



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2018.10.012
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2018.10.012
Chinese Journal of General Surgery, 2018, 27(10):1295-1303.

· 基础研究 ·

肝 X 受体 α 与蛋白酶体激活因子 28 γ 在胃癌中的表达及其对胃癌细胞生长的影响

陈冠阳¹, 陈子华¹, 袁伟杰¹, 高昱¹, 杨伟民², 陈志康²

(中南大学湘雅医院 1. 胃肠外科 2. 结直肠肛门外科, 湖南长沙 410008)

摘要

目的: 探讨肝 X 受体 α (LXR α) 与蛋白酶体激活因子 28 γ (PA28 γ) 在胃癌中的表达以及两者对胃癌细胞生长的影响。

方法: 用 qRT-PCR 和免疫组织化学方法检测 LXR α 与 PA28 γ 的 mRNA 与蛋白在 35 例胃癌和癌旁组织中的表达, 分析 LXR α 与 PA28 γ 蛋白表达与患者临床病理因素的关系以及两者的相关性。分别用流式细胞术、qRT-PCR、Western blot 检测过表达 LXR α 对胃癌 AGS 细胞的细胞周期、裸鼠体内生长以及细胞中 LXR α 对 PA28 γ 表达的变化。

结果: 与癌旁组织比较, 胃癌组织中 LXR α 的 mRNA 与蛋白表达明显降低, 而 PA28 γ 的 mRNA 与蛋白表达明显升高 (均 $P < 0.05$); 两者蛋白的表达与胃癌患者主要临床病理因素均无明显关系 (均 $P > 0.05$); LXR α 与 PA28 γ 蛋白表达在胃癌组织中呈明显负相关 ($r = -0.452$, $P = 0.006$)。过表达 LXR α 后, AGS 细胞的 LXR α 的 mRNA 表达明显升高, 而 PA28 γ 的 mRNA 与蛋白表达明显降低; 细胞周期进程受到明显阻滞; 在裸鼠体内的生长明显抑制, 且移植瘤组织中的 LXR α 的 mRNA 与蛋白表达明显上调、PA28 γ 的 mRNA 与蛋白表达明显下调 (均 $P < 0.05$)。

结论: LXR α 在胃癌中表达下调, 同时伴随 PA28 γ 表达上调, 两者之间的消长可能通过影响细胞周期进程而调节胃癌细胞的生长。

关键词

胃肿瘤; 肝 X 受体; 蛋白酶体激活因子; 细胞增殖
中图分类号: R735.2

Expressions of liver X receptor α and proteasome activator 28 in gastric cancer and their effects on growth of gastric cancer cells

CHEN Guanyang¹, CHEN Zihua¹, YUAN Weijie¹, GAO Yu¹, YANG Weimin², CHEN Zhikang²

(1. Department of Gastrointestinal Surgery 2. Department of Colorectal and Anal Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract

Objective: To investigate the expressions of liver X receptor α (LXR α) and proteasome activator 28 γ (PA28 γ) in gastric cancer and their effects on the growth of gastric cancer cells.

Methods: The mRNA and protein expressions of LXR α and PA28 γ in 35 specimens of gastric cancer and paired

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573012)。

收稿日期: 2018-01-26; 修订日期: 2018-09-14。

作者简介: 陈冠阳, 中南大学湘雅医院住院医师, 主要从事胃肠道肿瘤方面的研究。

通信作者: 陈志康, Email: chenzk1974@hotmail.com

adjacent tissue were determined by qRT-PCR and immunohistochemical staining. The relations of their protein expressions with the clinicopathologic factors of the patients, and their correlation were analyzed. In gastric AGS cells after overexpression with LXR α , the changes in cell cycle, growth in nude mice and expressions of LXR α and that of PA28 γ were analyzed by flow cytometry, qRT-PCR and Western blot, respectively.

Results: Both mRNA and protein expressions of LXR α were significantly decreased, and both mRNA and protein expressions of PA28 γ were significantly increased in gastric cancer tissue compared with adjacent tissue (all $P < 0.05$); the expressions of either LXR α or PA28 γ showed no significant associations with the main clinicopathologic factors of the gastric cancer patients (all $P > 0.05$); there was a significant negative correlation between LXR α and PA28 γ protein expressions in gastric cancer tissue ($r = -0.452$, $P = 0.006$). In gastric AGS cells after overexpression with LXR α , the LXR α mRNA expression was significantly increased, while the mRNA and protein expressions of PA28 γ were significantly reduced, the cell cycle process was significantly blocked, the growth in nude mice was significantly suppressed, with significantly up-regulated mRNA and protein expressions of LXR α and down-regulated mRNA and protein expressions of PA28 γ in the tissue of the transplanted tumor (all $P < 0.05$).

Conclusion: LXR α expression is down-regulated in gastric cancer with synchronous up-regulated PA28 γ expression, and their growth and decline may probably regulate the growth of gastric cancer cells through affecting the cell cycle process.

Key words

Stomach Neoplasms; Liver X Receptors; Proteasome Activator; Cell Proliferation

CLC number: R735.2

胃癌是世界第五常见恶性肿瘤，我国是胃癌高发地区^[1-2]。传统的胃癌治疗是以手术为主，结合化疗等其他方法的综合治疗。目前，胃癌的分子靶向治疗日新月异，越来越多的基因受到人们的关注，成为胃癌治疗的潜在靶点^[3]。

肝X受体 (liver x receptor, LXR) 属于核受体家族的一员，包括LXR α (也称为NR1H3) 和LXR β (也称为NR1H2) 两种亚型，在糖类、胆固醇、脂肪酸的代谢过程中起到了重要的调节作用^[4]。近年来的研究发现LXR参与肿瘤的免疫调节^[5]，并在多种恶性肿瘤中发挥抑癌作用^[6]。GW3965是LXR的激动剂，能特异性激动上调LXR^[7]。在前期的工作中，笔者通过高通量测序发现：上调LXR α 后，胃癌细胞AGS中蛋白酶体激活因子28 γ (PA28 γ) 的mRNA表达水平出现了明显下调。蛋白酶体激活剂PA28 γ 是11S蛋白酶体激活剂家族 (REG家族) 成员之一，能够通过一种不依赖泛素化和ATP的方式降解目的蛋白，从而参与调控细胞信号传导、细胞凋亡、细胞周期及免疫应答等^[8]。PA28 γ 在多种恶性肿瘤中高表达，发挥促癌作用，与多种肿瘤的预后、发生和临床病理特征密切相关^[9]。因此推测：在胃癌细胞AGS中，LXR α 可能与PA28 γ 存在一定联系；这

