

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.05.011

· 临床研究 ·

γ -synuclein 在食管癌中的表达及其对食管癌 Eca-109 细胞侵袭力的影响

荆丽, 王玉栋, 吕雅蕾, 左静, 冯莉, 刘巍(河北医科大学第四医院 肿瘤内科, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 研究 γ -synuclein 在食管癌中的表达及其对人食管癌细胞株 Eca-109 侵袭力的影响。**方法:** 选取 2010 年 1 月至 12 月于河北医科大学第四医院食管癌患者组织标本 30 例, 同时取 10 例正常食管组织作对照。采用免疫组化法观察食管癌组织中 γ -synuclein 的表达情况。采用脂质体法转染含 γ -synuclein 的重组质粒 pcDNA3.0- γ -synuclein, 应用 RT-PCR 检测转染后 Eca-109 细胞中 γ -synuclein mRNA 的表达, 流式细胞术检测 γ -synuclein 蛋白的表达, 利用 Transwell 实验检测转染后 Eca-109 细胞侵袭力的变化。**结果:** 与正常食管组织相比, 食管癌组织中 γ -synuclein 蛋白阳性表达率明显增强(83.3% vs 40.0%, $P < 0.05$), I-II 期食管癌患者 γ -synuclein 表达率明显低于 III-IV 期(22.2% vs 76.2%, $P < 0.05$)。pcDNA3.0- γ -synuclein 质粒转染后, Eca-109 细胞中 γ -synuclein mRNA 表达水平显著高于空质粒转染组和未转染组([1.10 ± 0.03] vs [0.42 ± 0.03], [0.45 ± 0.15], $P < 0.01$), 蛋白表达水平也明显增高([1.05 ± 0.06] vs [0.80 ± 0.45], [0.79 ± 0.46]; $P < 0.05$), 穿膜细胞数明显增加([167 ± 2.51] vs [65 ± 2.60], [70 ± 2.50]; $P < 0.01$)。**结论:** 食管癌组织高表达 γ -synuclein, 其表达上调能增强人食管癌 Eca-109 细胞的侵袭力, 提示其在食管癌的转移和恶性发展中发挥重要作用。

[关键词] 食管癌; γ -synuclein; 转染; 侵袭

[中图分类号] R735.1; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)05-0521-05

Expression of γ -synuclein in esophageal carcinoma and its effect on invasion of esophageal carcinoma Eca-109 cells

JING Li, WANG Yu-dong, LÜ Ya-lei, ZUO Jing, FENG Li, LIU Wei (Department of Medical Oncology, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the expression of γ -synuclein in esophageal adenocarcinoma and evaluate its effect on invasion of esophageal carcinoma Eca-109 cells. **Methods:** SP immunohistochemical staining was used to examine the expression of γ -synuclein in 30 esophageal carcinoma specimens and 10 normal control specimens from January to December 2010 (Fourth Hospital of Hebei Medical University). The plasmid containing γ -synuclein (pcDNA3.0- γ -synuclein) was transfected into Eca-109 cells by lipofectamine. The expressions of γ -synuclein mRNA and protein were investigated by RT-PCR and flow cytometry, respectively. The invasion ability of transfected Eca-109 cells was detected by Transwell assay. **Results:** The positive expression rate of γ -synuclein was 83% in human esophageal carcinoma, which was significantly higher than that in normal esophageal tissues ($P < 0.05$), and the positive rate of γ -synuclein in stage-II esophageal carcinoma patients was significantly lower than that in stage III-IV patients (22.2% vs 76.2%, $P < 0.05$). By comparing transfected group in Eca-109 cells with empty plasmid group and control group, RT-PCR showed the expression level of γ -synuclein mRNA increased significantly ([1.10 ± 0.03] vs [0.42 ± 0.03], [0.45 ± 0.15]; $P < 0.01$). Flow cytometry showed that the expression level of γ -synuclein protein increased significantly compared with the other two groups ([1.05 ± 0.06] vs [0.80 ± 0.45], [0.79 ± 0.46]; $P < 0.05$). Invasion through matrigel abilities of Eca-109 cells increased significantly ([167 ± 2.51] vs [65 ± 2.60], [70 ± 2.50]; $P < 0.01$). **Conclusion:** γ -synuclein is highly expressed in esophageal carcinoma tissues and can enhance the invasion of Eca-109 cells, which may play an im-

[基金项目] 河北省自然科学基金资助项目(No. C2008000948)。Project supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. C2008000948)

[作者简介] 荆丽(1982-),女,河北省邢台市,硕士,主治医师,主要从事肿瘤综合治疗的研究。E-mail: jingli82669@yahoo.com.cn

[通信作者] 刘巍(LIU Wei, corresponding author), E-mail: hebeiliuwei@yahoo.com.cn

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120926.0850.006.html>

portant role in carcinogenesis progression and metastasis of esophageal carcinoma.

