

胃癌组织中 LMO1 与 Bcl-2、Bax、Survivin、Caspase-3 蛋白表达的关系及意义

孙云, 胡晓杰, 马国娟, 尹香云, 彭彦辉

(河北省人民医院, 河北 石家庄 050051)

摘要: [目的] 检测 LMO1、Bcl-2、Bax、Survivin、Caspase-3 蛋白在胃癌组织中的表达, 并对这些蛋白之间的关系和临床意义进行分析。[方法] 对 96 例胃癌手术患者的肿瘤组织标本及 50 例癌旁组织标本进行免疫组化染色 (SP 法), 检测 LMO1、Bcl-2、Bax、Survivin、Caspase-3 蛋白的表达情况。同时收集患者的病理学情况, 对与各指标的关系进行分析。[结果] 胃癌组织中 LMO1、Bcl-2、Survivin 表达均比癌旁组织增强 (均 $P < 0.05$), Caspase-3 蛋白在胃癌组织中表达低于癌旁组织 ($P < 0.05$), Bax 在两种组织中表达无明显差异 ($P > 0.05$)。胃癌组织中细胞凋亡率明显低于癌旁组织 ($P < 0.01$)。胃癌组织中 LMO1 蛋白强表达者细胞凋亡率明显低于弱表达者 ($P < 0.01$)。Spearman 相关分析发现, 胃癌组织中 LMO1 与 Bcl-2 表达存在正相关 ($r = 0.3058, P = 0.002$), LMO1 与 Caspase-3 表达存在负相关 ($r = -0.2886, P = 0.004$); Bcl-2 与 Survivin 表达存在正相关关系 ($r = 0.2986, P = 0.0315$), Bcl-2 与 Bax 表达呈负相关 ($r = -0.4062, P < 0.001$), Survivin 与 Caspase-3 也呈负相关 ($r = -0.3142, P = 0.002$)。[结论] 胃癌组织中 LMO1 蛋白可能通过调节 Bcl-2、Caspase-3 的表达和活性而参与肿瘤凋亡。

关键词: 胃肿瘤; LMO1; Bcl-2; Caspase-3; 凋亡

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)09-0703-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.09.B003

Expression of LMO1 in Gastric Cancer Tissue and Its Relation to Cell Apoptosis

SUN Yun, HU Xiao-jie, MA Guo-juan, et al.

(Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: [Objective] To investigate the relationship between LMO1 expression and cell apoptosis in gastric cancer. [Methods] The expressions of LMO1 and apoptosis-related proteins Bcl-2, Bax, Survivin, Caspase-3 were detected immunohistochemically in 96 gastric cancer specimens and 50 adjacent tissue specimens. The relationship of LMO1 expression with cell apoptosis was analyzed. [Results] Expressions of LMO1, Bcl-2, Survivin proteins in gastric cancer tissues were stronger and expression of Caspase-3 protein was weaker than those in adjacent cancer tissues (all $P < 0.05$); no significant difference in Bax expression was found between gastric cancer tissues and adjacent cancer tissues ($P > 0.05$). Apoptosis rate in gastric cancer tissues was lower than that in adjacent cancer tissues ($P < 0.01$). In gastric cancer tissues, apoptosis rate in cancer with positive expression of LMO1 was lower than that with negative expression of LMO1 ($P < 0.01$). Spearman correlation analysis showed that positive correlation was found between LMO1 and Bcl-2 ($r = 0.3058, P = 0.002$); negative correlation was found between LMO1 and Caspase-3 ($r = -0.2886, P = 0.004$); positive correlation was found between Bcl-2 and Survivin ($r = 0.2986, P = 0.0315$); negative correlation was found between Bcl-2 and Bax ($r = -0.4062, P < 0.001$), Survivin and Caspase-3 ($r = -0.3142, P = 0.002$). [Conclusion] LMO1 protein might be involved in apoptosis of gastric cancer by regulating expression and activity of Bcl-2, caspase-3 proteins.

