

·国内论著·

高尔基膜蛋白 1 在前列腺癌中的表达及意义

韦自卫^{1,2}, 王忠¹, 李文智^{1*}

(1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院 泌尿外科, 上海 200011;

2. 复旦大学附属金山医院 泌尿外科, 上海 201508)

摘要: 目的 探讨新型高尔基相关蛋白高尔基膜蛋白 1 (golgi membrane protein 1, GOLM1) 在前列腺癌组织中的表达特点及在诊断中的临床价值。**方法** 获取正常前列腺、良性前列腺增生和前列腺癌等不同前列腺组织芯片, 采用免疫组化法检测 GOLM1 蛋白的表达, 并分析其表达差异。在人前列腺癌细胞 (human prostate cancer cell, PC-3)、DU145 和 22Rv1 三种不同前列腺癌细胞系中, 分别采用定量 PCR 技术和 Western blot 方法, 同时检测 GOLM1 在 mRNA 水平和蛋白水平的表达情况。在 DU145 中, 使用免疫荧光技术观察 GOLM1 在前列腺癌细胞中的定位情况。**结果** GOLM1 在正常前列腺、良性前列腺增生和前列腺癌组织中表达程度不同, 其中阳性表达率分别为 40.0% (4/10)、50.0% (10/20) 和 92.0% (46/50), 前列腺癌组织中阳性表达率显著高于其他两组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。但病理结果显示, GOLM1 的高表达状态与肿瘤 Gleason 分级和病理分期则差异无统计学意义 ($P>0.05$)。PC-3、DU145 和 22Rv1 三种不同前列腺癌细胞中均见 GOLM1 表达, 激素依赖型前列腺癌细胞 22Rv1 显著低于激素非依赖型前列腺癌细胞 (PC-3 和 DU145), 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。GOLM1 定位于前列腺癌细胞 DU145 高尔基体顺面网络结构。**结论** 与正常前列腺和良性前列腺增生相比, GOLM1 在前列腺癌中表达明显升高, 是一种潜在的肿瘤标志物, 进一步研究其在前列腺癌中的作用机制具有重要意义。

关键词: 高尔基膜蛋白 1; 前列腺癌; 表达特征

中图分类号: R737.25

文献标识码: A

文章编号: 1674-7410(2022)01-0026-05

Expression and significance of Golgi membrane protein 1 in prostate cancer

Wei Ziwei, Wang Zhong, Li Wenzhi*

(1. Department of Urology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200011, China;

2. Department of Urology, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai, 201508, China)

Corresponding author: Li Wenzhi, E-mail: wenjhylee@hotmail.com

Abstract: Objective To investigate the expression characteristics of a novel Golgi membrane protein 1 (GOLM1) in prostate cancer tissues and its clinical value in diagnosis. **Methods** Different prostate tissue specimens, including normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostate cancer, were collected. The expression of GOLM1 protein was detected via immunohistochemistry and its expression differences were analyzed. Quantitative polymerase chain reaction and western blotting were used to determine the expression of GOLM1 at the mRNA and protein levels, respectively, in three different prostate cancer cell lines, including PC-3, DU145, and 22Rv1. In DU145 cells, the localization of GOLM1 was observed using immunofluorescence. **Results** GOLM1 was expressed differently in normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostate cancer tissue samples. The positive expression rates were 40.0% (4/10), 50.0% (10/20), and 92.0% (46/50), respectively. The positive expression rate in cancer tissue was significantly higher than that in the other two groups ($P<0.05$). However, the pathological results showed that there was no significant correlation between the high expression of GOLM1 and tumor Gleason grade and pathological stage ($P>0.05$). GOLM1 expression in hormone-dependent 22Rv1 prostate cancer cells was

基金项目: 上海市自然科学基金面上项目 (20ZR1431400)

※通信作者: 李文智, E-mail: wenjhylee@hotmail.com

significantly lower than that in hormone-independent prostate cancer cells PC-3 and DU145 ($P<0.05$). GOLM1 localized to the cis-plane network structure of the Golgi apparatus in DU145 cells. **Conclusion** Compared to normal prostate and benign prostatic hyperplasia tissue samples, the expression of GOLM1 was significantly increased in prostate cancer, making it a potential tumor marker. Therefore, it is imperative to further study its mechanism of action in prostate cancer.

