

## 基于 GEO 数据库研究缺氧肺癌中 GBE1 的表达和意义

丁翔<sup>1,2</sup>, 葛圣林<sup>1</sup>, 张朝东<sup>2</sup>

**摘要** **目的** 探讨糖原分支酶 1 (GBE1) 在缺氧肺癌组织和细胞中的表达情况, 评估其对肺癌缺氧耐受的意义, 并探讨其影响肺癌凋亡的机制。**方法** 通过 GEO 数据库下载含 20 例缺氧肺癌和常氧肺癌组织基因芯片的数据, 结合 GCBI 平台, 筛选差异基因进行 GO 和 KEGG 通路分析; 体外培养 A549 细胞, 敲降或高表达 GBE1, 缺氧处理后, MTT 法检测细胞活力, Western blot 和 Real-time PCR 检测凋亡相关基因的表达。**结果** 20 例肺癌标本中, 差异基因共 206 个, GBE1 为差异最显著, GO 及 KEGG 通路分析后发现差异基因涉及细胞周期、细胞代谢等多个通路; A549 细胞缺氧处理后 GBE1 表达水平显著升高, 敲降 GBE1 能显著增强 A549 细胞缺氧处理后细胞凋亡相关分子的表达, 高表达 GBE1 能够抑制细胞凋亡相关分子的表达。**结论** GBE1 可能是潜在的造成肺癌缺氧耐受的分子标志物, 为进一步研究肺癌的缺氧耐受机制提供参考。

**关键词** 肺癌; 缺氧; GBE1; 基因芯片

**中图分类号** R 734.2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2018)03-0359-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.006

肺癌是最常见的恶性肿瘤, 其发病率和死亡率均位居全球癌症首位<sup>[1]</sup>。最新研究<sup>[2]</sup>显示, 2015 年我国因肺癌死亡 61 万例, 占有癌症死亡人数的 21.7%, 死亡率居我国各种癌症死亡率之首。非小细胞肺癌 (normal small cell carcinoma, NSCLC) 是肺癌最常见的类型, 约占肺癌总数的 87%。研究<sup>[3]</sup>显示, 肿瘤微环境对肿瘤的增殖、侵袭、迁移、黏附能力及新生血管的形成有重要影响, 是肿瘤不断恶化并发生转移的重要原因。而缺氧在细胞增殖、血管生

成、免疫监控、新陈代谢, 以及肿瘤的侵袭转移中发挥着重要作用<sup>[4]</sup>。肿瘤细胞在应对缺氧微环境时, 能够上调葡萄糖转运蛋白和糖酵解相关酶的表达。葡萄糖是肿瘤无氧酵解主要的能量供给物质, 在细胞中能够以糖原的形式储存, 储存糖原是肿瘤细胞在应对缺氧和营养不足时的能量来源和生存保障。有研究<sup>[5]</sup>表明, 低氧刺激能够提高肿瘤细胞中糖原水平, 并诱导糖原代谢相关酶的转录表达。低氧引发的糖原合成升高, 与糖原合成相关酶的表达水平升高相关, 包括 UGP2、GYS1、GBE1、PGM 和 PPP1R3C。

糖原分支酶 (glucogen branching enzyme 1, GBE1) 是一种葡萄糖基转移酶, 属  $\alpha$ -淀粉酶家族成员。在糖原合成的过程中, 能够催化水解  $\alpha$ -1,4-糖苷键, 将直链糖转化成分支糖<sup>[6]</sup>。有报道<sup>[7-8]</sup>称 GBE1 在卵巢癌、宫颈癌等肿瘤中的表达水平不同, 可能与肿瘤的发生发展密切相关。但 GBE1 在肺癌中的作用尚未有报道。因此, 该研究以 GEO 数据库为基础, 首次探讨 GBE1 在肺癌缺氧状态下抑制细胞凋亡的作用。

