

谷胱甘肽特异性 γ -谷氨酰转移酶 1 在胃腺癌组织中的表达及其临床意义

陈俊廷, 柳逸楠, 黄志鑫, 陈斯乐, 蔡世荣*

中山大学附属第一医院 胃肠外科中心, 广东 广州 510080

【摘要】 目的 探讨胃癌组织中谷胱甘肽特异性 γ -谷氨酰转移酶 1(CHAC1)表达情况及其临床意义。方法 采用免疫组织化学法检测 CHAC1 在 58 例接受根治性手术切除的胃癌患者的胃癌组织及相应癌旁组织中的表达。应用组织芯片及免疫组织化学法检测在含有预后患者的样本中 CHAC1 的差异表达。结果 CHAC1 在胃癌组织中的阳性率明显低于癌旁组织($P<0.05$);CHAC1 在经过免疫组织化学半定量评分后,通过预后分析发现:胃癌中高表达 CHAC1 基因的患者 5 年生存期较长($P<0.05$)。多因素 Cox 回归分析得出 CHAC1 是胃癌的独立预后因素($P=0.001$;95%CI=0.249~0.622;HR=0.393)。结论 CHAC1 在胃癌组织中高表达,且与较差的生物学行为相关。

【关键词】 谷胱甘肽特异性 γ -谷氨酰转移酶 1; 胃癌

Expression of glutathione-specific γ -glutamyltransferase 1 in gastric adenocarcinoma tissues and its clinical significance

Chen Junting, Liu Yinan, Huang Zhixin, Chen Sile, Cai Shirong*

Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangzhou, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression of glutathione-specific γ -glutamyltransferase 1 (CHAC1) in gastric cancer tissues and its clinical significance. **Methods** The expression of CHAC1 in gastric cancer tissues and corresponding paraneoplastic tissues of 40 gastric cancer patients who underwent radical surgical resection was detected by immunohistochemistry. Tissue microarray and immunohistochemistry were applied to detect the differential expression of CHAC1 in samples containing patients with prognosis. **Results** The positive rate of CHAC1 in gastric cancer tissues was significantly lower than that in paraneoplastic tissues ($P<0.05$); CHAC1 was obtained by post-hoc analysis after IRS immunohistological scoring. Five-year survival was longer in patients with high expression of CHAC1 gene in gastric cancer ($P<0.05$). In addition, CHAC1 was an independent prognostic factor for gastric cancer by Cox multivariate regression analysis ($P=0.001$; 95%CI=0.249-0.622; HR=0.393). **Conclusion** CHAC1 is highly expressed in gastric cancer tissues and is associated with poorer biological behavior.

【Key words】 Glutathione-specific γ -glutamyltransferase 1; Gastric cancer

胃癌(gastric cancer, GC)是世界上第五大最常见的肿瘤和第三大最致命的癌症,全球几乎一半的胃癌病例是在东亚确诊的^[1,2]。大多数胃癌患者第一次诊断是在恶性增殖和转移的晚期^[3]。晚期胃癌患者的预后很差^[4,5]。因此,寻找新的生物标

志物和治疗靶点对胃癌的诊断和治疗是迫切需要的。维持细胞内的抗氧化水平被认为是癌症的一个显著特征,癌细胞通过调节氧化还原水平,有效抵御化疗药物和体内活性氧的损害,从而促进恶性肿瘤的起始与进展。谷胱甘肽(glutathione, GSH)是一种抗氧化剂,在细胞中充当自由基清除剂和解毒剂。在氧化应激下,GSH与活性氧(reactive oxygen species, ROS)自由基反应后被GSH依赖性过氧化物酶转化为氧化型谷胱甘肽^[6-8]。对于癌症,GSH在其进展中起着双重作用。它对于致癌物

基金项目:国家自然科学基金(82173239);广东省自然科学基金(2018A030313634)

