



## 陆军军医大学研究生学位论文独创性声明

秉承学校严谨的校风和科研作风，本人申明所呈交的论文是我本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得我校或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料，与我同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名： 元复 日期： 2018.11.29

## 陆军军医大学研究生学位论文授权使用授权书

本人完全了解陆军军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在攻读学位期间论文工作的知识产权单位属陆军军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文或使用论文工作成果时署各单位为陆军军医大学。学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。学校可以公布学位论文的全部或部分内容（保密内容除外），可以采用影印、缩印或其他手段保存论文。

论文作者签名： 元复  
指导教师签名： 郭永辉  
日期： 2018.11.29

# 目 录

|  |    |
|--|----|
| 缩略语表.....                                  | 1  |
| 英文摘要.....                                  | 3  |
| 中文摘要.....                                  | 7  |
| 论文正文 IRF-4 结合蛋白 (IBP) 在胃腺癌中表达及意义的初步研究..... | 10 |
| 第一章 前    言.....                            | 10 |
| 第二章 IBP 在人胃腺癌细胞株中表达的初步研究.....              | 12 |
| 2.1 材料与方法.....                             | 12 |
| 2.2 结    果.....                            | 20 |
| 2.3 讨    论.....                            | 21 |
| 2.4 小    结.....                            | 22 |
| 第三章 IBP、p53 蛋白在胃腺癌组织标本中的表达及意义.....         | 23 |
| 3.1 材料与方法.....                             | 23 |
| 3.2 结    果.....                            | 26 |
| 3.3 讨    论.....                            | 31 |
| 3.4 小    结.....                            | 32 |
| 全文总结.....                                  | 34 |
| 参考文献.....                                  | 36 |
| 文献综述 IRF-4 在肿瘤中的研究进展.....                  | 39 |
| 参考文献.....                                  | 46 |
| 攻读硕士学位期间发表的论文.....                         | 49 |
| 致    谢.....                                | 50 |

## 缩略语表

| 英文缩写  | 英文全称                                | 中文全称           |
|-------|-------------------------------------|----------------|
| Amp   | ampicillin                          | 氨苄西林           |
| bp    | base pair                           | 碱基对            |
| BSA   | Bovine serum albumin                | 牛血清白蛋白         |
| CCK-8 | Cell Counting Kit-8                 | 细胞计数试剂盒        |
| cDNA  | complementary DNA                   | 互补脱氧核糖核酸       |
| d     | day                                 | 天              |
| DAB   | 3,3'-diaminobenzidine               | 3,3'-二氨基联苯胺    |
| DMEM  | dulbecco's modified eagle medium    | 改良 eagle 培养基   |
| HRP   | Horseradish peroxidase              | 辣根过氧化物酶        |
| DNA   | deoxyribonucleic acid               | 脱氧核糖核酸         |
| dNTP  | deoxyribonucleotide triphosphate    | 脱氧核糖核苷三磷酸      |
| cm    | centimeter                          | 厘米             |
| EDTA  | Ethylene diamine tetraacetic acid   | 乙二胺四乙酸         |
| FBS   | Fetal bovine serum                  | 胎牛血清           |
| IRF-4 | Interferon regulatory factor 4      | 干扰素调节因子-4      |
| GEF   | Guanine nucleotide exchange factors | 鸟苷酸交换因子        |
| GST   | Glutathione S-transferase           | 谷胱甘肽S-转移酶      |
| h     | Hour                                | 小时             |
| DTT   | dithiothreitol                      | 二硫苏糖醇          |
| mAb   | monoclonal antibody                 | 单克隆抗体          |
| IBP   | IRF-4 binding protein               | 干扰素调节因子 4 结合蛋白 |
| IL-8  | Interleukin-8                       | 白细胞介素-8        |
| ICC   | immunocytochemistry                 | 免疫细胞化学技术       |
| DMSO  | dimethyl sulfoxide                  | 二甲亚砜           |
| L     | litre                               | 升              |
| M     | marker                              | 标准品            |

---

|        |   |                |
|--------|---|----------------|
| mg     | milligram                               | 毫克             |
| Min    | Minute                                  | 分钟             |
| ml     | millilitre                              | 毫升             |
| mol/L  | mole/litre                              | 摩尔/升           |
| mRNA   | messenger ribonucleic acid              | 信使RNA          |
| His    | Histidine                               | 组氨酸            |
| ng     | nanogram                                | 纳克             |
| nM     | nanomole                                | 纳摩尔            |
| μl     | microliter                              | 微升             |
| RNase  | ribonuclease                            | 核糖核酸酶          |
| μg     | microgram                               | 微克             |
| PCR    | polymerase chain reaction               | 聚合酶链反应         |
| WB     | Western blot                            | 免疫印迹           |
| rpm    | rotate per minute                       | 每分钟转速          |
| RNA    | Ribonucleic acid                        | 核糖核酸           |
| PAGE   | polyacrylamide gel electrophoresis      | 聚丙烯酰胺凝胶电泳法     |
| RT-PCR | Reverse transcription-PCR               | 反转录PCR         |
| s      | Second                                  | 秒              |
| SPSS   | statistical package for social science  | 社会科学统计软件包      |
| TAE    | Tris-acetic acid-EDTA buffer            | Tris乙酸-EDTA缓冲液 |
| TEMED  | N,N,N',N'-tetra methyl ethylene diamine | 四甲基乙烯基二胺       |
| PI     | Isoelectric point                       | 等电点            |
| PBS    | phosphate buffered saline               | 磷酸盐缓冲液         |
| OD     | Optical density                         | 光密度            |
| μM     | micromole                               | 微摩尔            |

# **A Priliminary Study On The Expression And Significance Of IRF-4 Binding Protein (IBP) In Gastric Adenocarcinoma**

## **Abstract**

Gastric cancer (GC) is already the fourth most common diagnosed cancer in the world and the second most fatal cancer in the world. In China, GC is the third most common cause of cancer and cancer deaths in both sexes, and the incidence of gastric cancer in China is gradually increasing. Since the early diagnosis of gastric cancer is difficult, the survival rate is always low, and most patients have late unresectable or metastatic lesions at the time of diagnosis. Therefore, the overall clinical outcome of GC patients is still poor, and the 5-year survival rate is lower than 30%. The discovery of new biomarkers and their use in combination with the diagnosis, staging, and prognosis of traditional cancers will help improve the early diagnosis of GC and the care of patients. In particular, the discovery of biomarkers capable of early identification of tumor cells and predicting therapeutic response can greatly improve the therapeutic effect of GC.

The interferon regulatory factor 4 binding protein (IBP) is a protein that can be screened from the human lymph node cDNA library by the Pernis team in 2002 through a yeast two-hybrid technique to bind IRF-4. It is mainly expressed on T lymphocytes and plays an important role. IBP is a highly conserved protein in vertebrates with a molecular weight of about 75Kd. The coding gene is located on chromosome 6p21.31. It is highly homologous to SWAP-70. SWAP-70 plays an important role in B cell activation and Ig subclass transformation. IBP is called It is a novel guanine nucleotide exchange factor (GEF). GEFs are members of the Dbl protein family and represent regulatory factors for the activation state of major Rho GTPases. Rho GTPases play an important role in many biological processes, including regulation of cytoskeletal organization, cell cycle progression, and transduction of signals from extracellular environments. They have also been shown to contribute to pathological processes such as cancer cell migration, invasion and metastasis. In addition, Rho GTPases have oncogenic activity, which is associated with increased expression and activity

in various cancers, and related reports also indicate that IBPs exhibit GEF activity against Rho family GTPases including Rac1, Cdc42, and RhoA.

The human p53 gene is about 20 kb in length and has 11 exons and introns. It is located in the 17th short arm of human chromosome. It has both wild-type and mutant genotypes. Its products also have mutant p53 protein and wild-type p53 protein. Two kinds, wild-type p53 gene can regulate cell growth and apoptosis, and is a tumor suppressor gene. The product p53 protein is an anti-cancer factor, and its moderate expression can regulate the normal growth and development of cells, but the deletion of its coding gene and The mutant p53 protein produced by the mutation is positively correlated with the development of many tumors, and the available data indicate that it is a cancer-promoting factor. Because the wild-type p53 protein has a short half-life and is difficult to detect, and the mutant p53 protein has a property of being difficult to hydrolyze due to loss of function, and often accumulates in cells, the detection of p53 protein by immunohistochemistry is generally a mutation type (In this paper, the mutation type p53 is detected, and the following unspecified is referred to as p53). Mutations in the p53 gene have been reported to be associated with up to 50% of malignant tumor patients. In gastric cancer, the p53 gene is one of the most mutated tumor suppressor genes, and its gene mutations and product overexpression can occur at various stages of the tumor.

In recent years, the research team led by Prof. Hu Chuanqi found that IBP is highly expressed in colon cancer and breast cancer and plays an important role. It is found that IBP is negatively correlated with the expression of mutant p53 protein in breast cancer specimens. Further studies have found that IBP is a novel target gene of p53 protein (wild type). Increased expression of p53 can inhibit the expression of IBP, while induction of IBP is associated with inhibition of p53. In breast cancer cell lines, wild-type p53 can bind to the IBP promoter. Recent studies have also found that IBP plays an important role in tumors such as oral squamous cell carcinoma and human salivary adenoid cystic carcinoma. However, the expression of IBP in GC has not been reported. Therefore, this study firstly detected the expression of IBP in gastric adenocarcinoma cell lines by immunofluorescence, Real-time PCR and Western blot, and preliminary analysis of IBP in gastric adenocarcinoma cells. Expression pattern. Then, immunohistochemical staining was used to detect the expression of IBP and p53 protein in human gastric adenocarcinoma tissue samples, and to explore the

relationship between IBP and p53 protein expression and clinicopathological features in GC. The main experimental contents, results and conclusions are as follows:

1. Immunofluorescence assay showed that IBP was mainly expressed in the cytoplasm and membrane of gastric adenocarcinoma cell line MKN-45. Immunoblotting and Real-Time PCR confirmed the expression of IBP in gastric adenocarcinoma cell line MKN-45 and SGC-7901. MKN-45 expression was higher than that of SGC-7901 cells, and the difference in malignancy between the two cells was associated. IBP appeared to have a tendency to be expressed in gastric cancer cells with higher malignancy.

2. In this experiment, 150 cases of HE-slices of gastric adenocarcinoma confirmed by pathology of our hospital were collected. Immunohistochemical EnVision staining showed that the positive expression rate of IBP was higher than that of non-gastric adenocarcinoma group, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ), and also confirmed that IBP is expressed in the membrane and cytoplasm of patients with gastric adenocarcinoma, which is brown-yellow particles. The positive expression of IBP was correlated with the pathological grade of the patients ( $P < 0.05$ ), and there was no correlation with the age, gender, depth of invasion of the stomach wall, TNM stage, Lauren classification and tumor location ( $P > 0.05$ ), indicating that IBP was The occurrence and development of GC plays an important role. In connection with the cell experiment in the first step, we speculate that overexpression of IBP will promote the development of tumors and stimulate the development of tumor cells to poor differentiation and malignancy. Overexpression of IBP suggests that the patient's prognosis is poor, making it an important indicator of GC prognosis, but further case follow-up verification is needed.

3. We also detected the expression of mutant p53 protein in 150 specimens by immunohistochemical EnVision method. The positive expression rate of p53 protein in 150 specimens was higher than that in non-gastric adenocarcinoma group. The difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ), p53 protein is mainly expressed in the nucleus and is brownish yellow or tan particles. At the same time, statistical analysis showed that the positive expression of p53 protein was correlated with age, gender, pathological grade and Lauren classification ( $P < 0.05$ ), and had no correlation with the depth of gastric wall invasion, TNM stage and tumor location ( $P > 0.05$ ). Then, Spearman rank correlation was used to analyze the correlation between IBP and p53 protein. The results showed that there was no significant

correlation between the expression of IBP and the expression of p53 protein in gastric adenocarcinoma tissues, and the difference was not statistically significant ( $r = 0.013$ ,  $P > 0.05$ ), which seems to contradict the clinical pathology of IBP and gastric adenocarcinoma, but the occurrence and development of gastric adenocarcinoma is a multi-step multi-step process involving multiple pathological pathways and complex relationships between various tumor factors. . Moreover, there are many mutants of mutant p53 protein in gastric adenocarcinoma, and a single p53 antibody cannot accurately reflect the expression of the entire mutant p53 protein. Therefore, further molecular pathology studies are needed regarding the detailed relationship between p53 protein and IBP.

**Key words:** gastric adenocarcinoma; interferon regulatory factor 4 binding protein; p53 protein

# IRF-4 结合蛋白 (IBP) 在胃腺癌中表达及意义的初步研究

## 摘 要

胃癌 (Gastric cancer, GC) 已经是全球第四大确诊的最常见癌症,也是全球第二大致命恶性肿瘤<sup>[1,2]</sup>。在我国,GC 是两性中第二大常见癌症和癌症死亡的第三大原因,且胃癌在我国的发病率呈逐步上升趋势<sup>[3]</sup>。由于胃癌早期诊断较为困难,存活率一直较低,而且大多数患者在确诊时存在晚期不可切除的或转移性的病灶,因此 GC 患者的总体临床结果仍然很差,5 年存活率低于 30%<sup>[4-6]</sup>。新生物标志物的发现及其应用与传统癌症的诊断、分期和预后相结合将有助于改善 GC 的早期诊断和对患者的护理,特别是能够早期鉴定肿瘤细胞并预测治疗反应的生物标志物的发现能够很大提高 GC 的治疗效果<sup>[7]</sup>。

干扰素调节因子 4 结合蛋白 (The interferon regulatory factor 4 binding protein, IBP) 是 2002 年 Pernis 研究小组通过酵母双杂交技术,从人淋巴结 cDNA 文库中筛选出的一个可以与 IRF-4 具有结合作用的蛋白,主要表达于 T 淋巴细胞并发挥重要作用<sup>[7]</sup>。IBP 是脊椎动物中高度保守的蛋白质,分子量约 75Kd,编码基因位于染色体 6p21.31,与 SWAP-70 高度同源,SWAP-70 在 B 细胞激活和 Ig 亚类转换中具有重要作用<sup>[8]</sup>,IBP 被称为一种新型的鸟嘌呤核苷酸交换因子 (GEF)<sup>[1,9]</sup>。GEFs 是 Dbl 蛋白家族的成员,代表主要 Rho GTPases 活化状态的调节因子<sup>[10]</sup>。Rho GTPases 在许多生物过程中发挥着重要的作用,包括细胞骨架组织的调节,细胞周期进程以及来自细胞外环境信号的转导<sup>[11-14]</sup>。他们也被证明有助于病理过程,如癌细胞迁移,侵袭和转移<sup>[15-18]</sup>。此外,Rho GTPases 具有致癌活性,这与多种癌症中的表达和活性增加相关<sup>[19-21]</sup>,相关报道还指出 IBP 显示出对 Rho 家族 GTP 酶 (包括 Rac1, Cdc42 和 RhoA) 的 GEF 活性<sup>[22]</sup>。

人类 p53 基因长约 20kb,有 11 个外显子和内含子,位于人类染色体第 17 位短臂,有野生型和突变体两种基因型,其产物也有突变型 p53 蛋白和野生型 p53 蛋白两种,野生型 p53 基因可以调节细胞生长和凋亡,是一种肿瘤抑制基因,产物 p53 蛋白是一种抗癌因子,其适度表达可以调节细胞的正常生长发育,但其编码基因的缺失和突变产生的突变型 p53 蛋白却与许多肿瘤的发生发展呈正相关<sup>[23]</sup>,现有数据表明它是一种促癌因子。由于野生型 p53 蛋白半衰期短,不易检测,而突变型 p53 蛋白因功能丧失而具有不易水解的特性,常常在细胞内积累,因此免疫组化方法检测 p53 蛋白一般是突变类型(本文所检测为突变型 p53,后面未加说明均简称为 p53)。据报道,p53 基因突变与多达

50%的恶性肿瘤患者有关<sup>[24]</sup>。在胃癌中，p53 基因是突变最多的肿瘤抑制基因之一，其基因突变和产物过表达可发生在肿瘤发展的各个阶段<sup>[25]</sup>。

