

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.05.013

高尔基磷蛋白 3 在非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义

吕希利¹, 田辉², 鲁铭², 岳韦名², 李林², 李树海², 高存², 司立博² (1. 德州市禹城市人民医院胸外科, 山东 禹城 251200; 2. 山东大学齐鲁医院胸外科, 山东 济南 250012)

[摘要] **目的:** 检测高尔基磷蛋白 3 (Golgi phosphoprotein 3, GOLPH3) 在人非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 组织及癌旁肺组织中的表达, 探讨 GOLPH3 表达与非小细胞肺癌临床病理特征及预后中的意义。**方法:** 选取 2004 年 2 月至 2006 年 2 月在山东大学齐鲁医院胸外科行手术治疗的 116 例 NSCLC 患者组织标本及 43 例癌旁肺组织标本, 采用免疫组化方法检测 NSCLC 组织和癌旁肺组织标本中 GOLPH3 蛋白表达水平, 采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计学分析。**结果:** 与癌旁肺组织相比, 肺癌组织中 GOLPH3 蛋白的阳性表达率明显增高 [57.8% (67/116) vs 28.0% (12/43), $P < 0.01$]。NSCLC 组织中 GOLPH3 蛋白表达水平在不同的年龄、性别、病理类型、肿瘤细胞分化程度、有无淋巴结转移及肿瘤浸润程度组间的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 单因素及多因素分析结果显示, GOLPH3 蛋白高表达与患者不良预后有关。**结论:** GOLPH3 蛋白高表达在 NSCLC 发生发展过程中起到重要作用, 并与患者不良预后显著相关, 可作为肺癌生物学特征和预后判断的参考指标之一。

[关键词] 高尔基磷蛋白 3; 非小细胞肺癌; 免疫组织化学; 预后

[中图分类号] R734.2; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)05-0554-05

Golgi phosphoprotein 3 expression in non-small cell lung cancer and its clinical significance

Lv Xili¹, Tian Hui², Lu Ming², Yue Weiming², Li Lin², Li Shuhai², Gao Cun², Si Libo¹ (1. Department of Thoracic Surgery, People's Hospital of Yucheng City, Dezhou City, Yucheng 251200, Shandong, China; 2. Department of Thoracic Surgery, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the possible involvement of Golgi phosphoprotein 3 (GOLPH3) in the development and progression of non-small cell lung cancer (NSCLC) by examining the expression of GOLPH3 in cancerous versus noncancerous lung tissue. **Methods:** Cancerous ($n = 116$) and para-carcinoma ($n = 43$, at least 5 cm from the tumor proper) lung tissue specimens were collected from 116 patients with NSCLC who were surgically treated between February, 2004 and February, 2006 in Qilu Hospital of Shandong University. GOLPH3 protein in these specimens was assessed by immunohistochemistry. Possible correlations of the intensity of the immunoreactive GOLPH3 protein signal were various clinical and pathologic variables were analyzed by Cox regression analysis. **Results:** GOLPH3 protein was detected in 57.8% (67/116) of the cancerous specimens and in 28.0% (12/43) of the non-cancerous specimens ($P < 0.01$). The intensity of the immunoreactive GOLPH3 protein signal was not significantly correlated with any of the clinical and pathological variables assessed ($P > 0.05$). In addition, univariate and multivariate analysis demonstrated that BRF2 protein overexpression were significantly associated with tumor relapse and prognosis. **Conclusion:** GOLPH3 is present in a robustly higher rate in cancerous tissue than in non-cancerous lung tissue of patients with NSCLC. The diagnostic and prognostic value of GOLPH3 for NSCLC warrants further investigations.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30571844); 山东省自然科学基金资助项目 (No. ZR2013HM089); 吴阶平医学基金资助项目 (No. 320.6750.12393)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30571844), the Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2013HM089), and the Wu Jie Ping Medical Foundation (No. 320.6750.12393)

[作者简介] 吕希利 (1974 -), 男, 山东省德州市人, 硕士生, 主治医师, 主要从事胸部肿瘤防治研究, E-mail: 1023413092@qq.com