第一作者:陈俊廷,医学学士,E-mail:chenjt33@mail2.sysu.edu.cn

*通信作者:蔡世荣,E-mail:caishr@mail.sysu.edu.cn

的去除和解毒至关重要,该途径的改变会对细胞存活产生深远的影响^[9,10]。因此,了解GC中氧化还原和氧自由基水平改变的分子机制对于制定未来的诊断和治疗策略至关重要。

CHAC1 基因编码 γ -谷氨酰环转移酶蛋白家族的成员。在调节体内谷胱甘肽的水平中发挥重要作用,谷胱甘肽是细胞凋亡启动和执行的重要因素^[11]。本研究希望通过免疫组织化学法检测人胃腺癌组织中的 *CHAC1* 表达及预后分析,分析其与临床病理数据之间的关系,探讨胃癌治疗的新靶点。

1 数据与方法

1.1 一般资料 回顾性收集中山大学附属第一医院2004年5月至2008年5月行根治性手术切除的胃癌组织样本及相应癌旁组织。纳入标准:病理诊断胃癌患者;于本单位接受胃癌根治手术;有完整的预后随访数据。排除标准:胃癌发生远处转移患者;合并其他恶性肿瘤患者;病历数据及预后随访资料不全。入选病例117例,另外再前瞻性收集2020年9月至2021年9月行根治性手术切除的胃癌组织及相应癌旁组织。纳入标准及排除标准同前所述。共纳入58例病例,女性20例,男性38例;年龄35~76岁,平均年龄61岁。以胃癌切缘2~5 cm分为胃癌组织和癌旁组织。所有入选病例均经医院伦理委员会批准。

1.2 分组标准 采用免疫组织化学半定量评分标准,记录染色强度和阳性区域。染色指数(0~12)获得的阳性染色强度(无=0,弱=1,中=2,或强的得分=3)和阳性细胞的比例(<10%=1,10~50%=2,51%~75%=3,>75%=4分)。计算 *CHAC1* 的免疫组织化学评分=阳性染色强度 X 组化阳性细胞的比例(0~12),根据 *CHAC1* 的免疫组织化学评分分为高表达组(≥ 6 分)和低表达组(<6分)。

1.3 方法

1.3.1 标本及试剂 *CHAC1* 兔抗人单克隆抗体,(工作浓度1:200),DAB显色剂试剂盒、戊二醛固定液均购自北京中杉金桥有限公司。免疫组织化学法所用标本均经10%甲醛固定,脱水,包埋,5 μm 连续切片。

1.3.2 免疫组织化学 免疫组织化学染色采用Envision法:石蜡切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,置于EDTA缓冲液中,经高压锅120℃ 2 min

抗原修复后,放入3%过氧化氢溶液中30 min,封闭内源性过氧化氢酶,加入一抗 *CHAC1*,置于4℃冰箱过夜孵育,加入Dako二抗,室温孵育1 h,滴加DAB显色剂显色,苏木精复染,脱水,封片。

1.4 统计学方法 使用SPSS 6.0软件进行分析,*CHAC1*在胃癌中的表达情况与临床病理数据之间的关系采用 χ^2 检验,在前瞻性收集的58例患者比较癌与癌旁表达差异采用配对 *t* 检验进行分析,*CHAC1*在胃癌中高低表达的预后分析采用Kaplan-Meier及Cox回归分析方法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 在前瞻性数据中的58例患者,*CHAC1*在胃癌组织与对应的癌旁组织中的表达,通过免疫组织化学染色结果显示,*CHAC1*蛋白表达主要在胞质,阳性结果为棕黄色。由图1可见 *CHAC1*在癌旁组织中阳性区域及颜色均显著高于胃癌组织。另外,我们通过免疫组织化学评分计算出 *CHAC1*分别在胃癌与癌旁组织中的分数。*CHAC1*在癌旁组织中阳性表达率显著高于胃癌组织,差异有统计学意义($P=0.0045$)(图2)。