近年来发现 IBP 在结肠癌和乳腺癌中高表达并起着重要的作用，并发现在乳腺癌标本中 IBP 与突变型 p53 蛋白的表达呈负相关<sup>[26]</sup>，更进一步的研究发现 IBP 是一个新的 p53 蛋白（野生型）的靶基因，p53 表达增加可以抑制 IBP 的表达，而 IBP 的诱导则与 p53 的抑制相关。在乳腺癌细胞株中，野生型 p53 可以与 IBP 启动子结合<sup>[27,28]</sup>。近年研究还发现，IBP 在口腔鳞癌<sup>[29]</sup>、人涎腺腺样囊性癌<sup>[30]</sup>等肿瘤中均发挥着重要作用。但 IBP 在 GC 中的表达情况还未见报道，因此，本研究首先通过免疫荧光、Real-time PCR 和 Western blot 方法检测 IBP 在胃腺癌细胞株中的表达情况，初步分析 IBP 在胃腺癌细胞中的表达模式。然后通过免疫组织化学染色检测 IBP、p53 蛋白在人胃腺癌组织标本中的表达情况，探究 GC 中 IBP 与 p53 蛋白表达及其与临床病理特征之间的关系。主要实验内容、结果及结论如下：

(1) 通过免疫荧光检测显示 IBP 主要表达在胃腺癌细胞株 MKN-45 的胞浆和胞膜中，免疫印迹及 Real-Time PCR 均证实在胃腺癌细胞株 MKN-45、SGC-7901 中均有 IBP 的表达，MKN-45 细胞中表达高于 SGC-7901 细胞，联系到这两种细胞恶性度的差异，IBP 似乎具有在恶性度较高的胃腺癌细胞中表达的趋势，但由于所研究胃腺癌细胞系较少，该猜测需要进一步引入更多胃腺癌细胞系才能确认。

(2) 本实验收集我院病理科确诊的胃腺癌 HE 切片对应蜡块 150 例，行免疫组化 EnVision 法染色，发现 IBP 阳性表达率高于非胃腺癌组，差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )，且同样证实 IBP 在胃腺癌组患者胞膜及胞浆中均有表达，为棕黄色颗粒。IBP 的阳性表达与患者的病理分级具有明显相关性 ( $P < 0.05$ )，病理分级越高的患者其 IBP 的表达具有升高的趋势；与患者年龄、性别、胃壁浸润深度、TNM 分期、Lauren 分型及肿瘤部位无明显相关性 ( $P > 0.05$ )，说明 IBP 可能在 GC 的发生发展中起了重要作用，联系到第一步的细胞实验，我们推测 IBP 过度表达将会促进肿瘤的发生发展，激发肿瘤细胞向低分化、高恶性方向发展。IBP 的过表达提示患者的预后不良，使其有可能成为一个判断 GC 预后的重要指标，但还需要进一步病例实验验证。

(3) 我们同时对收集的 150 例标本行免疫组化 EnVision 法检测 p53 蛋白的表达情况，发现在 150 例标本中 p53 蛋白阳性表达率均高于非胃腺癌组，差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，p53 蛋白主要在胞核表达，为棕黄色或棕褐色颗粒。同时，通过统计学分析发现 p53 蛋白的阳性表达与患者的年龄、性别、病理分级、Lauren 分型具有明显相关性 ( $P < 0.05$ )。p53 蛋白有在年龄越大的人群中表达越高的趋势；p53 蛋白在男性患者

中的表达率明显比女性患者高；和 IBP 一样，病理分级越高的患者其 p53 蛋白的表达具有升高的趋势；p53 蛋白还有在肠型胃腺癌中表达增高的趋势。p53 蛋白表达与患者胃壁浸润深度、TNM 分期及肿瘤部位无明显相关性 ( $P>0.05$ )。然后运用 *Spearman* 等级相关性分析 IBP 和 p53 蛋白二者之间的相关关系，结果显示，胃腺癌组织中，IBP 的表达与 p53 蛋白的表达没有明显的相关性，差异无统计学意义 ( $r=0.013$ ,  $P>0.05$ )，这与 IBP 与胃腺癌临床病理相关似乎相矛盾，但胃腺癌的发生和发展是一个多基因的多步骤过程，涉及多种病理途径及各种肿瘤因子之间的复杂关系，且在胃腺癌中突变型 p53 蛋白的突变体很多，单一的 p53 抗体不能准确反映整个突变型 p53 蛋白的表达情况，所以，关于 p53 蛋白和 IBP 之间的详细关系，还需要进一步分子病理学研究。

综上所述，本研究表明：IBP 在胃腺癌细胞和组织中过度表达，主要表达于胞膜胞浆，IBP 过表达与胃腺癌患者的病理分级呈正相关，IBP 的表达与突变型 p53 蛋白的表达没有显著的相关性。尽管还需要进一步的实验，但我们认为 IBP 作为 GC 的一种新的肿瘤标志物及预后指标有着广阔的研究前景，对于 IBP 在 GC 发生发展中的机制的进一步研究将为其发生机理及综合治疗提供新的思路。

**关键词：**胃腺癌；干扰素调节因子 4 结合蛋白；p53 蛋白

# IRF-4 结合蛋白 (IBP) 在胃腺癌中表达及意义的初步研究

## 第一章 前 言

胃癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,而且在亚洲更为普遍,治疗胃癌的方法包括手术以及放化疗,虽然手术切除联合术后放化疗使患者暂时获得预想的结果,但并不意味着胃癌患者的存活率能大大提升,这就要求研究者深入探究胃癌发生以及发展的机制,而探索在其过程中起关键作用的分子,将有助与我们开发新的、更有效的靶向治疗药物。

干扰素调节因子 4 结合蛋白 (The interferon regulatory factor 4 binding protein, IBP) 是一种微管结合蛋白,亦被称为 Def-6 (differentially expressed in the haemopoietic system)<sup>[31]</sup>或者 SLAT (SWAP-70-like adapter of T cells)<sup>[2]</sup>,由 631 个氨基酸构成,编码基因位于人染色体 6p21.31,IBP 分子结构与 Rho GEF 家族其他分子相似,都具有 PH 及 DH 结构域<sup>[8]</sup>。IBP 具有 GEF 活性,能够激活 Rho GTPase 家族分子 Cdc42、Rac1 和 RhoA<sup>[22]</sup>。IBP 于淋巴组织中广泛表达,特别是在 T 淋巴细胞中能检测到比较高水平的 IBP 表达<sup>[32]</sup>。在免疫系统中 IBP 具有重要的功能:IBP 参与 T 细胞的调节,包括 CD4<sup>+</sup>T 细胞的活化、辅助 T 细胞的分化,IBP 以静止的非活化状态散布于细胞膜表面,TCR 信号则可募集其到免疫突触,发挥其 DH 域依赖的 GEF 活性,进而形成特定的免疫突触,建立细胞之间的桥梁骨架作用,以此发挥免疫作用。IBP 主要受到 Ca<sup>2+</sup>/NFAT 信号作用起到调节辅助 T 细胞的作用<sup>[33]</sup>。通过对比实验,缺失 IBP 的小鼠表现的症状说明 IBP 对免疫自稳的维持发挥着重要的作用<sup>[34]</sup>,现在已知 IBP 在多种自身免疫性疾病中扮演重要角色<sup>[35]</sup>。IBP 不仅可以通过其 GEF 活性激活 Rac1,而且还能直接与 Rac1 结合对细胞形态产生影响<sup>[36]</sup>,同时 IBP 还可以通过与整合素相互的协同作用进而调节细胞分化<sup>[37]</sup>,提示 IBP 除发挥 GEF 活性作用外还具有其他功能。最新的研究证实了通过 TCR 介导信号的刺激下,IBP 可转变为 Tec kinase ITK 物质,这种物质易磷酸化,并且可在胞浆中由可溶性蛋白聚集转化为细胞颗粒进而调节 mRNA 的翻译<sup>[38]</sup>。这些研究结果充分说明 IBP 是 TCR 介导的信号通路中的关键分子之一,不仅参与了细胞微丝骨架的调节,还具有与另一个 Rho GEF 家族分子 Vav1 相似的功能,通过该功能参与了众多生理过程的调节。同时 IBP 功能的发挥不仅仅是通过其 GEF 活性调节 Rho GTPase 在 GTP 限制型(活性型)和 GDP 限制型(失活型)构象之间循环,还包括 IBP 分子本身具有的分子构象和生物化学活性。

p53 蛋白发现至今已有三十多年的时间，人们已经明确的知道野生型 p53 蛋白在介导细胞的压力应激中，通过诱导或抑制参与细胞周期停滞、衰老、凋亡、DNA 修复以及血管发生等相关基因，发挥着非常重要的作用<sup>[23]</sup>，在野生型 p53 蛋白的众多作用中，其肿瘤抑制的功能最受瞩目，该功能与其作为转录因子调控基因的表达密切相关<sup>[27]</sup>。之前对 IBP 的研究主要集中在免疫系统，新近证据指出该蛋白参与调节细胞骨架重构及细胞内信号传导，与部分恶性肿瘤的发生发展密切相关<sup>[11-14]</sup>。胡川闽教授的研究小组发现 IBP 在结肠癌和乳腺癌中具有高度表达性，对肿瘤的发生发展发挥重要的作用，并发现 IBP 和突变型 p53 蛋白在乳腺癌标本中的表达呈负相关<sup>[26]</sup>，并进一步研究发现在乳腺癌细胞株中 IBP 是一种新的 p53 蛋白（野生型）的靶基因，p53 表达增加可以抑制 IBP 的表达，而 IBP 的诱导与 p53 的抑制有关，而在乳腺癌细胞系中，野生型 p53 可以结合于 IBP 启动子<sup>[27,28]</sup>。研究者认为 IBP 可能成为癌症分子治疗的新靶点。近年发现 IBP 在结肠癌、乳腺癌<sup>[29]</sup>、口腔鳞癌<sup>[29]</sup>、人涎腺腺样囊性癌<sup>[30]</sup>等肿瘤中均存在着异常表达，发挥着多种生物学功能。但 IBP 在胃腺癌中的生理功能仍未知，因此，本研究将探讨 IBP 在不同胃腺癌细胞株中的表达情况，并进一步在探究其在临床大样本中的表达情况及其和 p53 蛋白及临床相关因子之间的关系。

## 第二章 IBP 在人胃腺癌细胞株中表达的初步研究

IBP 被称作为一种新型的鸟嘌呤核苷酸交换因子 (GEF)，有越来越多的研究表明，其在多种肿瘤中存在异常表达，比如乳腺癌、结肠癌、口腔鳞癌<sup>[29]</sup>和人涎腺腺样囊性癌<sup>[30]</sup>等。进一步研究还发现，IBP 的高表达与这些肿瘤的恶性程度、侵袭、转移、化疗抵抗和不良预后等都密切相关。但 IBP 在胃癌中的研究还未见报道，其在胃癌中的表达情况及作用机制尚不清楚。本部分实验通过免疫荧光、Real-time PCR 和 Western Blot 检测 IBP 在不同胃腺癌细胞株 MKN-45、SGC-7901 中的蛋白表达，初步探讨 IBP 在胃腺癌中的表达情况。

### 2.1 材料与方法

#### 2.1.1 主要仪器及产地

| 设备名称                     | 生产商                  |
|--------------------------|----------------------|
| 智能 CO <sub>2</sub> 细胞培养箱 | Thermo Forma 公司 (美国) |
| 电热恒温干燥箱                  | 上海精宏实验设备有限公司 (中国)    |
| 空气净化灭菌器                  | 上东新华医疗器械厂 (中国)       |
| 全自动倒置显微镜                 | 日本 OLYMPUS 公司        |
| 液氮罐                      | 美国 Talar-Warton 公司   |
| 微波炉                      | 广东美的集团公司 (中国)        |
| 高速低温离心机                  | 德国 Eppendorf 公司      |
| 超净工作台 SW-CJ-1F 型         | 苏州苏洁有限公司 (中国)        |
| 恒温水浴箱                    | 重庆医疗仪器厂 (中国)         |
| 移液枪                      | 美国 Thermo Fisher 公司  |
| 实时荧光定量 PCR 仪             | 新加坡 ABI 有限公司         |
| 超低温冰箱 DW-86L626 型        | 青岛海尔集团公司 (中国)        |
| 磁力搅拌机 HJ-3               | 常州国华公司 (中国)          |
| 制冰机                      | 常熟雪科电器有限公司 (中国)      |
| SDS-PAGE 蛋白电泳仪           | 美国 Bio-Rad 公司        |
| 超纯水仪                     | 美国 Thermo Fisher 公司  |
| 微量核酸蛋白检测仪 ND-2000        | 美国 Thermo Fisher 公司  |

|                      |                   |
|----------------------|-------------------|
| 水平摇床                 | 海门其林贝儿仪器有限公司（中国）  |
| 超灵敏凝胶成像仪             | 美国 GE 公司          |
| <b>2.1.2 实验药品及试剂</b> |                   |
| 品名                   | 生产商               |
| DEME/H 培养基           | Hyclone公司（美国）     |
| 胎牛血清                 | BI公司（以色列）         |
| 青霉素链霉素溶液（100X）       | Gibco公司（美国）       |
| PBS 粉末               | 北京中杉金桥生物公司（中国）    |
| 二甲基亚砷（DMSO）          | Sigma 公司          |
| 胰蛋白酶                 | Hyclone 公司（美国）    |
| 多聚甲醛                 | 武汉博士德公司（中国）       |
| TritonX-100          | 上海碧云天生物技术有限公司（中国） |
| Western-抗稀释液         | 上海碧云天生物技术有限公司（中国） |
| RNAiso Plus          | TaKaRa 公司（中国）     |
| 蛋白浓度BCA测定试剂盒         | 上海碧云天生物技术有限公司（中国） |
| 小鼠抗人 IBP 单克隆抗体       | 陆军军医大学检验系胡川闽教授提供  |
| GAPDH 兔抗人单克隆抗体       | 北京博奥龙公司（中国）       |
| HRP 标记羊抗兔二抗          | 北京博奥龙公司（中国）       |
| PVDF 膜               | Roche 公司（美国）      |
| 甲醇                   | 重庆川东化工有限责任公司（中国）  |
| SDS-PAGE 凝胶电泳试剂盒     | 上海碧云天生物技术有限公司（中国） |
| 彩色预染蛋白 maker         | 上海碧云天生物技术有限公司（中国） |
| ECL Plus 显色液         | 上海碧云天生物技术有限公司（中国） |
| 蛋白酶抑制剂               | Roche公司（美国）       |
| RIPA蛋白裂解液            | 上海碧云天生物技术有限公司（中国） |
| 三氯甲烷                 | 上海生工生物工程有限公司（中国）  |
| 异丙醇                  | 上海生工生物工程有限公司（中国）  |
| 无水乙醇                 | 重庆川东化工有限公司（中国）    |
| 蛋白上样缓冲液（5X）          | 上海碧云天生物技术有限公司（中国） |
| 封闭蛋白干粉               | 博士德生物工程有限公司（中国）   |
| Tween-20             | 北京索莱宝科技有限公司（中国）   |

|                       |                  |
|-----------------------|------------------|
| Tris                  | BioFroxx 公司 (德国) |
| SDS                   | BioFroxx 公司 (德国) |
| 甘氨酸                   | BioFroxx 公司 (德国) |
| 反转录试剂盒                | TaKaRa公司 (中国)    |
| SYBR Premix Ex Taq™II | TaKaRa 公司 (中国)   |

### 2.1.3 细胞株

SGC-7901 细胞株购自南京凯基生物科技公司,

MKN-45 细胞株购自上海中科院细胞库,

Jurkat 细胞株为本实验室传代保存。

### 2.1.4 主要试剂及溶液配制

(1) 1640 (高糖) 培养基 Gibco

(2) 胎牛血清 Gibco

(3) 青链霉素溶液: 分别取青霉素和链霉素各 100 万 U 溶于 100ml 的灭菌水中, 随后分装成 1ml/份, -20℃冻存。

(4) 细胞冻存液: 分别取胎牛血清 9ml 和 DMSO 1ml, 混合均匀成 10ml 细胞冻存液, 4℃冻存。

(5) 胰酶 Gibco

(6) D-Hank'S: 分别称量酚红 0.02g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.06g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.06g, KCl 0.4g, NaHCO<sub>3</sub> 0.35g, NaCl 8g, 加 900ml 的去离子水溶解, 定容至 1L 后, 混合均匀并高压灭菌。