可能是LXR α 发挥抑癌作用的机制之一。

本研究首先使用免疫组织化学染色和qRT-PCR确定了LXR α 、PA28 γ 在胃癌组织和癌旁组织中的表达情况；分析LXR α 和PA28 γ 蛋白表达的相关性；并分析了LXR α 、PA28 γ 蛋白的表达水平与临床病理参数的关系。接下来选择胃癌细胞株AGS为研究对象，利用LXR α 过表达慢病毒载体处理AGS细胞；通过流式细胞术探究了LXR α 对AGS细胞细胞周期的影响；并通过qRT-PCR和Western blot验证了LXR α 对PA28 γ 表达水平的影响。最后在动物实验中进一步验证LXR α 对AGS细胞增殖的影响。旨在为理解LXR α 、PA28 γ 在胃癌增殖中的地位、作用和可能机制提供了新的实验依据和思路，并为LXR α 、PA28 γ 潜在临床价值的发掘奠定了理论基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 组织标本 收集 35 例中南大学湘雅医院自 2015 年 7 月—2016 年 8 月收治的胃癌患者癌组织以及距肿瘤边缘约 2 cm 癌旁正常组织，每例患者手术后 30 min 内取新鲜组织标本，并迅速转移至

液氮中保存。所有患者术前均未行化学治疗、放射治疗以及其他针对肿瘤的治疗,其中女12例,男23例;年龄分布32~75岁,中位年龄54岁;未分化和低分化者30例,中分化和高分化者5例;按照AJCC第7版TNM分期标准分期:I~II期10例,III~IV期25例;肿瘤 ≥ 5 cm者18例, < 5 cm者17例; T_1/T_2 期者5例, T_3/T_4 期者30例;淋巴结转移者24例,无淋巴结转移者11例。所有患者均知情同意,本研究经医院伦理委员会审批。

1.1.2 细胞与实验动物 胃癌细胞株AGS由中南大学湘雅医院中心实验室提供。裸鼠BALB/c-nu,全为雄性,4周龄,体质量18~22 g,由中南大学动物实验中心提供,共6只,SPF级条件下饲养,标准实验室食物,自由饮水。

1.1.3 主要试剂与耗材 培养液RPMI1640、胰蛋白酶、TRIzol试剂、胎牛血清(FBS)购自美国Gibco公司;DAB显色试剂盒购自瑞士Roche公司;BCA试剂盒购自中国上海碧云天生物技术有限公司;二甲基亚砜(DMSO)明胶、嘌呤霉素、碘化丙啶(PI)以及核糖核酸酶A(RNase A)购自美国Sigma公司;PCR试剂盒、反转录试剂盒均购自日本TaKaRa公司;引物由上海生物生工公司合成;LXR α 抗体,二抗均购自英国Abcam公司;PA28 γ 抗体,二抗均购自美国CST公司;CCK-8试剂盒购自日本同仁化学研究所;6孔细胞培养板购自美国Corning公司;其他各种化学试剂均为国产分析纯产品。

1.2 实验方法

1.2.1 标本处理 标本各取部分由10%福尔马林固定,常规行石蜡包埋。蜡块切片后行免疫组织化学染色。所有石蜡标本行连续切片,片厚4 μ m,共4张。1张作常规HE染色,2张作LXR α 、PA28 γ 免疫组化染色,1张以PBS液代替一抗作为阴性对照。随机抽取15例胃癌患者术后新鲜标本进行qRT-PCR。

1.2.2 免疫组织化学及评分标准 石蜡标本4 μ m厚连续切片,常规脱蜡以及水化,3%双氧水室温下15 min灭活内源性过氧化物酶,于0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)中用微波法进行抗原修复,冷却后PBS漂洗3次。然后使用5%的牛血清白蛋白(BSA)封闭,滴加一抗,4 $^{\circ}$ C条件下过夜。接着滴加生物素化山羊抗兔二抗,37 $^{\circ}$ C孵育20 min。之后使用辣根过氧化物酶DAB显色试剂盒于室温下显色,蒸馏水洗涤。用苏木精复染5 min。

以细胞核出现淡黄色至棕褐色判为阳性。使用低倍镜观察整个切片,随机取10个视野,切换高倍镜观察细胞染色情况;结合阳性细胞百分率和染色强度进行免疫组化评分。结果判定参照相关文献^[10]:阳性细胞百分数为0评为0分; $> 0 \sim < 10\%$ 为1分;10%~50%为2分; $> 50\%$ 为3分。染色深度计分:阴性为0分;淡黄色为1分;棕黄色为2分;棕褐色为3分。按“阳性细胞 \times 染色深度”计总分,0~3分为阴性,4~6分为中度阳性, > 6 分为强阳性。所有染色结果的判定都采用双盲法和统一评分标准,在完全不知对应样本临床资料的前提下,由2名研究者分别对免疫组织化学结果进行评分,所有打分过程都重复3次以上。

1.2.3 细胞培养 人胃癌AGS细胞采用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基进行培养,用25 cm^2 培养瓶置于5% CO_2 的37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养。细胞铺满80%培养瓶时,胰酶消化后1 000 r/min离心5 min,进行1:3传代培养。

1.2.4 过表达LXR α 慢病毒构建和转染 过表达LXR α 的重组慢病毒颗粒-LV-NR1H3(25063-1)由上海吉凯基因化学技术有限公司构建。根据厂家说明书进行慢病毒转染,经过嘌呤霉素筛选后得到稳定转染细胞株。

1.2.5 qRT-PCR 分别提取新鲜胃癌与癌旁组织、各组皮下成瘤瘤体以及体外实验各组细胞中的总RNA,将1 μ g总RNA依照反转录试剂盒中的操作步骤反转录成cDNA。采用SYBR Green法进行qRT-PCR,引物序列见表1。 $^{\Delta}\text{CT}=\text{CT}(\text{目的基因,待测样本})-\text{CT}(\text{内标基因,待测样本})$ (表1)。