### 1 材料与方法

**1.1 试剂** 人非小细胞肺癌细胞 A549 细胞购自中国科学院上海细胞库; Lipo2000、青霉素-链霉素溶液、PVDF 膜和预染蛋白 Marker 购自美国 Life technology 公司; 30% 甲叉双丙烯酰胺溶液购自南京厚百公司; ECL 发光液购自美国 Millipore 公司; SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、细胞裂解液、PMSF 和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; GBE1 siRNA (货号: sc-78413) 及对照 siNC 购自美国 Santa Cruz 公司; GBE1 质粒和对照质粒购自上海吉玛制药技术有限公司;  $\beta$ -actin (货号: ab8226) 和 GBE1 (货号: ab180596) 抗体购自美国 Abcam 公司; cleaved-caspase-3 (货号: #9664)、bax (货号: #2774) 和 bcl-2 (货号: #4223) 抗体购自美国 CST 公司; Real-time PCR 引物由南京金斯瑞公司设计合成; 逆转录试剂盒 (货号: RR047A) 与 SYBR (货号: RR430A) 购自大连 TaKaRa 有限公司。

2017-11-28 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: KJ2013Z108)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学第一附属医院心胸外科, 合肥 230022

<sup>2</sup> 安徽省胸科医院胸外一科, 合肥 230032

作者简介: 丁翔, 男, 硕士研究生, 主治医师, 责任作者, E-mail: 394024310@qq.com

**1.2 仪器** 全自动酶标仪(美国 Bio Rad 公司);三气培养箱(型号 3131,美国 Thermo 公司);Step one Plus Real-time PCR 扩增仪(美国 Life technology 公司);Tanon 5200 全自动化学发光图像分析系统(上海天能公司)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 基于 GEO 肺癌芯片数据的生物信息学分析

在基因表达汇编(gene expression omnibus, GEO)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载肺癌基因芯片数据。每个数据集均需符合以下条件:①数据集来自全基因组 RNA 表达芯片;②实验使用人类缺氧肺癌组织与常氧肺癌组织对照。经过筛选,下载基因表达谱公共数据集 GSE30979<sup>[9]</sup>中 10 例缺氧组织和 10 例常氧组织。将这两组芯片数据导入 GCBI(<https://www.gcbi.com.cn>)在线平台进行差异基因分析,并对差异基因进行 Gene ontology 功能富集分析(GO 分析),最后基于 KEGG 数据库进行信号通路富集分析。

**1.3.2 细胞常氧和低氧培养** 细胞常氧培养的条件:A549 细胞用含 10% FBS、100 U/ml 青霉素及 100 mg/ml 链霉素的 DMEM 培养基,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养。细胞低氧培养的条件:培养液同常氧培养的细胞,置于 37 °C、O<sub>2</sub> 体积分数为 1%、CO<sub>2</sub> 体积分数为 5% 和 N<sub>2</sub> 体积分数为 94% 的三气培养箱中培养 24 h<sup>[10]</sup>。6 孔板每孔转染 50 pmol siRNA,96 孔板每孔转染 5 pmol siRNA。将 siRNA 与 Lipofectamine 2000 混合加入无血清 DMEM 培养基中,混匀后室温静置 5 min,加入培养板中继续培养 24 h 后进行缺氧处理。A549 细胞以 5 × 10<sup>5</sup> 个/ml 的密度接种于 6 孔板中,转染 siGBE1 或高表达 GBE1 的质粒 24 h 后,缺氧处理 24 h,Western blot 检测细胞 GBE1、cleaved-caspase-3、bcl-2 和 bax 蛋白表达水平,real-time PCR 法检测细胞 GBE1、bcl-2 和 bax mRNA 水平。

**1.3.3 MTT 法检测 GBE1 对 A549 缺氧后细胞活力的影响** 将 A549 悬液调整为 1 × 10<sup>5</sup> /ml,接种于 96 孔培养板,每孔 200 μl,分别用 Lipofectamine 2000 转染空白质粒和 GBE1 质粒,每组 6 个复孔,48 h 后各孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl,继续培养 4 h 后,弃去培养基,每孔加入 200 μl DMSO,测定在 570 nm 下的吸光度。

