



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 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%CO₂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。 $^{\Delta}$ CT=CT(目的基因,待测样本)-CT(内标基因,待测样本)(表1)。

表1 引物序列

Table 1 The sequences of gene primers

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)。

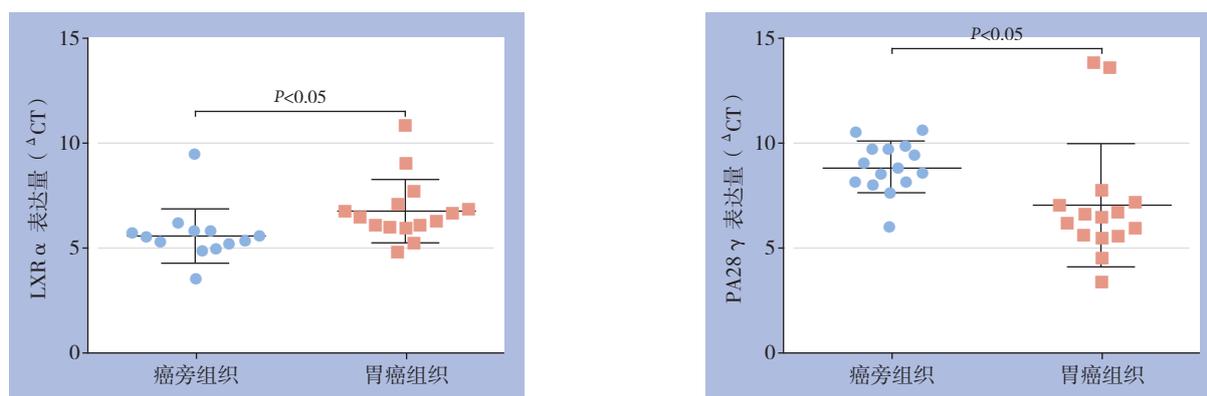


图 1 LXR α 和 PA28 γ mRNA 在胃癌和癌旁组织中的相对水平

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)。

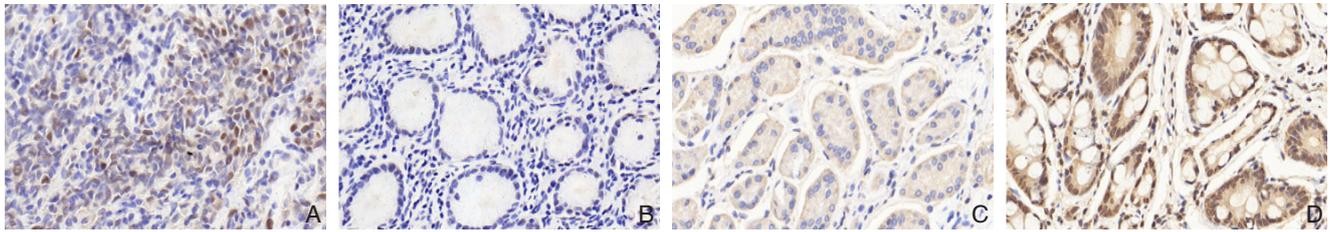


图 2 免疫组化检测 PA28 γ 和 LXR α 蛋白表达 ($\times 400$) A: 胃癌中 PA28 γ 阳性; B: 癌旁中 PA28 γ 阴性; C: 胃癌中 LXR α 阴性; D: 癌旁中 LXR α 阳性

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 \pm 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 \pm 0.003, 明显低于空白对照组的 0.526 \pm 0.001 ($P=0.000$) (图 4) (表 5)。