Keywords: Golgi membrane protein 1; Prostate cancer; Expression characteristics

前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 是男性泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤之一。2021年, 美国癌症协会预测本国确诊PCa患者248 530例, 占男性肿瘤的26%, 居男性癌症发病率首位; 死亡34 130例, 在男性癌症病死率中排第二位^[1]。在我国, 随着社会经济水平和医疗卫生条件的提高及前列腺特异性抗原 (prostate specific antigen, PSA) 筛查的普及, PCa发病率呈上升趋势, 且初次发病年龄有所下降^[2]。高尔基膜蛋白1 (golgi membrane protein 1, GOLM1) 具有典型的高尔基体结构, 是一种上皮细胞特异性跨膜蛋白, 维持着高尔基体正常生理功能。GOLM1被证明在多种癌症 (包括胰腺癌、肺癌等) 中过量表达, 是这些癌症早期诊断和预后最有潜力的标志物之一^[3-4]。在前列腺癌中, 也有研究表明GOLM1呈高表达状态^[5]。本研究应用半定量RT-PCR和Western-blot技术及免疫组化技术检测GOLM1在PCa中的表达变化, 探讨其在PCa诊断中的临床意义。

1 材料与方法

1.1 组织来源 前列腺组织标本: 前列腺组织组合芯片 (PR807a) (美国Biomax公司) 包含正常前列腺组织10例、良性前列腺增生组织20例和PCa组织50例。PCa组织中, 48例PCa标本 (其中2例评分缺失) 按Gleason评分, 低分化PCa (8~10分) 21例, 中分化PCa (7分) 17例, 高分化PCa (≤ 6 分) 10例。按TNM分期, T1~T2期27例, T3~T4期23例。PCa细胞系22Rv1、PC-3和DU145人PCa细胞株, 均从上海中科院细胞库获得。22Rv1来源于异种移植的人PCa上皮细胞, 是雄激素依赖型PCa细胞。PC-3是来源于人PCa的骨转移细胞, DU145是来源于白人的PCa细胞, 二者均为雄激素非依赖型PCa细胞。

1.2 实验试剂 逆转录试剂盒 (德国Fermentas, K1622); SYBRPremix ExTaq II (大连Takara, RR820A); Giantin抗体和GOLM1抗体 (英国Abcam公司, ab80864); 0.3% Triton X-100 (美国

Sigma, 9036-19-5); ECL发光试剂盒 (美国Millipore公司, WBKLS0100); HRP标记羊抗小鼠二抗、HRP标记羊抗兔二抗、EliVision plus试剂盒、0.01M柠檬酸缓冲液 (pH6.0) 和DAB酶底物显色试剂盒 (福州迈新公司, DAB-0031)。

1.3 SYBR法检测GOLM1在PCa细胞中mRNA水平表达 采用RNA抽提试剂盒严格按照说明书提取各细胞系总RNA。GOLM1和内参肌动蛋白 (β -actin, β -Actin) 引物由上海生工服务公司根据GenBank设计合成。 β -Actin上游引物5'-3': ACCACTCCTCCACCTTTGA, 下游引物5'-3': 5'-TGTTGCTGTAGCCAAATTCGTT; GOLM1上游引物5'-3': ACCAAAAAGGGGAATGAAGC, 下游引物5'-3': GTGTCTGGGACTTGCTGTTACC。RT-PCR采用一步法RT-PCR试剂盒, 应用BIO-RADPCR扩增仪, 在Stage 2 step 3进行荧光采集。

Step 1	94℃	2 min	1 cycle	Stage 1
Step 1	95℃	30 s	40 cycle	Stage 2
Step 2	60℃	30 s		
Step 3	72℃	30 s		

1.4 Western blot法检测GOLM1在PCa细胞系中蛋白水平表达 取生长对数期的三种PCa细胞, 磷酸缓冲液洗涤2次, 100℃沸水中煮10 min使蛋白变性, 蛋白浓度采用二喹啉甲酸蛋白定量试剂盒进行测定。采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳进行电泳分离, 之后将蛋白印迹转印至聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜。结束后置于10%脱脂奶粉的TBST缓冲液中, 脱色摇床上封闭30 min。加入GOLM1抗体, 室温下孵育1 h。脱色摇床上洗涤3次, 每次5 min, 加入对应二抗。再次洗膜, 采用ECL发光试剂盒定量监测蛋白表达。加入底物后, 用胶片收集信号, 然后显影、定影、扫描胶片。