**1.3.4 Real-time PCR** A549 细胞接种于 6 孔板中,加入 TRIzol 提取 RNA,根据试剂盒反应体系逆转录合成 cDNA,进行 Real-time PCR 检测。以 GAP-

DH 为内参计算 mRNA 相对表达量,各指标的 PCR 引物序列如下: GAPDH 上游引物: 5'-TGTGGGCAT-CAATGGATTTGG-3',下游引物: 5'-ACACCATGTAT-TCCGGGTCAAT-3'; GBE1 上游引物: 5'-GGAGATCGACCCGTAATTGAA-3',下游引物: 5'-ACATCTGTGGACGCCAAATGA-3'; bcl-2 上游引物: 5'-GTCTTCGCTGCGGAGATCAT-3',下游引物: 5'-CATTCCGATATACGCTGGGAC-3'; bax 上游引物: 5'-CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG-3',下游引物: 5'-CCAGCCCATGATGTTCTGAT-3'; 按以下条件进行 PCR 扩增反应: 扩增曲线的反应条件为 95 °C、5 min 1 个循环,95 °C、5 s、60 °C、60 s,共 40 个循环;熔解曲线的反应条件为 95 °C、15 s、60 °C、30 s、95 °C、15 s,之后用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法定量分析目的基因表达情况。

**1.3.5 Western blot 检测 caspase-3、bax 和 bcl-2 蛋白表达** 取对数生长期的细胞,以 1 × 10<sup>5</sup> 个/ml 接种在 6 孔培养板内,待细胞生长至融合度为 70% 时转染 siNC 和 siGBE1,缺氧处理 24 h 后每孔用 100 μl RIPA 裂解细胞,12 000 r/min 离心后取上清液。BCA 法测量样品中总蛋白浓度。取蛋白样品(30 μg/孔)加入 10% 聚丙烯酰胺凝胶,经电泳、转膜、5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗(cleaved-caspase-3、bax 和 bcl-2 按 1 : 1 000 稀释)4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,加入相应二抗(1 : 5 000 稀释),常温孵育 1 h,最后加 ECL 发光液,用天能 5200 曝光仪拍照。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS 20.0 和 GraphPad Prism 5 统计学软件进行数据处理,实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 差异基因** GCBI 平台对上传的原始芯片数据,首先进行芯片信号值的预处理与预过滤,然后使用差异分析方法,对 2 组基因芯片数据进行差异基因的筛选。差异基因的筛选条件为: *Q* 值 < 0.05,得到 206 个差异基因,其中上调的基因 82,下调的基因 124。本研究选取差异最大的 20 个基因进行排序并聚类分析。基因表达谱的聚类结果见图 1,GBE1 在缺氧肺癌组织中的表达水平较常氧组织相比升高 2.32 倍,是两组基因芯片差异最大的基因。

**2.2 GO 富集分析** 将 206 个差异基因用 DAVID 软件进行 GO 富集分析(*FDR* < 0.01),结果显示这些基因富集在细胞周期、细胞增殖等生物学进程和

表1 GO富集分析结果

名次	GO ID	GO 名称	差异基因数	FDR
1	GO:000236	有丝分裂前中期	14	$2.30 \times 10^{-14}$
2	GO:0000087	有丝分裂细胞周期的M期	17	$2.30 \times 10^{-14}$
3	GO:0030968	内质网未折叠蛋白反应	13	$3.06 \times 10^{-14}$
4	GO:0051301	细胞分裂	19	$3.17 \times 10^{-14}$
5	GO:0000278	有丝分裂细胞周期	20	$7.71 \times 10^{-14}$
6	GO:0006987	参与未折叠蛋白反应信号转导蛋白活性的激活	10	$6.73 \times 10^{-11}$
7	GO:0044267	细胞蛋白质代谢过程	19	$4.06 \times 10^{-10}$
8	GO:0000090	有丝分裂后期	11	$3.89 \times 10^{-8}$
9	GO:0007018	基于微管的运动	8	$1.77 \times 10^{-7}$
10	GO:0018401	脯氨酸羟基化为4-羟基-L-脯氨酸	4	$8.79 \times 10^{-7}$
11	GO:0005975	碳水化合物代谢过程	12	$4.45 \times 10^{-6}$
12	GO:0007077	核分裂解体	4	$1.01 \times 10^{-5}$
13	GO:0007067	有丝分裂	9	$1.57 \times 10^{-5}$
14	GO:0044281	小分子代谢过程	22	$1.81 \times 10^{-5}$
15	GO:0019886	通过MHC CLA处理和展示外源肽抗原	7	$1.92 \times 10^{-5}$
16	GO:0030433	内质网相关蛋白分解代谢过程	5	$3.81 \times 10^{-5}$
17	GO:0007059	染色体分离	6	$3.81 \times 10^{-5}$
18	GO:0006457	蛋白质折叠	8	$8.80 \times 10^{-5}$
19	GO:0000086	有丝分裂细胞周期的转变	7	$9.84 \times 10^{-5}$
20	GO:0000070	有丝分裂姐妹染色单体分离	4	$1.03 \times 10^{-4}$