(7) 胰酶消化液: 将 0.25% 的胰酶和 0.02% 的 EDTA 加入 D-Hank'S 液内, 0.22μm 滤膜过滤除菌后分装, -20℃储存。

(8) Western blot 试剂

1) PBS 的配方: 1XPBS: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g, KCl 0.2g, NaHPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2.9g, NaCl 8.0g, 加蒸馏水定容至 1L 后, 调节 pH 至 pH7.2~7.4。

2) TBS: 取 10mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM NaCl, 总体积为 200ml。

3) TBST: 分别取 10mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 10mMNaCl, 0.05%Tween20, 总体积为 200ml。

4) Transfer Buffer: 3g Tris-base、14.4gGly、200ml 甲醇, 加双蒸水至 1000ml。

5) Blocking Buffer: 分别称量 3%BSA 3g, 卵白蛋白 1g, 溶于 100mlTBS。

6) 一抗缓冲液: 用封闭液将一抗稀释至所需的比例。

7) 二抗缓冲液: 用含 3%脱脂奶粉的 TBS 将二抗稀释至所需比例。

8) 显影液(5X): 分别称取米吐尔 1.55g, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 22.5g, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 33.75g, KBr 20.95g, 依次溶解于 375ml 预温至 50℃ 的双蒸水中, 定容至 500ml 后, 于 4℃ 中保存, 使用时用等体积的单蒸水稀释。

9) 定影液: 分别称取 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 240g, 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 15g, 冰乙酸 12.6ml, 硼酸 7.5g, 依次溶解于 700ml 预温至 50℃ 的双蒸水中, 待水温降至 30℃ 以下时再加入钾明矾 15g, 然后定容至 1L, 室温保存。

## 2.1.5 研究方法

### 2.1.5.1 细胞培养技术

(1) 细胞复苏: 从液氮罐或者 -80℃ 冰箱中取出细胞, 于 37℃ 恒温水浴锅中快速解冻, 随后将细胞悬液转移至离心管, 常温条件下离心速度 1000rpm, 并持续 5min, 小心丢弃上清, 加入适量完全培养基吹打为单细胞后, 将细胞接种于培养瓶中, 按交叉交叉摇匀法混匀后, 置于 37 摄氏度, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养。

(2) 细胞传代: 当细胞融合率达到 90%, PBS 冲刷细胞 2 次, 0.25%胰蛋白酶 1.5ml 常温消化 3min 左右, 倒置显微镜下观察细胞皱缩变圆后, 加入等体积完全培养基中和胰酶, 将细胞悬液 1000rpm×5min 离心后, 按 1:3 或者 1:4 比例将细胞接种于新的培养瓶中, 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱平培养, 2 至 3d 换液。

(3) 细胞冻存: 取生长状态良好的细胞经胰酶消化离心后, 用制备好的冻存液将细胞重悬, 转移至冷冻管。按细胞梯度冻存法 4℃×30min→-20℃×2h→-80℃过夜, 最终转移至液氮罐中长期保存。

### 2.1.5.2 免疫荧光检测 IBP 在胃腺癌细胞株中的表达

#### (1) 细胞爬片的制备

取生长良好的 MKN-45 细胞, 制备浓度为  $1 \times 10^5$  个细胞/ml 完全 DMEM/F12 培养液的细胞悬液, 接种于  $1 \times 1\text{cm}^2$  的盖玻片, 48 小时后中止培养, 以冰冷的 PBS 洗涤细胞爬片, 4%多聚甲醛固定 30min, PBS 洗涤 3×5min, 含 0.5%Triton X-100 的 PBS 浸泡盖玻片 15 分钟 (打孔), PBS 洗涤 3×5min。

#### (2) MKN-45 细胞 IBP 的免疫荧光检测

取出上步骤中经 PBS 洗涤的细胞爬片, 以 PBS 洗涤 2X5min, 3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 15min, 封闭内源性过氧化物酶活性, 免疫染色封闭液 (碧云天) 37℃孵育 1h, 加入含 1%BSA PBS 1:200 稀释的抗 IBP 单克隆抗体, 37℃湿盒中孵育 2h, PBST 洗涤 3×5min, PBS 洗涤 2×5min, 加入以含 1%BSA PBS 1:1000 稀释的 Cy3 标记山羊抗兔 IgG 二抗(红

色荧光), 37℃湿盒中孵育 1h, PBST 洗涤 3×5min PBS 洗涤 2×5min 抗荧光淬灭封片剂封片后以激光共聚焦显微镜观察拍照。

### 2.1.5.3 利用 Real-time PCR 检测不同胃腺癌细胞株中 IBP 的 mRNA 含量

(1) 引物由上海 Invitrogen 公司设计合成。GAPDH、IBP 引物系列如下表 (2-1)。

表 2-1 RT-PCR 扩增引物序列

| 基因    | 引物序列(5'-3') |                              | 退火温度 (°C) |
|-------|-------------|------------------------------|-----------|
| GAPDH | 上游          | 5'-CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC-3' | 60        |
|       | 下游          | 5'-GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT-3' |           |
| IBP   | 上游          | 5'-GAAAGCTCGGCGAGATGAAG-3'   | 60        |
|       | 下游          | 5'-GATGATGCGCTCCTGCTCCT-3'   |           |

#### (2) 总 RNA 提取

1) 预防 Rnase 污染, 需准备的液体及器材: 烧杯等玻璃器皿需 150℃烘烤 4h; 枪头等塑料制品需要 0.1%DEPC 水 37℃浸泡 2h 后烘干, 121℃高压灭菌 20min。

2) 将扩大培养的胃腺癌细胞水平离心 800rpm 10min, 去上清, 1ml 无血清 RPMI1640 培养基重悬沉淀的细胞, 倒置显微镜下计数, 将细胞重新离心收集。

3) 将 Trizol 按体积 1ml/5×10<sup>6</sup> 细胞的比例加入到细胞沉淀内, 室温放置 5min, 使其充分裂解, 12000rpm 离心 5min, 收集上清, 此时可放入-70℃长期保存。

4) 按 200ul 氯仿/ml Trizol 的比例, 加入适量氯仿, 并剧烈振荡 30 秒, 使之均匀混合, 在室温条件下放置 3 分钟。

5) 在 4℃温度下, 按 16000r/min 离心速度持续 15min。此时, 样品将会分层, 分别是黄色的有机相, 中间层和无色的水相, 其中, RNA 基本上在水相层中, 而水相的体积通常约为所用裂解液体积的 60%。把水相转移到新管中, 进行下一步操作。

6) 按 0.5ml 异丙醇/ml Trizol 的比例, 加入一定量的异丙醇并混匀, 在常温下静置 5-10 分钟。

7) 同样在 4℃条件下 16000r/min 离心 10 分钟, 此时需要舍弃上清, 此时, 管底中物质主要为 RNA。

8) 按 1ml 75%乙醇/ml Trizol 比例加入 75%乙醇适量, 轻轻振荡离心管, 使沉淀悬浮在管中。随后在 4℃下保持 13000r/min 离心速度持续 5 分钟, 尽量弃上清。

9) 通过室温晾干或真空干燥的方法。将 RNA 样品溶解在 30ul DEPC 溶液中。并通过紫外吸收法, 测定纯度和浓度。-20℃保存。

### (3) 细胞 RNA 浓度测定

先用去离子水清洗核酸蛋白定量仪 3 次, 调零, 吸取 2ulRNA 样品, 测定其 OD260/OD280 的比值, 若比值处于 1.8-2.0 之间, 表明 RNA 浓度好, 可用做后续试验。同时计算出反转录反应时需加入的 RNA 量( $\mu$ l)。根据 Prime Script RT reagent Kit 说明书, RNA 加入量( $\mu$ l)=1000/RNA 浓度 (ng/ $\mu$ l)。

### (4) 反转录反应

1) 根据 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 说明书 (如下表 2-2、2-3), 在冰上配制反转录体系。为保证反应液配制的精确性, 在各项反应时, 先将试剂按反应数+1 的量配制, 再分装到各管中。

表 2-2 基因组去除 DNA 反应

| 试剂                           | 使用量              |
|------------------------------|------------------|
| 5×gDNAEraser Buffer          | 2 $\mu$ l        |
| gDNAEraser                   | 1 $\mu$ l        |
| Total RNA                    | 根据 RNA 浓度计算      |
| RNase Free dH <sub>2</sub> O | up to 10 $\mu$ l |

表 2-3 反转录体系

| 试剂                                    | 使用量        |
|---------------------------------------|------------|
| 步骤 1 的反应液                             | 10 $\mu$ l |
| 5×PrimeScript Buffer 2(for Real Time) | 4 $\mu$ l  |
| PrimeScript RT Enzyme Mix I           | 1 $\mu$ l  |
| RT Primer Mix                         | 1 $\mu$ l  |
| RNase Free dH <sub>2</sub> O          | 4 $\mu$ l  |
| Total                                 | 20 $\mu$ l |

## 2) 反转录反应条件

42°C 2min(去除 DNA), 37°C 15min→85°C 5s→4°C 保存

## (3) 实时定量 PCR 反应

1) 按表 2-4 配制实时定量 PCR 反应体系(在冰上配制完成)。

表 2-4 PCR 反应体系

| 试剂                        | 使用量    |
|---------------------------|--------|
| SYBR Premix Ex Taq™II(2x) | 5 μl   |
| PCR Forward Primer        | 0.5 μl |
| PCR Reverse Primer        | 0.5 μl |
| DNA 模板                    | 0.8 μl |
| dH <sub>2</sub> O(灭菌蒸馏水)  | 3.2μl  |
| Total                     | 10μl   |

## 2) 实时定量 PCR 反应条件为

STEP 1: 95°C, 30s;

STEP 2: 95°C, 5s; 60°C, 1min; 40 cycles;

STEP 3: Melt Curve。

3) 实验结果分析: 用 StepOnePlus RT-PCR 系统软件进行结果分析。

**2.1.5.4 Western Blot 检测 IBP 在胃腺癌细胞株中的表达**

## (1) 蛋白提取

由于细胞呈对数增长, 当细胞沾满培养瓶底约 80%-90%后, 采用 PBS 冷冻水轻柔地洗涤细胞 3 次, 洗涤后, 使用吸管和滤纸尽可能的减少培养皿细胞间的水分, 并置于冰上保存, 取 RIPA (强) 裂解液 (Beyotime), 按照 10ul/ml 的比例加入 100mM 裂解液, 并与溶解在异丙醇中浓度为 1mM 的 PMSF 混匀, 再依据 300ul/100ml 培养瓶的比例, 加入适量样品细胞, 通过震荡操作, 让细胞充分接触培养瓶中的裂解液置于冰上冷却 15min, 随后将细胞转移至 RP 管中, 再使用一次性注射器反复吹打裂解液以让 DNA 断裂, 此时液体呈清亮半透明状, 于 4°C 14000g 离心 15min 后收集上清, 取 10ul 的样品用于浓度测定, 其余蛋白则加入适量的 5×上清缓冲液, 在水浴中煮沸 5min 后分装, 置于-80°C 保存。

## (2) 蛋白浓度测定:

测试的方法是将 BCA 蛋白测定试剂盒 (Beyotime) 提供的 1.2ml 蛋白标准配置液滴加至一管 30mg BSA 的标准蛋白中, 在两种物质混合后, 形成 25mg/ml 的蛋白标准溶液。取一定量配置好的 25mg/ml 蛋白标准, 在蛋白裂解液的稀释作用下, 配制成浓度为 0.5mg/ml 蛋白标准, 此时, 该蛋白液将存放在 -20℃ 的环境下。按 50:1 的 BCA 试剂 A 与 BCA 试剂 B 的比例, 自主配制 3ml 的 BCA 工作液, 并混匀, 其中, 所配置出来的工作液能在 24 小时内保持稳定性能。随后, 将标准液按 0,1,2,4,8,12,16,20ul 滴加到 96 孔板的标准品孔中, 并在每个标准孔中, 加入标准品稀释液, 使每个空溶液达到 20ul, 取所提的蛋白 10ul 以裂解液稀释至 500ul (50 倍), 取 20ul 蛋白稀释液滴加到 96 孔板的待测样品孔中。各孔分别加入 200ul 的 BCA 工作液, 于 37℃ 中放置 30min 后, 再用 Bio-Rad 550 酶标仪测定 590nm 吸光度值, 绘制标准曲线并建立回归方程, 然后利用回归方程, 将各样品测定的 OD 值经过换算得到相应的蛋白浓度。

## (3) Western blot:

根据所测得的蛋白浓度, 用 1× 上样缓冲液调整各蛋白浓度和体积为 120ug/20ul 的 Jurkat 细胞蛋白作阳性对照, 用 7.5% 分离胶浓度来做 SDS-PAGE, 电泳至溴酚兰距离凝胶底部 1cm 时停止, 将凝胶取出, 裁切成合适的大小, 放入 transfer buffer 中浸泡 30min。再将 PVDF 膜裁剪成比凝胶 yue 大的尺寸, 用铅笔标记正面并浸入无水甲醇中 15s, 再浸入 transfer buffer 中浸泡 10min; 将厚滤纸裁剪成比 PVDF 膜 yue 小的尺寸并浸入 transfer buffer 中浸泡 10min。在转移装置内依次铺上滤纸、凝胶、PVDF 膜和滤纸, 注意防止气泡产生; 将 PVDF 膜一侧向正极, 凝胶一面侧向负极。Bio-rad 半干电转仪 18V 50min 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 用蒸馏水漂洗 2 次后, 经 TBS 洗涤 2×5min, 然后以含 5% 脱脂奶粉的 TBS 室温封闭 90min。用含 3%BSA 的 TBS 配制抗 IBP 的单克隆抗体 (A9) 一抗工作液 (1:2000) 15ml, 封闭完成以后加入到含 PVDF 膜的孵育盒中于 4℃ 中过夜。第二天取出 PVDF 膜, 用 TBST 洗涤 4×15min 后再用 TBS 洗涤 2×15min, 加入 3%BSA TBS 配制的辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG 二抗工作液 (1:10000) 15ml, 室温 1h。再次用 TBST 洗涤 4×15min 后再以 TBS 洗涤 2×15min。在暗盒内铺上保鲜膜, 并将 chemiluminescence reagent 与 luminal reagent 按 1:1 混合, 用移液枪吸取 1ml 混合液均匀涂布膜的正面, 1min 后用吸水纸从膜一角将底物液吸干; 将 PVDF 膜铺在保鲜膜上, 再用保鲜膜覆盖, 赶走气泡后放上合适大小的底片, 然后关闭暗盒曝光 3min。再暗室中取出底片, 并在显影液中不断漂洗至条带显现为止, 立即在蒸馏水中漂洗 1min, 然后于定影液中漂洗 5min。最后将膜于蒸馏水中漂洗 2×15min, 取出观察结果。

### 2.1.6 统计学分析

实验数据资料通过平均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 来显示。采用独立样本 t 检验的方法, 分析了两组样本的平均数差异, 以上所有的数据分析采用 SPSS 21.0 统计学软件,  $P < 0.05$ , 认为具有统计学意义。