[**Key words**] esophageal carcinoma; γ -synuclein; transfection; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(5): 521-525]

食管癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,局部复发和转移是影响预后并导致食管癌患者死亡的主要原因^[1]。研究^[2]认为,食管癌发生可由基因表达和调控的异常所致,但对于其复发和转移的机制仍未清楚。 γ -synuclein 基因属神经突触核蛋白 synuclein 家族成员,在肝脏、胃、胰腺、乳腺、卵巢等多种肿瘤组织中表达,与肿瘤远处转移密切相关;其能够增加肿瘤细胞的侵袭和转移能力,或导致对某些化疗药物的耐药^[3-6]。目前,有关 γ -synuclein 在食管癌中研究的报道很少。本研究采用免疫组织化学方法检测 γ -synuclein 在食管癌组织中的表达及其与食管癌临床病理学因素的关系,并通过基因转染上调食管癌细胞中 γ -synuclein 的表达,观察其对食管癌细胞侵袭的影响,以揭示 γ -synuclein 在食管癌发生、发展中的生物学功能和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

收集河北医科大学第四医院 2010 年 1 月至 12 月收治的临床病例资料完整的食管癌石蜡标本 30 例,同时取正常食管组织 10 例。其中男性 22 例、女性 8 例,年龄 32 ~ 70 岁,中位年龄 59 岁。按肿瘤的病理学分级:低分化 7 例(23.3%),中分化 13 例(43.3%),高分化 10 例(33.3%)。全部病例均经病理学确诊,其中鳞癌 23 例(76.7%),腺癌 5 例(16.7%),小细胞未分化癌 1 例,其他类型 1 例。临床分期采用 TNM 分期,其中 I 期 5 例(16.7%),II 期 4 例(13.3%),III 期 12 例(40%),IV 期 9 例(30%)。所有患者术前均未行化放疗。

人食管癌细胞系 Eca-109 由河北医科大学第四医院科研中心保存。含 γ -synuclein 全长的重组质粒 pcDNA3.0- γ -synuclein 由美国福克斯癌症研究中心 Andrew K. Godwin 教授惠赠。大肠杆菌 DH α 购自美国 Promega 公司,羊抗人 γ -synuclein 单克隆抗体购自美国 Senta 公司,羊抗人 γ -synuclein 多克隆抗体购自美国 Sigma 公司,脂质体转染试剂 Lipofectin 2000 购自美国 Invitrogen 公司,Transwell 小室购自美国 Corning 公司,SP 法免疫组化试剂盒、浓缩型 DAB 显色剂均购自北京中杉金桥生物技术公司。

1.2 免疫组织化学法检测 γ -synuclein 蛋白的表达

免疫组织化学法检测食管癌组织中 γ -synuclein

蛋白的表达, γ -synuclein 一抗稀释度为 1:100,用已知阳性组织切片做阳性对照,用 PBS 代替一抗做阴性对照,DAB 显色,苏木精复染。同时每例取一张切片做 H-E 染色观察形态学。

γ -synuclein 蛋白主要为胞质着色,少数病例可见胞核着色。参考文献[7]的判定标准进行改良,采用阳性细胞比例和着色强度两项计分综合评定阳性结果,即阳性细胞数 <25% 计 0 分、25% ~ 50% 计 1 分、51% ~ 75% 计 2 分、 \geq 75% 计 3 分;轻度着色计 1 分、中度着色计 2 分、重度着色计 3 分。每张切片的两项得分之和为该病理评分结果:<3 分为阴性, \geq 3 分为阳性。