1.5 免疫荧光检测GOLM1在细胞中的定位 ①铺版: 将DU145 (生长状态良好、70%~80%密度) 进行传代, 均匀接种至铺有事先包被好明胶的玻片的

培养皿中过夜,铺版细胞密度为第二天细胞贴壁后密度达到30%~50%。②清洗:实验开始前,吸除培养基,使用磷酸缓冲液清洗3次。③固定:使用4%多聚赖氨酸进行固定,固定时间15 min,磷酸缓冲液清洗3次。④通透:使用0.3%的Triton X-100进行通透15 min,磷酸缓冲液清洗3次。⑤封闭:使用0.05%牛血清白蛋白进行封闭,室温封闭1 h,磷酸缓冲液清洗3次。⑥一抗:分别加入GOLM1一抗和高尔基体marker (Giantin抗体)孵育过夜,环境温度为4℃。⑦二抗:磷酸缓冲液清洗3次,加入二抗,孵育1 h。⑧核染:使用4',6-二脒基-2-苯基吡啶进行染色。⑨拍照:使用激光共聚焦显微镜观察GOLM1的定位情况。

1.6 免疫组化检测 GOLM1 在不同前列腺组织中的表达 ①脱蜡水化:在60℃环境中烤组织芯片30 min。②抗原修复:使用0.01 mol/L柠檬酸缓冲液(pH6.0)修复抗原,高压2 min后冷却至室温,使用磷酸缓冲液洗3次,5 min/次。③封闭:室温条件下,使用3% H_2O_2 -甲醇封闭内源性过氧化物酶10 min,使用磷酸缓冲液洗3次,5 min/次。④一抗:滴加GOLM1(1:50)一抗,冰箱4℃条件下过夜,之后用0.1%Tween-20磷酸缓冲液洗3次,5 min/次。⑤加聚合物增强剂,室温孵育20 min,之后用0.1%Tween-20磷酸缓冲液清洗3次,5 min/次。⑥滴加酶标抗鼠/兔聚合物,室温孵育30 min。⑦二氨基联苯胺显色,蒸馏水洗终止显色。⑧苏木素复染、水洗、分化后充分水洗返蓝。⑨常规脱水透明,中性树胶封片。以磷酸缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.7 结果判断标准 ①染色强度:染色强阳性(棕褐色),3分;染色阳性(黄色或棕色),2分;染色弱阳性(浅棕色),1分。②染色范围:≥51%者为3分;11%~50%者为2分;≤10%者为1分;不显色者为0分。以上两项相乘评分,4~9分评为阳性(+),(+++):≥6分,(++):5分,(+):4分;0~3分评为阴性(-)。

1.8 统计学处理 采用SPSS 16.0软件进行统计分析,计量资料(转录和翻译表达水平等)以均数±标准差表示,组间的比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析;计数资料(病理类型和分级分期的病例数等)以例(%)表示,比较采用卡方检验。 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GOLM1 在不同前列腺组织中的表达 GOLM1在三种前列腺组织中均见不同程度的染色,胞浆着色,且不同组织间着色强弱有明显差异性,见图1、图2。GOLM1在PCa组织中表达率高,而在正常前列腺和良性前列腺增生组织中表达率低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 新型高尔基相关蛋白高尔基膜蛋白1在前列腺组织中的表达情况(例)

临床病理特征	例数	阳性	阴性	P值
病理类型				<0.05
正常前列腺	10	4	6	
良性前列腺增生	20	10	10	
前列腺癌	50	46	4	
Gleason 分级				>0.05
高分化	10	9	1	
中分化	17	16	1	
低分化	21	19	2	
肿瘤分期				>0.05
T1~T2	27	25	2	
T3~T4	23	21	2	

