

肺腺癌组织中 GSK3 β 的表达及其临床意义

尚自强，周燕，张灿斌，李纪远，王献，郑帅玉

作者单位：471000 洛阳，河南科技大学第一附属医院胸外科

作者简介：尚自强(1988-)，男，医学硕士，住院医师，研究方向：胸部肿瘤的诊治与研究。E-mail: shangzq567@126.com

[摘要] 目的 观察肺腺癌组织中糖原合成酶激酶(glycogen synthesis kinase, GSK)3 β mRNA 和蛋白的表达情况，并探讨其在肺腺癌发生发展中的意义。**方法** 随机选取 55 例肺腺癌患者的癌组织标本作为实验组，相对应的癌旁正常组织标本作为对照组。用 RT-PCR 法检测两组中 GSK3 β mRNA 相对表达量；用 Western blot 法检测两组中 GSK3 β 蛋白的相对表达量。**结果** 实验组 GSK3 β mRNA 及 GSK3 β 蛋白的相对表达量分别为 (0.366 ± 0.138) 和 (0.460 ± 0.242) ，对照组分别为 (0.485 ± 0.137) 和 (0.689 ± 0.183) 。实验组 GSK3 β mRNA 及 GSK3 β 蛋白表达量均低于对照组($P < 0.01$)。肺腺癌 I ~ II 期患者 GSK3 β mRNA 及蛋白相对表达量明显高于 III 期患者($P < 0.01$)。**结论** 相比癌旁正常组织，GSK3 β 在肺腺癌组织中表达下调，伴随临床分期上升，GSK3 β 表达下降。提示 GSK3 β 对肺腺癌的发生发展有抑制作用，提高 GSK3 β 的表达可能使肺腺癌的治疗获益。

[关键词] 肺肿瘤；肺腺癌；糖原合成酶激酶-3；肿瘤分期

[中图分类号] R 734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2020)07-0701-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2020.07.13

Expression of GSK3 β in lung adenocarcinoma tissues and its clinical significances SHANG Zi-qiang, ZHOU Yan, ZHANG Can-bin, et al. Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China

[Abstract] **Objective** To observe the expressions of messenger ribonucleic acid(mRNA) and protein of glycogen synthesis kinase-3 beta(GSK3 β) in lung adenocarcinoma tissues, and to explore their clinical significances in the occurrence and development of lung adenocarcinoma. **Methods** The cancer tissue samples of 55 patients with lung adenocarcinoma were randomly selected as the experimental group and the matched normal tissue samples beside the cancer tissues as the control group. The relative expressions of GSK3 β mRNA in the two groups were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). The relative expressions of GSK3 β protein in the two groups were detected by Western blot. **Results** The relative expressions of GSK3 β mRNA and GSK3 β protein were (0.366 ± 0.138) , (0.460 ± 0.242) in the experimental group respectively, and (0.485 ± 0.137) and (0.689 ± 0.183) in the control group respectively. The expressions of GSK3 β mRNA and GSK3 β protein in the experimental group were significantly lower than those in the control group($P < 0.01$). The relative expressions of GSK3 β mRNA and GSK3 β protein in the patients with stage I ~ II lung adenocarcinoma were significantly higher than those in the patients with stage III lung adenocarcinoma($P < 0.01$). **Conclusion** The expression of GSK3 β is down-regulated in lung adenocarcinoma tissues compared with that in the matched normal tissues beside the cancer tissues, and the expression of GSK3 β decreased with the increase of clinical stages, suggesting that GSK3 β may inhibit the occurrence and development of lung adenocarcinoma, and that increasing the expression of GSK3 β may benefit the treatment of lung adenocarcinoma.

[Key words] Lung neoplasms；Lung adenocarcinoma；Glycogen synthesis kinase-3(GSK3)；Neoplasm staging

肺癌在世界范围内的发病率及病死率近几十年来一直居于所有恶性肿瘤之首^[1]，严重威胁着人类健康，在我国，肺癌的防治工作同样严峻^[2]。肺腺癌是肺癌的主要类型^[3]。由于多种原因造成不同

程度的诊治延误，分子靶向治疗为失去手术机会的肺腺癌患者提供了新的治疗选择。但目前靶向治疗存在着可治疗靶点少、耐药等问题^[4]，研究与肺腺癌相关的基因表达情况对丰富肺腺癌的靶向治疗资