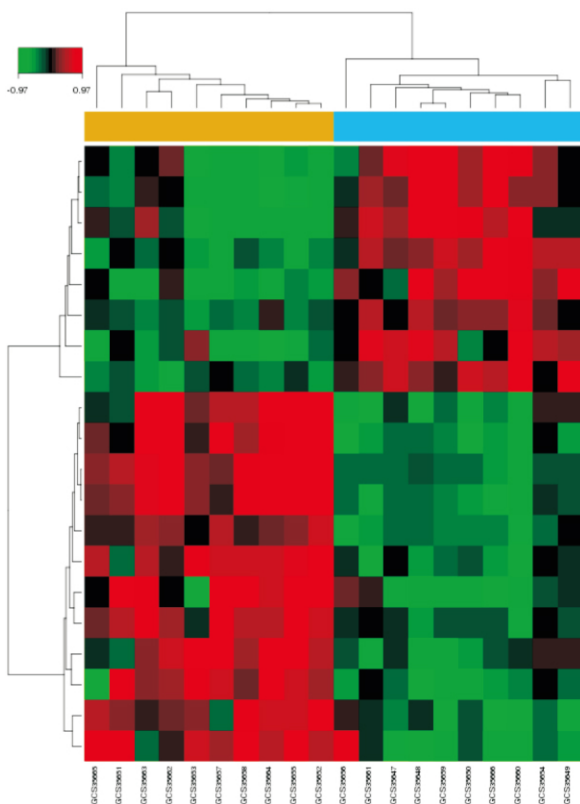


图1 差异基因的聚类图

注:红色代表相对较高的表达,绿色代表相对较低的表达,黑色代表没有变化,每一列代表一个样本,每一行代表一个基因

核分裂调控等分子功能上。GO富集排名前20的结果见表1。由表1可知,肺癌组织缺氧可能会影响

GBE1所涉及的碳水化合物代谢过程(GO:0005975)和小分子代谢过程(GO:0044281)。

**2.3 KEGG 通路分析** 将206个差异基因进行KEGG通路分析,结果显示这些基因显著富集于内质网蛋白加工信号通路、HIF-1信号通路、细胞周期、细胞代谢等30个有统计学意义的相关通路( $P < 0.05$ ),Pathway分析排名前10的通路见表2。

表2 KEGG通路分析结果

排名	通路ID	通路名	差异基因数	FDR
1	4141	内质网蛋白加工	10	$9.22 \times 10^{-7}$
2	4066	HIF-1信号通路	8	$2.85 \times 10^{-6}$
3	4110	细胞周期	8	$6.48 \times 10^{-6}$
4	4914	孕酮调节的卵母细胞成熟	7	$6.51 \times 10^{-6}$
5	1100	代谢通路	20	$1.46 \times 10^{-5}$
6	4114	卵母细胞有丝分裂	6	$4.18 \times 10^{-4}$
7	51	果糖和甘露醇代谢	4	$6.41 \times 10^{-4}$
8	330	精氨酸和脯氨酸代谢	4	$3.50 \times 10^{-3}$
9	3060	蛋白输出	3	$3.66 \times 10^{-3}$
10	5211	肾细胞癌	4	$4.96 \times 10^{-3}$

**2.4 GBE1对A549缺氧后的细胞活力的影响** 与常氧组相比,缺氧可以分别增加A549细胞GBE1蛋白和mRNA水平( $2.67 \pm 0.28$ )倍( $P = 0.0091$ )和( $2.45 \pm 0.31$ )倍( $P = 0.0085$ );转染siGBE1后,A549细胞GBE1的蛋白和mRNA水平分别降低( $0.52 \pm 0.09$ )倍( $P = 0.0078$ )和( $0.45 \pm 0.07$ )倍( $P = 0.0083$ )倍;转染GBE1高表达质粒后,A549