## 2.2 结 果

### 2.2.1 免疫荧光检测 IBP 在胃腺癌细胞中的表达情况。

激光共聚焦显示 IBP 在胃腺癌细胞株 MKN45 的胞膜和胞浆中均有表达。见图 2-1

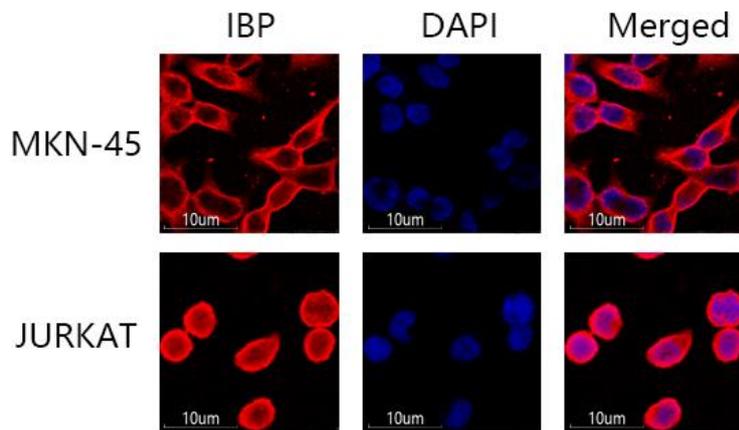


图 2-1 IBP 在 JURKAT 细胞、胃腺癌细胞 MKN-45 中定位分析

### 2.2.2 Real-time PCR 检测不同胃腺癌细胞株中的 mRNA 的含量。

Real-time PCR 检测发现 IBP 在两种不同的胃腺癌细胞株 SGC-7901、MKN-45 中均有表达, 且在恶性程度较高的 MKN-45 细胞中 IBP 表达要明显高于恶性程度较低的 SGC-7901 细胞。见图 2-2

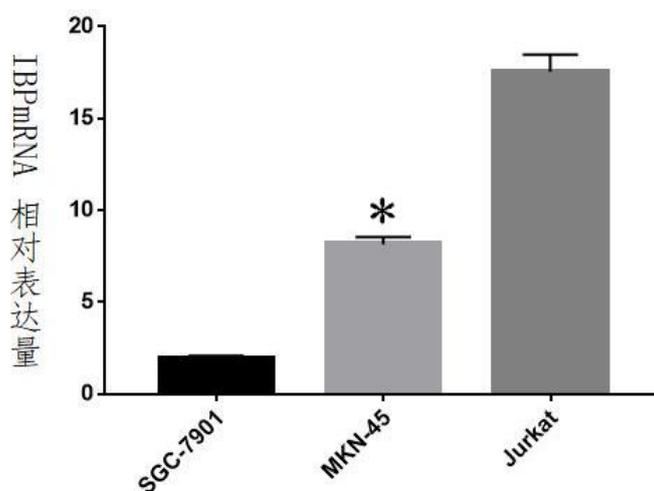


图 2-2 Real-time PCR 检测 JURKAT 细胞及胃腺癌细胞株中 IBP 的 mRNA 含量

\* $P < 0.05$ , MKN-45 组与 SGC-7901 组比较

### 2.2.3 Western Blot 检测 IBP 在胃腺癌细胞株中的表达情况。

采用 WB 检测发现 IBP 在人胃腺癌细胞株 MKN45 和 SGC7901 中的蛋白表达水平同 RT-PCR 检测结果一致, IBP 在胃腺癌细胞株 MKN-45 中的表达要明显高于 SGC-7901 细胞。见图 2-3

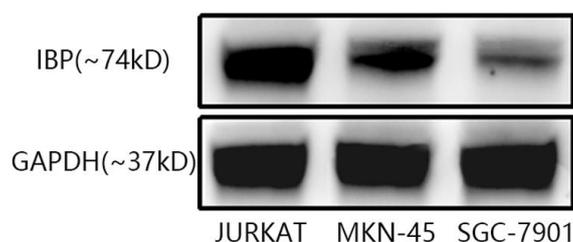


图 2-3 Western Blot 检测 IBP 在 JURKAT 细胞及胃腺癌细胞株中的表达情况

## 2.3 讨 论

肿瘤的发生发展是一个多基因参与的复杂的病理过程。在本世纪初, Pernis 研究小组采用酵母双杂交技术,成功的提炼出了干扰素调节因子 4 结合蛋白,并成功的筛选出了一个可以与 IRF-4 具有结合作用的蛋白。该蛋白主要优势是能在 T 淋巴细胞正常表达,并发挥着重要作用<sup>[7]</sup>。胃癌 (Gastric cancer, GC) 已经是全球第四大确诊的最常见癌症,也是全球第二大致命恶性肿瘤<sup>[1,2]</sup>。在我国, GC 是第二大常见癌症和第三大癌症死亡的

原因,且胃癌在我国的发病率呈逐步上升趋势<sup>[3]</sup>。近些年研究发现,IBP在乳腺癌、结肠癌、人涎腺腺样囊性癌等肿瘤中均发挥着重要作用<sup>[7]</sup>,但IBP在GC中是否有一定的作用,IBP在胃癌组织中是否表达,其具体表达情况如何,目前还没有这方面的报道。本研究旨在揭示IBP在胃腺癌细胞株中的表达情况,为进一步的研究打好基础。

本研究首先通过免疫荧光检测显示IBP主要表达在胃腺癌细胞株MKN-45的胞浆和胞膜中,主要以胞膜表达为主。该结果与IBP在乳腺癌细胞株中的表达情况相符合<sup>[26]</sup>,我们知道IBP的蛋白质序列N端具有豆蔻酰基序列,其通常是蛋白质锚定在脂质膜中的作用,我们认为IBP可能与许多其他细胞间信息转导分子相似,可定位于膜内部发挥作用,IBP可能参与了细胞外信息向细胞内的传导。免疫印迹及Real-time PCR均证实在胃腺癌细胞株MKN-45、SGC-7901中均有IBP的表达,MKN-45表达高于SGC-7901细胞,联系到这几种细胞恶性度的差异,IBP可能具有在恶性度较高的胃腺癌细胞中表达的趋势,但由于本实验只做了两个细胞系,这个结论并不明确,下一步研究中需要引入更多胃腺癌细胞株。同时据报道,IBP在造血祖细胞中高表达,但在分化为红细胞、粒细胞和巨噬细胞的过程中,显示IBP在低分化组织中表达高于高分化组织,表明IBP在组织分化和发展中具有一定的作用,也与本实验高分化胃腺癌中表达升高的结果相吻合。本实验结果显示IBP在胃腺癌细胞株中高表达,而且可能具有在恶性程度较高细胞中表达逐渐升高的趋势,前文已经提起,IBP是一种新型的GEF,具有GEF活性<sup>[9,22]</sup>,而GEF对细胞骨架的调节、细胞周期进程及转导来自于细胞外的信号具有重要的作用,GEF和绝大多数的肿瘤发生发展息息相关。联系到IBP在免疫系统中作用及已报道的IBP在几种肿瘤中表达情况,我们猜测IBP的异常表达是否是肿瘤发生发展中的一个普遍现象,当然,需要进一步更多的研究才能证明我们的假设。而在胃腺癌中,我们为了进一步研究IBP在胃腺癌中发生和发展中的作用,将进行临床标本大样本的实验研究。

## 2.4 小 结

本部分实验为了明确IBP在胃腺癌细胞株中的表达情况。我们通过免疫荧光对IBP的表达情况进行了定性检测,确认了IBP在胃腺癌细胞株的胞膜和胞浆中均有表达,同时通过Real-time PCR、Western Blot检测了不同级别胃腺癌细胞株中IBP的mRNA和蛋白表达水平,结果显示IBP在MKN-45,SGC-7901细胞株中均呈阳性表达,但在低级别胃腺癌细胞株SGC-7901中的表达量明显少于高级别细胞株MKN-45。提示IBP的表达可能与胃腺癌的恶性程度相关,IBP可能参与了胃腺癌的发生发展过程。

## 第三章 IBP、p53 蛋白在胃腺癌组织标本中的表达及意义

近年来,胡川闽教授带领的课题组发现 IBP 在结肠癌和乳腺癌中高表达并起着重要的作用,并发现在乳腺癌标本中 IBP 与突变型 p53 蛋白的表达呈负相关,进而研究发现在乳腺癌细胞株中 IBP 是一个新的 p53 (野生型)的靶基因, p53 表达增加可以抑制 IBP 的表达,而 IBP 的诱导则与 p53 的抑制相关,在乳腺癌细胞株中, p53 可以与 IBP 启动子结合<sup>[27,28]</sup>。在上一部分实验中,我们发现 IBP 高表达于胃腺癌细胞株中。但 IBP 在胃腺癌临床标本中是否也过表达, IBP 与 p53 蛋白表达在胃腺癌组织中是否也具有相关性,以及 IBP 高表达与患者临床病理参数的关系都尚不清楚。

因此本部分实验通过免疫组织化学技术检测 150 例胃腺癌组织标本中 IBP、p53 蛋白的表达情况,以癌旁胃组织的 50 例标本为内对照,显微镜下阅片,分析 IBP、p53 蛋白与临床病理参数之间的关系,同时,将 IBP 按照 0、1+、2+、3+进行分类,对 p53 蛋白进行+、-分类,进一步分析 IBP 和 p53 蛋白在胃腺癌标本中表达情况以及相互之间的相关关系。

### 3.1 材料与方法

#### 3.1.1 临床标本

研究标本来自于陆军军医大学附属新桥医院病理科 2015 年 1 月~2016 年 12 月确诊的胃腺癌 HE 切片对应存档蜡块,包含了 150 例该时期内胃镜室活检时制作的胃粘膜标本和以及进行外科手术后做成的切除标本,根据每个标本下所进行的诊断结果,构建了患者临床病理资料库,方便查阅学习。其中 109 例胃腺癌组织标本来自于外科手术切除(男性 87 例,女性 22 例),年龄 24 岁~79 岁(平均年龄 54.74 岁);根据国际胃癌 TNM 分期标准,将临床病理进行分期,在 I 期的患者有 14 人,II 期 45 人,III 期 49 人,IV 期 1 人;高分化的病例高达 60 例,中分化案例 47 例,低分化仅有 2 例。来自同期胃镜室活检胃腺癌病变标本 41 例(男性 29 例,女性 12 例),年龄 37~81 岁(平均年龄 61.04 岁);6 例高分化,8 例中分化,27 例低分化。选取其他 50 例正常胃粘膜标本作为对照组,相关临床信息见表 3-1。本实验经过新桥医院伦理委员会审查并获得患者知情同意。

表 3-1 肿瘤患者临床病理特征

| 临床病理特征   | n/例 | 临床病理特征    | n/例 |
|----------|-----|-----------|-----|
| 切片类型     |     | 组织学类型     |     |
| 活检标本     | 41  | 腺癌        | 146 |
| 手术标本     | 109 | 粘液腺癌      | 2   |
| 年龄（岁）    |     | 印戒细胞癌     | 2   |
| >60      | 71  | Lauren 分型 |     |
| ≤60      | 79  | 肠型        | 114 |
| 性别       |     | 弥漫型       | 30  |
| 男        | 116 | 混合型       | 6   |
| 女        | 34  | 肿瘤部位      |     |
| 分化程度     |     | 贲门        | 24  |
| 高分化      | 19  | 胃底体       | 45  |
| 中-低分化    | 131 | 胃窦        | 78  |
| TMN 分期   |     | 幽门管       | 1   |
| I、II 期   | 59  | 残胃        | 1   |
| III、IV 期 | 50  |           |     |

### 3.1.2 主要实验仪器及产地

|                   |                    |
|-------------------|--------------------|
| 石蜡切片机             | Leica 公司（德国）       |
| 微波炉               | 格兰仕公司（中国）          |
| EasyScan 数字切片扫描系统 | 麦克奥迪医疗诊断系统有限公司（中国） |
| 余实验仪器同前           |                    |

### 3.1.3 实验药品及试剂

|                  |                    |
|------------------|--------------------|
| 30%过氧化氢溶液        | 上海抚生生物科技有限公司（中国）   |
| 小鼠抗人 IBP 单克隆抗体   | 陆军军医大学检验系胡川闽教授提供   |
| 小鼠抗人 p53 蛋白单克隆抗体 | 福州迈新生物技术开发有限公司（中国） |
| 免疫组织化学试剂盒        | 北京中杉金桥生物技术有限公司（中国） |
| DAB 显色试剂盒        | 北京中杉金桥生物技术有限公司（中国） |

|            |                    |
|------------|--------------------|
| EDTA 抗原修复液 | 北京中杉金桥生物技术有限公司（中国） |
| 二甲苯        | 重庆市化学试剂产（中国）       |
| 苏木素        | 重庆市化学试剂产（中国）       |
| 中性树胶       | Solarbio 公司（中国）    |
| 余实验药品及试剂同前 |                    |

### 3.1.4 主要溶液的配制方法

(1) 3%过氧化氢溶液的配制，将 30%过氧化氢溶液分别与甲醇、蒸馏水按照 1:1.8 的比例配制。

(2) 磷酸盐缓冲液的配制（PH=7.4），配制方法同前。

### 3.1.5 研究方法

(1) 免疫组织化学染色

1) 胃腺癌组织蜡块 4um 厚度连续切片，切片平铺于载玻片后 60℃下烘烤 1h，常温保存；

2) 烤灯下烘烤切片 30min，一次将切片转移至二甲苯 I 10min、二甲苯 II 10min、二甲苯 III 10min、无水乙醇 5min、95%乙醇 5min、80%乙醇 5min、70%乙醇 5min，蒸馏水漂洗浸泡切片 5min；

3) 取适量的柠檬酸缓冲液（PH=6）加入修复盒内，微波加热至沸腾，将组织切片放置沸腾的修复液处理 10min，取出切片自然冷却至室温，PBS 漂洗切片 5min×3 次；

4) 3%过氧化氢溶液滴于切片上，37℃孵育 10min，阻断内源性的过氧化物酶，PBS 漂洗切片 3min×3 次；

5) 滴加适量的山羊血清封闭切片，37℃恒温箱作用 15min；

6) 吸水纸吸尽液体，滴加 40ul 已稀释好的一抗（IBP，1:500；p53，即用型），将玻片置于 4℃湿盒过夜；

7) PBS 漂洗切片 5min×3 次，滴加生物素标记山羊抗兔二抗，37℃恒温箱孵育 30min；

8) PBS 漂洗切片 5min×3 次，切片上滴加 DAB 显色液，显微镜下观察显色程度，适时用蒸馏水终止反应；

9) 将切片苏木素染色 2min，0.1%盐酸酒精分化 10s，自来水冲洗蓝化；

10) 依次将切片放入梯度浓度酒精溶液中脱水处理；

11) 二甲苯透明组织切片，中性树胶封片；

12) 显微镜下观察，数字切片扫描系统采图，统计分析结果。

## (2) 免疫组织化学评分

1) 参照半定量积分法进行结果判读, 每个切片随机选择 10 个区域, 用高倍镜(400 倍)显微镜评估 1000 个肿瘤细胞(100 个细胞/区域)中的表达产物, 每例标本都有至少两位病理科医师做出准确判断;

2) 每张组织切片的阳性细胞染色程度计分: 阳性着色细胞 <5% 为 0 分, 5~25% 为 1 分、26%~50% 记作 2 分、51~75% 记为 3 分、>75% 记作 4 分;

3) 染色强度评分标准: 无着色, 0 分; 淡黄色, 1 分; 棕黄色, 2 分; 棕褐色, 3 分;

4) 根据染色程度、染色强度得分统计最终结果并进行判定, 0~1 分为(-), 2~3 分为弱阳性(+), 4~5 分为阳性(++), 6~7 分为强阳性(+++), 其中(+~+++ )均判读为阳性。

## (3) 统计学分析

运用 SPSS 21.0 版统计软件统计所有数据结果, 并进行相应的结果分析。以百分计数, 同时, 各组间相互比则使用  $\chi^2$  检验的方法。此外, 采用斯皮尔曼(Spearman)等级法对结果的等级相关性分析做出正确的分析, 当然, 只有当  $P < 0.05$  时, 结果才具有统计学意义。

## 3.2 结 果

### 3.2.1 IBP 在胃腺癌组织和癌旁组织中的表达

胃腺癌组患者 IBP 在胞膜及胞浆中均有表达, 为棕黄色颗粒, 与正常胃粘膜组患者相比, 其阳性表达较高, 通过计算得到  $P < 0.05$ , 结果具有统计意义。见表 3-2 和图 3-1。

