

GKNs 在胃癌中的研究进展

刘 姣 凌 晖

摘 要 一类胃特异性的蛋白新家族,称为“胃动蛋白”。这些分泌蛋白是胃黏液细胞谱系的产物,其基因家族被认为是胃肠道组织特异性的抑癌基因。胃动蛋白(gastrokines,GKNs)在结构上具有高度保守性,据研究 GKNs 的功能主要在动态平衡和抑制胃肿瘤上发挥作用。GKNs 在正常胃组织中表达,而在胃肿瘤中表达下降或缺失,且其与三叶草因子家族、幽门螺杆菌(Hp)会影响胃癌的发生、发展过程。本文旨在集中已有的证据来证实 GKNs 有维持胃上皮内环境和肿瘤抑制的作用。

关键词 胃癌 GKNs 三叶因子

中图分类号 R735

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.02.006

目前发现胃动蛋白家族包括 3 个成员,即胃动蛋白-1(GKN1,AMP-18,gastrokine-1),胃动蛋白-2(GKN2,GDDR,gastrokine-2),胃动蛋白-3(GKN3,gastrokine-3)。30 年前,在胃激素促胃液素的克隆过程中,一种未知 cDNA 被分离出来。这种 cDNA 后来被人发现它编码一种 18kDa 的蛋白,AMP-18,在人、鼠和猪当中都有很高的序列同源性,说明其在进化上具有高度的保守性,AMP-18 在胃窦中高表达,但在其他组织中表达减少或无表达。之后,在所观察到的这种生长因子或“细胞因子样”活性物质倾向于胃上皮细胞的前提下,经 HUGO 基因命名委员会(HGNC)批准,人们将这种以前被称为 AMP18、CA11、BRICD1 和 TFIZ2 的蛋白,正式命名为 GKN1^[1]。后来杜建军博士克隆到胃癌下调或缺失的一种新基因,命名为 GDDR^[2]。GDDR 编码的蛋白与 GKN1 结构相似,并为同源蛋白,所以 GDDR 又称为 GKN2。这是 GKN 家族的第 2 个成员,此外, GDDR 的基因产物可经二硫键与三叶草蛋白家族成员 TFF1 结合形成异源二聚体,因此 GDDR 又称为 TFIZ1 [trefoil factor interaction(z)1]^[3]。此外,这个家族的第 3 个成员 GKN3,不像 GKN1 和 GKN2 是有功能的, GKN3 在人体内是作为无效的假基因存在的。然而, GKN3 在大量其他的哺乳动物,包括小鼠中都发挥出功能。已知的证据显示,GKNs 在调节胃上皮动态平衡及在幽门螺旋杆菌对宿主的免疫反应中都具有重要的作用,而且,由于其表现出抗增殖作用,被认为可

以抑制肿瘤发展。尤其是 GKN2 和胃特异性肿瘤抑制蛋白三叶因子(TFF1)之间已知的相互作用很关键。

一、基因结构

在哺乳动物中 GKN 是高度保守的直系同源物,但在鱼类或昆虫中一直没有描述,因此,推测 GKNs 是高级脊椎动物的进化创新。迄今为止,在所有的哺乳动物研究中,基因组水平的 3 个 GKN 基因旁系同源物显示他们严格保守,它们被紧紧地聚集在一起^[4]。人类 GKN 基因位于染色体 2p13.3。GKN3 基因在鼠科动物中定位于染色体 6qD1。

二、蛋白质结构与 BRICHOS 域

GKN 基因编码小(181~184 个氨基酸)的蛋白质。除了具有类似的相对分子质量,GKN 蛋白也有统一的结构特征,最显眼的是神秘的 BRICHOS 域和一个羧基末端片段,这显示了 GKN 有高度保守的氨基酸序列。GKN 蛋白质的最鲜明的结构特征是该 BRICHOS 域,它是 1 个 100 个氨基酸的序列,它被一小部分的无相关性的蛋白质所共享。虽然数量不多,但 BRICHOS 蛋白质具有重要的临床意义,它与人类疾病如痴呆、呼吸系统疾病、癌症有联系^[5]。关于 BRICHOS 域蛋白与人类疾病相关联的数据越来越多,这对 GKN 的了解起了关键性作用。分子研究进一步阐明了 BRICHOS 域的功能,它参与细胞内运输、加工肽、分子伴侣功能/蛋白质折叠、分泌等。BRICHOS 域的 3 级结构是高度保守的,并且有相似的重要功能。尽管整体上共享重要的同源性结构,个别 GKN 旁系却有少量的结构进化。虽然没有经验证明,这些结构变化一定会影响 GKN 功能。这方面最显著的证据是半胱氨酸 38 在所有哺乳动物 GKN2 直系同源基因中存在,但在 GKN1 或 GKN3 中却没有。