细胞 GBE1 的蛋白和 mRNA 的表达水平分别升高 (3.39 ± 0.54) 倍 (P = 0.000 3) 和 (5.53 ± 0.64) 倍 (P = 0.000 6), 见图 2A、2B。

缺氧 24 h 后, MTT 法检测细胞增殖活性。结果显示, 与正常组相比, 缺氧组 A549 细胞活力降低至 (0.41 ± 0.06) 倍 (P = 0.006 2), 转染 siGBE1 后 A549 细胞活力进一步降低至 (0.23 ± 0.04) 倍 (P = 0.032 1), 而高表达 GBE1 可以升高缺氧造成的细胞活力至 (0.89 ± 0.12) 倍 (P = 0.007 7), 见图 2C。

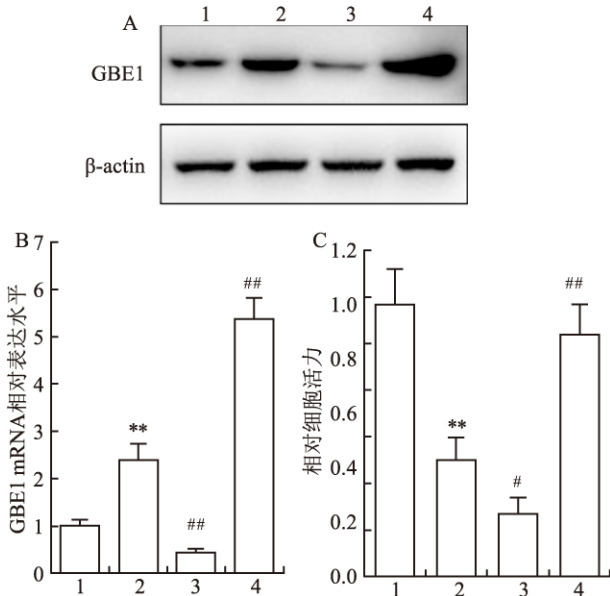


图2 GBE1 对 A549 缺氧后的细胞活力的影响

A: Western blot 检测 A549 细胞 GBE1 蛋白的表达水平; B: Real-time PCR 检测 A549 细胞 GBE1 mRNA 水平; C: MTT 法检测 A549 细胞活力; 1: 常氧对照组; 2: 缺氧组; 3: siGBE1 + 缺氧组; 4: GBE1 + 缺氧组; 与常氧对照组比较: \*\* P < 0.01; 与缺氧组比较: # P < 0.05, ## P < 0.01

**2.5 GBE1 对 A549 细胞缺氧处理后 caspase-3、bax 和 bcl-2 表达的影响** 与常氧组相比, 缺氧能够显著增强 cleaved-caspase-3 和 bax 蛋白表达水平 (5.48 ± 0.43) 倍 (P = 0.000 2) 和 (4.29 ± 0.37) 倍 (P = 0.000 9), 降低 bcl-2 表达至 (0.21 ± 0.06) 倍 (P = 0.008 1)。敲降 GBE1 能够进一步上调 cleaved-caspase-3 和 bax 表达 (6.98 ± 0.67) 倍 (P = 0.001 3) 和 (6.72 ± 0.90) 倍 (P = 0.008 3) 倍, 降低 bcl-2 表达至 (0.13 ± 0.02) 倍 (P = 0.012 9), 促进细胞凋亡。而高表达 GBE1 可以降低 cleaved-caspase-3 和 bax 表达水平分别至 (1.48 ± 0.23) 倍 (P = 0.001 2) 和 (2.78 ± 0.36) 倍 (P = 0.001 2), 升高 bcl-2 蛋白和 mRNA 表达水平至 (0.88 ± 0.06) 倍 (P = 0.002 5) 和 (0.78 ± 0.11) 倍 (P = 0.002 3), 逆转缺氧造成的细胞凋亡。见图 3。