表1 引物序列

| 基因 | 引物序列(5'-3') |
|---------------|-----------------------------------|
| LXR α | |
| 正向 | AGA ACA GAT CCG CCT GAA GA |
| 反向 | CCT CTC GAT CAT GCC CAG TT |
| PA28 γ | |
| 正向 | CCA GTC CCT GAC CCC ATT CT |
| 反向 | CCA AAG TTG TTT CCA TCT TCT ATC C |
| GAPDH | |
| 正向 | TGG GTG TGA ACC ATG AGA AGT |
| 反向 | TGA GTC CTT CCA CGA TAC CAA |

1.2.6 Western blot 分别提取各组皮下成瘤瘤体以及体外实验各组细胞中的总蛋白。使用二喹啉甲酸(BCA)法检测蛋白浓度。取各组蛋白样品

30 μg 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 下加热变性后上样, 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (SDS-PAGE) 电泳分离后, 转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上, 5% 的脱脂牛奶室温下封闭 2 h, 相应的一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜、使用洗涤缓冲液 (TBST) 洗膜 3 次, 每次 10 min, 室温下孵育二抗 1 h, 洗膜 3 次, 每次 10 min。使用 Bio-Rad 凝胶成像分析系统显影、拍照。采用 Image J 软件进行条带灰度分析, 以目的蛋白与内参的灰度比值表示目的蛋白的相对表达量。

1.2.7 流式细胞术检测细胞周期 将 AGS 细胞分为过表达组 (过表达 LXR α 慢病毒载体转染) 和空白对照组 (无处理), 常规方法计数并收集细胞 (约 2×10^6), $1 \times \text{PBS}$ 洗涤 1 次 (1 000 r/min, 5 min)。预冷 75% 乙醇固定, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。弃去 75% 乙醇, $1 \times \text{PBS}$ 洗涤 1 次 (1 000 r/min, 5 min)。重悬细胞于 800 μL $1 \times \text{PBS} + 1\% \text{BSA}$ 溶液中, 加入 100 μL PI 染液, 加入 100 μL RNA 酶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 上机检测。检测前预热 30 min 后荧光微球调整机器, 使各放大器接收信号的 HCV 值 $< 2\%$, 采用 Cell Modifit 软件进行分析。细胞增殖指数 = $(S + G_2/M) / (S + G_2/M + G_0/G_1)$ 。

1.2.8 裸鼠皮下成瘤 将裸鼠随机分为过表达组 (移植过表达 LXR α 的 AGS 细胞) 和空白对照组 (移植无处理的 AGS 细胞), 每组 3 只。取各组对数生长期的胃癌细胞株用胰蛋白酶消化, 用 RPMI1640 培养液稀释成单细胞悬液, 通过台盼蓝染

色测定细胞活力后, 用冰生理盐水离心洗涤 2 次, 悬浮于生理盐水中, 调整细胞浓度为 1×10^8 个/mL。将裸鼠左侧腋窝处皮肤用 75% 酒精消毒, 使用 1 mL 注射器抽取细胞悬液 0.1 mL 接种于左侧腋窝处皮下。观察期结束后用颈椎脱臼法处死裸鼠, 无菌条件下完整剥离瘤体, 称重。30 min 内转移至液氮中保存, 供后续实验使用。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 21.0 统计软件对实验数据进行统计分析, 计数资料使用 χ^2 检验和 Kruskal-Wallis H 检验, 相关性检验使用 Spearman 等级相关分析, 计量资料使用 t 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌手术标本中 LXR α 与 PA28 γ 的表达

2.1.1 LXR α 与 PA28 γ mRNA 的表达 qRT-PCR 结果显示, 与内参 GAPDH 相比较, LXR α 在 15 例胃癌组织中的 ΔCT 值为 6.81 ± 1.48 , 在癌旁组织中的 ΔCT 值为 5.61 ± 1.23 。即 LXR α mRNA 在胃癌组织中的水平低于癌旁组织, 差异有统计学意义 ($P = 0.0314$)。PA28 γ 在 15 例胃癌组织中的 ΔCT 值为 7.11 ± 2.91 , 在癌旁组织中的 ΔCT 值为 8.90 ± 1.20 。即 PA28 γ mRNA 在胃癌组织中的水平高于癌旁组织, 差异有统计学意义 ($P = 0.0414$) (图 1)。

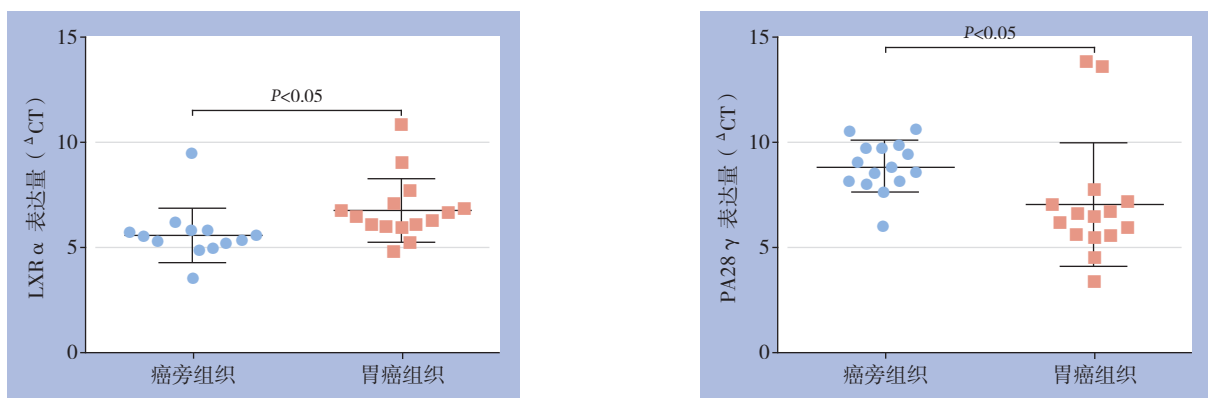


图 1 LXR α 和 PA28 γ mRNA 在胃癌和癌旁组织中的相对水平

Figure 1 The relative expression levels of LXR α and PA28 γ mRNA in gastric cancer and adjacent tissue