表 3-2 IBP 在胃腺癌组织和癌旁组织中的表达

| 组织类型   | n   | IBP |    |     |      |        |            |       |
|--------|-----|-----|----|-----|------|--------|------------|-------|
|        |     | +   | ++ | +++ | n/合计 | 阳性率    | $\chi^2$ 值 | P 值   |
| 胃腺癌组织  | 150 | 30  | 26 | 15  | 71   | 47.33% | 30.381     | 0.000 |
| 正常胃部组织 | 50  | 1   | 1  | 0   | 2    | 4.00%  |            |       |

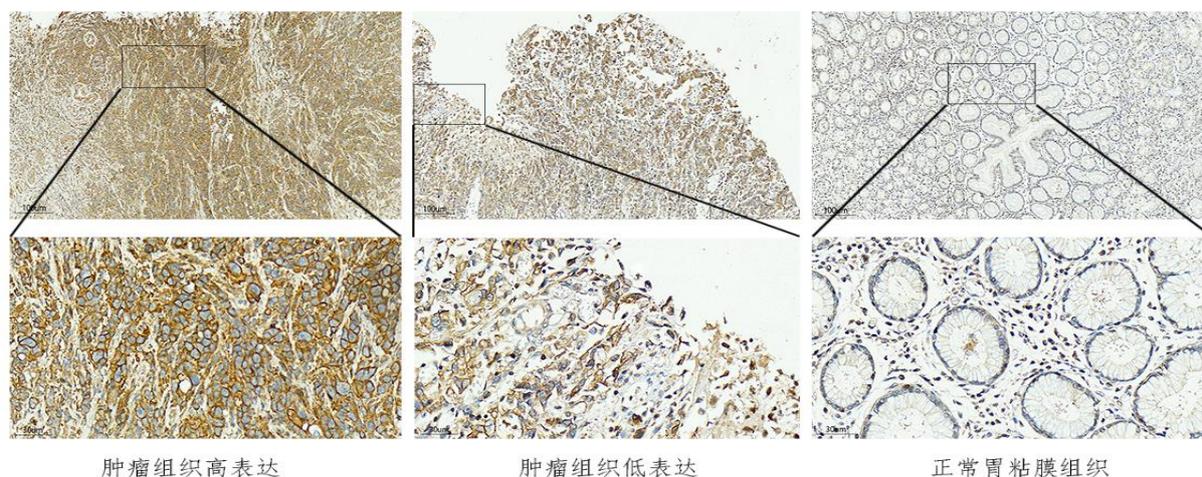


图 3-1 IBP 在胃腺癌组织和癌旁组织中的表达（免疫组化染色）

### 3.2.2 p53 蛋白在胃腺癌组织和癌旁组织中的表达

胃腺癌组患者的 p53 蛋白主要在细胞胞核中有表达，其阳性镜下显示为棕黄色或棕褐色颗粒，与非胃腺癌组患者相比，其阳性表达较高，通过计算得到  $P < 0.05$ ，结果具有统计意义，见表 3-3 及图 3-2。

表 3-3 p53 蛋白在胃腺癌组织和癌旁组织中的表达

| 组织类型   | n   | p53 蛋白 |    |        |            |       |
|--------|-----|--------|----|--------|------------|-------|
|        |     | +      | -  | 阳性率    | $\chi^2$ 值 | P 值   |
| 胃腺癌组织  | 150 | 58     | 92 | 38.67% | 27.23      | 0.000 |
| 正常胃部组织 | 50  | 0      | 50 | 0.00%  |            |       |

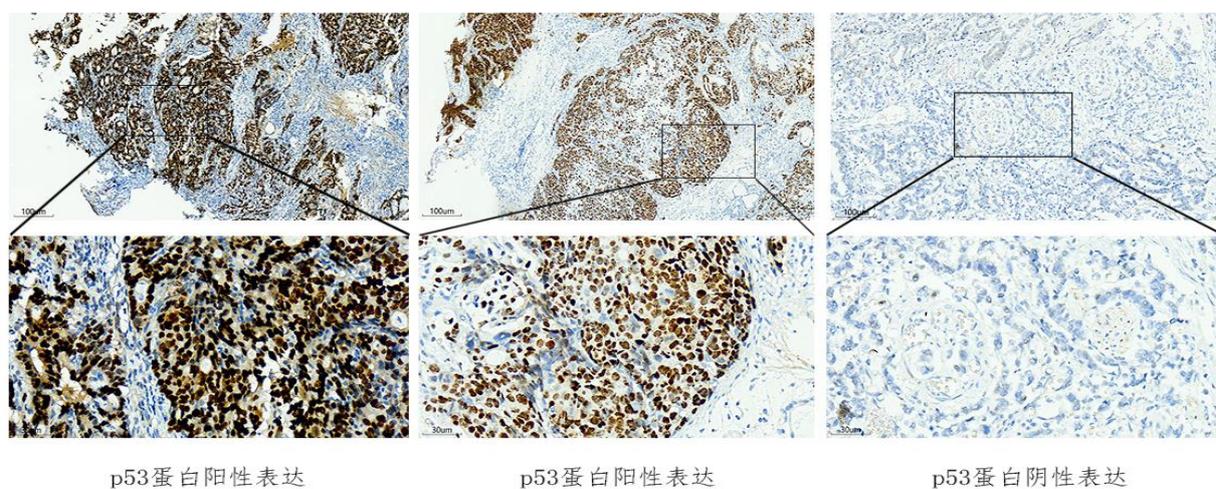


图 3-2 p53 蛋白在胃腺癌组织中的表达情况（免疫组化染色）

### 3.2.3 胃腺癌组 IBP、p53 蛋白阳性表达与胃腺癌临床病理特征之间关系

(1) IBP 在 >60 岁组中阳性率为 46.48%，≤60 岁组中阳性率为 48.10%，差异无统计学意义 ( $\chi^2=0.039$ ,  $P>0.05$ )；p53 蛋白在 >60 岁组中阳性率为 47.89%，≤60 岁组中阳性率为 30.38%，差异有统计学意义 ( $\chi^2=4.833$ ,  $P<0.05$ )，p53 蛋白有在年龄更大的人群中表达升高的趋势，见表 3-4。

表 3-4 IBP 和 p53 蛋白与患者年龄之间的关系

| 年龄<br>(岁) | n/例 | IBP |       |            |       | p53 蛋白 |       |            |       |
|-----------|-----|-----|-------|------------|-------|--------|-------|------------|-------|
|           |     | 阳性  | 阳性率/% | $\chi^2$ 值 | P 值   | 阳性     | 阳性率/% | $\chi^2$ 值 | P 值   |
| >60       | 71  | 33  | 46.48 | 0.039      | 0.842 | 34     | 47.89 | 4.833      | 0.028 |
| ≤60       | 79  | 38  | 48.10 |            |       | 24     | 30.38 |            |       |

(2) IBP 在男性组中阳性率为 50.86%，女性组中阳性率为 35.29%，差异无统计学意义 ( $\chi^2=2.556$ ,  $P>0.05$ )；p53 蛋白在男性组中阳性率为 43.10%，女性组中阳性率为 23.53%，差异有统计学意义 ( $\chi^2=4.248$ ,  $P<0.05$ )，p53 蛋白有在男性患者中表达增高的趋势，见表 3-5。

表 3-5 IBP 和 p53 蛋白与患者性别之间的关系

| 性别 | n/例 | IBP |       |            |       | p53 蛋白 |       |            |       |
|----|-----|-----|-------|------------|-------|--------|-------|------------|-------|
|    |     | 阳性  | 阳性率/% | $\chi^2$ 值 | P 值   | 阳性     | 阳性率/% | $\chi^2$ 值 | P 值   |
| 男  | 116 | 59  | 50.86 | 2.556      | 0.110 | 50     | 43.10 | 4.248      | 0.039 |
| 女  | 34  | 12  | 35.29 |            |       | 8      | 23.53 |            |       |

(3) IBP 高分化组中阳性率为 5.26%，中低分化组中阳性率为 53.44%，差异有统计学意义 ( $\chi^2=15.446$ ,  $P<0.05$ )；p53 蛋白高分化组中阳性率为 5.26%，中低分化组中阳性率为 43.51%，差异有统计学意义 ( $\chi^2=17.417$ ,  $P<0.05$ )，见表 3-6。

表 3-6 IBP 和 p53 蛋白与患者分化程度之间的关系

| 分化程度  | n/例 | IBP |       |            |            | p53 蛋白 |       |            |            |
|-------|-----|-----|-------|------------|------------|--------|-------|------------|------------|
|       |     | 阳性  | 阳性率/% | $\chi^2$ 值 | <i>P</i> 值 | 阳性     | 阳性率/% | $\chi^2$ 值 | <i>P</i> 值 |
| 高分化   | 19  | 1   | 5.26  | 15.446     | 0.000      | 1      | 5.26  | 17.417     | 0.000      |
| 中-低分化 | 131 | 70  | 53.44 |            |            | 57     | 43.51 |            |            |

(4) IBP 在 T1、T2 组中阳性率为 44.44%，T3、T4 组中阳性率为 56.04%，差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 0.814$ ,  $P > 0.05$ )；p53 蛋白在 T1、T2 组中阳性率为 38.89%，T3、T4 组中阳性率为 37.36%，差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 0.015$ ,  $P > 0.05$ )，见表 3-7。

表 3-7 IBP 和 p53 蛋白与患者胃壁浸润深度之间的关系

| 胃壁浸润深度 | n/例 | IBP |       |            |            | p53 蛋白 |       |            |            |
|--------|-----|-----|-------|------------|------------|--------|-------|------------|------------|
|        |     | 阳性  | 阳性率/% | $\chi^2$ 值 | <i>P</i> 值 | 阳性     | 阳性率/% | $\chi^2$ 值 | <i>P</i> 值 |
| T1、T2  | 18  | 8   | 44.44 | 0.814      | 0.367      | 7      | 38.89 | 0.015      | 0.903      |
| T3、T4  | 91  | 51  | 56.04 |            |            | 34     | 37.36 |            |            |

(5) IBP 在 I、II 期组中阳性率为 47.46%，III、IV 期组中阳性率为 62%，差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 2.305$ ,  $P > 0.05$ )；p53 蛋白在 I、II 期组中阳性率为 40.68%，III、IV 期组中阳性率为 34%，差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 0.514$ ,  $P > 0.05$ )，见表 3-8。

表 3-8 IBP 和 p53 蛋白与患者 TNM 分期之间的关系

| TMN 分期   | n/例 | IBP |       |            |            | p53 蛋白 |       |            |            |
|----------|-----|-----|-------|------------|------------|--------|-------|------------|------------|
|          |     | 阳性  | 阳性率/% | $\chi^2$ 值 | <i>P</i> 值 | 阳性     | 阳性率/% | $\chi^2$ 值 | <i>P</i> 值 |
| I、II 期   | 59  | 28  | 47.46 | 2.305      | 0.129      | 24     | 40.68 | 0.514      | 0.473      |
| III、IV 期 | 50  | 31  | 62    |            |            | 17     | 34.00 |            |            |

(6)IBP 在 Lauren 分型中,肠型组中阳性率为 44.74%,弥漫性组中阳性率为 53.33%,混合型组中阳性率为 66.67%,差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 1.641$ ,  $P > 0.05$ ); p53 蛋白在 Lauren 分型中,肠型组中阳性率为 44.74%,弥漫性组中阳性率为 23.33%,混合型组中阳性率为 0,差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 8.528$ ,  $P < 0.05$ ), p53 蛋白有在肠型胃腺癌标本中表达升高的趋势,见表 3-9。

表 3-9 IBP 和 p53 蛋白与患者 Lauren 分型之间的关系

| Lauren 分型 | n/例 | IBP |       |            |       | p53 蛋白 |       |            |       |
|-----------|-----|-----|-------|------------|-------|--------|-------|------------|-------|
|           |     | 阳性  | 阳性率/% | $\chi^2$ 值 | P 值   | 阳性     | 阳性率/% | $\chi^2$ 值 | P 值   |
| 肠型        | 114 | 51  | 44.74 |            |       | 51     | 44.74 |            |       |
| 弥漫型       | 30  | 16  | 53.33 | 1.641      | 0.440 | 7      | 23.33 | 8.528      | 0.014 |
| 混合型       | 6   | 4   | 66.67 |            |       | 0      | 0.00  |            |       |

(7) 在肿瘤部位中, IBP 在贲门组阳性率为 50.00%,胃底体组阳性率为 37.78%,胃窦组阳性率为 52.56%,其他组(幽门管、残胃)阳性率为 33.33%,差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 2.809$ ,  $P > 0.05$ ); p53 蛋白在贲门组阳性率为 50.00%,胃底体组阳性率为 24.44%,胃窦组阳性率为 43.59%,其他组(幽门管、残胃)阳性率为 33.33%,差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 5.971$ ,  $P > 0.05$ ),见表 3-10。

表 3-10 IBP 和 p53 蛋白与患者肿瘤部位之间的关系

| 肿瘤部位 | n/例 | IBP |       |            |       | p53 蛋白 |       |            |       |
|------|-----|-----|-------|------------|-------|--------|-------|------------|-------|
|      |     | 阳性  | 阳性率/% | $\chi^2$ 值 | P 值   | 阳性     | 阳性率/% | $\chi^2$ 值 | P 值   |
| 贲门   | 24  | 12  | 50.00 |            |       | 12     | 50.00 |            |       |
| 胃底体  | 45  | 17  | 37.78 | 2.809      | 0.422 | 11     | 24.44 | 5.971      | 0.113 |
| 胃窦   | 78  | 41  | 52.56 |            |       | 34     | 43.59 |            |       |
| 其他   | 3   | 1   | 33.33 |            |       | 1      | 33.33 |            |       |

### 3.2.4 胃腺癌组织中 IBP、p53 蛋白表达之间的相关关系。

我们运用 Spearman 等级相关性分析 IBP 和 p53 蛋白二者之间的相关关系,由结果

可知，胃腺癌组织中，IBP 的表达与 p53 蛋白的表达没有显著的相关性，差异无统计学意义 ( $r=0.013$ ,  $P>0.05$ )，见表 3-11。

表 3-11 IBP 和 p53 蛋白在胃腺癌组织中表达的相关性

| p53 蛋白 | IBP |    |    |    | 合计/n |
|--------|-----|----|----|----|------|
|        | -   | +  | 2+ | 3+ |      |
| -      | 49  | 18 | 16 | 9  | 92   |
| +      | 30  | 12 | 10 | 6  | 58   |
| 计数/n   | 79  | 30 | 26 | 15 | 150  |

### 3.3 讨 论

近年来，由于饮食结构的改变、工作压力增大以及幽门螺杆菌的感染等原因，使得胃癌呈现年轻化倾向，胃癌已成为我国发病率居第二位的恶性肿瘤，且发病率仍在增长，对人民群众的身体健康带来了极大危害。由于早期症状不明显以及早期诊断较为困难，很多患者在确诊时已属于中晚期，多已出现远程转移病灶<sup>[4-6]</sup>。因此寻求新的分子标志物，对胃癌的诊断和治疗具有重要意义。

干扰素调节因子 4 结合蛋白 (IBP) 是 2002 年 Pernis 研究小组通过酵母双杂交技术，从人淋巴结 cDNA 文库中筛选出的一个可以与 IRF-4 具有结合作用的蛋白，主要表达于 T 淋巴细胞并发挥重要作用。之前对 IBP 功能的研究主要集中在免疫系统：参与 TCR 信号刺激下 T 细胞免疫突触的形成<sup>[34]</sup>；对维持免疫内环境的稳定发挥重要作用，IBP 敲除小鼠表现出自身免疫性疾病症状<sup>[35]</sup>。但近年来其在肿瘤中的研究越来越深入：Li 等研究确认 IBP 促进乳腺癌的增殖与侵袭<sup>[26]</sup>，Zhang 等研究认为 IBP 与直肠癌的发生发展相关<sup>[9]</sup>。p53 蛋白已被发现超过三十年，野生型 p53 在介导细胞的压力应激下，通过诱导或抑制参与细胞周期停滞、衰老、凋亡、DNA 修复和血管生成等相关基因发挥着非常重要的作用<sup>[39]</sup>，在野生型 p53 的众多作用中，其肿瘤抑制功能最为显著，该功能与 p53 作为转录因子调控基因的表达密切相关<sup>[27]</sup>。Yang 在乳腺癌中发现野生型 p53 蛋白可在转录水平调节 IBP 的表达，IBP 与 p53 蛋白表达呈负相关<sup>[28]</sup>。