1.3 pcDNA3.0- γ -synuclein 转染 Eca-109 细胞

转染前 1 d,以 3×10^5 /孔将 Eca-109 细胞接种于 6 孔板中,培养 24 h,使细胞达 70% ~ 80% 融合;脂质体 10 μ l 与 250 μ l RPMI 1640 培养液混匀,加入重组质粒 pcDNA3.0- γ -synuclein 或 pcDNA3.0 空质粒 8 μ l,补充 RPMI 1640 培养液至总体积 500 μ l,促使 Lipofectin-DNA 混合物的形成;质粒-脂质体复合物分别小心滴加至 Eca-109 细胞上,轻轻混匀,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养。

1.4 RT-PCR 法检测 Eca-109 细胞中 γ -synuclein mRNA 的表达

按照 TRIzol 试剂盒的说明提取食管癌细胞总 RNA。PCR 引物均由上海生化生物工程有限责任公司负责合成并纯化, γ -synuclein 引物序列:上游为 5'-ATGGATGCTCTCAAGAAGGG-3',下游为 5'-CTAGTCTCCCCACTCTGGG-3'; β -actin 引物序列:上游为 5'-TGAGACCTTCAACACCCAG-3',下游为 5'-GCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,56 $^{\circ}$ C 复性 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,34 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.5 流式细胞术检测 Eca-109 细胞中 γ -Synuclein 蛋白的表达

转染 48 h 后收集各组细胞,每份样品加入羊抗人 γ -synuclein 单抗工作液,离心洗涤弃上清。加入鼠抗羊 FITC-IgG 二抗工作液 100 μ l,避光室温孵育。在对基因蛋白免疫荧光标记物测定时,设 PBS 代替一抗和二抗的阴性对照。以平均荧光指数(mean fluorescence index, MFI)表示蛋白表达的相对含量,MFI = 实验样品均值/正常对照样品均值。

1.6 Transwell 小室侵袭实验检测肿瘤细胞侵袭力

将 25 μ l matrigel(1 mg/ml)分 3 次均匀涂于小室微孔膜上并使其胶化,将转染 12 h 后的 Eca-109 单细胞悬液加入小室中,每组设 3 复孔,培养箱中培养 36 h;弃培养液,擦去小室内侧 matrigel 胶及细胞,取下微孔滤膜置甲醛液中固定 30 min,常规 H-E 染色。随机取 5 个高倍视野,计数透过人工基底膜细胞总数。

1.7 统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计软件,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 γ -synuclein 在食管癌组织中的表达及其与食管癌临床病理学因素的关系

γ -synuclein 免疫组化阳性表达定位于细胞质,可见大量棕黄色颗粒。与正常食管组织相比,人食管癌组织中 γ -synuclein 蛋白阳性表达率明显增高 (83.3% vs 40.0% , $P < 0.05$; 图 1)。

淋巴结转移阳性者 γ -synuclein 阳性率明显高于无转移者 (75.0% vs 30.0% , $P < 0.05$), I ~ II 期 γ -synuclein 高表达率明显低于 III ~ IV 期 (22.2% vs 76.2% , $P < 0.05$)。随着分期的增加, γ -synuclein 表达增强,二者成正相关。 γ -synuclein 表达水平与食管癌组织分化程度无关 ($P = 0.051$)。 γ -synuclein 表达水平与食管癌肿瘤组织类型及患者性别、年龄无显著差异 ($P > 0.05$, 表 1)。

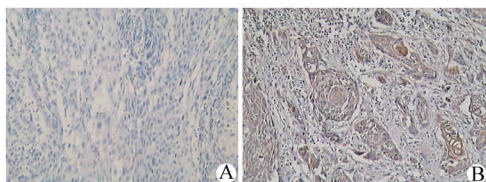


图 1 γ -Synuclein 在正常食管组织 (A) 和食管癌组织 (B) 中的表达 (SP, $\times 400$)

Fig. 1 Expression of γ -Synuclein in normal esophageal tissues (A) and esophageal carcinoma tissues (B) (SP, $\times 400$)

2.2 重组质粒 pcDNA3.0- γ -synuclein 测序及质粒 DNA 浓度和纯度的测定

重组质粒中 γ -synuclein cDNA 序列与 Gene bank 中的相一致。利用紫外线分光光度计检测所得 pcDNA3.0- γ -synuclein 和 pcDNA3.0 两种质粒 DNA 溶液 D_{260}/D_{280} 分别为 1.75 和 1.80。