2.1.2 LXR α 和 PA28 γ 蛋白的表达及其临床病理因素的关系 免疫组织化学结果显示, LXR α 在胃癌组织以及癌旁组织中表达的阳性率分别为 68.6% (24/35) 和 91.4% (32/35), 即 LXR α

在胃癌组织中的表达低于癌旁组织 ($P = 0.034$)。PA28 γ 在胃癌组织以及癌旁组织中表达的阳性率分别为 60.0% (21/35) 和 31.4% (11/35), 即 PA28 γ 在胃癌组织中的表达高于癌旁组织

($P=0.030$) (图 2) (表 2)。LXR α 与 PA28 γ 蛋白表达与患者性别、年龄、肿瘤分化程度、

TNM 分期、肿瘤大小、浸润深度、有无淋巴结转移均无明显关系 (均 $P>0.05$) (表 3)。

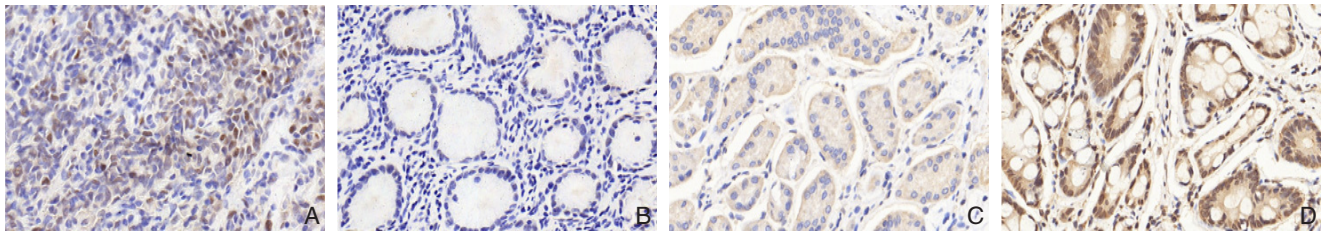


图 2 免疫组化检测 PA28 γ 和 LXR α 蛋白表达 ($\times 400$) A: 胃癌中 PA28 γ 阳性; B: 癌旁中 PA28 γ 阴性; C: 胃癌中 LXR α 阴性; D: 癌旁中 LXR α 阳性

Figure 2 Immunohistochemical staining for PA28 γ and LXR α protein expressions ($\times 400$) A: Positive PA28 γ expression in gastric cancer tissue; B: Negative PA28 γ expression in tumor adjacent tissue; C: Negative LXR α expression in gastric cancer tissue; D: Positive LXR α expression in tumor adjacent tissue

表 2 LXR α 和 PA28 γ 蛋白在胃癌及其癌旁组织中的表达比较 [n (%)]

Table 2 Comparison of LXR α and PA28 γ protein expressions in gastric cancer and adjacent tissue [n (%)]

| 组织 | LXR α | | PA28 γ | |
|----------|--------------|-----------|---------------|-----------|
| | (-) | (+) | (-) | (+) |
| 胃癌组织 | 11 (31.4) | 24 (68.6) | 14 (40.0) | 21 (60.0) |
| 癌旁组织 | 3 (8.6) | 32 (91.4) | 24 (68.6) | 11 (31.4) |
| χ^2 | 5.714 | | 5.757 | |
| P | 0.034 | | 0.030 | |

表 3 LXR α 与 PA28 γ 蛋白的表达与胃癌临床病理特征的关系 [n (%)]

Table 3 The relations of LXR α and PA28 γ protein expressions with the clinical factors of gastric cancer [n (%)]

| 因素 | n | LXR α | | | P | PA28 γ | | | P |
|--------------------------------|-----|--------------|-----------|----------|-------|---------------|-----------|----------|-------|
| | | (-) | (+) | (++) | | (-) | (+) | (++) | |
| 性别 | | | | | | | | | |
| 男 | 23 | 8 (34.8) | 10 (43.5) | 5 (21.7) | 0.435 | 8 (34.8) | 12 (52.2) | 3 (13.0) | 0.244 |
| 女 | 12 | 3 (25.0) | 5 (41.7) | 4 (33.3) | | 6 (50.0) | 6 (50.0) | 0 (0.0) | |
| 年龄 (岁) | | | | | | | | | |
| < 60 | 24 | 7 (29.2) | 12 (50.0) | 5 (20.8) | 0.790 | 8 (33.3) | 14 (58.4) | 2 (8.3) | 0.321 |
| ≥ 60 | 11 | 4 (36.4) | 3 (27.3) | 4 (36.4) | | 6 (54.5) | 4 (36.4) | 1 (9.1) | |
| 病理分化 | | | | | | | | | |
| 低分化 | 30 | 10 (33.3) | 13 (43.4) | 7 (23.3) | 0.420 | 10 (33.3) | 17 (56.7) | 3 (10.0) | 0.054 |
| 中高分化 | 5 | 1 (20.0) | 2 (40.0) | 2 (40.0) | | 4 (80.0) | 1 (20.0) | 0 (0.0) | |
| TNM 分期 | | | | | | | | | |
| I/II | 10 | 2 (20.0) | 5 (50.0) | 3 (30.0) | 0.435 | 5 (50.0) | 4 (40.0) | 1 (10.0) | 0.554 |
| III/IV | 25 | 9 (36.0) | 10 (40.0) | 6 (24.0) | | 9 (36.0) | 14 (56.0) | 2 (8.0) | |
| 肿瘤大小 (cm) | | | | | | | | | |
| < 5 | 17 | 6 (35.3) | 7 (41.2) | 4 (23.5) | 0.646 | 7 (41.2) | 9 (52.9) | 1 (5.9) | 0.768 |
| ≥ 5 | 18 | 5 (27.8) | 8 (44.4) | 5 (27.8) | | 7 (38.9) | 9 (50.0) | 2 (11.1) | |
| 浸润深度 | | | | | | | | | |
| T ₁ /T ₂ | 5 | 1 (20.0) | 2 (40.0) | 2 (40.0) | 0.420 | 2 (40.0) | 3 (60.0) | 0 (0.0) | 0.813 |
| T ₃ /T ₄ | 30 | 10 (33.3) | 13 (43.4) | 7 (23.3) | | 12 (40.0) | 15 (50.0) | 3 (10.0) | |
| 淋巴结转移 | | | | | | | | | |
| 无 | 11 | 2 (18.2) | 5 (45.4) | 4 (36.4) | 0.210 | 6 (54.5) | 4 (36.4) | 1 (9.1) | 0.321 |
| 有 | 24 | 9 (37.5) | 10 (41.7) | 5 (20.8) | | 8 (33.3) | 14 (58.3) | 2 (8.3) | |

