

AP3M2在胃癌中的作用及临床意义分析

吴晓滨*, 罗辉兴, 翁诺卿

中山大学附属第八医院 胃肠外科, 广东 深圳 518033

【摘要】 目的 探讨接头相关复合体蛋白3亚基2(adaptor related protein complex 3 subunit mu 2, AP3M2)在胃癌中的表达情况及其临床意义。**方法** 通过TCGA数据库、实时荧光定量PCR及免疫印迹实验检测AP3M2基因的mRNA及蛋白在胃癌组织中的表达情况。通过检测KM Plotter网站探索AP3M2的表达与胃癌患者预后的关系。通过平板克隆形成实验检测AP3M2对胃癌细胞的作用。**结果** TCGA数据库数据及本研究收集的胃癌患者组织显示AP3M2相比于癌旁组织,其在胃癌组织中的mRNA表达水平升高,同时AP3M2的蛋白在胃癌组织中的表达也有上调的现象。同时本研究通过KM Plotter网站分析得到AP3M2的mRNA表达水平与胃癌患者的预后有关,高表达AP3M2的胃癌患者其预后较低表达AP3M2的胃癌患者差。通过在AGS细胞(人胃腺癌细胞)中过表达AP3M2并检测其平板克隆形成能力的变化,发现过表达AP3M2可以增强胃癌细胞的克隆形成能力。**结论** AP3M2在胃癌中高表达,高表达AP3M2与胃癌患者的不良预后有关,且能增强胃癌细胞的克隆形成能力。

【关键词】 AP3M2; 胃癌; 生存预后; 促癌作用

The function and clinical significance of AP3M2 in gastric cancer

Wu Xiaobin*, Luo Xinghui, Weng Ruqing

Department of Gastrointestinal Surgery, the Eighth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Shenzhen, Guangdong, 518033

【Abstract】 Objective To investigate the expression of AP3M2 in gastric cancer and its clinical significance. **Methods** The mRNA expression of AP3M2 was detected by TCGA database and RT-qPCR and the protein expression of AP3M2 was measured by western blotting. The relationship between the expression of AP3M2 and the prognosis of gastric cancer patients was explored by KM Plotter website. The effect of AP3M2 on gastric cancer cells was detected by clone formation experiment. **Results** The data from the TCGA database and the tissues of gastric cancer patients collected by ourselves showed that the mRNA expression level of AP3M2 in gastric cancer tissues was increased compared with the adjacent tissues, and the protein expression of AP3M2 in gastric cancer tissues was also upregulated. Meanwhile, according to the analysis of KM Plotter website, we found that the mRNA expression level of AP3M2 was related to the prognosis of gastric cancer patients, while the prognosis of gastric cancer patients with high expression of AP3M2 was worse than that of gastric cancer patients with low expression of AP3M2. Overexpressing of AP3M2 in AGS cells can enhance the clonal formation ability of gastric cancer cells. **Conclusion** The high expression of AP3M2 in gastric cancer is related to the poor prognosis of gastric cancer patients, and can enhance the clonogenesis ability of gastric cancer cells.

【Key words】 Adaptor related protein complex 3 subunit mu 2; Gastric Cancer; Survival prognosis

胃癌是全世界范围内第五大最常见的恶性肿瘤,也是死亡率排名第三的恶性肿瘤^[1]。胃癌的发生是一个多重因素、多种细胞、多个步骤参与的复

杂过程。环境因素(饮食、外源性化学物质)、在胃内形成的致癌物质以及幽门螺杆菌感染能够诱导胃癌的发生发展^[2]。胃癌一般起病隐匿,无明显的症状,因此胃癌患者的筛查工作有较大的难度。目前胃癌的主要治疗手段仍然是手术切除与辅助化疗^[3]。同时由于基因检测技术的发展,针对基因位

基金项目:广东省科技计划项目(2017A010105004)