基金项目:湖南省科技计划重点项目(2012SK2012);湖南省高校创新平台开放基金资助项目(12K093)

作者单位:421001 衡阳,南华大学病理研究所

通讯作者:凌晖,硕士生导师,教授,电子信箱:281987393@qq.

com

总之, GKNs 享有强大的结构同源性意味着它们在体内密切相关, 然而, 其中个别成员有独特的功能也是进化所产生的结果。

三、GKNs 在正常组织中表达

GKNs 表达的主要部位是胃, 除少量在子宫、胎盘和十二指肠散在表达^[6,7]。同样的, GDDR 在胃肠道高度表达, 包括小肠、胃、胰腺、直肠和结肠, 而它不存在于心脏、骨骼肌、肝、脾和脑中, 证明它在正常胃肠道黏膜特异性表达。因为 GKN3 在人类中是缺失的, 所以常在小鼠中进行 GKN3 的研究, 研究显示 GKN3 蛋白和 mRNA 在胃窦腺细胞、胃底黏膜颈部亚群细胞 (MNCs) 和十二指肠布伦纳腺中表达。

四、在胃肿瘤中的表达以及其对胃肿瘤的影响

GKN1 和 GKN2 在胃癌中明显下调^[8,9]。已知的研究提示 GKNs 可能作为胃特异性的肿瘤抑制基因, 意味着其在临床预测和诊断中有潜在效用^[10]。GKN1 在胃肿瘤中表达减少是在做正常胃组织黏膜和胃肿瘤的差异筛选分析中被首次发现。有研究表明, GKN1 在弥漫型胃癌中缺失, 肠型胃癌中缺失, 而 GKN2 类似 GKN1, 其缺失的频率在弥漫型胃癌和肠型胃癌中分别为 85% 和 54%, 总体而言, GKN1 的表达缺失与 GKN2 呈正相关^[10]。除了胃肿瘤组织, GKN1 在胃癌细胞系中也普遍缺失, 在 7 个胃癌细胞系 (MKN28、MKN45、AGS、N87、SNU 1、SNU 16 和 KATO) 中 GKN1 表达均显著下调或缺失, GKN2 被证实 AGS、KATO III 和 HCT-1 胃癌细胞系中表达完全缺失, 而在 SGC-7901、N87、MKN45、MGC803 和 BGC823 细胞中表达显著下调或缺失^[11]。

GKN1 可能在胃癌的形成和发展中作为一种抑癌基因发挥显著的作用^[6]。GKN1 在胃黏膜的防御机制中起着重要的作用, 它是胃黏液层的组成成分之一。GKN1 基因可能通过抑制上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 和肿瘤细胞的迁移发挥重要作用^[12]。GKN1 还可以通过激活 p16/Rb 通路诱导胃癌细胞发生衰老^[13]。因此, GKN1 基因失活可促进胃癌细胞增生, 且在胃癌细胞的恶性转化中发挥启动作用^[12]。GKN1 蛋白可以抑制胃癌细胞的生长^[6]。关于 GKN2 的研究显示, GKN2 基因的瞬时表达可以抑制胃癌细胞的增生。GKN2 蛋白在胃表面黏膜上皮的细胞质中表达, 具有维持胃黏膜完整和促进受损黏膜的修复以及调节胃黏膜上皮细胞增生和凋亡的作用^[1]。人正常胃黏膜上皮中可分离出一种相对分子质量约 25kDa 的复合物, 具有保护和修复胃黏膜的作用, 这种复合物是由 GKN2 及 TFF1

之间通过二硫键结合而生成的一個异源二聚体复合物^[3]。但在胃癌细胞中 GKN2 的表达或缺失, 导致 TFF1-GKN2 异二聚体形成减少, 使 TFF1 失去正常的功能从而促进肿瘤的发生、发展^[14]。因此, GKN2 可作为监控胃癌患者疾病进展和预测预后的指标。GKN2 的过表达可以抑制胃癌细胞增生、迁移和侵袭, 并使细胞周期阻滞在 G₁~S 期。另外一种胃动蛋白 GKN3, 在人类基因中也存在表达缺失。在远端胃 GKN3 编码的是与 TFF-2 (三叶因子 2) 共表达的分泌蛋白, 并且能够识别一种在近端胃的 *Griffinia simplicifolia* lectin (GS)-II-阳性颈黏液细胞 (MNC) 亚群。GKN3 编码一种与 GKN1 和 GKN2 功能不同的 GKN, 并且其过度表达可能抑制胃黏膜萎缩中的上皮细胞增生。