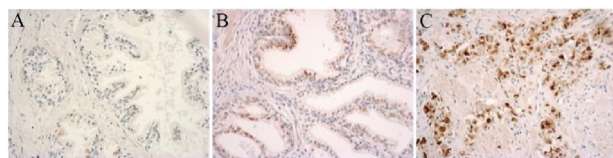


图1 前列腺癌在前列腺组织中的表达特点
注:A.正常前列腺组织;B.良性前列腺增生组织;
C.前列腺癌组织(200×)。

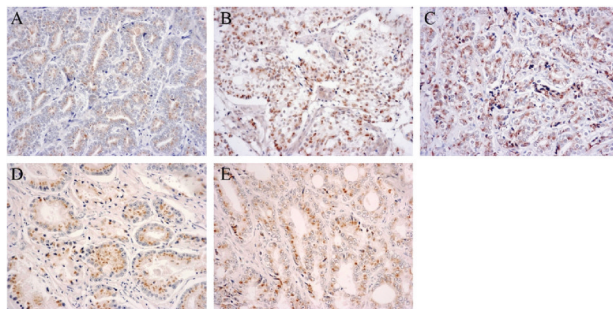


图2 新型高尔基相关蛋白高尔基膜蛋白1在前列腺癌不同分级和分期组织中的表达

注:A.高分化前列腺癌;B.中分化前列腺癌;
C.低分化前列腺癌;
D.T1期前列腺癌;E.T3期前列腺癌;A、D为(+),
B、C、E为(++)(200×)。

2.2 GOLM1 在 PCa 细胞中的定位 免疫荧光结果显示,GOLM1定位于PCa细胞器高尔基体内。其中GOLM1与Giantin共同定位于高尔基体顺面高尔基

网状结构。见图3。

2.3 GOLM1在不同PCa细胞系中的表达 PCR结果显示, GOLM1在PC-3、DU145和22Rv1三种PCa细胞中均见mRNA水平表达, 在PCa激素依赖型细胞22Rv1中的表达显著低于PCa激素非依赖型细胞PC-3和DU145中的表达, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见图4A。Western blot结果显示, GOLM1在三种PCa细胞中均见蛋白水平表达, 不同细胞系间的表达差异明显, 在PCa激素依赖型细胞22Rv1中的表达显著低于PCa激素非依赖型细胞PC-3和DU145中的表达, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见图4B。