2.1.3 LXR α 与 PA28 γ 蛋白表达的相关性 免疫组织化学结果显示, 35 例胃癌组织中, LXR α 蛋白强阳性者 9 例, 中等阳性者 15 例, 阴性者 11 例。PA28 γ 蛋白强阳性者 5 例, 中等阳性者 16 例,

阴性者 14 例。经 Spearman 等级相关分析显示, LXR α 和 PA28 γ 蛋白在胃癌中的表达呈负相关 ($r=-0.452$, $P=0.006$) (表 4)。

表 4 胃癌组织中 LXR α 和 PA28 γ 蛋白表达的相关性
Table 4 Correlation between LXR α and PA28 γ protein expressions in gastric cancer tissue

| PA28 γ | LXR α | | | <i>r</i> | <i>P</i> |
|---------------|--------------|-----|------|----------|----------|
| | (-) | (+) | (++) | | |
| (-) | 1 | 6 | 7 | -0.452 | 0.006 |
| (+) | 7 | 9 | 0 | | |
| (++) | 3 | 0 | 2 | | |

2.2 细胞实验结果

2.2.1 转染效率检测以及过表达 LXR α 对 PA28 γ 表达的影响 用 qRT-PCR 检测空白对照组 AGS 细胞和过表达组 AGS 细胞中 PA28 γ mRNA 相对水平, 结果显示, 过表达组 LXR α mRNA 的

相对水平为空白对照组的 (26.507 ± 3.016) 倍。同时用 qRT-PCR 与 Western blot 检测 PA28 γ mRNA 与蛋白的表达, 结果显示, 与空白对照组比较, 过表达组 PA28 γ 的 mRNA 与蛋白的表达水平均明显下降 ($P=0.0068$ 、 $P=0.0010$) (图 3)。2.2.2 过表达 LXR α 对体外 AGS 细胞细胞周期的影响 流式细胞仪检测结果显示, 过表达组细胞处于亚 G₀ 期以及 G₀/G₁ 期比例高于空白对照组; 而 S 期和 G₂/M 期细胞比例均低于空白对照组 (均 $P<0.05$)。LXR α 过表达组增殖指数为 0.433 ± 0.003 , 明显低于空白对照组的 0.526 ± 0.001 ($P=0.000$) (图 4) (表 5)。

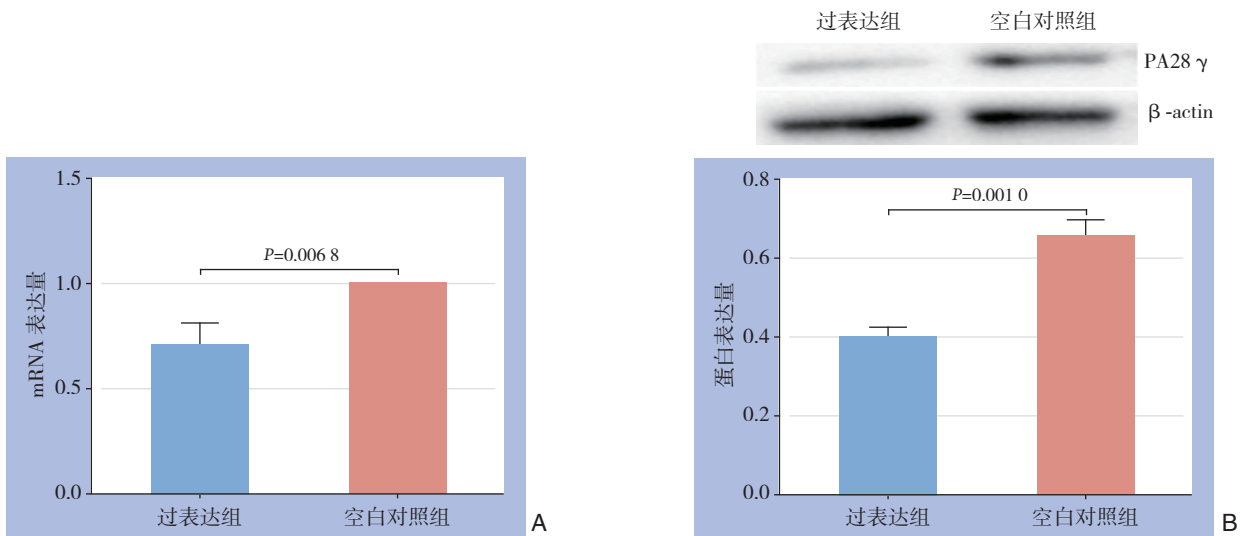


图 3 PA28 γ 表达检测 A: mRNA 表达; B: 蛋白表达
Figure 3 Determination of PA28 γ expression A: mRNA expression; B: Protein expression