五、GKNs 在胃炎和癌前疾病中表达

胃炎至胃癌的组织病理学进程是慢性胃炎, 胃黏膜萎缩, 肠上皮化生, 不典型增生和最终的胃癌。几个研究小组已经表明, 幽门螺杆菌感染的胃黏膜组织中 GKN1 和 GKN2 表达下调。GKN1 表达在正常黏膜、炎症、癌前组织、癌组织中逐步减少。胃黏膜损伤后, 在 GKN1 的存在下胃黏膜很快恢复。相反, 如果该蛋白下调, 修复过程受影响。这些研究结果表明, Hp 慢性持续性感染导致 GKN1 的表达减少, 它的表达在幽门螺杆菌根除后上调^[15]。动物实验也表明, 传统的非甾体类抗炎药可通过减少 GKN1 的表达从而诱导胃损伤。总之, 已有的数据表明, GKN1 表达可能与胃黏膜的炎症损伤有关。

GKN2 被确定为一个胃黏膜 TFF2 的结合配偶体。据报道该 GKN2 的表达在幽门螺杆菌感染性胃炎和胃癌中降低。正常人胃部 GKN2 呈内源性高表达, 但在幽门螺杆菌 (*helicobacter pylori*, Hp) 感染胃部直至形成胃癌的期间 GKN2 显示出渐进性的表达缺失, 研究显示, 在胃炎基础上发生胃癌的鼠模型中 GKN2 基因表达被显著抑制, 该肿瘤增生与促炎性因子的驱动及致癌的转录因子 STAT3 的活化相关。相反, 人类胃组织芯片研究显示, 根除慢性 Hp 感染后 GKN2 在所有上调转录组基因中表达上调最为明显。IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 及 IL-6 这些促炎性因子在胃癌细胞系中可以下调 GKN2 基因的表达^[2]。

幽门螺旋杆菌定殖胃上皮诱导的炎性反应使活性氧的生成和一氧化氮水平增加, 可能影响 DNA 和突变最终导致胃癌。有报道 GKN1 表达抑制 NF- κ B 的活化和核转位, 而 NF- κ B 是连接胃炎和胃癌的关键机制^[16]。胃黏膜受损是由于攻击因子压倒黏膜防

御的结果,一旦攻击因子压倒黏膜防御,胃黏膜的完整性可能会遭到破坏。幽门螺杆菌(Hp)感染被证实会损伤胃黏膜,是慢性胃炎和消化性溃疡最常见的病因。有研究表明,GKN1、GKN2 在表面胃上皮细胞和腺的上半部分大量表达,但不存在于较深胃腺,这表明 GKN1 可能发挥胃黏膜的防御屏障的作用。

六、GKNs 与 TFF 的关系

GKN 和三叶因子家族是在正常胃黏膜上皮细胞中大量特异性表达且结构和功能密切相关的两个蛋白家族。三叶因子家族(TFF)肽是胃黏膜上皮细胞主要分泌产物,它在细胞保护、细胞凋亡、免疫应答中发挥多种作用,且它在胃中调节黏膜修复和抑制肿瘤的形成。TFF1 缺乏可促使胃癌发生,而 TFF2 缺乏增加胃炎, TFF2 也在一些人体胃腺癌病例中下调。在人类组织样品, TFF2 启动子 DNA 的甲基化在幽门螺旋杆菌感染的时间开始和在整个胃肿瘤进展的过程中增加。TFF3 在非肿瘤胃黏膜中的表达是罕见的,但在大约 50% 的胃癌中发生。

研究首先发现 GKN2 和 TFF1 的联系,不同于其他家族成员, GKN2 含有一个 38 位的半胱氨酸残基,其间的二硫键就是由位于 TFF1 58 位的半胱氨酸残基和它的这个半胱氨酸残基构成,连接形成的二聚体复合物^[17]。一些报告表明,在实验鼠中 GKN2 和 TFF2 也以非共价键结合。该 GKN2 的表达,平行于该 TFF 基因,表明它们可以一起在维持胃肠道稳态中发挥重要作用。胃癌中 GKN2 与 TFF1 蛋白的共表达遭到破坏时, GKN2 表达缺失时诱导 TFF1 表达恢复能促进胃癌侵袭和转移。此外, GKN2 可以通过抑制 GKN1 来调节胃黏膜的动态平衡^[18]。GKN3 过表达可以抑制细胞增生。GKN3 编码的蛋白质和三叶因子(TFF)2 在正常胃黏膜上皮中共表达,在胃萎缩中高表达,但二者没有通过二硫键形成异二聚体,免疫共沉淀反应也验证了这一点^[4]。