Subject words: gastric neoplasms; LMO1; Bcl-2; Caspase-3; apoptosis

胃癌的药物治疗效果一直不能令人满意, 其中重要的原因在于胃癌细胞具有较强的凋亡抵抗能

力, 能够减轻药物的凋亡诱导效果, 使肿瘤细胞得以存活, 而使药效降低^[1,2]。因此, 胃癌细胞的凋亡抵抗形成的机制及逆转策略一直是研究的热点。但迄今并没有突破性进展。LMO1 是近年来发现的与肿瘤关系密切的基因, 在白血病的进展中发挥了重要作

通讯作者: 彭彦辉, 主任医师, 教授, 博士生导师, 博士; 河北省人民医院普外三科, 河北省石家庄市新华区和平西路 348 号 (050051); E-mail: puwaisike@163.com

收稿日期: 2016-03-27; **修回日期:** 2016-04-24

用^[3]。但关于 LOM1 在胃癌中发挥的作用还不完全明确, LOM1 与胃癌细胞凋亡能力的关系研究也较为罕见。为初步探讨 LOM1 与胃癌凋亡的关系, 本研究以临床石蜡组织标本为研究对象, 检测了 LOM1 蛋白在肿瘤组织及癌旁组织的表达, 分析了 LOM1 与胃癌凋亡的关系, 同时检测了肿瘤凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Survivin、Caspase-3 的表达, 分析了 LOM1 与这些蛋白之间的关系, 为探讨 LOM1 与胃癌凋亡的关系提供了依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

入组患者共 96 例, 均为确诊的胃癌患者, 为 2014 年 1 月至 2015 年 12 月于河北省人民医院外科住院并手术者, 患者均为初诊, 均经手术切除原发肿瘤, 患者手术前未接受放疗、化疗等针对肿瘤的治疗。患者中男性 68 例, 女性 28 例; 年龄 33~81 岁, 中位年龄 58 岁。患者肿瘤均为腺癌, 中高分化者 67 例, 低分化者 29 例; 肿瘤位于近端胃 37 例、胃体 18 例、远端胃 32 例、全胃 9 例; 肿瘤 ≥ 5 cm 者 40 例, < 5 cm 者 56 例; 按 UICC 分期 I~II 期者 38 例, III~IV 期者 58 例。

1.2 组织标本收集

患者肿瘤离体后立即从标本上取材, 癌旁组织为距肿瘤边缘 3 cm 以上, 镜检无癌细胞的组织。肿瘤组织及癌旁组织均一式两份, 每份约 0.5 cm $\times$ 0.5 cm $\times$ 0.5 cm, 一份以多聚甲醛固定用于免疫组化检测, 另一份置于 70% 乙醇中用于后续流式细胞术。

1.3 主要试剂及仪器

鼠抗人 LOM1 单克隆抗体、兔抗人 Bcl-2、Bax、Survivin、Caspase-3 多克隆抗体均为美国 Santa Cruz 公司产品, 免疫组化试剂盒购自北京中杉生物公司。Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒为美国 Yeasen 公司产品。流式细胞仪 (Epics-XL, type II 型) 为美国 Beckman 公司产品。

1.4 流式细胞术检测组织中细胞凋亡情况

组织以 300 目铜网过滤制备单细胞悬液。按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作。将细胞悬液调整浓度为 10^6 个/ml, 加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 10 μ l of Propidium Iodide (PI) 混

匀, 避光室温下孵育 15 min 后上机检测。数据以 Cell Quest 软件进行分析。

1.5 免疫组化染色 (SP 法) 测定各蛋白表达情况

将留取的以多聚甲醛固定的标本进行石蜡包埋, 蜡块以 5 μ m 连续切片, 进行 HE 染色确定组织性质。对用于免疫组化染色的切片进行脱蜡水化, 以 3% 过氧化氢孵育、蒸馏水冲洗、抗原修复。按试剂盒说明书对标本进行工作液封闭、分别加入调整好浓度的一抗、孵育、漂洗后依次加二抗工作液、辣根酶标记链酶卵白素 (Horseradish enzyme labeled chain enzyme) 工作液。然后 DAB 显色, 苏木素复染, 脱水, 中性树脂封片, 读取结果。切片由两位病理学专业人员双盲阅片判断结果。在 400 $\times$ 镜下每张切片随机取 5 个视野, 在每视野内计数 100 个细胞, 计算细胞的阳性率及染色强度。LOM1、Bcl-2、Bax、Survivin、Caspase-3 蛋白主要表达在细胞浆和细胞核内, 以出现黄或棕黄色染色颗粒为阳性。计分采用两步法: 阳性细胞 $< 10\%$ 为 0 分, $10\% \sim 30\%$ 为 1 分, $30\% \sim 50\%$ 为 2 分, $> 50\%$ 为 3 分; 细胞无阳性染色为 0 分, 浅黄色染色为 1 分, 黄色染色为 2 分, 棕黄色染色为 3 分。计分采用两种结果相乘, 0~1 分计为 (-), 2~3 分计为 (+), 4~6 分为 (++) , > 6 分为 (+++)。