[通信作者] 田辉 (Tian Hui, corresponding author), E-mail: tianhuiql@126.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20140928.1510.007.html>

[**Key words**] Golgi phosphoprotein 3 (GOLPH3); non-small cell lung cancer (NSCLC); immunohistochemistry; prognosis

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(5): 554-558]

肺癌为严重危害人类生命健康的恶性肿瘤,已成为人类癌症死亡的首要原因;非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌总数 80%, 5 年生存率仅为 30% 左右,主要原因是术后复发和转移^[1-2]。肺癌的发生和浸润转移是非常复杂的过程,受多种相关基因的调控。高尔基磷蛋白 3(Golgi phosphoprotein 3, *GOLPH3*)是最近发现的癌基因,位于人类染色体 5p13,许多实体肿瘤癌基因在该染色体区高度扩增^[3-5];研究发现,*GOLPH3* 在促进肿瘤细胞的分化、增殖方面有重要作用^[6]; *GOLPH3* 可激活丝/苏氨酸蛋白激酶(AKT)^[7],促进癌细胞增殖、抑制细胞凋亡^[8];目前,有关 *GOLPH3* 基因表达与肺癌组织病理指标及预后相关性的报道尚不多见。本研究主要应用免疫组化方法检测人肺癌组织正常肺组织中 *GOLPH3* 蛋白的表达水平,探讨 *GOLPH3* 表达与 NSCLC 临床病理特征及预后的相关性,为 NSCLC 患者的临床诊断、治疗及预后提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取 2004 年 2 月至 2006 年 2 月在山东大学齐鲁医院胸外科行肺叶切除加肺门纵隔淋巴结清扫术的、有明确病理诊断的、术前未行放射治疗及化学治疗的原发性肺癌患者的癌组织标本 116 例,其中男性 72 例、女性 44 例,中位年龄 63 岁(36 ~ 78 岁);另取距离癌组织边缘 5 cm 以上的正常肺组织标本 43 例,其中男性 28 例、女性 15 例,中位年龄 54 岁(39 ~ 76 岁)作为阴性对照。

1.2 主要试剂

GOLPH3 抗体系多克隆抗体购自 Abcam 公司,按 1:200 比例进行稀释;即用型 SP 试剂盒购自北京中山金桥试剂公司。其余生物试剂均购自北京碧云天生物技术公司。

1.3 免疫组织化学法检测 *GOLPH3* 蛋白的表达

全部标本均在手术中收集,经 10% 甲醛液固定,石蜡包埋,常规制备 5 μm 连续切片后行免疫组化检测;石蜡切片烘片 30 ~ 60 min,二甲苯脱蜡 2 次,各 10 min;经 100% 酒精至 70% 酒精逐级脱水;滴加 0.3% H_2O_2 甲醇液,室温下置放 20 min, PBS 洗 3 次;滴加 0.05% ~ 0.10% 胰蛋白酶消化 30 min 至 2 h, PBS 洗 3 次;滴加 1:10 正常小牛血清,室温

下置放 30 min。滴加第一抗体兔抗 *GOLPH3* 抗体,稀释浓度为 1:200,置湿盒内 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜;PBS 洗 3 次,滴加第二抗体,置湿盒内室温下置放 45 min, PBS 洗 3 次;滴加第三抗体,湿盒内室温下置放 45 min;PBS 洗 3 次;切片置于 DAB 显色液中,显微镜下控制显色时间 7 min 后观察并摄片。随机选取每张染色片的 3 个高倍视野($\times 400$)进行观察(细胞总数大于 100 个)。

GOLPH3 蛋白阳性染色以细胞质呈黄色至棕黄色为主,根据染色强度和阳性细胞数进行综合评分。按着色程度分为:未着色、染色与背景相似者为 0 分;着色浅、略高于背景者为 1 分;中度着色、明显高于背景者为 2 分;强着色、呈深棕色者为 3 分。按阳性细胞数分为:阳性细胞数 < 10% 为 0 分,10% ~ 50% 为 1 分,51% ~ 75% 为 2 分, > 75% 为 3 分。2 项评分相加,0 ~ 1 分为阴性(-), ≥ 2 分为阳性(+)。