本研究通过检测，发现 IBP 在胃腺癌组织中的表达明显高于正常胃组织，提示其可能成为对 GC 治疗和诊断有积极作用的一种生物标志物；同时，统计学分析表明，IBP

过表达与患者肿瘤分化程度呈比较强的正相关,提示 IBP 在 GC 的发生发展中起了重要作用,IBP 的过度表达促进了肿瘤的发生和发展,使肿瘤向高度恶性、低分化的方向发展,说明 IBP 高表达的患者有可能预后不良,随着浸润深度及 TMN 分期的上升,IBP 的表达有增高的趋势,但差异无显著性;而同时,我们也检测了突变型 p53 蛋白在这 150 例胃腺癌组织中的表达情况,发现 p53 蛋白的过表达与患者年龄、性别、肿瘤分化程度及胃腺癌的 Lauren 分型有关,这与 Waraya 等<sup>[40]</sup>研究中突变型 p53 蛋白在胃癌中的临床病理学特征类似。同时通过统计学分析,我们发现 p53 蛋白与 IBP 的在胃组织中的表达上调没有明显的相关性,由于我们免疫组化检测的 p53 蛋白为突变型,二者无相关性似乎与 IBP 与肿瘤临床病理相关相矛盾。但是,胃癌的发生发展是多种癌基因进行网络式相互作用的结果,不同基因间的信号调节复杂,本组研究的 IBP 既可以依赖于 p53 基因通路,也可以通过独立于 p53 基因途径影响细胞凋亡过程,在其他一些肿瘤的表达情况也说明了该问题,如乳腺癌中甚至出现 IBP 和突变型 p53 蛋白的表达在临床病理标本中表达呈负相关的情况<sup>[26]</sup>,这也充分说明了肿瘤的发生发展绝不是单一基因单一因子的作用,而是多基因多因子相互作用影响的过程;再次,由于 p53 蛋白的突变更多是点突变和少量插入、缺失或蛋白质融合,因此难以制备一种能够识别各种突变的 p53 蛋白,且不与正常的 p53 交叉反应的抗体。因此,仅采用免疫组化方法难以判断突变型 p53 蛋白表达的真实情况,应进一步采用核酸检测方法用于验证。

综上所述,我们的研究表明,IBP 在一些胃腺癌细胞和组织中过度表达,主要表达于胞膜、胞浆,IBP 的过表达与 GC 患者的预后有一定的相关性,IBP 的表达与突变型 p53 蛋白的表达并没有明显的相关性。尽管还需要进一步的实验,但我们认为 IBP 作为 GC 的一种新的肿瘤标志物及预后指标有着广阔的研究前景,对于 IBP 在 GC 发生发展中的机制的进一步研究将为其发生机理及综合治疗提供新的思路。

### 3.4 小 结

本部分实验我们收集了 150 例胃腺癌组织标本,采用免疫组织化学技术标记 IBP、p53 蛋白在 150 例胃腺癌的表达,以癌旁胃组织的 50 例标本为内对照,显微镜下阅片,将 IBP 按照 0、1+、2+、3+进行分类,将 p53 蛋白按照 +、- 分类。应用 SPSS21.0 统计软件,采用  $\chi^2$  检验以及 Spearman 等级相关性分析等方法,总结 IBP 和 p53 蛋白在胃腺癌中表达百分比,总结 150 例胃腺癌患者的相关临床资料:年龄、性别、肿瘤部位、组织学分型、临床分期等,分析 IBP 和 p53 蛋白的表达与患者临床特点之间的联系,并

进一步分析 IBP 和 p53 蛋白表达之间的相关关系。得到结果如下：

(1) IBP 主要表达于胃腺癌细胞胞膜和胞浆中，阳性率为 47.33%，差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

(2) P53 蛋白主要表达于胃腺癌细胞的胞核中，阳性率为 38.67%，差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

(3) 在胃腺癌临床组织标本中，IBP 阳性表达与患者的病理分级具有相关性 ( $P < 0.05$ )，病理分级越高的患者其 IBP 的表达具有升高的趋势。与患者年龄、性别、胃壁浸润深度、TMN 分期、Lauren 分型及肿瘤部位无相关性 ( $P > 0.05$ )。p53 蛋白阳性表达与患者年龄、性别、病理分级、Lauren 分型具有相关性 ( $P < 0.05$ )。p53 蛋白有在年龄越大的人群中表达越高的趋势；p53 蛋白在男性患者中的表达率明显比女性患者高；和 IBP 一样，病理分级越高的患者其 p53 蛋白的表达具有升高的趋势；p53 蛋白还有在肠型胃腺癌中表达增高的趋势。与胃壁浸润深度、TMN 分期、肿瘤部位无相关性 ( $P > 0.05$ )。

(4) 运用 *Spearman* 等级相关性分析 IBP 和 p53 蛋白二者之间的相关关系，由结果可知，胃腺癌组织中，IBP 的表达与 p53 蛋白的表达没有显著的相关关系，差异没有统计学意义 ( $r = 0.013$ ,  $P > 0.05$ )。

## 全文总结

胃癌是人类最常见的恶性肿瘤，高居全世界癌症病死率第二位，在我国胃癌的患病情况也不容乐观，是具有高频的发病率和死亡率的恶性肿瘤。由于技术水平的限制，早期胃癌患者很难诊断出来，一旦诊断为胃癌，都已经发展为了进展期胃癌，此时，不得不采取手术对肿瘤进行切除、或者采用化疗等综合措施对患者进行治疗，不仅没有预期的效果，而且对发展到晚期的患者预后很差。这就意味着必须打破传统的治疗手段，积极的寻求新的治疗方式。近年来，研究者对肿瘤分子生物学研究进一步深入，逐渐发现胃癌的发生发展是由很多因素造成的，与基因的表达也息息相关，而且，不同时期的病理表现也不尽相同，当基因中某些原癌基因的激活或者抑癌基因的缺失，以及某些转录和调节因子的过度表达，都会使细胞不受限制的增殖或者细胞凋亡机制失效等，这些都是导致癌症发生发展的机制。分子靶向治疗是目前肿瘤治疗的一个具有积极意义的新方向，该方式是以肿瘤细胞过度表达的标志性分子作为靶点，通过其他表达产物对标志性分子进行调控或者抑制肿瘤细胞的增值信号的表达，使肿瘤细胞无法无限增值。但是，目前为止，关于寻找胃癌细胞中的有效的分子靶点，除 HER2 外还没有更多的进展，还需要投入更多的精力去进一步的研究。

近年来，IBP 在肿瘤中的研究不断深入，现有报道其在乳腺癌、结肠癌、口腔鳞癌等许多肿瘤中存在着异常表达，并与这些肿瘤的侵袭、增殖、转移以及化疗抵抗等密切相关。但 IBP 在胃癌中的表达情况如何？其在胃腺癌细胞株中的表达模式是什么？在胃腺癌临床标本中的表达情况又是怎样？其与某些肿瘤因子及临床病理特征间有无关系？这是我们需要探索和解决的问题。因此，本研究通过免疫荧光检测 IBP 在胃腺癌细胞株中的表达模式，通过 Real-time PCR、Western blot 检测 IBP 在不同胃腺癌细胞株中的表达情况，收集胃腺癌临床标本，通过免疫组化 EnVision 法检测 IBP 和 p53 蛋白在胃腺癌临床标本中的表达情况，并进一步检测了 IBP 和 p53 蛋白与患者临床病理因子之间的关系及其在胃腺癌标本中表达的相关关系，而有关其具体的分子机制有待于下一步深入研究。主要实验结果及结论如下：

一、IBP 在表达于胃腺癌细胞株的胞膜和胞浆，并在两种胃腺癌细胞株中均呈阳性表达，其表达量高低与胃腺癌细胞的恶性程度相关，故推测 IBP 可能参与了胃腺癌的发生发展过程。

二、在胃腺癌临床组织标本中，免疫组化结果显示 IBP 阳性表达具有统计学意义( $P < 0.05$ )，主要表达于胞膜和胞浆，与细胞实验结果一致。p53 蛋白的阳性表达率为

38.67%，主要表达于胞核，差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

三、在胃腺癌临床组织标本中，IBP 阳性表达与患者的病理分级具有相关性 ( $P < 0.05$ )。病理分级越高的患者其 IBP 的表达具有升高的趋势。与患者年龄、性别、胃壁浸润深度、TMN 分期、Lauren 分型及肿瘤部位无相关性 ( $P > 0.05$ )。p53 蛋白阳性表达与患者年龄、性别、病理分级、Lauren 分型具有相关性 ( $P < 0.05$ )。p53 蛋白有在年龄越大的人群中表达越高的趋势；p53 蛋白在男性患者中的表达率明显比女性患者高；和 IBP 一样，病理分级越高的患者其 p53 蛋白的表达具有升高的趋势；p53 蛋白还有在肠型胃腺癌中表达增高的趋势。与胃壁浸润深度、TMN 分期、肿瘤部位无相关性 ( $P > 0.05$ )。

四、在胃腺癌临床组织标本中，IBP 的表达与 p53 蛋白的表达没有明显的相关性，差异无统计学意义 ( $r = 0.013$ ,  $P > 0.05$ )。

综上所述，本研究得出的主要结论是：

IBP 在胃腺癌细胞和组织中过度表达，主要表达于胞膜胞浆，IBP 过表达与胃腺癌患者的病理分级呈正相关，IBP 的表达与突变型 p53 蛋白的表达没有显著的相关性。尽管还需要进一步的实验，但我们认为 IBP 作为 GC 的一种新的肿瘤标志物及预后指标有着广阔的研究前景，对于 IBP 在 GC 发生发展中的机制的进一步研究将为其发生机理及综合治疗提供新的思路。

## 参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90
- [2] Nagini S. Carcinoma of the stomach: a review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. *World J Gastrointest Oncol.* 2012;4(7):156-69
- [3] Chen W, Sun K, Zheng R, Zeng H, Zhang S, Xia C, Yang Z, Li H, Zou X, He J. Cancer incidence and mortality in China, 2014. 2018 Feb;30(1):1-12. DOI: 10.21147/j.issn.1000-9604
- [4] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2015):5-29
- [5] Ohtsu A. Chemotherapy for metastatic gastric cancer: past, present, and future. *J Gastroenterol.* 2008;43:256-64
- [6] Hartgrink HH, Jansen EP, van Grieken NC, et al. Gastric cancer. *Lancet.* 2009;374:477-90
- [7] Durães C, Almeida GM, Seruca R, et al. Biomarkers for gastric cancer: prognostic, predictive or targets of therapy? *Virchows Arch.* 2014;464(3):367-78
- [8] Gupta S, Lee A, Hu C, et al. Molecular cloning of IBP, a SWAP-70 homologous GEF, which is highly expressed in the immune system[J]. *Hum Immunol*, 2003, 64(4):389-401
- [9] Zhang Z, Wang Q, Li P, et al. Overexpression of the Interferon regulatory factor 4-binding protein in human colorectal cancer and its clinical significance[J]. *Cancer Epidemiol*, 2009, 33(2):130-136
- [10] Zheng Y. Dbl family guanine nucleotide exchange factors[J]. *Trends Biochem Sci* 2001;26:724-32
- [11] Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton[J]. *Science* 1998;279:509-14
- [12] Ridley AJ. Rho family proteins: coordinating cell responses[J]. *Trends Cell Biol* 2001;11:471-7
- [13] Bokoch GM. Regulation of cell function by Rho family GTPases[J]. *Immunol Res* 2000;21:139-48
- [14] Bar-Sagi D, Hall A. Ras and Rho GTPases: a family reunion[J]. *Cell* 2000;103:227-38
- [15] Pruitt K, Der CJ. Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis[J]. *Cancer Lett* 2001;171:1-10
- [16] Jayachandran G, Sasaki J, Nishizaki M, Xu K, Girard L, Minna JD, et al. Fragile histidine

- triad-mediated tumor suppression of lung cancer by targeting multiple components of the Ras/Rho GTPase molecular switch[J].*Cancer Res* 2007;67:10379-88
- [17] Guo F,Zheng Y.Rho family GTPases cooperate with p53 deletion to promote primary mouse embryonic fibroblast cell invasion[J].*Oncogene* 2004;23:5577-85
- [18] Taniuchi K,et al.Overexpressed P-cadherin/CDH3 promotes motility of pancreatic cancer cells by interacting with p120ctn and activating rho-family GTPases[J].*Cancer Res* 2005;65:3092-9
- [19] Vega FM,Ridley AJ.Rho GTPases in cancer cell biology[J].*FEBS Lett* 2008;582:2093-101
- [20] Lin M,van Golen KL.Rho-regulatory proteins in breast cancer cell motility and invasion[J]. *Breast Cancer Res Treat* 2004;84:49-60
- [21] Banyard J,Anand-Apte B,Symons M,Zetter BR.Motility and invasion are differentially modulated by Rho family GTPases[J].*Oncogene* 2000;19:580-91
- [22] Mavrakis KJ,McKinlay KJ,Jones P,Sablitzky F.DEF6,a novel PH-DH-like domain protein,is an upstream activator of the Rho GTPases Rac1,Cdc42,and RhoA[J].*Exp Cell Res* 2004;294:335-44
- [23] Muller PA,Vousden KH.p53 mutations in cancer [J].*Nat Cell Bio*,2013,15(1):2-8.
- [24] Fang L,Gao H,Zhang W,et al.Resveratrol alleviates nerve injury after cerebral ischemia and reperfusion in mice by inhibiting inflammation and apoptosis[J].*Int J Clin Exp Med*,2015,8(3):3219-3226.
- [25] Prass K,Scharff A,Ruscher K,et al.Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin[J].*Stroke*,2003,34(8):1981-1986.
- [26] Peng L,Zhang Z,Wang Q,et al.The ectopic expression of IFN regulatory factor 4-binding protein is correlated with the malignant behavior of human breast cancer cells[J].*Int Immunopharmacol*,2009,9(7/8):1002-1009.
- [27] Menendez D,Inga A,Resnick MA.Potentiating the p53 network[J].*Discovery Medicine*, 2010,10(50):94-100
- [28] Yang M,Fang Y,Peng L,et al.Interferon regulatory factor 4 binding protein is a novel p53 target gene and suppresses cisplatin-induced apoptosis of breast cancer cells[J].*Mol Cancer*,2011,11(1):1-13.
- [29] 简从相,黄晓山,李晨军.IRF-4 结合蛋白在口腔鳞癌中的表达及临床意义[J].*实用口腔*

- 医学杂志,2012,28(4):478-481.
- [30] 简从相,熊剑,李鹏,等.RNAi 沉默 IBP 基因表达对乳腺癌细胞的抑制作用[J].第三军医大学学报,2010,32(21):2277-2280.
- [31] Hotfilder M, Baxendale S, Cross MA, Sablitzky F.Def-2, -3, -6, -8, novel mouse genes differentially expressed in the haem oppietic system[J].Br J Haematol.1999 Aug;106(2):335-44
- [32] Canonigo-Balancio AJ,Fos C,Prod'homme T,Becart S,Altman A.SLAT/Def6 plays a critical role in the development of Th17 cell-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis[J].J Immunol,2009 Dec 1,183(11):7259-67.
- [33] Tanka Y,Bi K,Kitamura R,Hong S,Altman Y,Matsumoto A,et al.SWAP-70-like adapter of T cells,an adapter protein that regulates early TCR-initiated signaling in Th2 lineage cells[J].Immunity.2003 Mar;18(3):403-14.
- [34] Becart S,Charvet C,Canonigo Balancio AJ,De Trez C,Tanaka Y,Duan W,et al.SLAT regulates Th1 and Th2 inflammatory responses by controlling  $Ca^{2+}$ /NFAT signaling[J].J Clin Invest.2007 Aug;117(8):2164-75
- [35] Fanzo JC,Yang W,Jang SY,Gupta S,Chen Q,Siddiq A,et al.Loss of IRF-4-binding protein leads to the spontaneous development of systemic autoimmunity.J Clin Invest.2006 Mar;116(3):703-14.
- [36] Vistica BP,Shi G,Nugent L,et al.SLAT/Def6 plays a critical role in the pathogenic process of experimental autoimmune uveitis(EAU)[J].Mol Vis,2012,18(192):1858-1864.
- [37] Oka T,Ihara S,Fukui Y.Cooperation of DEF6 with activated Rac in regulating cell morphology.J Biol Chem.2007 Jan 19;282(3):2011-8.
- [38] Samson T,Will C,Knoblauch A,Sharek L,von der Mark K,Burridge K,et al.Def-6,a guanine nucleotide exchange factor for Rac1,interacts with the skeletal muscle integrin chain alpha7A and influences myoblast differentiation.J Biol Chem.2007 May 25;282(21):15730-42.
- [39] Levine AJ,Oren M.The first 30 years of p53:growing ever more complex[J]. Nature Reviews Cancer, 2009,9(10):749-758
- [40] Waraya M,Yamashita K,Ena A,et al.Exclusive association of p53 mutation with super-high methylation of tumor suppressor genes in the p53 pathway in a unique gastric cancer phenotype.PLOS One,2015,10(10):1-17.