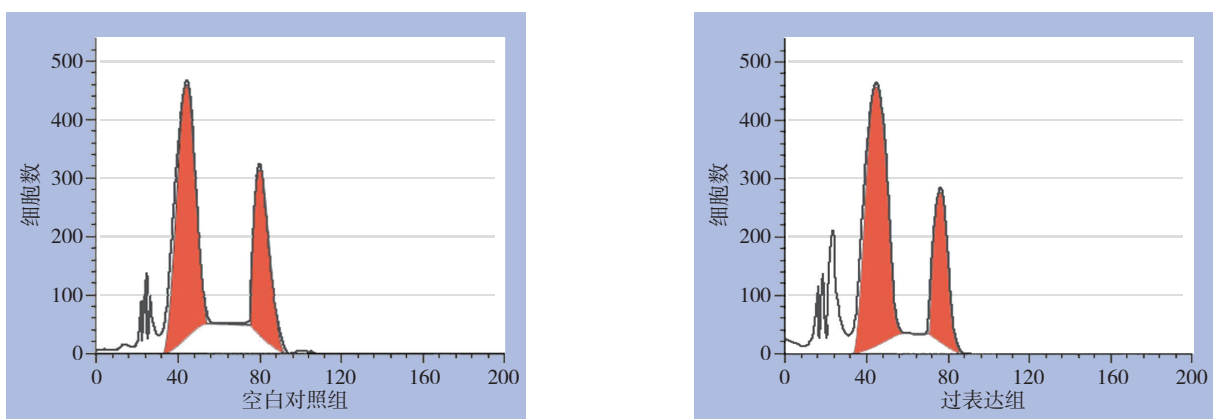


图 4 流式细胞仪检测细胞周期变化
Figure 4 Flow cytometric analysis of cell cycle

表 5 周期相关指标的比较
Table 5 Comparison of cell cycle-related variables

| 组别 | 亚 G ₀ (%) | G ₀ /G ₁ (%) | S (%) | G ₂ /M (%) | 增殖指数 |
|----------|----------------------|------------------------------------|--------------------|-----------------------|-------------------|
| 空白对照组 | 7.710 ± 0.270 | 43.810 ± 0.240 | 22.680 ± 0.210 | 25.830 ± 0.250 | 0.526 ± 0.001 |
| 过表达组 | 17.770 ± 0.550 | 46.590 ± 0.030 | 17.630 ± 0.080 | 18.010 ± 0.600 | 0.433 ± 0.003 |
| <i>P</i> | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |

2.3 动物实验结果

2.3.1 移植瘤生长情况 空白对照组和过表达组的裸鼠在接种后7 d左右皆可见接种部位皮下长出约米粒大小硬结,成瘤率为100%。肿瘤随着时间的推移呈不同速度生长。接种24 d后处死裸

鼠,取出肿瘤组织称重。过表达组和空白对照组肿瘤质量分别为(0.475±0.099)g、(2.295±0.178)g,过表达组肿瘤质量明显轻于空白对照组($P=0.0009$) (图5)。

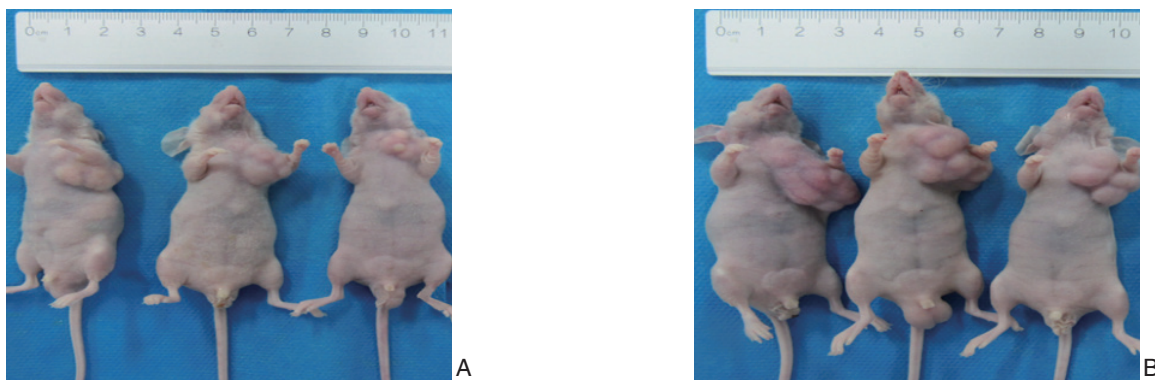


图5 接种24 d后小鼠皮下移植瘤情况 A: 过表达组; B: 空白对照组

Figure 5 The subcutaneous xenografts in mice 24 d after transplantation A: LXR α overexpression group; B: Blank control group

2.3.2 移植瘤组织中LXR α 与PA28 γ 水平 用qRT-PCR检测两组皮下移植瘤中LXR α 和PA28 γ mRNA的相对水平,结果显示,与空白对照组比较,过表达组PA28 γ mRNA水平明显下调($P=0.0018$),LXR α mRNA水平明显上调($P=0.0011$)。用

Western blot检测两组皮下移植瘤中LXR α 和PA28 γ 蛋白的相对水平,结果显示,与空白对照组比较,过表达组PA28 γ 蛋白表达水平明显下调($P=0.0014$),LXR α 蛋白表达水平明显上调($P=0.0020$) (图6)。