料具有意义。糖原合成酶激酶-3(glycogen synthesis kinase-3, GSK3),最早作为糖原代谢的关键酶被发现^[5]。近年来研究发现,GSK3在癌细胞基因转录、加速细胞周期、参与肿瘤细胞侵袭与转移及凋亡过程中起到调控作用^[6]。作为GSK3的一个亚型,GSK3β与人类多种肿瘤关系密切,但其在肺腺癌中的表达国内外罕见报道,为此本研究设计实验,以期发现GSK3β在肺腺癌发生发展中的作用,为肺腺癌的靶向治疗提供更多靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取2018-02~2019-02在我院胸外科收治的肺腺癌患者55例。纳入标准:(1)所有患者为手术治疗;(2)术前临床分期为Ia~IIIa期;(3)手术前未经化疗、放疗等其他治疗;(4)所有病例经术后病理证实为肺腺癌;(5)患者及其家属对本研究知情同意,并签署知情同意书。排除标准:(1)合并其他肿瘤;(2)合并心、肝、肾等重要器官功能障碍者;(3)继发性肺腺癌;(4)合并糖尿病、乙肝、帕金森病患者。其中男25例,女30例;年龄49~79(65.04 ± 7.69)岁。根据2017-01国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)/美国癌症联合会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)发布的第8版肺癌分期标准,其中Ia期9例,Ib期7例,IIa期7例,IIb期21例,IIIa期11例。在手术标本离体20 min内切下适当大小(约5 mm×5 mm×5 mm)组织块,包括癌组织和距离癌组织5 cm以上的癌旁正常组织,分别作为实验组和对照组。取材后置于液氮中速冻,然后移入-80 °C冰箱保存备用。

1.2 检测方法

1.2.1 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)法检测 组织标本中GSK3β相对表达量采用Primer5.0软件设计引物,由上海生工生物工程股份有限公司合成。GSK3β(5'-3'):上游引物GAACCACCTCCTTGCGGAG,下游引物ATGGCGACCAGTTCTCCTGA,扩增片段长度约235 bp;内参GAPDH(5'-3')上游引物CGGGGGCTCTCCAG-AACATCAT,下游引物CCAGCCCCAGCGTCAAAGGTG,扩增片段长度约301 bp。应用TRIzol法(试剂购自美国Invitrogen公司)提取组织总RNA,紫外分光光度仪检测所提RNA的纯度及浓度,OD260/OD280>1.83;将所得总RNA进行逆转录得cDNA(Reverse Transcription System A3500 Promega公司);以cDNA为模板进行扩增(Promega公司)。扩增条件:预变性95 °C 5 min;变性95 °C 30 s,退火58 °C 30 s,延

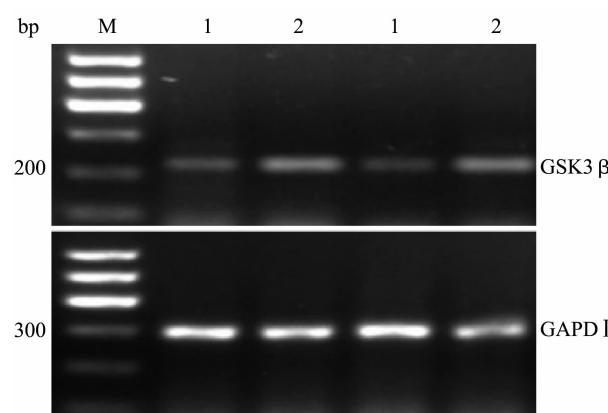
伸72 °C 30 s,35个循环;72 °C 6 min,4 °C 10 min。取扩增产物5 μl、Marker 3 μl(北京天根生化科技有限公司),2%琼脂糖凝胶电泳约40 min。采用Imaging Lab凝胶图像处理系统分析目标条带及内参条带的积分光密度值。目的基因GSK3β积分光密度值与对应内参甘油醛-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH)积分光密度值的比值为GSK3β mRNA的相对表达量。