*通信作者:吴晓滨,副主任医师, E-mail: xiaobinwoo@hotmail.com

点的靶向治疗或者免疫治疗也是目前常用的治疗手段。如针对 HER2 突变的患者可以采用曲妥单抗进行治疗,而肿瘤组织中存在 EB 病毒感染,存在微卫星不稳定状态 (microsatellite instability, MSI) 或者错配修复缺陷 (mismatch repair, MMR) 时,可以使用程序性死亡受体 1 (programmed cell death protein 1, PD-1)/程序性死亡受体-配体 1 (programmed cell death-Ligand 1, PD-L1) 抑制剂进行治疗^[4-6]。由于胃癌的异质性较高,因此我们仍然需要更加深入地探索胃癌的发生发展机制以及免疫治疗的重要分子标志物。

接头相关复合体蛋白 3 亚基 2 (adaptor related protein complex 3 subunit mu 2, AP3M2) 是一个编码蛋白的基因,主要编码的蛋白是接头相关复合体蛋白 3 (adaptor-related protein complex 3, AP-3)。AP-3 复合体的主要功能是将蛋白质转运到溶酶体或者特定的细胞器中从而来调控生命活动^[7]。目前对于 AP3M2 的研究较少,主要是发现 AP3M2 的突变与癫痫的发生有关^[8]。由于 AP3M2 作为一个转运蛋白,可以将蛋白质转运到溶酶体中,促进蛋白质的降解,提示 AP3M2 的这一项功能可能在肿瘤的发生发展中起到重要作用。

1 材料与方法

1.1 胃癌组织及癌旁组织 人胃癌组织与配对癌旁组织是从 2016 年 12 月至 2018 年 8 月在中山大学附属第六医院接受手术的胃癌患者术后标本收集的,总共有 16 对配对的胃癌及癌旁组织。

1.2 使用的主要试剂 提取组织 RNA 使用的 Trizol 试剂购自 Thermo Fisher 公司,将 RNA 逆转录为 cDNA 时使用的逆转录酶购自 TAKARA 公司,进行 qPCR 时使用的 PCR 混合酶来自于 TAKARA 公司。使用的 AP3M2 抗体和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde -3 -phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体购自 Proteintech 公司。DMEM 高糖培养基, RPMI1640 培养基及胰酶购自 BI 公司,胎牛血清购自 Gibco 公司。

1.3 RNA 提取 将新鲜的胃癌组织及癌旁组织加入 Trizol 试剂中,然后在有冷冻功能的匀浆机中打碎,4℃的条件下以 12 000 r/min 的速度离心 10 min 后取上清。加入 200 μ l 氯仿后振荡混匀 15 s,在室温下孵育 15 min 后 4℃的条件下以 12 000 r/min 的速度离心 15 min。取上清后,加入

等体积的异丙醇,振荡混匀 10 s,在室温下孵育 10 min 后 4℃的条件下以 12 000 r/min 的速度离心 10 min。去上清,加入 75%乙醇洗涤 1 次后 4℃的条件下以 7500 r/min 的速度离心 5 min。去上清,晾干 RNA 后,加入 50 μ l 焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonated, DEPC) 水将 RNA 溶解。

1.4 实时荧光定量 PCR (quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR) 取 2 μ g RNA 进行逆转录,分别加入逆转录酶混合物,之后在 PCR 仪中进行逆转录。遵循引物设计原则设计好引物后,将逆转录后的 cDNA 稀释 10 倍。在 96 孔板中加入上下游引物,酶混合物,稀释好的 cDNA 后将 96 孔板放入罗氏 LightCycle96 中进行扩增并检测其 Cq 值。接着以 GAPDH 的 Cq 值作为内参,通过 $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 的计算公式计算每个样本的相对表达量。

1.5 免疫印迹 将新鲜胃癌组织及癌旁组织放入已经加入蛋白酶抑制剂的放射免疫沉淀试验 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液中,然后在有冷冻功能的匀浆机中打碎,4℃的条件下以 12 000 转/min 的速度离心 15 min 后取上清。使用 BCA 蛋白定量试剂盒测量组织蛋白的浓度,加入 4 $\times$ 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 加样缓冲液后在 100℃的金属浴中变性 10 min。取 20 μ g 蛋白进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,将蛋白从凝胶中转移到聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜后,使用 5%脱脂奶粉在室温封闭 2 h。随后加入一抗 (AP3M2 的抗体比例为 1:1000, GAPDH 的抗体比例为 1:5000) 在 4℃的条件下进行过夜孵育。第 2 天使用洗涤缓冲液 (tris buffered saline tween, TBST) 洗涤 3 次,每次 10 min 后加入羊抗兔二抗 (抗体比例为 1:5000) 在室温孵育 2 h,最后使用 TBST 洗涤 3 次后就可以进行化学发光。