2.2 在回顾性数据中,我们分析 *CHAC1*在胃癌组织中的表达与常见患者临床病理特征的关系。结果得出在肿瘤大小、淋巴结转移、远处转移、TNM分期中的表达差异无统计学意义($P > 0.05$),而在性别及年龄不同患者的胃癌组织中表达不

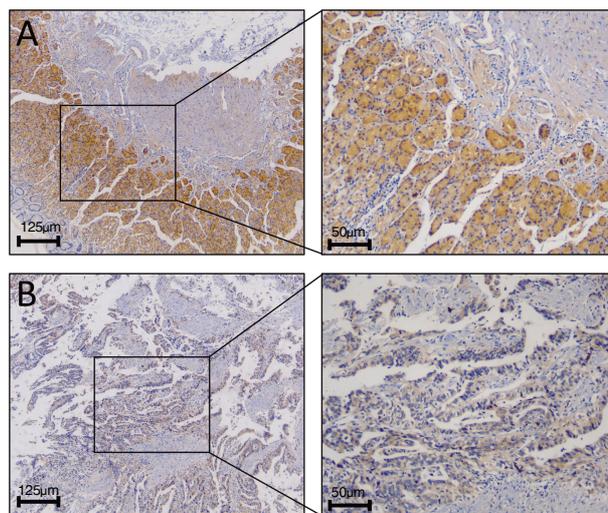


图1 *CHAC1*在胃癌组织及癌旁组织中的表达
注:A, *CHAC1*在癌旁组织中的表达(Envision法);B, *CHAC1*在胃癌组织中的表达(Envision法)。

同,差异有统计学意义($P<0.05$)。女性、年龄 <65 岁患者的 *CHAC1* 阳性表达率高于男性、年龄 >65 岁患者(表1)。

2.3 在回顾性数据中,我们分析 *CHAC1* 在胃癌组织中的高低表达,通过免疫组织化学评分将评分 ≥ 6 分为高表达组; <6 分为低表达组。通过Kaplan-Meier生存分析,在胃癌组织中高表达 *CHAC1* 的患者其5年生存率显著高于低表达 *CHAC1* 的患者,差异存在统计学意义($P<0.01$)(图3)。通过多因素Cox回归分析显示相比于肿瘤大小、淋巴转移与否、远处转移与否、年龄、性别、TNM分期,*CHAC1* 的表达高低更能预测胃癌患者的预后情况($P=0.001$)(图4),并提示胃癌中 *CHAC1* 水

平降低,*CHAC1* 可能是胃癌患者的独立预后因素。

3 讨论

胃癌的发生与发展与体内多方面因素有关,但是始终离不开异常增殖的调控与细胞凋亡的抑制。其中谷胱甘肽在调节细胞凋亡中发挥了至关重要的作用^[11]。GSH是生物体中含量最丰富的抗氧化剂,具有多种功能,其中大部分能维持细胞氧化还原稳态。GSH保留了足够水平的半胱氨酸,并使外源性物质解毒,同时还赋予对癌细胞的治疗抗性^[9,10]。然而,GSH代谢在多种恶性肿瘤中发挥