1.4 NSCLC 患者的随访

所有患者手术后均顺利出院,前 3 年每隔 3 个月随访 1 次,其后每隔 6 个月随访 1 次。随访的内容包括体格检查、胸片、化验分析、CT、超声以及纤维支气管镜检查等。术后总生存率是指从手术之日起至患者死亡或随访截止之日为止的时间。本研究的随访截止时间为 2011 年 2 月,中位随访时间为 49 个月(15 ~ 82 个月)。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,组间比较采用 *t* 检验, *GOLPH3* 蛋白的表达与 NSCLC 临床病理指标间的关系采用 χ^2 检验,生存期比较采用 Kaplan-Meier 生存分析,用 Log-rank 单因素分析法比较患者的生存期差异, Cox 回归多因素分析判定独立预后影响因素。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 组织中高表达 *GOLPH3* 蛋白

免疫组化染色结果(图 1)显示: NSCLC 组织中 *GOLPH3* 蛋白的阳性表达率明显高于正常肺组织 [57.8% (67/116) vs 28.0% (12/43), $P < 0.01$]。

2.2 *GOLPH3* 蛋白的表达与 NSCLC 患者临床病理特征及预后的关系

采用 χ^2 检验分析 *GOLPH3* 蛋白表达与 NSCLC

患者临床病理指标之间的关系,结果(表 1)显示, GOLPH3 蛋白在患者不同的年龄、性别、病理类型、

肿瘤细胞分化程度、有无淋巴结转移及肿瘤浸润程度间均无明显差异($P > 0.05$)。

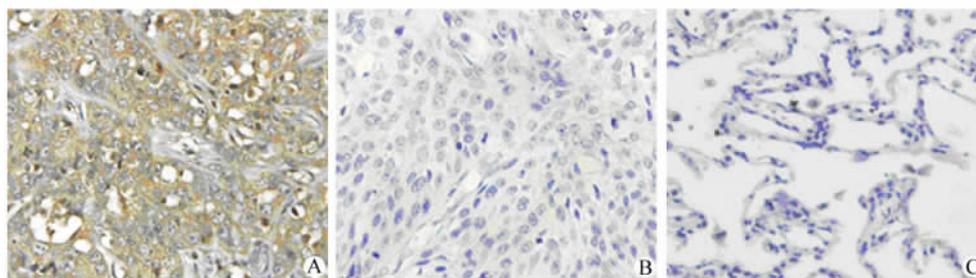


图 1 免疫组织化学检测 GOLPH3 蛋白在肺癌组织及肺组织中表达(×400)

Fig. 1 Expression of GOLPH protein in lung cancer and normal tissues by immunohistochemistry(×400)

A:High GOLPH3 expression in lung cancer tissue;B:Low GOLPH3 expression in lung cancer tissue;C: GOLPH3 expression in normal lung tissues

表 1 GOLPH3 表达与 NSCLC 患者临床病理特征的关系[n(%)]

Tab.1 Relationship between GOLPH3 expression and the clinicopathologic characteristics of NSCLC patients[n(%)]

Characteristic	N	GOLPH3 positive	χ^2	P
Age(t/a)			0.591	0.442
≤65	52	28(53.85)		
>65	64	39(60.94)		
Gender			0.874	0.350
Male	72	44(61.11)		
Female	44	23(52.27)		
Histology			2.446	0.118
Adeno	66	34(51.52)		
Squamous	50	33(66.00)		
Differentiation			0.588	0.745
Well	35	19(54.29)		
Modertate	40	25(62.50)		
Poor	41	23(56.10)		
Invasion depth			0.201	0.654
T1	54	30(55.56)		
T2	62	37(59.68)		
Lymph node metastasis			0.083	0.773
No	86	49(56.98)		
Yes	30	18(60.00)		