2.3 pcDNA3.0- γ -synuclein 转染上调 Eca-109 细胞中 γ -synuclein mRNA 的表达

RT-PCR 检测结果显示: pcDNA3.0- γ -synuclein 重组质粒转染组、空质粒转染组和未转染组 γ -synuclein/ β -actin 光密度比值分别为 (1.10 \pm 0.03), (0.42 \pm 0.03), (0.45 \pm 0.15)。 pcDNA3.0- γ -synuclein 转染组较其余两组的比值增加 ($P < 0.01$), 而空质粒转染组和未转染组间无明显差异 ($P > 0.05$, 图 2)。

表 1 γ -Synuclein 在食管癌组织中的表达与食管癌临床病理特征的相关性

Tab. 1 Correlation between γ -synuclein expression and clinicopathologic parameters of esophageal carcinoma

Parameter	Expression of γ -synuclein		P
	- or +	++ or +++	
Lymph nodemetastasis			
Negative	7	3	
Positive	5	15	0.045
Clinical stage			
I - II	7	2	
III - IV	5	16	0.013
Histological grade			
High	7	3	
Middle	5	8	
Low	1	6	0.051
Histopathological type			
Squamous cell carcinoma	8	15	
Adenocarcinoma	3	2	
Other type	1	1	0.561
Gender			
Male	8	14	
Fmale	4	4	0.678
Age (t/a)			
< 50	3	5	
≥ 50	9	13	1.000

2.4 pcDNA3.0- γ -synuclein 转染上调 Eca-109 细胞中 γ -synuclein 蛋白的表达

由重组质粒转染组、空质粒转染组和未转染组 Eca-109 细胞 γ -synuclein 的 MFI 值可见, pcDNA3.0- γ -synuclein 转染组 γ -synuclein 蛋白表达水平较后两组显著增高 [(1.05 \pm 0.06) vs (0.80 \pm 0.45) ,

(0.79 ± 0.46), $P < 0.05$], 而空质粒转染组和未转染组无明显差异 ($P > 0.05$, 图 3)。

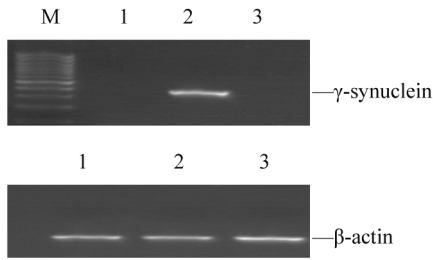


图 2 pcDNA3.0- γ -synuclein 转染后 Eca-109 细胞中 γ -synuclein mRNA 的表达
Fig. 2 γ -synuclein mRNA expression in Eca-109 cells after pcDNA3.0- γ -synuclein transfection
 M: Maker; 1: Untransfected;
 2: pcDNA3.0- γ -synuclein; 3: pcDNA3.0

2.5 pcDNA3.0- γ -synuclein 转染对 Eca-109 细胞侵袭力的影响

侵袭实验结果(图 4)显示: pcDNA3.0- γ -synuclein 重组质粒转染组穿过基底膜细胞数为(167 ± 2.5)个/视野, 较空质粒转染组的(65 ± 2.6)个/视野和未转染组的(70 ± 2.5)个/视野明显增加 ($P < 0.01$), 而后两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果提示, γ -synuclein 能够促进 Eca-109 细胞的侵袭。

3 讨论

γ -synuclein 作为肿瘤标志物已经在乳腺癌中得到广泛研究, 并已被证实具有促进乳腺癌浸润和转移的作用^[8-9]。 γ -Synuclein 在 67.5% 的不同种类肿瘤组织中存在表达, 包括肝脏、食管、结肠、胃、肺、胆囊、前列腺等, 而在肿瘤邻近的正常组织中表达少见; 其表达与多种肿瘤分期相关, I 期表达水平低, II 到 IV 期表达增高^[11-14]。 γ -Synuclein 表达与肿瘤远处转移密切相关, 是判定预后的新指标。