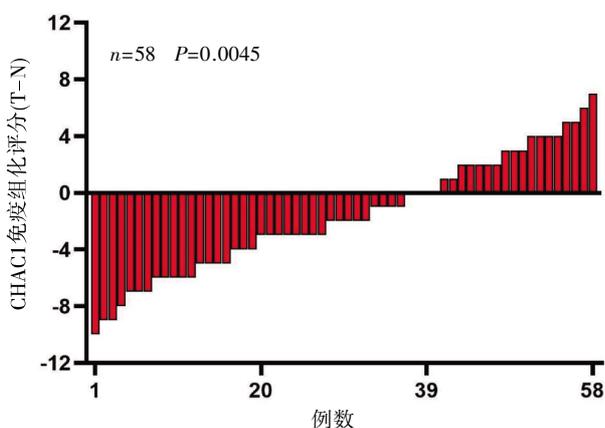


图2 *CHAC1* 在胃癌组织及癌旁组织中的免疫组织化学评分

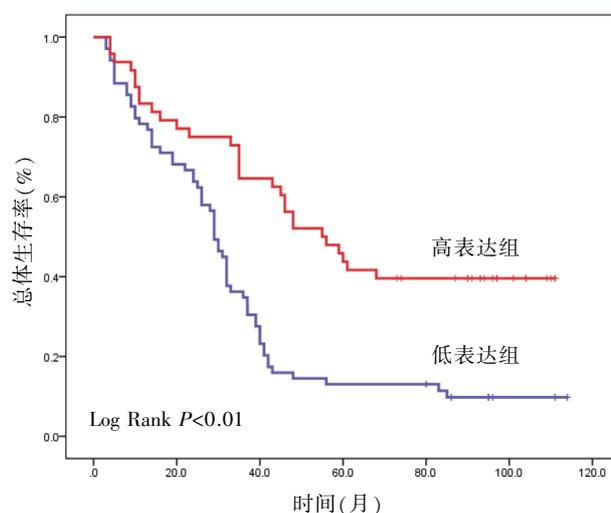


图3 胃癌患者的组织芯片(TMA)中 *CHAC1* 高低表达的生存分析

表1 *CHAC1* 在胃癌组织中的表达与常见患者临床病理特征的关系[例(%)]

参数	例数[例(%)](n=117)	低表达组(n=69)	高表达组(n=48)	χ^2	P
性别				3.894	0.048
男	71(69.9)	47(31.9)	24(50)		
女	46(30.1)	22(68.1)	24(50)		
年龄				4.836	0.028
<60 岁	74(63.2)	38(55.1)	36(75.0)		
>60 岁	43(36.8)	31(44.9)	12(25.0)		
肿瘤大小				2.523	0.112
<5 cm	46(39.3)	23(33.3)	23(47.9)		
>5 cm	71(60.7)	46(66.7)	25(52.1)		
远处转移				0.040	0.842
否	104(88.9)	61(88.4)	43(89.6)		
是	13(11.1)	8(11.6)	5(10.4)		
淋巴转移				0.116	0.733
否	25(21.4)	14(20.3)	11(22.9)		
是	92(78.6)	55(79.7)	37(77.1)		
TNM分期				0.519	0.471
I/II	36(30.8)	23(33.3)	13(27.1)		
III/IV	81(69.2)	46(66.7)	35(72.9)		