1.6 统计学处理

用 SPSS16.0 统计分析软件对数据进行分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示, 采用组间比较的 t 检验。计数资料以率或百分比表示, 采用 χ^2 检验。等级资料采用成组比较的秩和检验。各蛋白质间的关系采用 Spearman 相关分析并计算相关系数。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌和癌旁组织中 LOM1、Bcl-2、Bax、Survivin、Caspase-3 蛋白表达情况

96 例胃癌组织中 LOM1、Bcl-2、Bax、Survivin、Caspase-3 蛋白阳性表达率分别为 78.13% (75/96)、60.42% (58/96)、50.00% (48/96)、84.38% (81/96)、31.25% (30/96); 癌旁组织 5 种蛋白表达阳性率分别为 22.00% (11/50)、24.00% (12/50)、60.00% (30/50)、44.00% (22/50)、62.00% (31/50)。胃癌组织中 LOM1、Bcl-2、Survivin 表达均比癌旁组织增强 (均 $P < 0.05$),

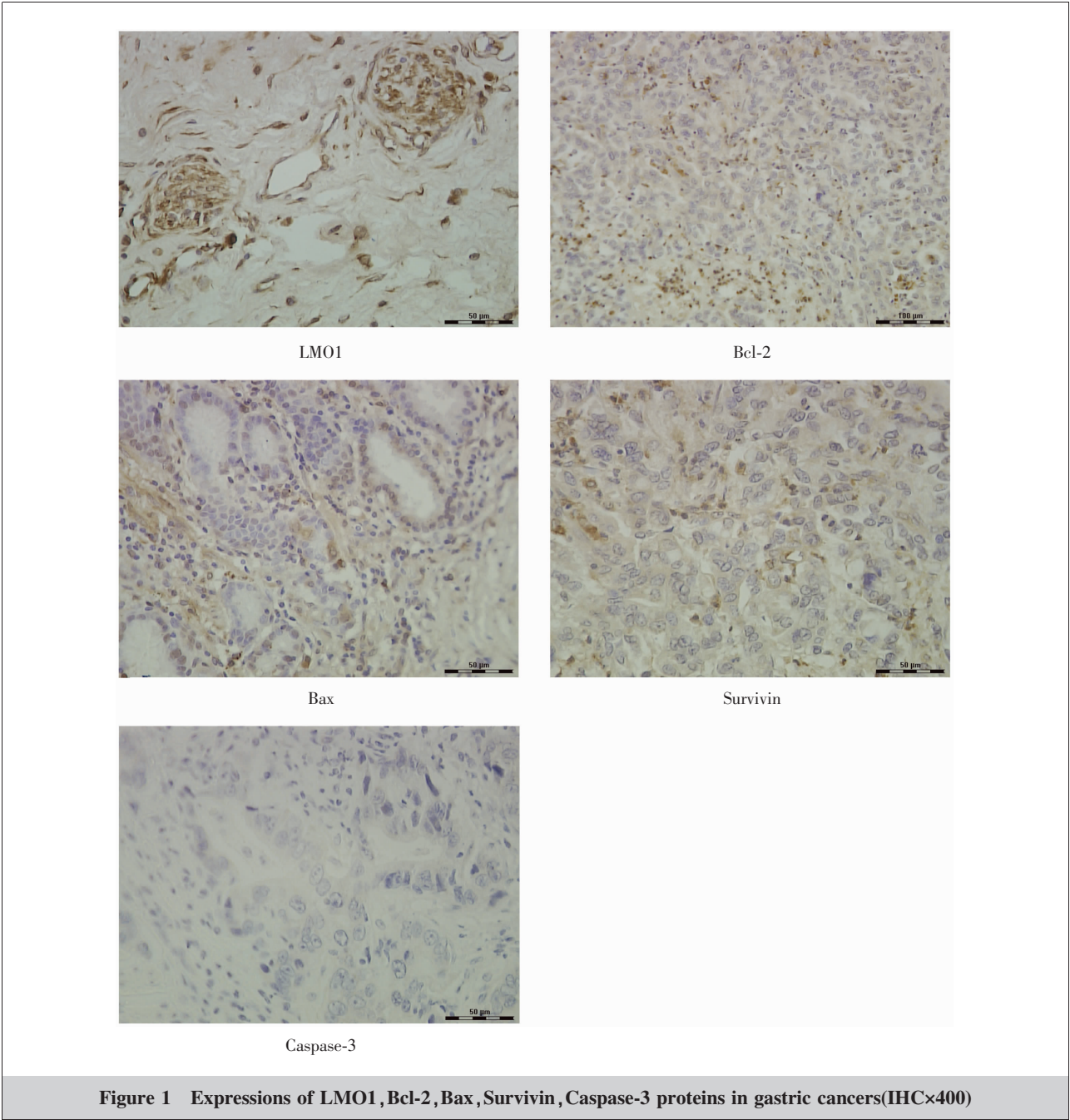
Caspase-3 蛋白在胃癌组织中表达低于癌旁组织 ($P<0.05$),Bax 在两种组织中无明显差异 ($P>0.05$) (Table 1,Figure 1)。