1.2.2 Western blot法检测 肺腺癌中GSK3β蛋白表达量按照试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司)说明进行蛋白提取及总蛋白浓度测定。按制胶试剂盒(北京索莱宝公司)说明书制胶,在12%分离胶及5%浓缩胶上电泳,冰浴中转膜。转膜后用5%脱脂牛奶室温封闭120 min,加入鼠抗人GSK3β单克隆抗体(1:500,美国Abcam公司)或内参β-actin(1:750)置摇床,4 °C孵育过夜,孵育二抗(1:7 500)后使用ECL发光试剂盒曝光显影。所得图像采用Imaging Lab图像分析软件进行分析。测定GSK3β蛋白调整体积与同一标本内参蛋白β-actin调整体积的比值作为GSK3β蛋白的相对表达量。

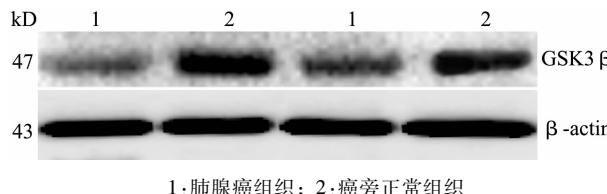
1.3 统计学方法 应用SPSS17.0统计软件处理数据,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用配对t检验,方差不齐时采用t'检验;多组间比较采用方差分析,方差不齐时采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GSK3β mRNA及蛋白在肺腺癌及癌旁正常组织表达比较 GSK3β mRNA在肺腺癌及癌旁正常组织中的相对表达量分别为(0.366 ± 0.138)、(0.485 ± 0.137),差异有统计学意义($P < 0.01$);GSK3β蛋白相对表达量分别为(0.460 ± 0.242)、(0.689 ± 0.183),差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图1,2。



1:肺腺癌组织;2:癌旁正常组织
图1 肺腺癌及其癌旁正常组织GSK3β mRNA表达电泳图



1:肺腺癌组织; 2:癌旁正常组织

图 2 肺腺癌及其癌旁正常组织 GSK3β 蛋白表达电泳图

2.2 GSK3 β mRNA 及其蛋白相对表达量与肺腺癌患者临床病理特征的关系 III 期肺腺癌患者的 GSK3 β mRNA 及蛋白的相对表达量低于 I ~ II 期患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 其在不同年龄、性别、分化程度、浸润深度及淋巴结转移对比中差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 GSK3 β mRNA 及其蛋白相对表达量与肺腺癌患者临床病理特征的关系 ($\bar{x} \pm s$)

临床病理特征	例数	GSK3 β mRNA			GSK3 β 蛋白		
		相对表达量	t/F	P	相对表达量	t/F	P
年龄							
≤65 岁	30	0.357 ± 0.133			0.450 ± 0.280		
>65 岁	25	0.377 ± 0.147	0.534	0.596	0.472 ± 0.191	0.331	0.742
性别							
男	25	0.387 ± 0.147			0.429 ± 0.217		
女	30	0.349 ± 0.131	1.027	0.309	0.486 ± 0.261	0.862	0.393
分化程度							
低分化	12	0.381 ± 0.115			0.431 ± 0.229		
中分化	23	0.377 ± 0.156	0.393	0.677	0.458 ± 0.244	0.155	0.857
高分化	20	0.344 ± 0.136			0.481 ± 0.256		
浸润深度							
T ₁ /T ₂	36	0.377 ± 0.135			0.483 ± 0.236		
T ₃ /T ₄	19	0.346 ± 0.149	0.788	0.434	0.417 ± 0.253	0.959	0.342
淋巴结转移							
有	33	0.390 ± 0.148			0.501 ± 0.246		
无	22	0.331 ± 0.120	1.563	0.124	0.399 ± 0.227	1.540	0.129
临床分期							
I~II期	44	0.385 ± 0.146			0.504 ± 0.242		
III期	11	0.291 ± 0.071	3.040	0.005	0.286 ± 0.148	2.851	0.006

3 讨论

3.1 GSK3 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 有 GSK3 α 和 GSK3 β 两种形式, GSK3 β 参与机体多种生理生化过程, 与人类乳腺癌、结直肠癌及肝癌等多种肿瘤的发生发展有关^[6~9]。本研究通过 RT-PCR 及 Western blot 法对比 GSK3 β mRNA 及蛋白在肺腺癌组织及癌旁正常组织中的表达, 发现 GSK3 β 在肺腺癌组织中活性受抑制。进一步分析发现随着 GSK3 β 表达的降低, 肺腺癌临床分期升高。提示 GSK3 β 对肺腺癌的发生发展起抑制作用。