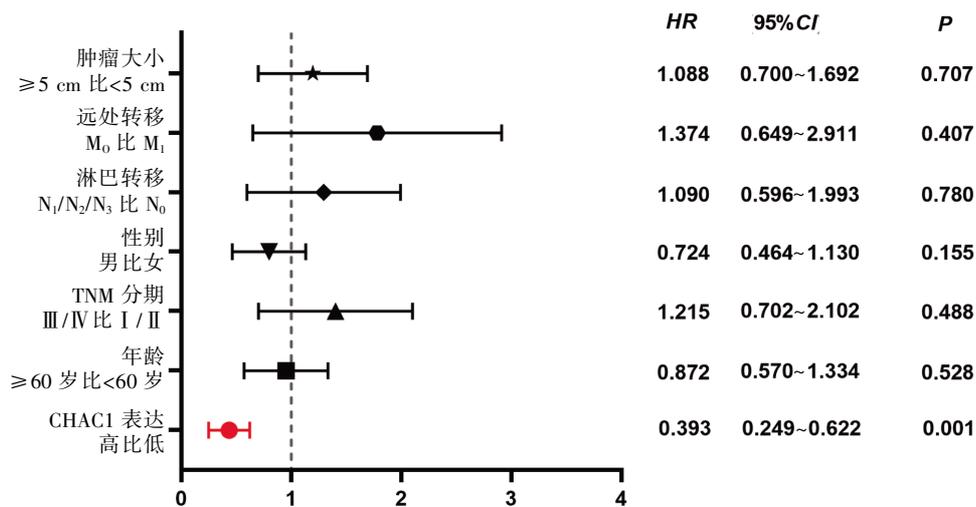


图4 胃癌患者的组织芯片(TMA)中 *CHAC1* 高低表达的多因素 Cox 回归分析

有益和致病作用。对于癌症, GSH 在其进展中起着双重作用。它对于致癌物的去除和解毒至关重要, 该途径的改变会对细胞存活产生深远的影响。然而, 肿瘤细胞中升高的 GSH 水平能够通过赋予对几种化疗药物的抗性来保护骨髓、乳腺癌、结肠癌、喉癌和肺癌中的此类细胞^[9,10]。过量的 GSH 促进肿瘤进展, 其中升高的水平与转移增加相关^[12-13]。

γ 谷氨酰转移酶是一种膜结合酶, 可催化细胞外 GSH 的降解, 有利于产生合成细胞内 GSH 所需的成分谷氨酸和半胱氨酸。该途径也称为 γ 谷氨酰循环^[14], 是从头生物合成途径的替代途径, 在维持细胞内谷胱甘肽和半胱氨酸方面起着重要作用^[15]。 γ 谷氨酰转移酶水平在氧化应激下显著上调, 尤其是在高代谢的癌细胞中^[6,16]。而 *CHAC1* 被认为是编码 γ 谷氨酰转移酶蛋白家族的一个成员。Mungrue 等^[17]在 2009 年首次报道 *CHAC1* 与凋亡之间的关系。*CHAC1/MGC4504* 是未折迭蛋白反应的新型促凋亡成分, 位于 ATF4-ATF3-CHOP 级联下游, 揭示了 *CHAC1* 调控细胞凋亡的新途径。在 2017 年, Kaur 等^[18]的研究发现, *CHAC1* 及其相关家族蛋白催化谷胱甘肽裂解为 5-氧代-L-脯氨酸和 Cys-Gly 二肽。专门作用于谷胱甘肽, 而不作用于其他 γ -谷氨酰肽。

近年来, 铁死亡(ferroptosis)概念陆续被人报导, 其是一种铁依赖性的, 区别于细胞凋亡、细胞坏死、细胞自噬的新型的细胞程序性死亡方式。铁死亡的主要机制是, 在二价铁或酯氧合酶的作用

下, 催化细胞膜上高表达的不饱和脂肪酸, 发生脂质过氧化, 从而诱导细胞死亡; 此外, 还表现为抗氧化体系(GSH 和谷胱甘肽过氧化物酶 4)的表达量的降低^[19]。其中 *CHAC1* 与铁死亡的关系也在近期被广泛关注, *CHAC1* 在肺癌、黑色素瘤、肝癌、胃癌中都有报道相关铁死亡的机制。在胃癌细胞系中, Guan 等^[20]报道在胃癌发现 Tan II A 增加脂质过氧化并上调 Ptgs2 和 *CHAC1* 的表达, 使其介导的铁死亡来抑制胃癌的增殖。在原发性肝癌中, Wang 等^[21]发现双氢青蒿素可能通过启动抗存活 UPR 和上调 *CHAC1* 表达来有效诱导 PLC 细胞中的铁死亡。在本研究当中发现胃癌组织中低表达 *CHAC1* 可能与铁死亡和凋亡机制相关, 在后续验证中我们也会探讨其中相关机制。