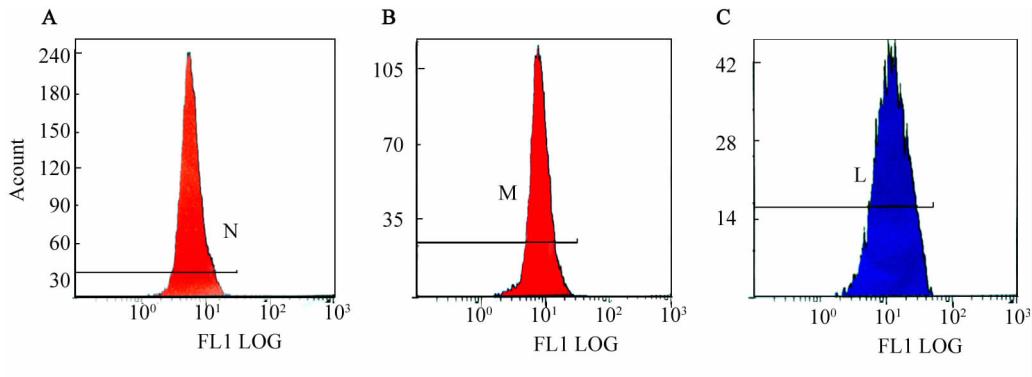


图 3 流式细胞术检测 Eca-109 细胞中 γ -synuclein 蛋白的表达
Fig. 3 γ -synuclein protein expression in Eca-109 cells detected by flow cytometry
 A: Eca-109; B: Eca-109 + pcDNA3.0; C: Eca-109 + pcDNA3.0- γ -synuclein

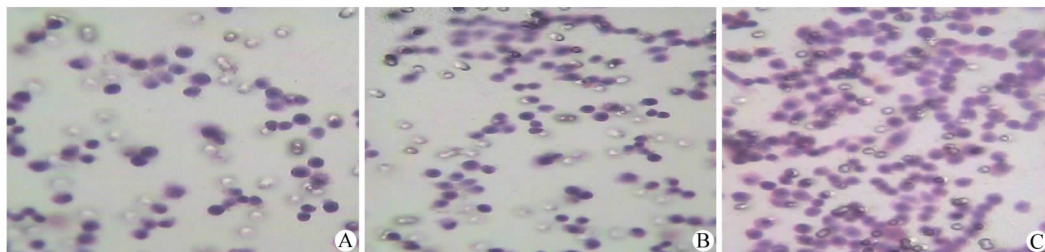


图 4 pcDNA3.0- γ -synuclein 转染对 Eca-109 细胞侵袭力的影响(H-E, $\times 200$)
Fig. 4 Effect of pcDNA3.0- γ -synuclein transfection on invasion of Eca-109 cells (H-E, $\times 200$)
 A: Eca-109; B: Eca-109 + pcDNA3.0; C: Eca-109 + pcDNA3.0- γ -synuclein

本研究显示, γ -synuclein 在食管癌组织中高表达, 且表达水平与食管癌淋巴结转移、TNM 分期呈正相关, γ -synuclein 有可能在食管癌的发生、发展及

远处转移中起重要作用。

本课题进一步在细胞水平上研究了 γ -synuclein 高表达对食管癌细胞 Eca-109 恶性表型的影响, 探

索 γ -synuclein 在食管癌的发展过程中的作用机制。结果表明, γ -synuclein 表达上调能使食管癌细胞 Eca-109 细胞的侵袭力增强,提示 γ -synuclein 可能通过影响细胞侵袭能力,从而促进食管癌浸润转移和恶性发展。

研究表明, γ -synuclein 是一种致癌基因,其表达与人类多种肿瘤的生长、浸润、转移和预后有关。Surgucheva 等^[15]发现,上调细胞 γ -synuclein 的表达,可使基质金属蛋白酶 MMP-9、MMP-2 表达增强,通过降解及重塑细胞外基质促进肿瘤细胞穿过细胞基质、基底膜、血管及淋巴管而向远处侵袭。研究^[16]认为, γ -synuclein 可通过激活 MAPK 信号通路磷酸化激活 AP-1,增强 MMP-9、MMP-2 基因转录活性。大量证据表明,微管蛋白(microtubule-associated protein, MAP) 在诱导微管组装控制微管的不稳定性方面起重要作用。 γ -synuclein 可能与 MAPK 相互作用,调节细胞支架的构成及其动力学,导致细胞动力增强。Pan 等^[17]发现,过表达 γ -synuclein 能够激活小 G 蛋白 RHO 家族成员(包括 Rho、Rac、Cdc42 等)GTP 结合的能力,增强乳腺癌及卵巢癌细胞的迁移及侵袭能力。如使用 Rho、Rac、Cdc42 等抑制剂则能抑制乳腺癌及卵巢癌细胞的迁移及侵袭。