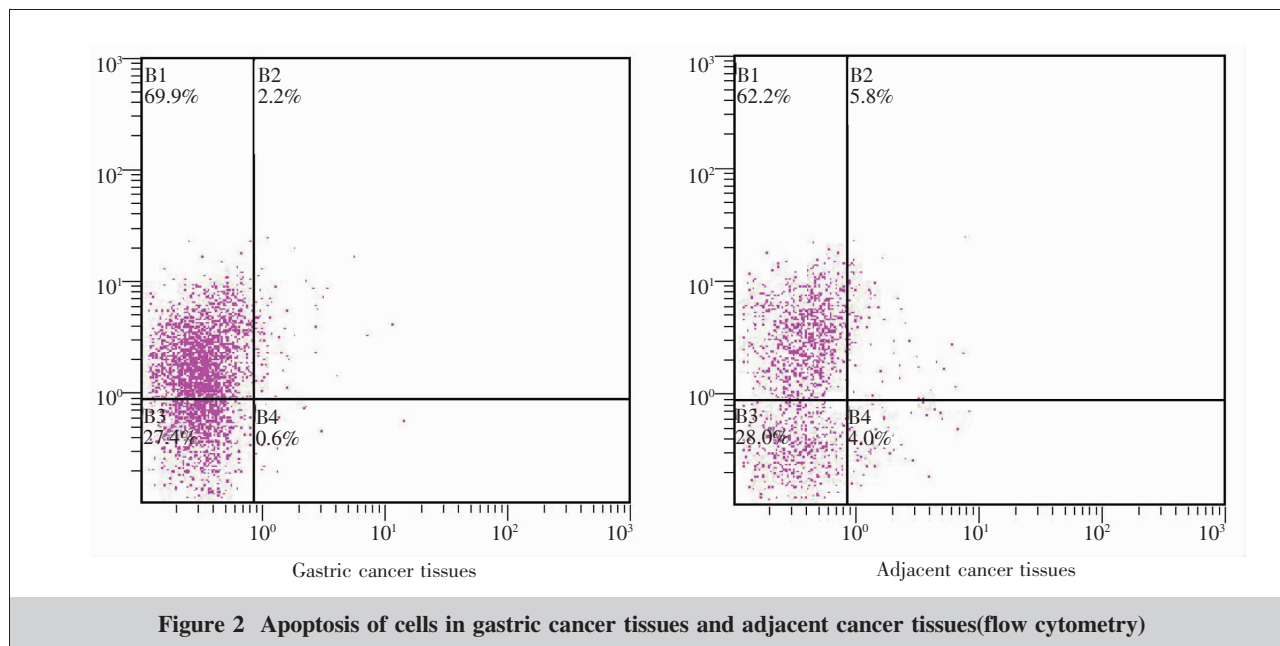
2.2 胃癌与癌旁组织凋亡情况

流式细胞术结果显示，胃癌组织中细胞凋亡率为 $2.90\%\pm0.93\%$,癌旁组织中细胞凋亡率为 $5.40\%\pm$

Table 1 Expression of LMO1,Bcl-2,Bax,Survivin,Caspase-3 proteins in gastric cancer and adjacent cancer tissues