治疗癌症一直是我们的主要目的, 化疗药物的选择与使用方法也是我们关注的重点。因此, 耐药机制的探究也是我们所要关注的。GSH 水平的增加与肿瘤细胞的耐药性有关, 通过与药物结合或反应、与活性氧相互作用、防止对蛋白质或 DNA 的损伤或通过参与 DNA 修复过程, GSH 的增加是耐药性的主要促成因素。在黑色素瘤细胞中, GSH 消耗和 γ 谷氨酰转移酶抑制显著增加了氧化应激引起的细胞毒性^[22]。此外, 已经证明过表达 GGT 的细胞对过氧化氢^[23]和化疗药物(如多柔比星^[24]、顺铂^[25]和 5-氟尿嘧啶^[26])具有更强的抵抗力。关于 GSH 在调节顺铂(CDDP)抗性中的作用提出了 3 种机制: GSH 可以作为辅助因子促进 MRP2 介导的 CDDP 在哺乳动物细胞中的流

出;基于对许多 CDDP 抗性细胞过度表达 GSH 和 γ -GCS 的观察,GSH 可作为氧化还原调节细胞保护剂;GSH 可用作铜(Cu)螯合剂。另外,在 Dixon 等^[27]研究也发现抑制逆向转运蛋白系统 xc(-) 能上调 CHAC1 并控制细胞内外胱氨酸、谷氨酸的比例从而调控 GSH 的可用性而达到对药物的抵抗作用。

综上所述,CHAC1 参与癌症的发生发展、凋亡、铁死亡、耐药等机制。在胃癌组织中低表达,与患者癌症发生的年龄与性别可能有关,通过 Cox 分析能有效预测胃癌患者,辅助胃癌临床分期,评估预后。关于 CHAC1 诱导剂的研究能有效促使体内癌细胞走向死亡并能有效促进化疗药物的敏感性为治疗癌症提供了新的方向,也为胃癌患者治疗和预后带来新的前景。