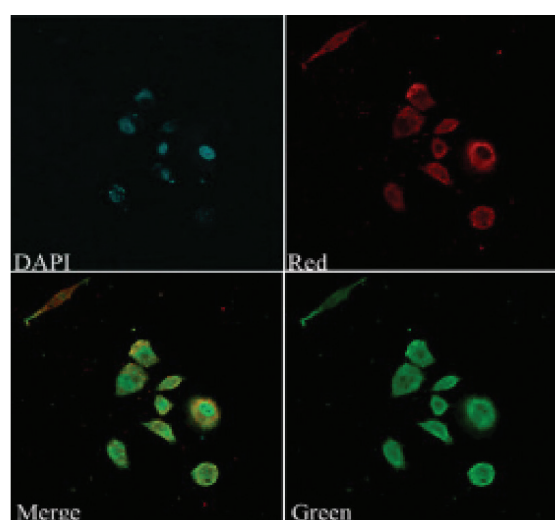


图3 前列腺癌细胞中新型高尔基相关蛋白高尔基膜蛋白1的定位分布

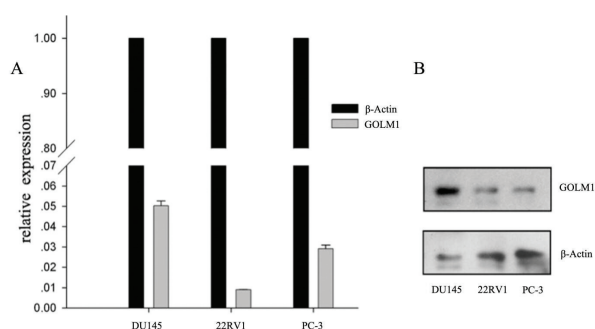


图4 三种前列腺癌细胞中新型高尔基相关蛋白高尔基膜蛋白1转录和翻译水平表达

注: A. 三种前列腺癌细胞中新型高尔基相关蛋白高尔基膜蛋白1转录水平表达; B. 三种前列腺癌细胞中新型高尔基相关蛋白高尔基膜蛋白1翻译水平表达。

3 讨论

近年来, 细胞器在肿瘤发生和进展过程中发挥的作用日益受到重视。作为真核细胞必不可少的功能单元, 高尔基体是蛋白质和糖脂等加工和修饰的

场所, 是维持正常细胞生理功能发挥的重要结构, 参与细胞分化及细胞间信号转导、蛋白质的分泌和转录表达后的修饰是真核细胞内吞作用的关键环节^[6-7]。高尔基及高尔基相关蛋白分为两类: 一类是基质蛋白, 参与调控高尔基体结构; 另一类是酶, 参与蛋白质的修饰。不同的细胞内定位是影响蛋白功能的重要因素, 位于细胞核中的蛋白一般承担转录因子的功能, 细胞膜上的一般发挥受体作用, 而位于胞浆中的则通常参与能量代谢和蛋白修饰。因此, 定位于高尔基体的蛋白可能具有重要功能。

GOLM1是一种上皮细胞特异性II型跨膜蛋白, 本研究同样证实了GOLM1在顺面高尔基网状结构的细胞定位。GOLM1的编码基因长约3 100 bp, 位于9q21.33, 内含开放阅读框1 206 bp, 可编码氨基酸402个。本研究通过聚丙烯酰胺电泳发现蛋白条带55 kDa, 但是根据基因序列推测, GOLM1蛋白相对分子质量应为45 kDa, 低于本研究所发现GOLM1分子质量, GOLM1包含的大量糖基化和酸性氨基酸结构可能是其重要因素。十二烷基硫酸钠的变性作用受到影响, 蛋白的迁移速度从而降低^[8]。近年来, GOLM1作为肿瘤标志物或靶向治疗在多种癌症中得到广泛关注^[9-11]。在正常生理情况下, GOLM1定位于高尔基体顺面膜上, 由胞内、胞外及跨膜区域组成。GOLM1是一个糖蛋白, 其N-末端是带有1个信号肽剪切位点的单跨膜区, 易于N-糖基化; 作为胞外段, C-末端编码的氨基酸则主要承担与其他蛋白相互作用的重要功能。一般情况下, GOLM1作为高尔基驻留蛋白是不能分泌到细胞表面的。但在疾病状态下, GOLM1能够从高尔基体顺面膜囊脱离并到达胞内体以及细胞表面^[12], 其过程可能是通过位于R⁵²VRR⁵⁵位点的前蛋白转化酶使其发生裂解, 释放到细胞质中, 再通过内体运输至胞外。前体加工酶介导的蛋白剪切和内体运输为GOLM1作为肿瘤诊断的标志物提供了潜在分子机制^[13]。

已知GOLM1的组成和结构, 本研究重点研究了GOLM1在PCa中的表达, 并探讨其表达水平与PCa病理分级分期等的关系。首先, GOLM1在PCa组织、良性增生组织和正常前列腺组织中均有不同程度的表达, 恶性肿瘤组织中表达显著高于良性前列腺组织。这种表达的显著差异提示GOLM1可能作为肿瘤标志物在PCa发生发展过程中发挥着重要作用, 与以往的研究结果一致^[14]。其机制可能为通过

激活 PI3K-AKT-mTOR 信号通路促进肿瘤的进展,也可以受到 LINC00992 等的调控发挥致癌作用^[15-16]。GOLM1 在 PCa 细胞和组织中的表达特点可能是 PCa 一个重要特征,分析 GOLM1 表达状态对于 PCa 的诊断具有重要意义,也有利于 PCa 患者的临床管理。

本研究还发现,尽管 GOLM1 在不同分期和分级的 PCa 中均高表达状态,但其表达水平却与 TNM 分期或 Gleason 分级不存在显著相关性,表明肿瘤的恶性程度和 GOLM1 的表达水平无明显相关。对激素依赖型 PCa 细胞 22Rv1 和激素非依赖型 PCa 细胞 PC-3 与 DU145 中的 GOLM1 的表达水平进行检测,结果表明 GOLM1 的 mRNA 表达水平和蛋白表达水平在上述三个 PCa 细胞系中均呈高表达状态,尤其是在激素非依赖型 PCa 细胞中的表达明显高于激素依赖型 PCa 细胞,提示 GOLM1 表达可能与激素敏感性有关,进一步提示 GOLM1 可能与 PCa 细胞的增殖和浸润等生物学行为有关。