1.6 过表达质粒的构建 酶切 pcDNA3.1 载体。提取 HEK-293T 细胞的 RNA,随后将 RNA 逆转录为 cDNA。设计扩增 AP3M2 的编码序列的引物,进行 PCR 扩增。将酶切的载体和扩增好的条带进行切胶回收,之后使用 T4-DNA 连接酶在室温连接 4 h。接着将连接产物进行转化,在大肠埃希菌 DH5 α 中扩增后提取质粒。

1.7 细胞培养 实验中使用到的主要细胞有 HEK-293T 细胞和 AGS 细胞。HEK-293T 细胞的

培养条件是 DMEM 高糖培养基加上 10% 的胎牛血清,而 AGS 细胞的培养条件是 RPMI-1640 培养基加上 10% 的胎牛血清。上述细胞均在 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中进行培养。

1.8 平板克隆形成实验 取对数期生长的过表达 AP3M2 及转染了空白对照的胃癌细胞 AGS, 以每孔 1000 个的数量种植到六孔板中, 在 37℃, 5% CO₂ 的条件下培养 14 d 后, 用结晶紫染色, 进行计数。

1.9 统计学分析 统计学分析是在 Graphpad Prism 8.0 软件中进行的。在分析胃癌组织及配对癌旁组织中 AP3M2 的 mRNA 相对表达水平是否有统计学差异时使用的方法是配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。在分析胃癌细胞的平板克隆形成能力的变化是否有统计学差异时, 使用的方法是两组独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。而在生物信息学分析时, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AP3M2 在胃癌组织及癌旁组织中的表达情况 首先通过 TCGA 数据库数据分析 AP3M2 在胃癌组织中的表达情况, 发现相较于癌旁组织, AP3M2 在胃癌组织中存在明显高表达的现象。具体见图 1。因此收集了 16 对胃癌组织及配对癌旁组织进行 AP3M2 的 mRNA 相对表达水平的检测, 对上述现象进行验证。通过 RT-qPCR 实验, 相较于癌旁组织, AP3M2 的 mRNA 表达水平在胃癌组织

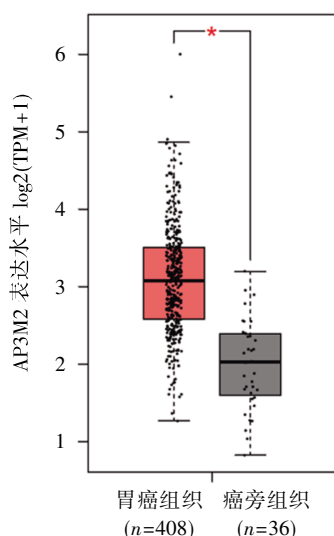


图 1 TCGA 数据库分析胃癌组织及癌旁组织中 AP3M2 的表达情况

中上调,且差异有统计学意义($P=0.040$)。具体见图 2。无论是在 TCGA 数据库中还是在本研究收集的样本中, AP3M2 的表达水平均升高。接着通过免疫印迹检测了 AP3M2 蛋白的表达情况, 结果显示 AP3M2 蛋白在胃癌组织中的表达上调。具体见图 3。