3.2 在与肿瘤关系密切的 Wnt 信号通路中, GSK3 β 活性受抑制会促使 β -catenin 在细胞核中聚集, 进而激活 Wnt 通路, 促进肿瘤发生发展^[10,11]。另外, zeste

基因增强子人类同源物 2 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2) 在人体多种肿瘤中过度表达^[12,13], GSK3 β 可以在 ser363 和 thr367 位点磷酸化 EZH2, 导致 EZH2 的生物活性降低, 从而发挥其抑癌作用^[14,15]。Kaneko 等^[16]研究表明, 抑制 GSK3 β 的表达可促使口腔鳞癌的侵袭转移。同时, GSK3 β 在鼻咽癌^[17]、涎腺癌^[18] 中均被发现表达下调。这些结论与本研究结果相一致。另有学者发现 GSK3 β 与 Wnt/ β -Catenin 等多种信号通路^[19,20] 及 p53^[21]、Ras^[22] 等多种肿瘤相关因子均关系密切, 提示 GSK3 β 在人类肿瘤的发生发展中扮演着重要而复杂的角色。

3.3 本研究的不足之处为回顾性研究, 入选样本量较少, 对结果可能有一定影响, 尚需大样本研究进一步证实。另外, 本研究资料为肺腺癌患者人体组织, 混杂因素较多。开展细胞培养, 在细胞株中进行 GSK3 β 基因敲除等相关实验, 可从多角度多侧面进一步验证 GSK3 β 的作用。

综上所述, GSK3 β 与肺腺癌的发生发展关系密切, 对 GSK3 β 的进一步研究可为肺腺癌的靶向治疗提供参考。

参考文献

- 1 Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87–108.
- 2 陈金东. 中国各类癌症的发病率和死亡率现状及发展趋势 [J]. 遵义医学院学报, 2018, 41(6): 653–662.
- 3 付丹阳, 张捷. 肺腺癌诊断的研究进展 [J]. 中国实验诊断学, 2019, 23(1): 172–174.
- 4 黄东明, 冯国生. 分子靶向药物联合治疗 EGFR-TKIs 继发性耐药肺癌的研究进展 [J]. 中国临床新医学, 2016, 9(8): 748–752.
- 5 Mury FB, Lugon MD, DA Fonseca RN, et al. Glycogen Synthase Kinase-3 is involved in glycogen metabolism control and embryogenesis of Rhodnius prolixus [J]. Parasitology, 2016, 143(12): 1569–1579.
- 6 Jain S, Ghanghas P, Rana C, et al. Role of GSK-3 β in Regulation of Canonical Wnt/ β -catenin Signaling and PI3-K/Akt Oncogenic Pathway in Colon Cancer [J]. Cancer Invest, 2017, 35(7): 473–483.
- 7 Aristizabal-Pachon AF, Castillo WO. Role of GSK3 β in breast cancer susceptibility [J]. Cancer Biomark, 2017, 18(2): 169–175.
- 8 Xu Q, Xu HX, Li JP, et al. Growth differentiation factor 15 induces growth and metastasis of human liver cancer stem-like cells via AKT/GSK-3 β / β -catenin signaling [J]. Oncotarget, 2017, 8(10): 16972–16987.
- 9 Shakoori A, Ougolkov A, Yu ZW, et al. Deregulated GSK3beta activity in colorectal cancer: Its association with tumor cell survival and proliferation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334(4): 1365–1373.
- 10 Ke X, Yuan Y, Guo C, et al. MiR-410 induces stemness by inhibiting Gsk3 β but upregulating β -catenin in non-small cells lung cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(7): 11356–11371.
- 11 Wang W, Yi M, Chen S, et al. NOR1 Suppresses Cancer Stem-Like Cells Properties of Tumor Cells via the Inhibition of the AKT-