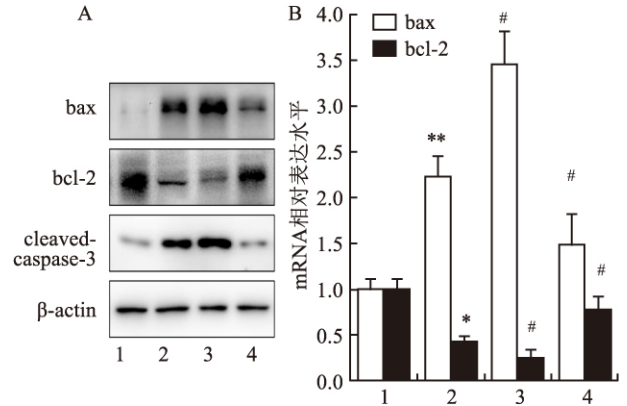


图3 GBE1 对 A549 细胞缺氧处理后 caspase-3、bax 和 bcl-2 表达的影响

A: Western blot 检测 A549 细胞 cleaved-caspase-3、bcl-2 和 bax 蛋白的表达水平; B: Real-time PCR 检测 A549 细胞 bax 和 bcl-2 mRNA 水平; 1: 常氧对照组; 2: 缺氧组; 3: siGBE1 + 缺氧组; 4: GBE1 + 缺氧组; 与常氧对照组比较: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01; 与缺氧组比较: # P < 0.05

### 3 讨论

近年来, 随着我国环境污染加重、人口老龄化加剧, 肺癌的发病率和死亡率居高不下。这一方面是由于肿瘤侵袭转移、易感人群遗传基因异常等引起, 另一些方面是由于肺癌细胞产生多药耐药、侵袭转移的分子机制不明<sup>[11]</sup>。因此, 深入研究肺癌细胞的生物学行为及其分子机制, 可以更加准确的评估患者的预后, 并找出新的药物治疗靶点。本研究通过分析 GEO 数据库和 GCBI 分析平台首次发现, GBE1 在缺氧肺癌组织中异常高表达, 可能与肺癌的缺氧耐受和代谢异常相关。为进一步揭示 GBE1 在肺癌缺氧耐受中作用机制, 笔者分别向 A549 细胞转染 siRNA 和 GBE1 的质粒, 在缺氧条件下检测 A549 细胞的活力, Western blot 和 Real-time PCR 检测凋亡相关基因和蛋白的表达水平, 探讨 GBE1 在缺氧肺癌中的意义。

随着生物信息学的发展, 基因芯片作为一种高效、大规模获取生物信息的技术得到越来越广泛的应用。GEO 数据库是由美国国家生物技术中心 (national center of Biotechnology Information, NCBI) 开发的用于存储和查询基因芯片数据的综合性数据库, 为全世界生物工作者进行数据挖掘提供了良好的平台<sup>[12]</sup>。本研究显示, 在缺氧肺癌组织中 GBE1 异常高表达, 这可能与肺癌的缺氧耐受有关; 对差异基因进行 GO 分析和信号通路富集分析, 发现肺癌组织缺氧可能会影响 GBE1 所涉及的碳水化合物代谢过程和小分子代谢过程, 而这些差异基因显著富

集于细胞代谢等信号通路。这些结果同样证实, GBE1 在肺癌缺氧耐受中具有十分重要的作用。

糖原分支的形成一方面增加了糖原水溶性, 有利于其贮存, 另一方面可为糖原结合蛋白提供对接位点<sup>[13]</sup>。糖原不仅能够在无氧的条件下快速代谢为 ATP, 为肿瘤细胞应对营养和氧气匮乏时提供能量支持, 维持细胞的生存, 而且在蛋白翻译后的修饰、生物合成以及抗氧化保护过程中发挥重要作用<sup>[14]</sup>。但是 GBE1 在肺癌缺氧耐受中的作用却鲜有报道。

本研究分别向 A549 细胞转染 siGBE1 和 GBE1 高表达质粒, 缺氧处理 24 h 后, 检测 GBE1 的蛋白和 mRNA 表达水平, 发现缺氧能够增加 A549 细胞 GBE1 蛋白和 mRNA 的表达。通过 MTT 法检测细胞活力, Western blot 和 Real-time PCR 检测凋亡相关 cleaved-caspase-3、bcl-2 和 bax 表达水平, 发现转染敲降 GBE1 后, 可以加重缺氧造成的细胞活力降低, 增加促凋亡因子 cleaved-caspase-3、bax 的表达水平, 降低凋亡抑制因子 bcl-2 的表达水平, 从而促进细胞凋亡; 高表达 GBE1 则有相反的效果。因此, GBE1 能够促进肺癌细胞缺氧条件下的代谢, 从而使细胞产生缺氧耐受, 抑制 GBE1 的表达可以抑制肺癌细胞的缺氧耐受, 促进细胞凋亡。