## 文献综述

## IBP 在肿瘤中的研究进展

**【摘要】** IBP (IRF-4 结合蛋白) 是一种主要表达于 T 淋巴细胞并且具有重要功能的微管结合蛋白, 对其早期的研究主要停留在免疫系统层次上。IBP 主要起 GEF 功能, 它是一种具有激活 Rho GTPase 家族中部分成员的能力, 提示该蛋白可能参与了调剂细胞骨架重构以及细胞内信号传导等机制<sup>[1]</sup>, 并在最近研究中发现其与部分恶性肿瘤的发生发展密切相关。研究者认为该蛋白有可能成为癌症分子靶向诊治的新靶点。本文结合已有的实验研究数据, 分析 IBP 的结构和功能, 以及该蛋白在癌症发生发展中的多重作用, 为进一步的靶向治疗研究提供理论依据。

**关键词:** IBP; 肿瘤; 靶向治疗

IBP 又名 SLAT、DEF-6, 是十多年前, Pernis 研究小组在研究干扰素调节因子 4 (IRF-4) 的结构和功能时发现的, 它使用酵母双杂交技术创造性地过滤出一种能够和 IRF-4 相互作用的蛋白质。前人主要对 IBP 的研究聚焦于免疫系统, 主要表达于 T 淋巴细胞并发挥着重要作用<sup>[2]</sup>, 近年来, 国内外研究证实 IBP 在多种肿瘤组织中存在异常表达并发挥着重要的生物学效用, 这就说明其很可能作为成为肿瘤治疗的新靶点。

### 一、IBP 的结构和功能

IBP 相对分子量高达 75000Da, 由 631 个氨基酸组成, 其编码基因处于人染色体 6p21.31 位置<sup>[3]</sup>, IBP 分子结构主要包含三个结构域, 从 N 端到 C 端分别为 EF-hand、PH (pleckstrin homology)、DH (Db1 homology) (图 1), 它们是通过介导钙离子信号实现转导通路的作用, 同时与磷酸肌相结合, 以达到激活 GEF 活性的目的<sup>[1]</sup>。然而, 研究发现, IBP 分子中还存在能够表达碱性氨基酸的编码区 K328-R340, 这是具有核移位信号表达的基因序列, 该序列能够起到调控细胞核对基因的表达起的作用<sup>[1]</sup>。IBP 在人免疫系统中大量表达并具有重要功能, 尤其高表达于胸腺及 T 淋巴细胞, 研究者认为 DH 结构域是 IBP 中主要的功能序列, 其包含了 Db1 家族蛋白的 GEFs 催化 Rho GTP 酶, 这种酶能够影响 GDP 到 GTP 的转化, 让不具活性的 GDP 结合态过渡到具有活性的 GTP 结合态, 对 Th2 细胞调控其细胞因子表达有重要作用<sup>[4]</sup>。此外,  $Ca^{2+}$  能够结合 N 末端的 EF 结构域, 其原理是在 TCR/CD28 的刺激影响下, 使邻近的 ITAM 序列迅速磷酸化,

激活了 IBP 下端的 PH 结构域，这样，精氨酸残基就能够成功和 PIP3 结合<sup>[5]</sup>，由于激活了 PH 结构域侧面基因序列，也就顺利的表现出 GEF 的活性<sup>[6]</sup>。IBP 还能够起到控制 MAPKs 与 NF- $\kappa$ B 的作用，使其参与 TLRs 传导通路以实现调控的作用<sup>[7]</sup>。最新的研究表明，IBP 也能影响细胞的极化，对细胞间的通讯甚至细胞骨架重塑等功能也有一定的影响<sup>[8-9]</sup>。现有的研究资料表明，IBP 能够在多种恶性肿瘤细胞中过表达，该方式能成功的与肿瘤相结合，也就意味着其能成为评估一些癌症未来的发展趋势。针对乳腺癌、结肠癌、口腔鳞癌及人涎腺腺样囊性癌（SACC）等常见的恶性肿瘤研究发现，IBP 可以促进肿瘤细胞的增殖和转移、促进上皮间充质转化、调节肿瘤细胞周期等，也发现在乳腺癌细胞中 IBP 能够抑制 p53 蛋白基因的表达，也就意味着 IBP 很可能作为癌症分子治疗的新靶点。

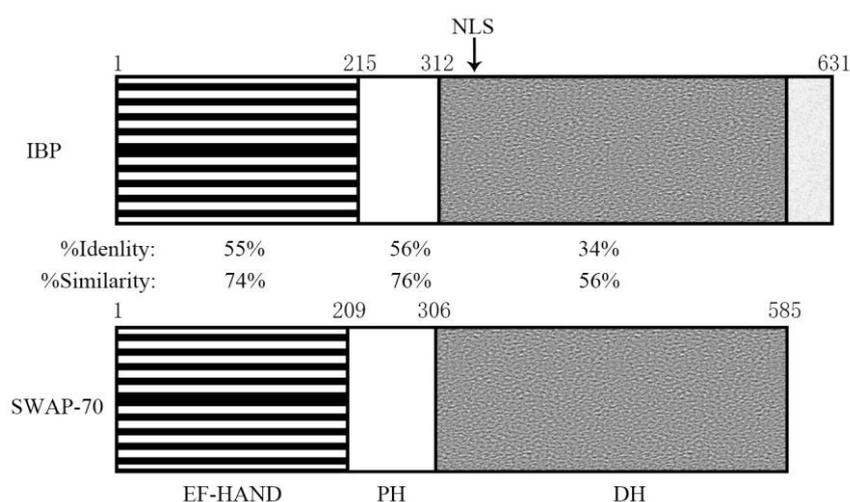


图1 IRF-4 结合蛋白(IBP)与 SWAP-70 同源性比较(引自 Gupta S, et al. Molecular cloning of IBP, a SWAP-70 homologous GEF, which is highly expressed in the immune system)<sup>[2]</sup>

## 二、IBP 在肿瘤中的表达情况

通过检测肿瘤细胞及临床标本，现已知 IBP 在乳腺癌、直肠癌、人涎腺腺样囊性癌（SACC）及人口腔鳞癌组织等肿瘤中均存在着异常表达。有研究发现了 IBP 在 MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435、MDA-MB-453、SKBR3 几种乳腺癌细胞中的表达情况，通过 WB 及 PCR 技术，发现随着乳腺癌细胞恶性程度的升高，癌细胞中 IBP 的表达的亦有逐渐升高的趋势，通过免疫荧光技术确定了在乳腺癌中的 IBP 主要表达于胞膜胞浆，提示 IBP 可能与许多其他信号分子相似，可以定位于胞膜内侧发挥作用<sup>[10]</sup>；进一步

收集临床乳腺癌手术组织及相应的正常乳腺和乳腺良性病变对照样品，构建乳腺癌组织芯片并进行免疫组化检测，发现乳腺癌中 IBP 的阳性率为 53.3% (57/107)，正常乳腺及乳腺良性病变组织中未见 IBP 表达；通过将 IBP 的表达与所收集标本的临床病理特征进行统计学分析，发现乳腺组织中 IBP 的表达能都针对乳腺癌的病理进行分级，其表达与淋巴结转移息息相关，而突变型 p53 蛋白的表达与它成负相关<sup>[10]</sup>。Zhang 等<sup>[11]</sup>运用 WB 及 PCR 技术，成功的发现了 IBP 可在某些人结肠癌的细胞株（如 SW480、SW620、HT29）进行阳性表达，其表达的物质主要集中在细胞浆内，在癌旁组织和正常结肠组织中，没有发现 IBP 表达产物。同时，在选取同一来源的 SW620 结肠癌细胞株与 SW480 结肠癌细胞株进行试验时，发现前者 IBP 表达水平明显高于后者<sup>[12]</sup>，这种结果很可能和 IBP 在乳腺癌中表情情况相似，随着细胞恶性程度的提高，结肠癌细胞中 IBP 的表达水平也逐渐升高；在 63 例结肠癌标本中 IBP 表达率为 (42/63) 66.7%，而癌旁正常结肠组织和腺瘤均为全阴性，结肠癌组织中 IBP 表达显著高于正常组织，在结肠癌组织中，IBP 表达有四个时期，其中在 I 期结肠癌的表达率最低，也验证了 IBP 的高表达与 TNM 的正相关关系，与分化程度呈负相关关系<sup>[11]</sup>。也有研究认为 IBP 在造血干细胞中能够发挥高效率的表达，但是在分化后的粒细胞、巨噬细胞和红细胞中，其基因序列的表达有所下降<sup>[13]</sup>，说明 IBP 在分化层次越低的细胞中更容易表达，通过结肠癌组织标本中检测得到的结果也可以说明这一点。简从相<sup>[14]</sup>、潘磊<sup>[15]</sup>等通过免疫组化检测 78 例人口腔鳞癌组织中 IBP 的表达情况，检测到有 36 例 IBP 阳性表达（表达率 46.15%），而全部 6 例口腔正常黏膜中未检测到 IBP 的表达产物。通常 IBP 表达含量的多少直接取决于肿瘤直径、TNM 临床分期以及能否发生远程转移等因素，同时与肿瘤分化程度呈负相关的关系，也就是说，IBP 蛋白高表达时，通常会明显降低患者的无瘤生存期和总生存期。通过 Western blot 检测 IBP 在人涎腺腺样囊性癌（SACC）细胞株 ACC2、ACCM 中的表达，确认 ACC2、ACCM 细胞株中未见 IBP 表达，使用免疫组化方法检测 IBP 在 20 例正常涎腺组织中全部表达阳性，27 例 SACC 中仅 3 例表达弱阳性，两组间存在显著差异<sup>[16]</sup>。此结果也验证了 Gupta 等认为 IBP 能够在正常涎腺中表达的结论，但是研究发现 IBP 在 SACC 中呈现低表达甚至不表达的效果，与其在乳腺癌与直肠癌中 IBP 阳性表达结论相冲突，分析原因，IBP 表达很可能与组织类型有很大的关联性：导致腺样囊性癌发生的主要原因是上皮细胞和管道内壁上皮细胞的错误表达，这些细胞是有闰管或闰管储备细胞分化而成的；构成乳腺癌的细胞来源因素则为乳腺终末导管小叶单元上皮的病变，肠黏膜上皮和腺体细胞发生癌变，则易导致直肠癌。

### 三、IBP 在肿瘤增殖和转移中的作用

关于 IBP 对肿瘤细胞增殖和转移作用的研究现在主要集中于乳腺癌中，这些研究都指向一个事实：IBP 的过表达促进了乳腺癌细胞的增殖和转移。Li 等<sup>[10]</sup>分别建立了 IBP 表达上调的 MDA-MB-435 细胞株和 IBP 表达受到抑制的 MDA-MB-231/178 细胞株，在培养皿中进行体外肿瘤的侵袭试验，得到 IBP 具有增强乳腺癌细胞增殖与迁移的结论<sup>[10]</sup>。简从相等在真核细胞中通过构建 shRNA 重组质粒，成功的达到干扰 IBP 表达的目的，通过增殖实验也验证了 IBP 有效的干扰效果，进行筛选后，也成功建立了 IBP 干扰的稳定的乳腺癌细胞系<sup>[17]</sup>。有人在进一步的实验中利用慢病毒介导 shRNA 构建了 IBP 抑制的稳定感染乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 和 HS578T，通过检测，发现 MDA-MB-231 和 HS578T 细胞中 E-钙粘蛋白（E-cadherin）表达水平明显升高，而 E-钙粘蛋白是一种重要的蛋白，能够判别细胞极性以及维持细胞间的联系，兼具抑制肿瘤侵袭和限制细胞转移的作用。当细胞中 E-钙粘蛋白蛋白的缺失或者功能异常使，往往会加剧肿瘤细胞的恶化，患者易出现不良症状<sup>[18]</sup>，该研究结果表明抑制 IBP 的表达能在一定程度上降低乳腺癌细胞的恶化，该结论由 MTT 细胞增殖实验和 Transwell 迁移实验已经得到验证，所以，利用了抑制 IBP 表达的效果，明显降低了 MDA-MB-231 和 HS578T 细胞的增殖能力和迁移效果，但这仅是证明了在体外 IBP 具有如此效果。同时，通过裸鼠实验证明，说明在体内抑制 IBP 的表达，同样能降低乳腺癌细胞的成瘤能力，两者结果相吻合<sup>[19]</sup>。

有研究指出 PI3K/Akt/mTOR 是细胞内抑制自噬作用重要因素，它能有效的致使肿瘤细胞自噬活性的变化。2013 年，Chen 等<sup>[20]</sup>通过实验发现 IBP 主要起效果的结构为 PH 片段，通过结合 PI3K 激活基因表达，这也意味着，当 IBP 引起 PI3K/Akt/mTOR 信号的激活时，它会导致细胞自噬减弱，从而更容易发生乳腺癌。在此基础上，通过基因敲除技术及基因过表达技术，研究人员成功构建了 MDA-MB-231/IBP siRNA 沉默 IBP 细胞系和 MDA-MB-468-IBP 过表达 IBP 细胞系，然后通过饥饿刺激，在显微镜下观察自噬指数 LC3 II 的表达，当抑制 IBP 表达时，Lc3 II 的含量显着增加，而 IBP 的表达在 LC3 II 中呈下降趋势<sup>[20]</sup>。为了验证此推论的正确性，提取临床乳腺癌组织标本，做成切片，并与正常乳腺组织标本切片进行对比，通过病理技术着色之后，观察到 IBP 过表达能够大大促进 Akt、mTOR 及 LC3 II 的表达。此结果也证 IBP 是抑制细胞自噬作用导致乳腺癌增殖和转移重要原因<sup>[20-21]</sup>（图 2）。

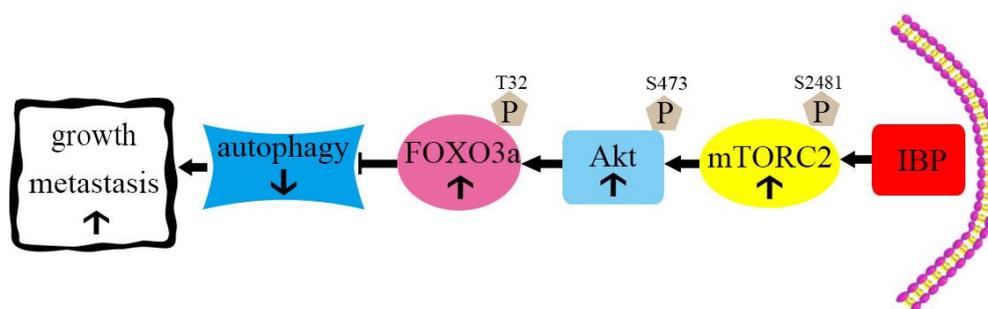


图 2 乳腺癌中 IBP 的功能模拟图 (引自 Chen S, et al. IBP-mediated suppression of autophagy promotes growth and metastasis of breast cancer cells via activating mTORC2/Akt/FOXO3a signaling pathway) [20]