2.3 NSCLC 患者预后单因素及多因素分析

116 例 NSCLC 患者中,有 63 例(54.31%)在术后 5 年内死亡,患者术后 5 年的总生存率为 45.69%。单因素生存分析结果显示,GOLPH3 蛋白高表达($P = 0.012$)、淋巴结转移($P = 0.006$)及 T 分期($P = 0.031$)与患者的不良预后密切相关(表 2)。Cox 回归多因素生存分析的结果(表 2)显示,GOLPH3 蛋白高表达($P = 0.017$)、淋巴结转移($P = 0.043$)是判定 NSCLC 患者预后的独立因素。为了进一步研究 GOLPH3 表达与预后的关系,分别在肺腺癌和非鳞状细胞癌分组中分析了 GOLPH3 表达与预后关系,在肺腺癌患者中高表达患者表现有高病死率趋势($P = 0.066$,图 2)。

3 讨论

定位于染色体 5p13 的 GOLPH3 基因,是一种磷酸化的高尔基体膜蛋白,参与执行高尔基体的蛋白质分选功能。GOLPH3 是第一个被发现的定位于反面高尔基网的具有强大转化能力的癌基因。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,(AKT)也是一种重要的信号转导分子,参与多种病理和生理过程。近年来的研究^[7,10]发现,mTOR 信号转导通路的异常激活与乳腺癌、肺癌、胶质瘤等多种实体肿瘤的发生发展有关,已成为肿瘤治疗的重要靶点。GOLPH3 可激活 AKT,促进癌细胞增殖,体外实验研究^[7,11]发现,GOLPH3 的高表达同样对小鼠移植瘤生长具有促进作用;而沉默 GOLPH3 的表达对癌细胞系生长具有抑制作用。还有研究^[12-13]

发现,GOLPH3 的表达在乳腺癌组织中显著上调,并与乳腺癌患者临床预后密切相关,并与肝癌患者 AFP 值升高存在着密切关系。本研究发现,GOLPH3 蛋白在 NSCLC 组织中存在高表达,表明 GOLPH3 的表达可能在肺癌的发生过程中起重要作用。进一步研究^[14-16]发现,GOLPH3 在正常组织中无表达或低表达,而在乳腺癌、食管癌、神经胶质瘤、前列腺癌等多种组织中存在 GOLPH3 表达明显上调。本研究也发现,GOLPH3 蛋白在 NSCLC 组织中的表达水平显著高于正常组织,提示 NSCLC 的发生可能与 GOLPH3 蛋白的高表达有密切关系;研究发现,GOLPH3 表达与患者临床病理特征之间没有相关性;单因素分析结果显示,GOLPH3 高表达患者有较短的生存期,患者较早出现复发转移死亡;多因素分析结果显示,GOLPH3 高表达、淋巴结转移可作为评估 NSCLC 患者预后的独立因素。

表 2 NSCLC 患者预后的多因素及单因素分析
Tab. 2 Univariate and multivariate analyses of prognostic variables for NSCLC patients

Variable	Univariate analysis P(Log-rank test)	OS multivariate analysis	
		95.0% CI	P
Age	0. 801	0. 533 ~ 1. 494	0. 665
Genger	0. 308	0. 670 ~ 1. 973	0. 612
Histology	0. 260	0. 671 ~ 1. 936	0. 627
Differentiation	0. 399	0. 638 ~ 1. 222	0. 453
Invasion depth	0. 031	0. 864 ~ 2. 535	0. 153
Lymph node metastasis	0. 006	1. 020 ~ 3. 128	0. 043
GOLPH3 expression	0. 012	0. 296 ~ 0. 888	0. 017