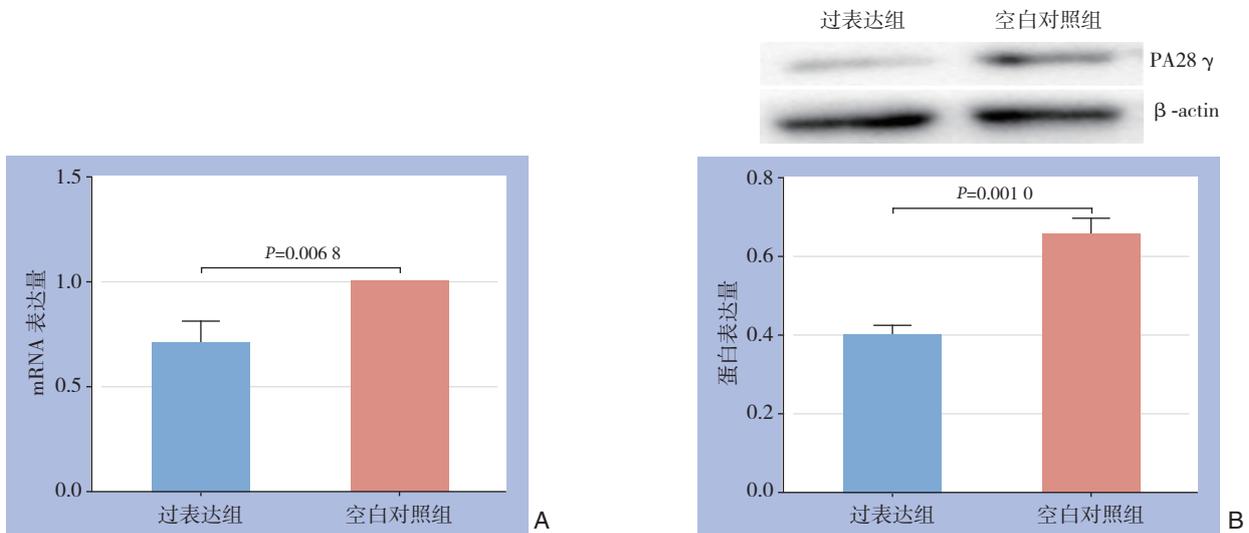


图 3 PA28 γ 表达检测 A: mRNA 表达; B: 蛋白表达
Figure 3 Determination of PA28 γ expression A: mRNA expression; B: Protein expression

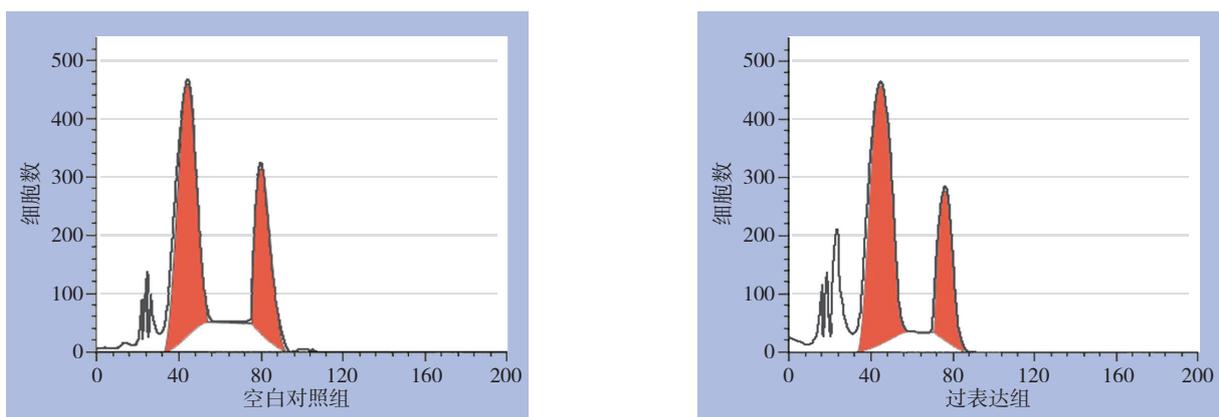


图 4 流式细胞仪检测细胞周期变化
Figure 4 Flow cytometric analysis of cell cycle

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 \pm 0.270	43.810 \pm 0.240	22.680 \pm 0.210	25.830 \pm 0.250	0.526 \pm 0.001
过表达组	17.770 \pm 0.550	46.590 \pm 0.030	17.630 \pm 0.080	18.010 \pm 0.600	0.433 \pm 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)。