综上所述, GOLM1 在前列腺癌组织中呈高表达状态,但其表达水平与肿瘤恶性程度无关,而可能与激素敏感性相关。由于存在样本量有限等不足,仍需进一步扩大样本量,证实 GOLM1 与肿瘤分级分期之间的相关性。目前对于 GOLM1 与激素敏感性之间的研究不充分,仍需进一步深入研究 GOLM1 异常表达状态在 PCa 中的生物学功能和具体作用机制。

参考文献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer Statistics, 2021 [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1):7-33.
- [2] 顾秀瑛, 郑荣寿, 张思维, 等. 2000-2014 年中国肿瘤登记地区前列腺癌发病趋势及年龄变化分析[J]. 中华预防医学杂志, 2018, 52(6):586-592.
- [3] DUAN J, LI X, HUANG S, et al. GOLPH2, a gene downstream of ras signaling, promotes the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(3): 4187-4194.
- [4] ZHANG Y, HU W, WANG L, et al. Association of GOLPH2 expression with survival in non-small-cell lung cancer: clinical implications and biological validation [J]. Biomark Med, 2017, 11(11):967-977.
- [5] VARAMBALLY S, LAXMAN B, MEHRA R, et al. Golgi Protein GOLM1 Is a Tissue and Urine Biomarker of Prostate Cancer [J]. Neoplasia, 2008, 10(11):1285-1294.
- [6] LU P H, YU C C, CHIANG P C, et al. Paclitaxel Induces Apoptosis Through Activation of Nuclear Protein Kinase C- δ and Subsequent Activation of Golgi Associated Cdk1 in Human Hormone Refractory Prostate Cancer [J]. J Urology, 2011, 186(6):2434-2441.
- [7] HILGEMANN D W, LIN M J, FINE M, et al. On the existence of endocytosis driven by membrane phase separations [J]. Bba-Biomembranes, 2020, 1862(1):183007.
- [8] KEHRER-SAWATZKI H, SZAMALEK JM, TANZER S, et al. Molecular characterization of the pericentric inversion of chimpanzee chromosome 11 homologous to human chromosome 9 [J]. Genomics, 2005, 85(5):542-550.
- [9] LIU C, WEN CC, WANG X, et al. Golgi membrane protein GP73 modified-liposome mediates the antitumor effect of survivin promoter-driven HSVtk in hepatocellular carcinoma [J]. Exp Cell Res, 2019, 383(1):111496.
- [10] YANG H J, LIU G L, LIU B, et al. GP73 promotes invasion and metastasis of bladder cancer by regulating the epithelial-mesenchymal transition through the TGF- β 1/Smad 2 signalling pathway [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(3): 1650-1665.
- [11] LIEWEN H, MARKULY N, LAEUBLI H, et al. Therapeutic Targeting of Golgi Phosphoprotein 2 (GOLPH2) with Armed Antibodies: A Preclinical Study of Anti-GOLPH2 Antibody Drug Conjugates in Lung and Colorectal Cancer Models of Patient Derived Xenografts (PDX) [J]. Target Oncol, 2019, 14(5):577-590.
- [12] PURI S, BACHERT C, FIMMEL C J, et al. Cycling of early Golgi proteins via the cell surface and endosomes upon luminal pH disruption [J]. Traffic, 2002, 3(9):641-653.
- [13] BACHERT C, FIMMEL C, LINSTEDT A D. Endosomal Trafficking and Proprotein Convertase Cleavage of cis Golgi Protein GP73 Produces Marker for Hepatocellular Carcinoma [J]. Traffic, 2007, 8(10):1415-1423.
- [14] SUN Z L, MAO Y H, ZHANG X, et al. Identification of ARHGEF38, NETO2, GOLM1, and SAPCD2 Associated With Prostate Cancer Progression by Bioinformatic Analysis and Experimental Validation [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9:718638.
- [15] YAN G, RU Y, WU K, et al. GOLM1 promotes prostate cancer progression through activating PI3K-AKT-mTOR signaling (vol 78, pg 166, 2018)[J]. Prostate, 2019, 79(9): 1060-1061.
- [16] CHEN J H, LIU X D, KE K B, et al. LINC00992 contributes to the oncogenic phenotypes in prostate cancer via targeting miR-3935 and augmenting GOLM1 expression [J]. BMC Cancer, 2020, 20(1):749.