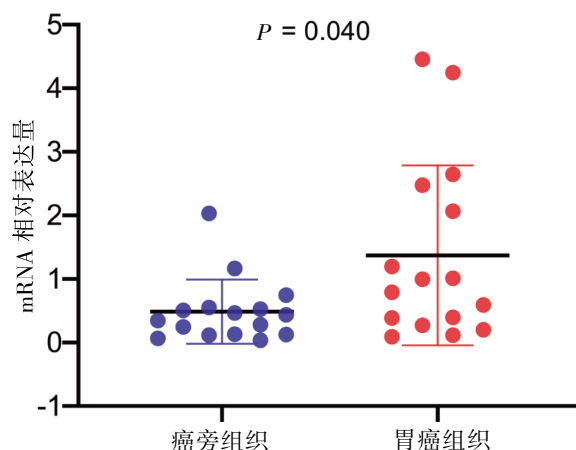


图 2 RT-qPCR 检测 16 对胃癌及癌旁组织中 AP3M2 的 mRNA 表达水平

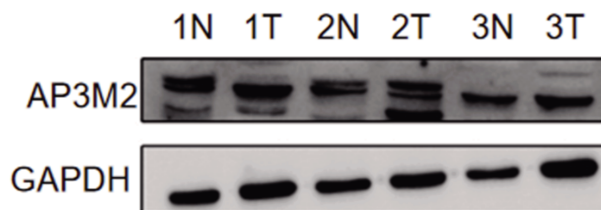


图 3 免疫印迹检测胃癌及癌旁组织中 AP3M2 的蛋白表达水平

注: N 为癌旁组织, T 为胃癌组织

2.2 AP3M2 的 mRNA 表达水平与胃癌患者生存预后的关系 通过 KM Plotter 网站分析发现根据 AP3M2 的表达量将胃癌患者分为高表达组和低表达组, AP3M2 高表达患者的预后较低表达的胃癌患者的预后差($HR=1.71$, $P < 0.001$)。具体见图 4。