陈忠蛟等<sup>[22]</sup>通过设计并合成针对人 IBP mRNA 的 RNA 干扰 (RNAi) 序列, 构建 RNAi 慢病毒表达载体, 与包装质粒共转染人胚肾 293FT 细胞获得病毒颗粒, 以病毒感染 MDA-MB-231 细胞。采用免疫印迹及实时聚合酶链反应 (RT-PCR) 确定能有效抑制 IBP 的 RNAi 序列, 筛选获得稳定感染的细胞株, 用微丝和微管染色, 染色结果证实, IBP 表达减少后细胞形态变化明显, 细胞体积变大, 丝状伪足数量减少, 片状伪足数量则增加, 微管排列无序, 提示 IBP 参与乳腺癌细胞骨架的重建, 这与乳腺癌转移息息相关。

#### 四、IBP 在肿瘤上皮间充质转化 (EMT) 中的作用

张竹君<sup>[23]</sup>通过 WB 和细胞免疫荧光分析发现 IBP 调节乳腺癌细胞中 EMT 标志分子 (E-cadherin、N-cadherin、Keratin18、Vimentin、Fibronectin) 的表达水平。相差显微镜观察发现 IBP 改变乳腺癌细胞的 EMT 表型。并发现 IBP 在 EGF 诱导的乳腺癌细胞 EMT 过程中表达水平显著升高; 在乳腺癌细胞中, IBP 表达抑制会降低 EGF 刺激引起的 EGFR 及其下游信号分子 ERK1/2、p38MAPK 的磷酸化水平。利用 RT-PCR 检测发现乳腺癌细胞中 IBP 抑制后 EMT 相关转录因子 Snail、Slug、ZEB1 和 ZEB2 的表达水平会不同程度的降低。利用 G-ELISA 技术分析 IBP 表达水平与乳腺癌细胞中 Rac1, RhoA 和 Cdc42 活性水平之间的关系: 乳腺癌细胞中 IBP 通过其 GEF 活性调控 Rac1, RhoA 和 Cdc42 的活化<sup>[23]</sup>。(图 3)

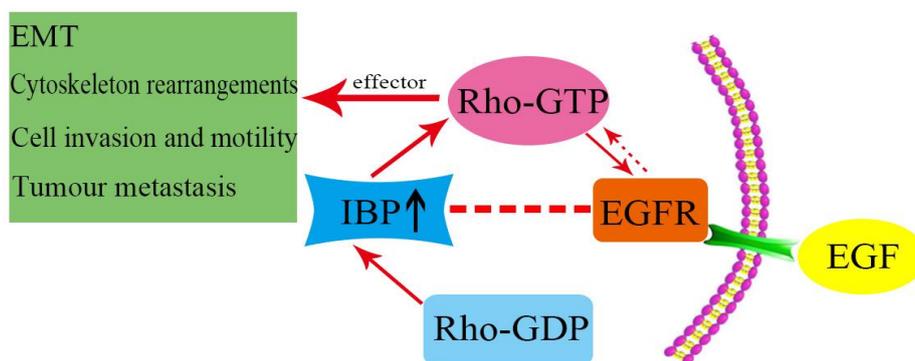


图3 IBP通过Rac1, RhoA和Cdc42信号通路调节乳腺癌细胞EMT进而促进其转移的分子机制(引自张竹君.IBP调节乳腺癌细胞EMT及促进其转移的分子机制研究)<sup>[23]</sup>

IBP可通过促进结肠癌上皮间充质转化(EMT)作用,间接的加强了肿瘤细胞的侵袭和迁移,Tiwari等<sup>[24]</sup>通过实验表明,上皮细胞受到EMT的作用,将短暂的导致细胞失去极性。而间质化细胞则因为EMT使细胞的增殖速率缓慢,但能增强细胞的侵袭转移能力,其结果与IBP的表达相吻合<sup>[25]</sup>。在显微镜下观察细胞爬片,可以发现,IBP阴性表达能使空质粒对照组细胞聚集到一起,与IBP过表达相反,这也与上皮间质转换发生后出现细胞分散的现象相吻合<sup>[25]</sup>。所以说,IBP是一种EMT过程的重要调节分子,不同的表达方式会产生不同的结果,有时可以导致细胞向恶性方向转变。IBP也能提高间叶标志物Fibronectin表达效率<sup>[12]</sup>,而有研究指出钙黏蛋白转换是EMT的重要标志<sup>[26]</sup>。由于Fibronectin具有提高结肠癌细胞浸润及转移的功能,所以E-钙粘蛋白则对维持上皮的完整性非常有利,肿瘤的发生和转移通常导致缺乏E-钙粘蛋白的缺失或变性。此时,转录因子Snail可直接抑制E-钙粘蛋白的转录表达,导致肿瘤加速发展<sup>[27]</sup>。众多研究表明,直结肠癌细胞株中IBP表达能够直接降低Snail的表达水平,这主要是因为IBP表达过程中会影响Snail的表达,影响了E-cadherin的调控效果,导致结肠癌细胞EMT变异<sup>[12]</sup>。此外,IBP还能够影响胶原酶MMP2的功能,一定程度上导致结肠癌细胞迁移和侵袭,MMP2能降解肿瘤细胞的基底膜,甚至是细胞外的基质,从而导致肿瘤细胞浸润到周围组织,促进肿瘤细胞的转移<sup>[28]</sup>。Ishii<sup>[29]</sup>发现EMT可加速人涎腺腺样囊性癌(SACC)的发生和发展,通过免疫荧光染色中间标记波形蛋白和EMT过程的上皮标记,发现ii型角蛋白CK-8:ACC2-C1/IBP细胞表达显著增强,CK-8表达显著下降。而IBP表达为阴性的ACC2-C1细胞的表达情况正相反。同时,在染色细胞后观察爬片,我们可以看到ACC2-C1细胞聚集在一起,而ACC2-C1/IBP细胞却呈离散状态。这与EMT所造成

的细胞间骨架结构破坏，链接疏松表现一致<sup>[31]</sup>。由此我们初步判断 IBP 可促进上皮间质转化。

### 五、IBP 与 p53 蛋白在肿瘤发生发展中的关系

现在关于 IBP 与 p53 蛋白间关系的研究主要集中于乳腺癌中，2009 年在人乳腺癌、结肠癌的上皮组织中发现 IBP 的阳性表达<sup>[10,11]</sup>。在关于乳腺癌组织样本的研究中，发现 IBP 与乳腺癌的 TMN 分期、病理分级等相关，并第一次发现与 p53 蛋白（突变型）水平呈负相关<sup>[10]</sup>。p53 蛋白有野生型和突变型两种类型，在 p53 蛋白（野生型）的众多作用中，其肿瘤抑制的功能一直是研究的热点，研究得也较为深入，该功能主要是 p53 蛋白充当调控基因表达的转录因子，进而影响相关肿瘤基因的表达<sup>[32]</sup>，这种 p53 蛋白的特征表明，乳腺癌的发生发展可能与 IBP 的转录调控机制有关，并提示 IBP 在乳腺癌中可能有新的和更重要的功能。2011 年 Yang 等<sup>[33]</sup>研究发现 IBP 可以作为抑癌基因 p53 的负反馈调节因子，增强乳腺癌的发生和转移，并抑制顺铂诱导的乳腺细胞凋亡。通过进一步的研究发现，在人 IBP 基因的 5' 侧翼中有一个非经典的 p53 结合位点，并且 p53 可以通过结合于该位点来抑制 IBP 的表达。而 IBP 可以使 Bcl-2（一种抗凋亡因子）高表达，从而改变 Bax 和 Bcl-2 两种因子的比例，激活 AKT/p53 信号通路，降低 p53 的表达活性，以上研究均证实 IBP 同抑癌基因 p53（野生型）之间也存在一个相互作用的反馈环<sup>[33]</sup>。

### 六、小结

综上所述，过去几年，我们发现 IBP 除了在免疫系统中发挥作用外，在多种人类肿瘤细胞中也起着重要作用，并与很多肿瘤组织的病理类型、TNM 分期、远处转移及患者的预后情况密切相关。随着对 IBP 在肿瘤发生发展中的作用机制的研究越来越深入，使其有望作为一种新型的肿瘤标志物和基因靶向治疗的新靶点，为肿瘤的分子靶向治疗开辟一个新的路径。

## 参考文献

- [1] Shu CL, Jing YL, Su LC, et al. SWAP-70: a new type of oncogene[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e4422.
- [2] Gupta S, Lee A, Hu C, et al. Molecular cloning of IBP, a SWAP-70 homologous GEF, which is highly expressed in the immune system[J]. *Hum Immunol*, 2003, 64(4): 389-401.
- [3] Hu CM, Jang SY, Fanzo JC, et al. Modulation of T cell cytokine production by interferon regulatory factor-4[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(51): 49238-49246.
- [4] Srougi MC, Burrige K. The nuclear guanine nucleotide exchange factors Ect2 and Net1 regulate RhoB-mediated cell death after DNA damage[J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e17108.
- [5] Liu JJ, Lin M, Yu JY, et al. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics[J]. *Cancer Lett*, 2011, 300(2): 105-114.
- [6] Lazer G, Katzav S. Guanine nucleotide exchange factors for RhoGTPases: good therapeutic targets for cancer therapy?[J]. *Cell Signal*, 2011, 23(23): 969-979.
- [7] Chen Q, Gupta S, Pernis AB. Regulation of TLR4-mediated signaling by IBP/Def6, a novel activator of Rho GTPases[J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 85(3): 539-543.
- [8] Goudevenou K, Martin P, Yeh YJ, et al. Def6 is required for convergent extension movements during zebrafish gastrulation downstream of Wnt5b signaling[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e65.
- [9] Burgess DJ. Breast cancer: circulating and dynamic EMT[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(3): 148-149.
- [10] Peng L, Zhang Z, Wang Q, et al. The ectopic expression of IFN regulatory factor 4-binding protein is correlated with the malignant behavior of human breast cancer cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(7/8): 1002-1009.
- [11] Zhang Z, Wang Q, Peng L, et al. Overexpression of the interferon regulatory factor 4-binding protein in human colorectal cancer and its clinical significance[J]. *Cancer Epidemiol*, 2009, 33(2): 130-136.
- [12] 何颖, 张竹君. IBP 通过上皮间质转化促进结肠癌细胞迁移和侵袭[J]. *第三军医大学学报*, 2016, 38(11): 1281-1285.
- [13] Vistica BP, Shi G, Nugent L, et al. SLAT/Def6 plays a critical role in the pathogenic process of experimental autoimmune uveitis(EAU)[J]. *Mol Vis*, 2012, 18(192): 1858-1864.

- [14] 简从相,黄晓山,李晨军.IRF-4 结合蛋白在口腔鳞癌中的表达及临床意义[J].实用口腔医学杂志,2012,28(4):478-481.
- [15] 潘磊,简从相,李卓,等.IRF-4 结合蛋白对口腔鳞癌细胞生长作用的机制研究[J].西南国防医药,2014,24(5):468-470.
- [16] 熊剑,简从相,李鹏,等.IRF-4 结合蛋白对人涎腺腺样囊性癌细胞增殖的抑制作用[J].第三军医大学学报,2011,33(6):554-557.
- [17] 简从相,熊剑,李鹏,等.RNAi 沉默 IBP 基因表达对乳腺癌细胞的抑制作用[J].第三军医大学学报,2010,32(21):2277-2280.
- [18] Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer[J]. Nat Rev Cancer,2004, 4(2):118-132.
- [19] 栗薇,杨明珍,张竹君.慢病毒介导 shRNA 抑制 IRF\_4 结合蛋白对乳腺癌细胞生物学特性的影响[J].免疫学杂志,2016,32(3):199-202.
- [20] Chen S,Han Q,Wang X,et al.IBP-mediated suppression of autophagy promotes growth and metastasis of breast cancer cells via activating mTORC2/Akt/FOXO3a signaling pathway[J].Cell Death Dis,2013,4(10): 377-377.
- [21] 杨明珍.乳腺癌中 IBP 的转录调控机制及其意义的初步研究[D].北京: 第三军医大学,2012.
- [22] 陈忠蛟,李鹏,等.RNAi 介导的 IBP 表达抑制对人乳腺癌 MDA\_MB\_231 细胞细胞骨架的影响[J].重庆医学,2013,42(1):1-5.
- [23] 张竹君.IBP 调节乳腺癌细胞 EMT 及促进其转移的分子机制研究[D].第三军医大学,2013.
- [24] Tiwari N,Gheldof A,Tatari M,et al.EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells[J].Semi in Cancer Biol,2012,22(22):194-207.
- [25] 张竹君.特异性 IRF-4 结合蛋白(IBP)多克隆抗体制备及其在人结肠癌中表达模式的初步研究[D].第三军医大学,2009.
- [26] Gulhati P,Bowen KA,Liu J,et al.MTORC1 and mTORC2 regulate EMT,motility,and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways[J].Cancer Res,2011,71(9):3246-3256.
- [27] Chang YJ,Cheng YW,Lin RK,et al.Thrombomodulin influences the survival of patients with non-metastatic colorectal cancer through epithelial-to-mesenchymal transition(EMT) [J].PLoS One,2016,11(8):e0160550.

- [28] Shuman Moss LA, Jensen-Taubman S, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis[J]. *Am J of Pathol*, 2018, 181(6):1895-1899.
- [29] Ishii K, Shimoda M, Sugiura T, et al. Involvement of epithelial-mesenchymal transition in adenoid cystic carcinoma metastasis[J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(4):921-931.
- [30] 熊剑. IBP(IRF-4 结合蛋白)在人涎腺腺样囊性癌中的表达及功能的实验研究[D]. 第三军医大学, 2011.
- [31] Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE, et al. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability[J]. *Nature*, 2005, 436(7047):123-127.
- [32] Menendez D, Inga A, Resnick MA. Potentiating the p53 network[J]. *Discovery Medicine*, 2010, 10(50):94-100.
- [33] Yang M, Fang Y, Peng L, et al. Interferon regulatory factor 4 binding protein is a novel p53 target gene and suppresses cisplatin-induced apoptosis of breast cancer cells[J]. *Mol Cancer*, 2011, 11(1):1-13.

## 攻读硕士学位期间发表的论文

1. 亢夏, 宋汉香, 郭乔楠. IBP与p53在胃腺癌中的表达情况及临床意义[J].第三军医大学学报.已接收。
2. 吕杨帆, 高自然, 彭动斌, 亢夏, 郭乔楠. Src激酶在骨肉瘤U2OS细胞失巢凋亡中的作用[J].西部医学, 2017, 29(2): p168-171.

## 致 谢

在基层工作了四年后，我来到了陆军军医大学攻读研究生课程。转眼间，三年多的学习生活即将结束，回顾这段令人难忘的时光，收获了不少，这将是人生宝贵的成长经历。在这里，我想关心并帮助我的老师和同学们表示深深的谢意！

首先，我衷心感谢我的导师郭乔楠教授，你的指导和教学将是我一生的财富，在读研究生期间，由于种种原因，个人事务一直不断，对研究生学习和科研工作产生很大影响，是你对我学习和生活给予无微不至的关怀和鼓励，让我顺利完成研究生学习。导师渊博的知识、勤奋的精神、严谨的学术态度、谦虚的品质影响着我，让我受益匪浅。在这里，谨向郭老师致以诚挚的谢意！

衷心感谢师姐宋汉香博士在我实验选题、实验设计、科研方法上的支持和帮助，感谢唐雪峰博士、赵郭盛博士、闫广宁博士、高自然硕士、彭动斌硕士在课题进展中的帮助和指导。感谢胡川闽教授惠赠 IBP 抗体。

衷心感谢病理科王亚丽老师、谭秋林老师在免疫组化中给予的帮助和支持，感谢师姐吕扬帆博士及科室秘书曹亚在毕业及答辩相关工作中的帮助和指导。衷心感谢中心试验室给我们提供良好的实验环境及精良的实验设备。

最后，衷心的感谢一直默默支持我的家人，正是你们全力的支持和鼓励，生活的关怀和陪伴，我才能顺利完成学业。在未来的工作研究中，我必须更加努力，不辜负你们的付出和期望。