Tissues	N	LMO1		Bcl-2		Bax		Survivin		Caspase-3	
		Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive
Gastric cancer	96	21	75	38	58	48	48	15	81	66	30
Adjacent cancer tissues	50	39	11	38	12	20	30	28	22	19	31
χ^2		42.78		17.47		1.32		25.79		12.78	
P		<0.001		<0.001		0.25		<0.001		<0.001	





1.06%，二者比较胃癌组织中细胞凋亡率明显低于癌旁组织($t=14.70, P<0.001$)(Figure 2)。

2.3 胃癌细胞凋亡率与 LOM1 蛋白表达的关系

结果显示，胃癌组织 LOM1 蛋白阳性表达者细胞凋亡率为 $3.137\% \pm 0.905\%$ ，阴性表达者凋亡率为 $2.075\% \pm 0.378\%$ ，二者比较 LOM1 蛋白阳性表达者细胞凋亡率明显低于阴性表达者 ($t=5.238, P<0.001$)。

2.4 胃癌组织中 LMO1、Bcl-2、Bax、Survivin、Caspase-3 蛋白之间的关系

Spearman 相关分析显示，胃癌组织中的上述指标中，LMO1 与 Bcl-2 表达存在正相关 ($r=0.3058, P=0.002$)，LMO1 与 Caspase-3 表达存在负相关 ($r=-0.2886, P=0.004$)；Bcl-2 与 Survivin 表达存在正相关关系 ($r=0.2853, P=0.005$)，Bcl-2 与 Bax 表达呈负相关 ($r=-0.4062, P<0.001$)，Survivin 与 Caspase-3 也呈负相关 ($r=-0.3142, P=0.002$)。LMO1 与 Bax、LMO1 与 Survivin、Bcl-2 与 Caspase-3、Bax 与 Survivin、Bax 与 Caspase-3 之间均无明显相关性(均 $P>0.05$)。

3 讨论

胃癌恶性程度高的原因之一在于胃癌细胞具有较强的凋亡抵抗能力，这种能力使胃癌细胞难以发

生凋亡，导致肿瘤生长进展。许多药物杀伤肿瘤细胞的机制在于这些药物能诱导细胞凋亡^[4,5]。而胃癌细胞这种凋亡抵抗能力使药物的效果减弱，这是胃癌药物治疗效果较差的重要原因。因此，如能有效抑制胃癌细胞这种凋亡抵抗能力有可能改善药物治疗效果，从而为改善胃癌综合治疗效果、提高患者的生存率作出贡献。本研究结果显示，胃癌组织的凋亡率明显低于癌旁正常组织，这证实胃癌组织与正常组织相比具有更强的凋亡抵抗能力。因此如能探讨阐明胃癌细胞凋亡抵抗形成的机制则可能找到相关靶点，从而有可能找到促进胃癌细胞凋亡的途径。但目前还没有能完全阐明胃癌细胞凋亡抵抗形成的机制，本研究在此方面进行了一些新的尝试。

LOM1 是 LOM 家族的成员之一，是一种锌指蛋白，具有转录调控功能，能与其他蛋白质结合发挥作用。已有研究发现，LOM1 在白血病、结肠癌、肺癌等多种恶性肿瘤中表达异常^[3,6,7]，与肿瘤的侵袭转移、凋亡有关。本研究显示，LOM1 在胃癌组织中表达高于癌旁组织，说明 LOM1 与胃癌发生有关。进一步研究结果显示，LOM1 强表达的胃癌组织凋亡率低于 LOM1 弱表达的胃癌组织。这一结果提示 LOM1 表达与胃癌的凋亡水平有关，LOM1 可能参与了肿瘤凋亡抵抗的形成，LOM1 强表达可能是导致胃癌凋亡抵抗能力增强的原因。