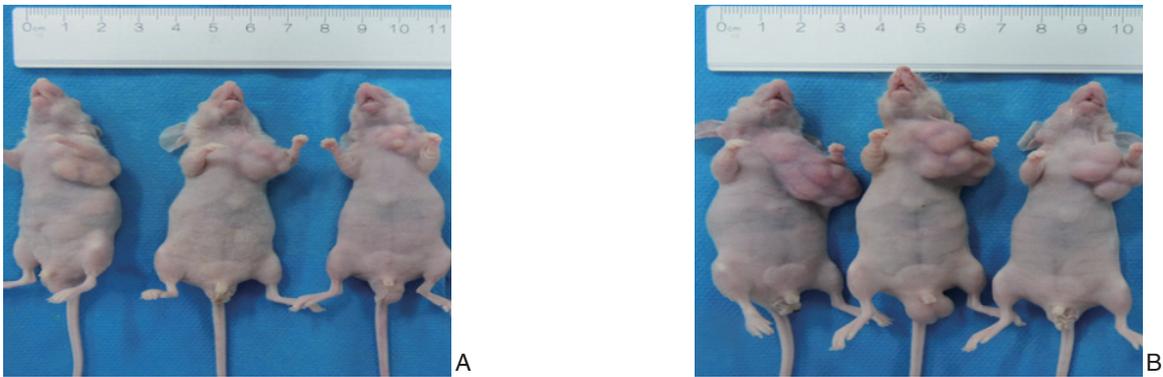


图 5 接种 24 d 后小鼠皮下移植瘤情况 A: 过表达组; B: 空白对照组

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)。

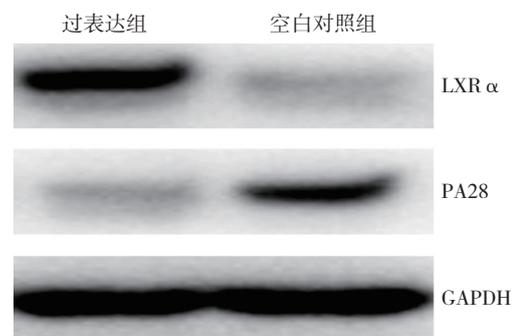
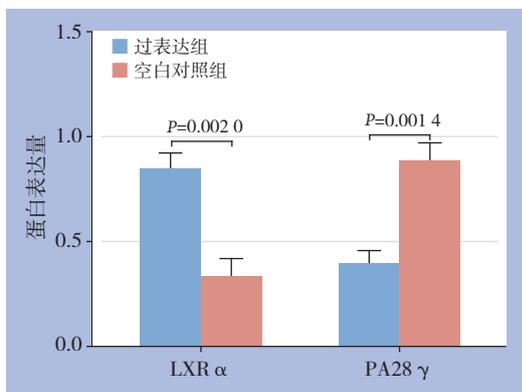
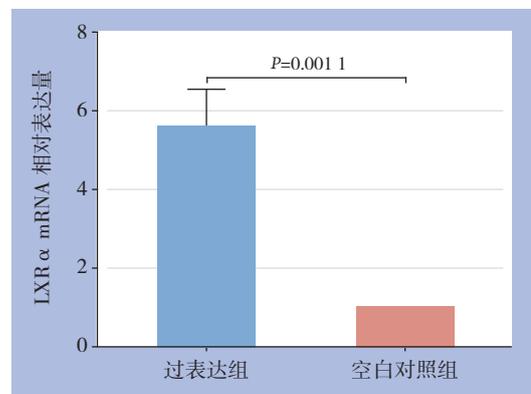
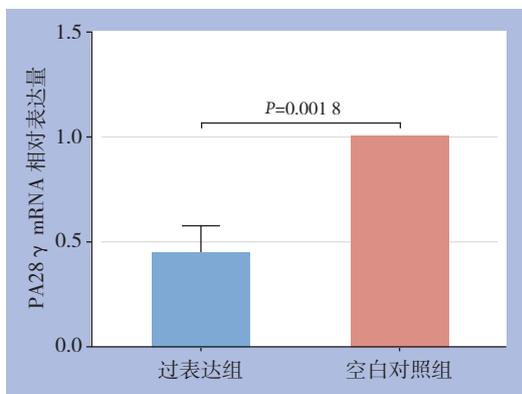


图 6 LXR α 和 PA28 γ 在皮下移植瘤组织中的表达检测 A: mRNA 表达; B: 蛋白表达

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