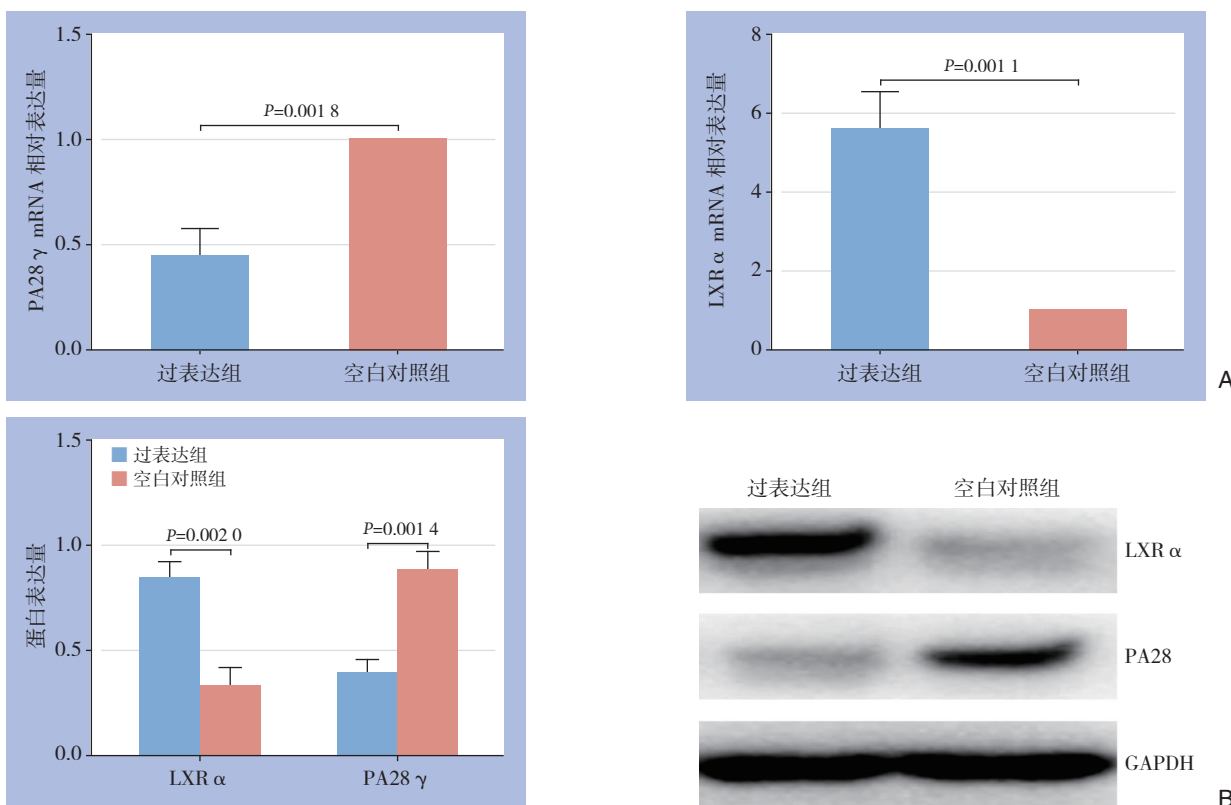


图6 LXR α 和PA28 γ 在皮下移植瘤组织中的表达检测 A: mRNA表达; B: 蛋白表达

Figure 6 Determination of the expression levels of LXR α and PA28 γ in the transplanted tumor tissue A: mRNA expressions; B: Protein expressions

3 讨论

胃癌是世界常见肿瘤,在我国恶性肿瘤中发病率居第2位,病死率居第3位^[1-2]。近年来,随着D₂根治术为主的规范手术的推广,以及合理的术后化疗,胃癌患者生存率有一定程度的提高,但其整体治疗效果依然不佳。除了传统的手术治疗以及新辅助化疗,胃癌的靶向治疗同样发展迅速。无数胃癌发生、发展的驱动基因被识别,受到学界的关注,而LXR α 则是近年来恶性肿瘤增殖研究的热点基因。

LXR是DNA结合转录因子核受体家族的成员,有LXR α 和LXR β 两种亚型。LXR β 广泛分布于全身各个组织,而LXR α 主要分布在肾上腺、小肠、脂肪、肝脏等代谢活跃的组织或器官中^[11-12]。近年来的研究发现LXR α 与多种肿瘤的发生、发展相关,且在多种肿瘤中发挥抑癌作用。蛋白酶体激活剂PA28 γ ,又名REG γ 、PSME3、11S γ 、Ki抗原^[13]。PA28 γ 是REG蛋白酶体激活因子家族(也称11S家族)中的一员,11S家族还包括PA28 α (REG α)和PA28 β (REG β)。这些成员可以在不依赖ATP和泛素的情况下激活20S蛋白酶体的裂解活性^[9]。目前,PA28 γ 被认为在多种肿瘤中发挥促癌作用^[9, 13-14]。

本研究首先在胃癌和癌旁组织中运用免疫组织化学方法和qRT-PCR检测LXR α 与PA28 γ 的表达。结果显示,LXR α 在胃癌组织中的蛋白和mRNA水平低于癌旁组织,PA28 γ 在胃癌组织中的蛋白和mRNA水平高于癌旁组织。Vigushin等^[15]发现:15例乳腺癌中LXR α mRNA的阳性率为11/15(73.3%),低于正常组织的14/15(93.3%)。PA28 γ 在人体正常组织中多为低表达,而在喉癌、胰腺癌、黑色素瘤等多种肿瘤中高表达^[16-18]。这与本研究结果相一致。在进一步的实验中,通过流式细胞术和动物实验发现,LXR α 对人胃癌细胞株AGS的细胞周期具有阻滞作用,并能抑制AGS细胞的生长。大量文献^[19-23]报道了类似结果:LXR在结直肠癌、黑色素瘤、前列腺癌、乳腺癌等肿瘤中起抑癌作用。免疫组化研究中发现:胃癌组织中LXR α 蛋白与PA28 γ 蛋白的表达存在明显负相关,提示LXR α 与PA28 γ 之间可能存在联系。随后本研究通过Western blot和qRT-PCR发现:过表达LXR α 可显著下调体内外AGS细胞中PA28 γ 的表达。近年的研究提示:

PA28 γ 具有促癌作用。Guo等^[17]发现在胰腺癌中PA28 γ 通过c-Myc-glycolysis信号轴促进胰腺癌生长。Chen等^[16]发现PA28 γ 通过Wnt/ β -catenin通路促进黑色素瘤增殖;阻断和敲除PA28 γ 能够抑制体内外黑色素瘤细胞增殖。进一步查阅文献发现PA28 γ 可特异性降解p53^[23]。p53是一种重要的抑癌基因^[24],而特异性降解p53被认为是PA28 γ 发挥促癌作用的重要途径之一。已有文献^[25]报道,激动LXR α 后p53的表达上调。综上所述,我们提出以下观点,即LXR α 可抑制人胃癌细胞的生长,并且其机制之一可能是通过抑制PA28 γ 的表达,进而上调抑癌基因p53的表达,最终达到抑制肿瘤的作用。

在本研究中,LXR α 在胃癌组织中相对低表达,在癌旁组织中相对高表达,并且抑制胃癌AGS细胞的生长,起抑癌作用,这与LXR α 在其他肿瘤中的作用是基本一致的。PA28 γ 在胃癌组织中相对高表达,在癌旁组织中相对低表达,这与其在其他肿瘤中的表达也基本一致。而LXR α 与PA28 γ 的负相关作用则是首次报道。在其他肿瘤中是否也存在类似现象,还需进一步实验证明。但无论如何,LXR α 的抑癌作用正逐步被揭示,有望成为胃癌靶向治疗的一个新靶点。