为了解 LOM1 可能参与胃癌凋亡的机制,本研究进一步检测了凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Survivin、Caspase-3 在胃癌组织中的表达情况,并分析了 LOM1 与这些蛋白之间的关系。Bcl-2 是通过线粒体途径调控细胞凋亡的重要基因之一,Bcl-2 的表达增高是导致细胞抗凋亡能力增强的重要原因^[8]。Bax 是重要的促凋亡基因,能与 Bcl-2 形成 Bcl-2/Bax 二聚体,二聚体中 Bcl-2 和 Bax 的比例决定了细胞的凋亡状态^[9]。Survivin 是凋亡抑制蛋白家族中分子量最小的成员,具有很强的凋亡抵抗能力,能通过直接抑制凋亡核心 Caspase-3 而导致细胞凋亡抵抗能力增强^[10,11]。Caspase-3 是诱导细胞凋亡的核心蛋白,该蛋白的表达和活性直接决定肿瘤细胞的凋亡状态^[12]。本研究结果显示,LOM1 蛋白与 Bcl-2 表达存在正相关,与 Caspase-3 表达存在负相关。这些结果提示 LOM1 蛋白可能通过促进 Bcl-2 表达、抑制 Caspase-3 表达而导致胃癌细胞凋亡抵抗能力增强。但本研究也发现 LOM1 蛋白与 Bax、Survivin 并无明显相关关系。这可能是由于胃癌细胞凋亡形成的途径较为复杂,LOM1 只在其中部分途径中发挥了作用。但本研究仅对临床现象进行了观察,进一步研究还需要相关实验对其中具体的机制进行分析。

本研究证实了胃癌组织中 LOM1 蛋白表达高于癌旁组织,且 LOM1 蛋白表达情况与胃癌凋亡状态有关。研究还发现 LOM1 蛋白可能通过调节 Bcl-2、Caspase-3 的表达而参与胃癌凋亡。但本研究的结果均来源于临床数据,具体的机制还有待于深入研究。

参考文献:

- [1] Pan WR, Chen YL, Hsu HC, et al. Antimicrobial peptide GW-H1-induced apoptosis of human gastric cancer AGS cell line is enhanced by suppression of autophagy[J]. Mol Cell Biochem, 2015, 400(1-2): 77-86.
- [2] Li G, Yang F, Gu S, et al. MicroRNA-101 induces apoptosis in cisplatin-resistant gastric cancer cells by targeting VEGF-C[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(1): 572-578.
- [3] Beuten J, Gelfond JA, Piwkhani D, et al. Candidate gene association analysis of acute lymphoblastic leukemia identifies new susceptibility locus at 11p15 (LOM1) [J]. Carcinogenesis, 2011, 32(9): 1349-1353.
- [4] Liu D, Zhou H, Wu J, et al. Infection by Cx43 adenovirus increased chemotherapy sensitivity in human gastric cancer BGC-823 cells; not involving in induction of cell apoptosis[J]. Gene, 2015, 574(2): 217-224.
- [5] Hu CJ, Wang B, Tang B, et al. The FOXM1-induced resistance to oxaliplatin is partially mediated by its novel target gene Mcl-1 in gastric cancer cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1849(3): 290-299.
- [6] Liu J, Yan P, Jing N, et al. LMO1 is a novel oncogene in colorectal cancer and its overexpression is a new predictive marker for anti-EGFR therapy [J]. Tumour Biol, 2014, 35(8): 8161-8167.
- [7] Zhang Y, Yang J, Wang J, et al. LMO1 is a novel oncogene in lung cancer, and its overexpression is a new predictive marker for anti-EGFR therapy [J]. Med Oncol, 2014, 31(8): 99.
- [8] Piro F, Leonardi L. Expression of Bcl-2 in canine osteosarcoma[J]. Open Vet J, 2015, 5(1): 27-29.
- [9] Sharifi S, Barar J, Hejazi MS, et al. Doxorubicin changes Bax/Bcl-xL ratio, Caspase-8 and 9 in breast cancer cells [J]. Adv Pharm Bull, 2015, 5(3): 351-359.
- [10] Zhuo W, Zhang L, Zhu Y, et al. Fisetin, a dietary bioflavonoid, reverses acquired cisplatin-resistance of lung adenocarcinoma cells through MAPK/Survivin/Caspase pathway[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(10): 2045-2052.
- [11] Zhou XL, Wang M. Expression levels of survivin, Bcl-2, and KAI1 proteins in cervical cancer and their correlation with metastasis[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(4): 17059-17067.
- [12] Gregoraszczuk EL, Rak-Mardyla A, Ryś J, et al. Effect of chemotherapeutic drugs on Caspase-3 activity, as a key biomarker for apoptosis in ovarian tumor cell cultured as monolayer. A pilot study [J]. Iran J Pharm Res, 2015, 14(4): 1153-1161.