2.3 AP3M2 对胃癌细胞的平板克隆形成能力的影响 在 AGS 细胞中过表达了 AP3M2 后, 检测其平板克隆形成能力的变化。通过统计, 发现当在 AGS 细胞中过表达 AP3M2 后, 其平板克隆形成能力明显增强。具体见图 5。

3 讨论

胃癌是一种恶性程度很高的肿瘤, 其起病隐匿, 预后不太理想。但是由于胃癌的异质性高, 发病机制不明确, 所以目前的治疗方式并不能很好

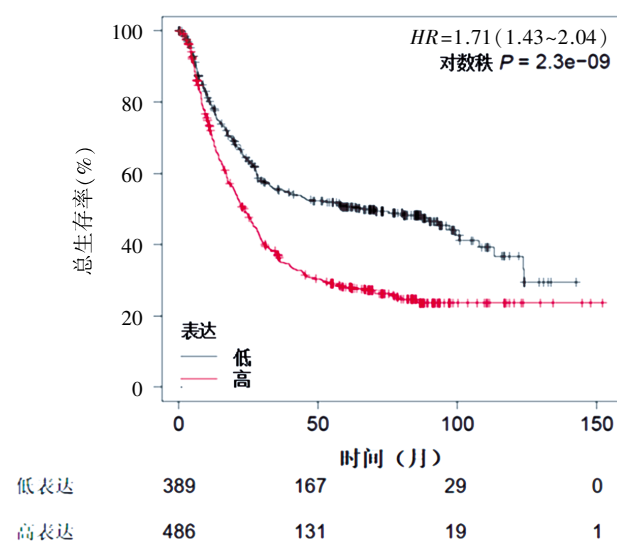


图4 KM Plotter 网站分析 AP3M2 的表达与胃癌患者生存预后的关系

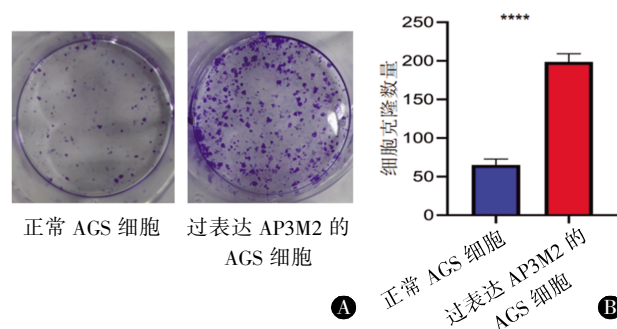


图5 AP3M2 对胃癌细胞平板克隆形成能力的影响
注:A. AGS 细胞平板克隆形成的图像;B. 对 AGS 平板克隆形成能力的定量分析

地改善患者的生存预后^[3]。为了更好地理解胃癌的发病机制,发掘有临床意义的分子标志物和胃癌发生发展中有重要作用的分子对于发展胃癌治疗新方案是十分重要的。目前 HER2 阳性的患者可以使用曲妥珠单抗进行治疗,而 MSI 和 MMR 的患者可以使用 PD-1/PD-L1 抑制剂进行治疗。但胃癌中还存在着 HER2 阴性,无 MSI 和 MMR 的患者,这部分患者使用上述药物的治疗效果不佳^[9-11]。因此寻找胃癌中新发现的分子标志物,开发新的治疗药物是接下来研究人员的重要课题之一。

AP3M2 是 AP-3 的一类亚型,AP-3 首先是在大鼠大脑的 cDNA 中被鉴定出来。既往研究表明 AP-3 参与将蛋白转运到溶酶体或者其他特定的细胞器的生物学过程^[12]。本研究发现了 AP3M2 这个基因在胃癌组织中存在着高表达的现象,同

时 AP3M2 高表达的胃癌患者,其预后较低表达 AP3M2 的患者差,提示 AP3M2 可能可以作为一个预测胃癌患者生存预后的分子标志物,这一假设需要进行下一步的研究才能得出结论。由于本研究样本仅为 16 对胃癌及配对癌旁组织,样本量较小,因此接下来将扩大检测的样本,进一步确认 AP3M2 在胃癌组织中的高表达现象。那么 AP3M2 是否可以作为胃癌患者的一个独立预后因素?接下来将收集胃癌的组织切片,进行免疫组织化学染色,明确 AP3M2 的表达水平是否能够预测胃癌患者的预后。通过平板克隆形成实验发现 AP3M2 能够增强胃癌细胞 AGS 的克隆形成能力,通过检测 AP3M2 是否能够促进胃癌细胞的增殖,加快胃癌细胞细胞周期的进程以及抑制胃癌细胞的凋亡等探索 AP3M2 在胃癌中的功能。与此同时也将对 AP3M2 调控胃癌的具体作用机制进行较深入的探索。

参考文献

- [1] SMYTH E C, NILSSON M, GRABBSCH H I, et al. Gastric cancer [J]. Lancet, 2020, 396 (10251): 635-648.
- [2] GUGGENHEIM D E, SHAH M A. Gastric cancer epidemiology and risk factors [J]. J Surg Oncol, 2013, 107 (3): 230-236.
- [3] JOHNSTON, FABIAN M, BECKMAN, et al. Updates on Management of Gastric Cancer [J]. Current Oncology Reports, 2019, 21 (8): 67.
- [4] LORDICK F, LORENZEN S, YAMADA YI. Optimal chemotherapy for advanced gastric cancer: is there a global consensus [J]. Gastric Cancer, 2014, 17(2): 213-225.
- [5] ABRAHAO -MACHADO L F, SCAPULATempo -NETO C. HER2 testing in gastric cancer: an update [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(19): 4619-4625.
- [6] AKIN TELL, TUGBA BREGNI, GIACOMO CAMERA, et al. PD-1 and PD-L1 inhibitors in oesophago-gastric cancers [J]. Cancer Letters, 2020, 469: 142-150.
- [7] BUBIER J A, JAY J J, BAKER C L, et al. Identification of a QTL in Mus musculus for alcohol preference, withdrawal, and Ap3m2 expression using integrative functional genomics and precision genetics [J]. Genetics, 2014, 197 (4): 1377-1393.
- [8] HUANG M C, OKADA M, NAKATSU F, et al. Mutation screening of AP3M2 in Japanese epilepsy patients [J]. Brain Dev, 2007, 29 (8): 462-467.
- [9] ROSENBERG JE, HOFFMAN CENSITS J, Powles T, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: A single-arm, multicentre, phase 2 trial [J]. Lancet, 2016, 387 (10031): 1909-1920.

(下转第 247 页)