综上, γ -synuclein 可能是一种新的肿瘤预后指标,在恶性肿瘤的病理学诊断、预后判断、个体化治疗方案的选择等方面将发挥重要作用^[18-19]。但到目前为止,其致癌机制、基因功能仍不明确,还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Tachimori Y, Nagai Y, Kanamori N, et al. Pattern of lymph node metastases of esophageal squamous cell carcinoma based on the anatomical lymphatic drainage system [J]. *Dis Esophagus*, 2011, 24(1): 33-38.
- [2] Kim T, Grobmyer SR, Smith R, et al. Esophageal cancer-the five year survivors [J]. *J Surg Oncol*, 2011, 103(1): 179-183.
- [3] Ji H, Liu YE, Jia T, et al. Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(2): 759-764.
- [4] Liu HY, Liu W, Liu JW, et al. Loss of epigenetic control of synuclein- γ gene as a molecular indicator of metastasis in a wide range of human cancers [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(8): 7635-7643.
- [5] Ye Q, Zheng MH, Cai Q, et al. Aberrant expression and demethylation of gamma-synuclein in colorectal cancer, correlated with progression of the disease [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(10): 1924-1932.
- [6] Ren T, Tan BX, Ma XJ, et al. Inhibition of γ -synuclein (SNCG) expression in breast cancer MDA-MB231 cell line [J]. *Chin Ger J Clin Oncol*, 2012, 11(3): 156-159.
- [7] 程世祥,张赛,张豪,等. 神经突出核蛋白- γ 过表达降低肝癌细胞对抗微管药物的敏感性 [J]. *药学学报*, 2010, 45(6): 724-729.
- [8] Mohsin SK, Zhang M, Clark GM, et al. Maspin expression in invasive breast cancer: Association with other prognostic factors [J]. *J Pathol*, 2003, 199(4): 432-435.
- [9] Jia T, Liu YE, Liu J, et al. Stimulation of breast cancer invasion and metastasis by synuclein gamma [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(10): 742-747.
- [10] Guo J, Shou C, Meng L, et al. Neuronal protein synuclein gamma predicts poor clinical outcome in breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2007, 12(1): 1296-1305.
- [11] Whawech-Fauceglia P, Wang D, Syriac S, et al. Synuclein- γ (SNCG) protein expression is associated with poor outcome in endometrial adenocarcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2012, 124(1): 148-152.
- [12] Shi LF, Zheng SF, Zhao YG, et al. Expressions of SNCG in gastric adenocarcinoma and its clinical significances [J]. *Pro Mod Bio*, 2011, 11(8): 1532-1535.
- [13] Liu CY, Dong B, Lu AP, et al. Synuclein gamma predicts poor clinical outcome in colon cancer with normal levels of carcinoembryonic antigen [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10(7): 359-368.
- [14] Morgan J, Hoekstra AV, Chapman-Davis E, et al. Synuclein-gamma (SNCG) may be a novel prognostic biomarker in uterine papillary serous carcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 114(2): 293-298.
- [15] Surgucheva IG, Sivak JM, Fini ME, et al. Effect of gamma-synuclein overexpression on matrix metalloproteinases in retinoblastoma Y79 cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 410(26): 167-176.
- [16] Singh VK, Zhou Y, Marsh JA, et al. Synuclein-gamma targeting peptide inhibitor that enhances sensitivity of breast cancer cells to antimicrotubule drugs [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(16): 626-633.
- [17] Pan ZZ, Bruening W, Godwin AK, et al. Involvement of RHO GTPases and ERK in synuclein-gamma enhanced cancer cell motility [J]. *Int J Oncol*, 2006, 29(12): 1201-1205.
- [18] Hibi T, Mori T, Fukuma M, et al. Synuclein- γ is closely involved in reneural invasion and distant metastasis in mouse models and is a novel prognostic factor in pancreatic cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(8): 2864-2871.
- [19] Frandsen PM, Madsen LB, Bendixen C, et al. Porcine gamma-synuclein: Molecular cloning, expression analysis, chromosomal localization and functional expression [J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(5): 917-919.
- [20] Liu C, Guo J, Qu L, et al. Applications of novel monoclonal antibodies specific for synuclein-gamma in evaluating its levels in sera and cancer tissues from colorectal cancer patients [J]. *Cancer Lett*, 2008, 269(1): 148-158.

[收稿日期] 2012-07-10

[修回日期] 2012-08-25

[本文编辑] 韩丹,周玲琳