- GSK-3 β -Wnt/ β -catenin-ALDH1A1 Signal Circuit [J]. J Cell Physiol, 2017, 232(10): 2829–2840.
- 12 Moore HM, Gonzalez ME, Toy KA, et al. EZH2 inhibition decreases p38 signaling and suppresses breast cancer motility and metastasis [J]. Breast Cancer Res Treat, 2013, 138(3): 741–752.
- 13 Ott M, Litzenburger UM, Sahm F, et al. Promotion of Glioblastoma Cell Motility by Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) Is Mediated by AXL Receptor Kinase [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47663.
- 14 Ko HW, Lee HH, Huo L, et al. GSK3 β inactivation promotes the oncogenic functions of EZH2 and enhances methylation of H3K27 in human breast cancers [J]. Oncotarget, 2016, 7(35): 57131–57144.
- 15 Zhang DM, Lin ZY, Yang ZH, et al. lncRNA H19 promotes tongue squamous cell carcinoma progression through β -catenin/GSK3 β /EMT signaling via association with EZH2 [J]. Am J Transl Res, 2017, 9(7): 3474–3486.
- 16 Kaneko T, Dehari H, Sasaki T, et al. Hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition is regulated by phosphorylation of GSK3- β via PI3K/Akt signaling in oral squamous cell carcinoma [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2016, 122(6): 719–730.
- 17 Hu W, Xiao L, Cao C, et al. UBE2T promotes nasopharyngeal carcinoma cell proliferation, invasion, and metastasis by activating the AKT/GSK3 β / β -catenin pathway [J]. Oncotarget, 2016, 7(12): 15161–15172.
- 18 Mohammadi Ghahhari N, Mohammadi Ghahhari H, Kadivar M. GSK3 β and CREB3 gene expression profiling in benign and malignant salivary gland tumors [J]. Iran Biomed J, 2012, 16(3): 140–144.
- 19 Guo H, Luo H, Yuan H, et al. Litchi seed extracts diminish prostate cancer progression via induction of apoptosis and attenuation of EMT through Akt/GSK-3 β signaling [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 41656.
- 20 Liu XF, Li XY, Zheng PS, et al. DAX1 promotes cervical cancer cell growth and tumorigenicity through activation of Wnt/ β -catenin pathway via GSK3 β [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(3): 339.
- 21 Rana S, Datta R, Chaudhuri RD, et al. Nanotized PPAR α Overexpression Targeted to Hypertrophied Myocardium Improves Cardiac Function by Attenuating the p53-GSK3 β -Mediated Mitochondrial Death Pathway [J]. Antioxid Redox Signal, 2019, 30(5): 713–732.
- 22 Sang B, Sun J, Yang D, et al. Ras-AKT signaling represses the phosphorylation of histone H1.5 at threonine 10 via GSK3 to promote the progression of glioma [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 2882–2890.

[收稿日期 2019-10-23] [本文编辑 韦所苏 刘京虹]

本文引用格式

尚自强,周燕,张灿斌,等.肺腺癌组织中GSK3 β 的表达及其临床意义[J].中国临床新医学,2020,13(7):701–704.

博硕论坛·论著

后路有限减压短节段固定融合手术治疗腰椎退行性侧凸的临床疗效评价

唐林, 梁斌

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院骨科

作者简介: 唐林(1984-),男,医学硕士,主治医师,研究方向:脊柱外科疾病诊治。E-mail:157298948@qq.com

[摘要] 目的 评价后路有限减压、短节段固定及融合手术治疗腰椎退行性侧凸的临床疗效。方法

收集2012-12~2014-08该院收治腰椎退行性侧凸患者22例。所有患者术前行X线、CT及MRI检查,均采用有限减压、短节段固定及融合手术进行治疗。术后随访,采用疼痛视觉模拟量表(VAS)、Oswestry功能障碍指数(ODI)评分系统进行疗效评估。结果 所有患者均获得随访,随访时间为24~60个月,平均34.8个月。手术时间78~208 min,平均138.5 min;出血量250~1 000 ml,平均433 ml。患者术后末次随访平均Cobb角(17.83 ± 11.38)°,腰椎前凸角(37.04 ± 15.27)°,矢状位平衡(36.99 ± 31.20)mm,与术前比较差异有统计学意义($P < 0.05$);术后末次随访腰部VAS评分为(1.73 ± 1.52)分,腿部VAS评分(1.59 ± 0.67)分,ODI评分(12.82 ± 3.08)分,均较术前降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。术后发生肺部感染1例,出现伤口深部感染1例,无一例发生腰椎侧凸进展、椎间隙塌陷、神经损伤及钉棒断裂等并发症。结论 后路有限减压、短节段固定及融合手术是治疗腰椎退行性侧凸的有效手段。

[关键词] 减压; 短节段固定; 融合; 腰椎退行性侧凸

[中图分类号] R 68 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2020)07-0704-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2020.07.14