参考文献

- [1] RAWLA P, BARSOUK A. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention [J]. Prz Gastroenterol, 2019, 14(1):26-38.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, SIEGEL RL, TORRE LA, JEMAL A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [3] ISHIMOTO T, MIYAKE K, NANDI T, et al. Activation of Transforming Growth Factor Beta 1 Signaling in Gastric Cancer-associated Fibroblasts Increases Their Motility, via Expression of Rhomboid 5 Homolog 2, and Ability to Induce Invasiveness of Gastric Cancer Cells [J]. Gastroenterology, 2017, 153(1):191-204.e16.
- [4] DIGKLIA A, WAGNER AD. Advanced gastric cancer: Current treatment landscape and future perspectives [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(8):2403-2414.
- [5] RUGGE M, MEGGIO A, PRAVADELLI C, et al. Gastritis staging in the endoscopic follow-up for the secondary prevention of gastric cancer: a 5-year prospective study of 1755 patients [J]. Gut, 2019, 68(1):11-17.
- [6] LU SC. Regulation of glutathione synthesis. Mol Aspects Med, 2009, 30(1-2):42-59.
- [7] LUO JL, HAMMARQVIST F, ANDERSSON K, WERNERMAN J. Surgical trauma decreases glutathione synthetic capacity in human skeletal muscle tissue [J]. Am J Physiol, 1998, 275(2):E359-E365.
- [8] LUSHCHAK VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions [J]. J Amino Acids, 2012, 2012:736837.
- [9] WU G, FANG YZ, YANG S, LUPTON JR, TURNER ND. Glutathione metabolism and its implications for health [J]. J Nutr, 2004, 134(3):489-492.
- [10] LU SC. Glutathione synthesis [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830(5):3143-3153.
- [11] YU X, LONG YC. Crosstalk between cystine and glutathione is critical for the regulation of amino acid signaling pathways and ferroptosis [J]. Sci Rep, 2016, 6:30033.
- [12] CARRETERO J, OBRADOR E, ANASAGASTI MJ, MARTIN JJ, VIDAL-VANACLOCHA F, ESTRELA JM. Growth-associated changes in glutathione content correlate with liver metastatic activity of B16 melanoma cells [J]. Clin Exp Metastasis, 1999, 17(7):567-574.
- [13] HUANG ZZ, CHEN C, ZENG Z, et al. Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration [J]. FASEB J, 2001, 15(1):19-21.
- [14] TRAVERSO N, RICCIARELLI R, NITTI M, et al. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance [J]. Oxid Med Cell Longev, 2013, 2013:972913.
- [15] ZHANG H, FORMAN HJ. Redox regulation of gamma-glutamyl transpeptidase [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009, 41(5):509-515.
- [16] ALANAZI AM, MOSTAFA GA, AL-BADR AA. Glutathione [J]. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol, 2015, 40:43-158.
- [17] MUNGRUE IN, PAGNON J, KOHANNIM O, GARGALOVIC PS, LUSIS AJ. CHAC1/MGC4504 is a novel proapoptotic component of the unfolded protein response, downstream of the ATF4-ATF3-CHOP cascade [J]. J Immunol, 2009, 182(1):466-476.
- [18] KAUR A, GAUTAM R, SRIVASTAVA R, et al. ChaC2, an Enzyme for Slow Turnover of Cytosolic Glutathione [J]. J Biol Chem, 2017, 292(2):638-651.
- [19] TANG D, KANG R, BERGHE TV, VANDENABEELE P, KROEMER G. The molecular machinery of regulated cell death [J]. Cell Res, 2019, 29(5):347-364.
- [20] GUAN Z, CHEN J, LI X, DONG N. Tanshinone IIA induces ferroptosis in gastric cancer cells through p53-mediated SLC7A11 down-regulation [J]. Biosci Rep, 2020, 40(8):BSR20201807.
- [21] WANG Z, LI M, LIU Y, et al. Dihydroartemisinin triggers ferroptosis in primary liver cancer cells by promoting and unfolded protein response-induced upregulation of CHAC1 expression [J]. Oncol Rep, 2021, 46(5):240.
- [22] BENLLOCH M, ORTEGA A, FERRER P, et al. Acceleration of glutathione efflux and inhibition of gamma-glutamyltranspeptidase sensitize metastatic B16 melanoma cells to endothelium-induced cytotoxicity [J]. J Biol Chem, 2005, 280(8):6950-6959.
- [23] SHI M, GOZAL E, CHOY HA, FORMAN HJ. Extracellular glutathione and gamma-glutamyl transpeptidase prevent H2O2-induced injury by 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone [J].

- Free Radic Biol Med, 1993, 15(1):57-67.
- [24] HOCHWALD SN, ROSE DM, BRENNAN MF, BURT ME. Elevation of glutathione and related enzyme activities in high-grade and metastatic extremity soft tissue sarcoma[J]. Ann Surg Oncol, 1997, 4(4):303-309.
- [25] GODWIN AK, MEISTER A, O'DWYER PJ, HUANG CS, HAMILTON TC, ANDERSON ME. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(7):3070-3074.
- [26] LEWIS AD, HAYES JD, WOLF CR. Glutathione and glutathione-dependent enzymes in ovarian adenocarcinoma cell lines derived from a patient before and after the onset of drug resistance: intrinsic differences and cell cycle effects [J]. Carcinogenesis, 1988, 9(7):1283-1287.
- [27] DIXON SJ, PATEL DN, WELSCH M, et al. Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis[J]. Elife, 2014, 3: e02523.

·读者·作者·编者·

本刊最新出版发行情况说明

《消化肿瘤杂志(电子版)》(ISSN 1674-7402, CN 11-9301/R)是国家卫生健康委员会主管、人民卫生出版社有限公司主办的消化肿瘤专业电子学术期刊。本刊目前为中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊),被《中国核心期刊(遴选)数据库》《中国学术期刊网络出版总库》《中文科技期刊数据库》全文收录。本刊旨在为广大医务工作者提供了一个优秀的专业论文发表和交流平台。本刊出版发行量大、覆盖范围广,在国内具有一定的影响力。欢迎各位同仁向本刊投稿,同时欢迎订阅。