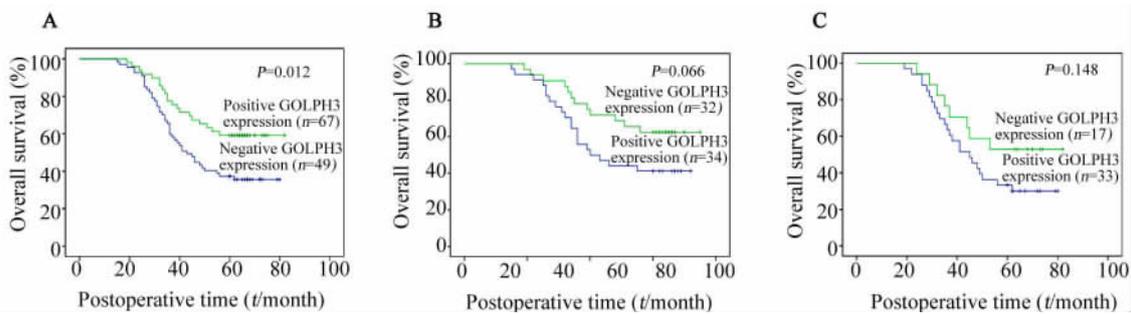


图 2 GOLPH3 表达 (A)、肺腺癌(B)和鳞癌(C)与患者生存期之间关系的 Kaplan-Meier 分析
Fig. 2 Kaplan-Meier curves of overall survival of NSCLC patients according to the status of GOLPH3 protein expression(A),Adenocarcinoma (B) and Squamous cell carcinoma(C)

综上所述,GOLPH3 在 NSCLC 组织中存在高表达,GOLPH3 高表达患者生存期较短;GOLPH3 蛋白表达可以作为评估患者预后的独立因素,同时 GOLPH3 基因可作为 NSCLC 生物治疗新靶点。本研究结果为探讨 NSCLC 的发生、发展机制提供了新的思路。

[参考文献]

[1] Brognard J, Clark AS, Ni Y, et al. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation [J]. Cancer Res, 2001, 61(10): 3986-3997.
[2] Ren H, Tang X, Lee JJ, et al. Expression of hepatoma-derived growth factor is a strong prognostic predictor for patients with early-stage non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2004, 22 (16): 3230-3237.

[3] Goringe KL, Boussioutas A, Bowtell DD. Novel regions of chromosomal amplification at 6p21, 5p13, and 12q14 in gastric cancer identified by array comparative genomic hybridization [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2005, 42(3): 247-259.
[4] Bohm M, Wieland I, Schmidt C, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 5p13-12 predicts adverse prognosis in advanced bladder cancer independent of tumor stage and grade [J]. J Urol, 2002, 168(6): 2655-2658.
[5] Yokoi S, Yasui K, Saito-Ohara F, et al. A novel target gene, SKP2, within the 5p13 amplicon that is frequently detected in small cell lung cancers [J]. Am J Pathol, 2002, 161(1): 207-216.
[6] Abraham RT. GOLPH3 links the Golgi network to mTOR signaling and human cancer [J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2009, 22 (4): 378-379.
[7] Scott K L, Kabbarah O, Liang M C, et al. GOLPH3 modulates mTOR signalling and rapamycin sensitivity in cancer [J]. Nature, 2009, 459(7250): 1085-1090.
[8] Zeng Z, Lin H, Zhao X, et al. Overexpression of GOLPH3 pro-

- motes proliferation and tumorigenicity in breast cancer via suppression of the FOXO1 transcription factor [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(15): 4059-4069.
- [9] Hay N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer [J]. Cancer Cell, 2005, 8(3): 179-183.
- [10] Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer [J]. Cancer Cell, 2007, 12(1): 9-22.
- [11] Scott KL, Chin L. Signaling from the Golgi: Mechanisms and models for Golgi phosphoprotein 3-mediated oncogenesis [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(8): 2229-2234.
- [12] 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): 4059-4069.
- [13] Hu G, Li Y, Yang M, et al. High expression of Golgi phosphoprotein-3 is associated with poor survival in patients with hepatocellular carcinoma [J]. Tumor Biol, 2014 [Epub ahead of print].
- [14] Wang JH, Chen XT, Wen ZS, et al. High expression of GOLPH3 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis [J]. PLoS ONE, 2012, 7(10): e45622.
- [15] Li XY, Liu W, Chen SF, et al. Expression of the Golgi phosphoprotein-3 gene in human gliomas: a pilot study [J]. J Neurooncol, 2011, 105(2): 159-163.
- [16] Hua X, Yu L, Pan W, et al. Increased expression of Golgi phosphoprotein-3 is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis of prostate cancer [J]. Diagn Pathol, 2012, 7: 127.
- [收稿日期] 2014-04-09 [修回日期] 2014-08-20
- [本文编辑] 阮芳铭