参考文献

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5):E359-386. doi: 10.1002/ijc.29210.
- [2] 陈万青, 郑荣寿, 张思维, 等. 2013年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. *中国肿瘤*, 2017, 26(1):1-7. doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2017.01.A001.
Chen WQ, Zheng RS, Zhang SW, et al. Report of Cancer Incidence and Mortality in China, 2013[J]. *China Cancer* 2017, 26(1):1-7. doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2017.01.A001.
- [3] Neuzillet C, Rousseau B, Kocher H, et al. Unravelling the pharmacologic opportunities and future directions for targeted therapies in gastro-intestinal cancers Part 1: GI carcinomas[J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 174:145-172. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.028.
- [4] Lin C, Vedin L, Steffensen KR. The emerging roles of liver X receptors and their ligands in cancer[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2016, 20(1):61-71. doi: 10.1517/14728222.2015.1081169.
- [5] Tavazoie MF, Pollack I, Tanquero R, et al. LXR/ApoE Activation

- Restricts Innate Immune Suppression in Cancer[J]. Cell, 2018, 172(4):825–840. doi: 10.1016/j.cell.2017.12.026.
- [6] Ju X, Huang P, Chen M, et al. Liver X receptors as potential targets for cancer therapeutics[J]. Oncol Lett, 2017, 14(6):7676–7680. doi: 10.3892/ol.2017.7259.
- [7] Herold M, Breuer J, Hucke S, et al. Liver X receptor activation promotes differentiation of regulatory T cells[J]. PLoS One, 2017, 12(9):e0184985. doi: 10.1371/journal.pone.0184985.
- [8] Xu J, Zhou L, Ji L, et al. The REG γ -proteasome forms a regulatory circuit with I κ B ϵ and NF κ B in experimental colitis[J]. Nat Commun, 2016, 7:10761. doi: 10.1038/ncomms10761.
- [9] 梁小龙, 王丽丽, 梁智勇, 等. 蛋白酶体激活剂REG γ 在肿瘤中的研究进展[J]. 中华病理学杂志, 2017, 46(2):139–140. doi:10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2017.02.023.
Liang XL, Wang LL, Liang ZY, et al. Research progress of proteasome activator REG γ in tumors[J]. Chinese Journal of Pathology, 2017, 46(2):139–140. doi:10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2017.02.023.
- [10] Cai J, Guan H, Fang L, et al. MicroRNA-374a activates Wnt/ β -catenin signaling to promote breast cancer metastasis[J]. J Clin Invest, 2013, 123(2):566–579. doi: 10.1172/JCI65871.
- [11] Gabbi C, Warner M, Gustafsson J. Action mechanisms of Liver X Receptors[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 446(3):647–650. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.077.
- [12] Viennois E, Mouzat K, Dufour J, et al. Selective liver X receptor modulators (SLiMs): What use in human health?[J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 351(2):129–141. doi: 10.1016/j.mce.2011.08.036.
- [13] Yi Z, Yang D, Liao X, et al. PSME3 induces epithelial–mesenchymal transition with inducing the expression of CSC markers and immunosuppression in breast cancer[J]. Exp Cell Res, 2017, 358(2):87–93. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.05.017.
- [14] Liu S, Liu D, Zeng X, et al. PA28 γ acts as a dual regulator of IL-6 and CCL2 and contributes to tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma[J]. Cancer Lett, 2018, 428:192–200. doi: 10.1016/j.canlet.2018.04.024.
- [15] Vigushin DM, Dong Y, Inman L, et al. The nuclear oxysterol receptor LXR α is expressed in the normal human breast and in breast cancer[J]. Med Oncol, 2004, 21(2):123–132. doi: 10.1385/MO:21:2:123.
- [16] Chen H, Gao X, Sun Z, et al. REG γ accelerates melanoma formation by regulating Wnt/ β -catenin signalling pathway[J]. Exp Dermatol, 2017, 26(11):1118–1124. doi: 10.1111/exd.13394.
- [17] Guo J, Hao J, Jiang H, et al. Proteasome activator subunit 3 promotes pancreatic cancer growth via c-Myc-glycolysis signaling axis[J]. Cancer Letters, 2017, 386:161–167. doi: 10.1016/j.canlet.2016.08.018.
- [18] Li LP, Cheng WB, Li H, et al. Expression of proteasome activator REG γ in human laryngeal carcinoma and associations with tumor suppressor proteins[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(6):2699–2703. doi:http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.6.2699.
- [19] El Roz A, Bard JM, Huvelin JM, et al. LXR agonists and ABCG1-dependent cholesterol efflux in MCF-7 breast cancer cells: relation to proliferation and apoptosis[J]. Anticancer Res, 2012, 32(7):3007–3013.
- [20] Lee CS, Park M, Han J, et al. Liver X receptor activation inhibits melanogenesis through the acceleration of ERK-mediated MITF degradation[J]. J Invest Dermatol, 2013, 133(4):1063–1071. doi: 10.1038/jid.2012.409.
- [21] Lo Sasso G, Bovenga F, Murzilli S, et al. Liver X receptors inhibit proliferation of human colorectal cancer cells and growth of intestinal tumors in mice[J]. Gastroenterology, 2013, 144(7):1497–1507. doi: 10.1053/j.gastro.2013.02.005.
- [22] Alioui A, Dufour J, Leoni V, et al. Liver X receptors constrain tumor development and metastasis dissemination in PTEN-deficient prostate cancer[J]. Nat Commun, 2017, 8(1):445. doi: 10.1038/s41467-017-00508-5.
- [23] Zhang Z, Zhang R. Proteasome activator PA28 γ regulates p53 by enhancing its MDM2-mediated degradation[J]. EMBO J, 2008, 27(6):852–864. doi: 10.1038/emboj.2008.25.
- [24] Roy S, Tomaszowski K H, Luzwick J W, et al. p53 orchestrates DNA replication restart homeostasis by suppressing mutagenic RAD52 and POLtheta pathways[J]. Elife, 2018, 7. pii: e31723. doi: 10.7554/eLife.31723.
- [25] Vedin L, Lewandowski S A, Parini P, et al. The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2009, 30(4):575–579. doi: 10.1093/carcin/bgp029.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 陈冠阳, 陈子华, 袁伟杰, 等. 肝X受体 α 与蛋白酶体激活因子28 γ 在胃癌中的表达及其对胃癌细胞生长的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2018, 27(10):1295–1303. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2018.10.012

Cite this article as: Chen GY, Chen ZH, Yuan WJ, et al. Expressions of liver X receptor α and proteasome activator 28 γ in gastric cancer and their effects on growth of gastric cancer cells[J]. Chin J Gen Surg, 2018, 27(10):1295–1303. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2018.10.012