.Wnt/beta-catenin signaling[J].Cytokine Growth Factor Rev,2000,11(4):273-282.

[3] Koch A,Waha A,Tonn JC,et al.Somatic mutations of WNT/ wingless signaling pathway components in primitive neuroectodermal tumors[J]. Int J Cancer,2001,93(3):445-449.

[4] Brenner S,Malech HL. Current developments in the design of onco-retrovirus and lentivirus vector systems for hematopoietic cell gene therapy [J].Biochim Biophys Acta,2003,1640 (1):1-24.

[5] Thiel A,Heinonen M,Rintahaka J,et al. Expression of cyclooxygenase-2 is regulated by glycogen synthase kinase-3beta in gastric cancer cells [J]. J Biol Chem, 2006,281(8):4564-4569

[6] Zheng HC,Xu XY,Xia P,et al. Involvement of inactive GSK3beta overexpression in tumorigenesis and progression of gastric carcinomas [J].Hum Pathol,2010,41 (9): 1255-1264.

[7] Liu J,Zhang Y,Xu R,et al. PI3K/Akt-dependent phosphorylation of GSK3β and activation of RhoA regulate Wnt5a-induced gastric cancer cell migration [J]. Cell Signal,2013,25(2):447-456.

[8] Feng JH,Yang WZ,Liu HP,et al. Expression of GSK3β in gastric cancer tissues[J]. Journal of Qiqihar University of Medicine,2012,30(12):1570-1571.[冯锦辉,杨伟珍,刘海鹏,等.GSK3β 在胃癌中的表达[J].齐齐哈尔医学院学报,2012,30(12):1570-1571.]

[9] Nag S,Das S,Chaudhuri K. In vivo induced clpB1 gene of Vibrio cholerae is involved in different stress responses and affects in vivo cholera toxin production [J]. Biochem Biophys Res Commun,2005,331 (4):1365-1373.

[10] Xu XL,Cao L,Shen Q,et al. Expression and significance of CyclinD1 in bile reflux gastritis and gastric cancer[J].Chinese Journal Gastroenterology,2014,19(4):235-237. [徐晓玲,曹丽,沈琴,等.细胞周期蛋白 D1 在胆汁反流性胃炎和胃癌中的表达及其意义[J].胃肠病学,2014,19(4):235-237.]