通过 GEO 基因芯片数据库进行数据挖掘的方法寻找新靶点和研究方向具有便捷、数据量大的特点, 但还需要设计实验进行验证。本实验利用数据库发现 GBE1 的表达与肺癌缺氧显著相关, 并通过 A549 细胞设计试验验证了这一结果, 证明了 GBE1 在肺癌缺氧耐受中的作用。综上所述, GBE1 可以作为治疗肺癌缺氧耐受的新靶点, 为未来肺癌临床治疗的研究提供新的方向。

#### 参考文献

[1] Manegold C and Thatcher N. Survival improvement in thoracic cancer: progress from the last decade and beyond [J]. *Lung Cancer*, 2007, 57 Suppl 2(2): S3.

[2] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115–32.

[3] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment [J]. *Cell*, 2010, 141(1): 52–67.

[4] Zeng W, Liu P, Pan W, et al. Hypoxia and hypoxia inducible factors in tumor metabolism [J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(2): 263–7.

[5] Zois C E, Favaro E, Harris A L. Glycogen metabolism in cancer [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2014, 92(1): 3–11.

[6] Said S M, Murphree M I, Mounajjed T, et al. A novel GBE1 Gene variant in a child with glycogen storage disease type IV [J]. *Hum Pathol*, 2016, 54: 152–6.

[7] Cody N A, Shen Z, Ripeau J S, et al. Characterization of the 3p12.3-pcen region associated with tumor suppression in a novel ovarian cancer cell line model genetically modified by chromosome 3 fragment transfer [J]. *Mol Carcinog*, 2009, 48(12): 1077.

[8] Lando M, Wilting S M, Snipstad K, et al. Identification of eight candidate target genes of the recurrent 3p12-p14 loss in cervical cancer by integrative genomic profiling [J]. *J Pathol*, 2013, 230(1): 59–69.

[9] Leithner K, Wohlkoenig C, Stacher E, et al. Hypoxia increases membrane metallo-endopeptidase expression in a novel lung cancer ex vivo model – role of tumor stroma cells [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(1): 40.

[10] Wu H M, Jiang Z F, Ding P S, et al. Hypoxia-induced autophagy mediates cisplatin resistance in lung cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 12291.

[11] De M S, Consonni D, Bertazzi P A. Exposure to occupational carcinogens and lung cancer risk. Evolution of epidemiological estimates of attributable fraction [J]. *Acta Biomed*, 2008, 79 Suppl 1 (suppl 1): 34.

[12] Barrett T, Wilhite S E, Ledoux P, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets-update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Database issue): D991–5.

[13] Ritterson L C, Guin S, Theodorescu D. Targeting glycogen metabolism in bladder cancer [J]. *Nat Rev Urol*, 2015, 12(7): 383–91.

[14] Zois C E, Harris A L. Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2016, 94(2): 137.

## The study of expression and significance of GBE1 in hypoxic lung cancer based on GEO database

Ding Xiang<sup>1,2</sup>, Ge Shenglin<sup>1</sup>, Zhang Chaodong<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

<sup>2</sup>Dept of Thoracic Surgery, Anhui Provincial Chest Hospital, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the expression of glucogen branching enzyme 1 ( GBE1) in hypoxic lung

## FAM96B 在胃癌组织中的表达及其对胃癌细胞增殖凋亡和侵袭转移的影响

叶家欣<sup>1</sup>, 王世杰<sup>1</sup>, 马丹丹<sup>1</sup>, 蔡 逊<sup>1</sup>, 张智勇<sup>1</sup>, 张建新<sup>1</sup>, 田 俊<sup>2</sup>