· 科技动态 ·

E3 泛素连接酶 TRIM6 通过合成非锚定 K48 多聚泛素修饰链促进干扰素受体- $IKK\epsilon$ 信号通路介导的抗病毒反应

美国西奈山医学院的 Adolfo Garcia-Sastre 教授以及他的研究团队通过实验发现, E3 泛素连接酶 TRIM6 可以通过合成 K48 多聚泛素链并且对底物进行非锚定的泛素化修饰参与抗病毒反应。其相关研究成果发表在 2014 年 5 月 29 日的 *Immunity* 杂志上。

天然免疫系统是人类抵御病原微生物的第一道防线, 它通过模式识别受体识别病原相关分子模式后会诱导 I 型干扰素及其他细胞因子的产生而发挥功能, 这其中的 I 型干扰素在抗病毒反应过程中发挥重要的作用。在 I 型干扰素产生过程中, IKK 相关激酶(包括 TBK1 和 $IKK\epsilon$) 磷酸化 IRF3 及 IRF7 是一个关键环节, 但是, $IKK\epsilon$ 本身是如何被活化的却不是很清楚。蛋白的泛素化是一种重要的转录后修饰方式, 它能够参与调节免疫反应以及细胞因子的产生。在最近的研究中, 德州大学西南医学中心的 Zhijian James Chen 教授率先发现, K63 多聚泛素链可以通过和底物蛋白非锚定结合的方式对底物蛋白的功能进行调控, 但是对于这个领域的研究还不够充分。

Adolfo Garcia-Sastre 教授在之前的研究中发现, TRIM 家族蛋白广泛参与到天然免疫模式识别受体下游信号的调控过程中, TRIM6 就是其中有调控功能的一员, 本研究则对 TRIM6 的调控功能进行了细致的探讨。

Adolfo Garcia-Sastre 教授团队首先证实了 TRIM6 能够正向调控干扰素 β 以及干扰素诱导基因(interferon stimulated gene, *ISG*) 的表达, 并且在体外有明显的抗仙台病毒(SeV)及抗脑心肌炎病毒(EMCV)的作用。之后, 他们发现 TRIM6 能够与 $IKK\epsilon$ 发生相互作用, 并且在病毒刺激及干扰素处理的情况下, 两者能够发生共定位, 并且在干扰素受体活化后, 下游 $IKK\epsilon$ 的活化需要 TRIM6 的参与。他们发现 TRIM6 活化 $IKK\epsilon$ 并不是通过比较常见的锚定的泛素化修饰, 而是通过对 $IKK\epsilon$ 进行了非锚定的 K48 多聚泛素化修饰, 并且 $IKK\epsilon$ 的 172 位的丝氨酸对于它与 TRIM6 的结合以及活性有着重要的作用。最后, 作者还初步探讨了介导 TRIM6 活化的上游信号, 发现 TRIM6 可以和 JAK1 相互作用, 推测有可能是干扰素受体活化 JAK1, 继而激活 TRIM6 而发挥促进 $IKK\epsilon$ 的功能。

本项工作首次报道了非锚定的 K48 多聚泛素化修饰方式, 并且提供了 TRIM 蛋白家族以及泛素化系统研究的一个新视角, 提示游离的多聚泛素链很有可能成为一种新的参与信号调控的第二信使。关于这种游离的多聚泛素链的合成以及发挥功能的方式还值得进一步的深入研究。

[俞宙 摘译, 陈涛涌 审阅. Rajsbaum R, Versteeg GA, Schmid S, et al. *Immunity*, 2014, 40(6): 880-895.]