七、展望

当前的实验资料表明胃动蛋白与多种疾病发生相关,且是胃组织特异性的抑癌基因,它在正常胃组织中表达,而在大多数胃癌及癌前病变中表达下调或缺失,并且和幽门螺杆菌感染,三叶草因子家族等存在着复杂联系,在胃癌进展过程中发挥着重要作用。国内外研究者进行了大量研究,尤其是对 GKN1 和胃癌关系进行了系统研究,但关于胃动蛋白家族的其他成员及胃动蛋白表达的作用机制却不完全清楚,相信对以上问题进行深入研究将为胃癌的治疗提供新的方向。

参考文献

- Menheniott TR, Kurklu B, Giraud AS. Gastrokines: stomach – specific proteins with putative homeostatic and tumor suppressor roles[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013, 304(2): 109 – 121
- 杜建军, 窦科峰, 彭淑牖, 等. 胃癌相关新基因 GDDR 的研究[J]. *中华外科杂志*, 2005, 43(1): 10 – 13
- Zhao Z, Fang C, Wang F, *et al.* Expression and clinical significance of gastric dramatic down – related gene in gastric cancer and precancerous lesions[J]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2014, 30(3): 306 – 308
- Menheniott TR. A novel gastrokine, Gkn3, marks gastric atrophy and shows evidence of adaptive gene loss in humans[J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(5): 1823 – 1835
- Willander H. BRICHOS domain associated with lung fibrosis, dementia and cancer – a chaperone that prevents amyloid fibril formation? [J]. *FEBS J*, 2011, 278(20): 3893 – 3904
- Yoon JH. GKN1 – miR – 185 – DNMT1 axis suppresses gastric carcinogenesis through regulation of epigenetic alteration and cell cycle [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(17): 4599 – 4610
- Fahlbusch FB. The tumor suppressor gastrokine – 1 is expressed in placenta and contributes to the regulation of trophoblast migration[J]. *Placenta*, 2013, 34(11): 1027 – 1035
- Mao W. Downregulation of gastrokine – 1 in gastric cancer tissues and restoration of its expression induced gastric cancer cells to apoptosis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31: 49
- Dai J. Gastrokine – 2 is downregulated in gastric cancer and its restoration suppresses gastric tumorigenesis and cancer metastasis [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(5): 4199 – 4207
- 褚光辉, 杜建军, 杨国栋, 等. 胃癌下调新基因 GDDR 表达特性及功能研究[J]. *科学技术与工程*, 2009, 9(7): 1696 – 1701
- Dai J. Gastrokine – 2 is downregulated in gastric cancer and its restoration suppresses gastric tumorigenesis and cancer metastasis [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(5): 4199 – 4207
- Yoon JH. Gastrokine 1 functions as a tumor suppressor by inhibition of epithelial – mesenchymal transition in gastric cancers [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(11): 1697 – 1704
- Xing R. Gastrokine 1 induces senescence through p16/Rb pathway activation in gastric cancer cells[J]. *Gut*, 2012, 61(1): 43 – 52
- Kosriwong K. Trefoil factors: tumor progression markers and mitogens via EGFR/MAPK activation in cholangiocarcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(12): 1631 – 1641
- Mao W. *Helicobacter pylori* infection and administration of non – steroidal anti – inflammatory drugs down – regulate the expression of gastrokine – 1 in gastric mucosa[J]. *Turk J Gastroenterol*, 2012, 23(3): 212 – 219
- Yoon JH. Gastrokine 1 regulates NF – kappaB signaling pathway and cytokine expression in gastric cancers[J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(8): 1800 – 1809
- Zhang Y. Activation of protease – activated receptor (PAR) 1 by frog trefoil factor (TFF) 2 and PAR4 by human TFF2 [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(22): 3771 – 3780
- Kim O. GKN2 contributes to the homeostasis of gastric mucosa by inhibiting GKN1 activity[J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(6): 762 – 771

(收稿日期: 2014 – 07 – 18)

(修回日期: 2014 – 09 – 02)