**摘要 目的** 观察 96 序列相似的家庭成员 B (FAM96B) 在 80 例胃癌组织中的表达, 分析表达差异与胃癌生物学特征的关系, 并探讨 FAM96B 对胃癌细胞系 SGC7901 细胞增殖及凋亡的影响。**方法** 采用 Western blot 法检测 FAM96B 蛋白在 80 例胃癌组织及配对癌旁组织中的表达, 并统计分析 FAM96B 蛋白表达差异与胃癌临床病理特征之间的相关性。采用脂质体转染法将含人 FAM96B 全长序列的 pcDNA3.1-myc-FAM96B 重组质粒转染至 SGC7901 细胞中, 分别采用 MTT 法及流式细胞术检测 FAM96B 过表达对 SGC7901 增殖和凋亡的影响。**结果** Western blot 结果显示 FAM96B 在癌旁组织中的蛋白表达水平显著高于胃癌组织 ( $t = 25.218, P < 0.05$ )。胃癌组织中 FAM96B 表达水平与胃癌浸润深度、淋巴结转移、远处转移及 TNM 分期显著相关 ( $P < 0.05$ ), 然而与患者性别、年龄、肿瘤大小无关。MTT 细胞实验结

果表明: FAM96B 组吸光度值显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。细胞凋亡检测结果显示: 过表达 FAM96B 组的细胞凋亡率高于对照组 ( $t = 85.585, P < 0.05$ )。**结论** FAM96B 在人胃癌组织中表达显著下降, 其表达水平与胃癌的发生发展、侵袭转移有密切相关。过表达 FAM96B 可抑制胃癌细胞增殖且诱导其凋亡。

**关键词** 96 序列相似的家庭成员 B; 胃癌; 表达; 增殖; 凋亡; 侵袭转移

**中图分类号** R 735.2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2018)03-0364-04  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.007

胃癌的形成和转移涉及到癌基因的激活、抑癌基因的失活及由此引起的各种细胞生物学行为的改变<sup>[1-2]</sup>。96 序列相似的家庭成员 B (family with sequence similarity 96, member B, FAM96B) 是分子量为  $18 \times 10^3$  的小分子蛋白, 其生物学功能尚不明确<sup>[3]</sup>。目前研究<sup>[4-5]</sup>显示, FAM96B 作为潜在抑癌基因参与肿瘤的发生发展、侵袭转移及血管形成。FAM96B 在人肝癌、结肠癌组织中低表达, 成为癌症潜在的诊断和治疗靶点<sup>[6-9]</sup>。但是 FAM96B 在胃癌发生发展中的功能尚未见报道。该研究旨在观察

2017-11-17 接收

基金项目: 湖北省自然科学基金(编号: 2012FFB06805); 国家自然科学基金(编号: 81350006)

作者单位: <sup>1</sup>中国人民解放军武汉总医院普通外科, 武汉 430070

<sup>2</sup>华中科技大学同济医学院基础医学院生物化学与分子生物学系, 武汉 430030

作者简介: 叶家欣, 男, 主治医师, 硕士研究生;

蔡 逊, 男, 教授, 主任医师, 博士, 硕士生导师, 责任作者,  
E-mail: caiwenqian@sina.com

cancer tissues and cells, to evaluate its significance for hypoxia tolerance in lung cancer and to explore its mechanism of apoptosis of lung cancer. **Methods** Data of 20 patients with hypoxic lung cancer and normoxia lung cancer tissue microarray were downloaded through the GEO database, GCBI was used to screen the differential genes for GO and KEGG pathway analysis. *In vitro* culture of A549 cells was cultured and transfected with siGEB1 for knock down or GBE1 for overexpression. After hypoxia treatment, cell viability was analyzed using MTT assay. Western blot and real-time PCR were used to detect the expression of apoptosis-related genes. **Results** The data from 20 cases of lung cancer specimens showed that 206 genes displayed differences, and the GBE1 was the most significant, GO and KEGG pathway analysis found that the differential gene involved in cell cycle, cell metabolism and other multiple access. The expression of GBE1 in A549 cells after hypoxia treatment was significantly increased, and GBE1 could significantly enhance the expression of apoptosis-related genes in A549 cells after hypoxia treatment. Over-expression of GBE1 could inhibit the expression of apoptosis-related genes. **Conclusion** GBE1 may be a potential marker of hypoxia tolerance in lung cancer, this study provide a reference for further study of hypoxia tolerance mechanism of lung cancer.

**Key words** lung cancer; hypoxia; GBE1; gene chip