

胃癌组织中MLF1IP、NKD1、GOLPH3表达及与免疫细胞浸润水平和药物敏感度的关系

崔广宾, 刘成远, 穆 速, 马广纵, 李俊江*

(商丘市第一人民医院胃肠肝胆外科三科, 河南 商丘 476000)

摘要: **目的** 检测胃癌组织中骨髓增生异常白血病因子1相互作用蛋白(MLF1IP)、裸角质膜同源蛋白1(NKD1)、高尔基体磷蛋白3(GOLPH3)表达情况,并判断与其免疫细胞浸润水平、药物敏感度之间的关系。**方法** 选取2022年1月—2024年1月于商丘市第一人民医院接受治疗的51例胃癌患者的癌及癌旁组织,利用免疫组化法检测GOLPH3、MLF1IP、NKD1表达,分析其表达情况与免疫细胞浸润水平、不同药物敏感度之间的关系。**结果** 与癌旁组织相比,胃癌组织GOLPH3表达、巨噬细胞水平、NKD1表达、MLF1IP表达较高,CD8⁺T细胞、B细胞、CD4⁺T细胞、中性粒细胞、树突状细胞水平较低,差异具有统计学意义($P<0.05$);胃癌组织阿霉素(ADM)、顺铂(DDP)耐药性高于氟尿嘧啶(5-FU)、丝裂霉素(MMC),差异有统计学意义($P<0.05$);NKD1、MLF1IP、GOLPH3与CD8⁺T细胞、中性粒细胞、B细胞、CD4⁺T细胞、树突状细胞水平呈负相关,与巨噬细胞水平呈正相关;与NKD1、MLF1IP阴性表达相比,NKD1、MLF1IP阳性表达MMC、DDP、5-FU、ADM耐药性高、敏感度低;与GOLPH3阴性表达相比,GOLPH3阳性表达ADM、5-FU、DDP、MMC敏感度高、耐药性低,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** MLF1IP、NKD1、GOLPH3在胃癌组织呈高表达,与化疗药物敏感度有密切联系,且可抑制免疫细胞浸润。

关键词: 胃癌组织;MLF1IP;GOLPH3;NKD1;免疫细胞浸润

中图分类号: R574

文献标志码: A

文章编号: 1004-6879(2025)06-0468-05

Expression of MLF1IP, NKD1 and GOLPH3 in gastric cancer tissues and relationship with immune cell infiltration level and drug sensitivity

CUI Guangbin, LIU Chengyuan, MU Su, MA Guangzong, LI Junjiang*

(Department of Gastroenterology, Hepatobiliary Surgery, First People's Hospital of Shangqiu City, Shangqiu, Henan, 476000, China)

Abstract: **Objective** To detect the expression of myelodysplastic leukemia factor 1-interacting protein (MLF1IP), naked cuticle homolog protein 1 (NKD1), and Golgi phosphoprotein 3 (GOLPH3) in gastric cancer tissues, and to determine the relationship between them and the level of immune cell infiltration and drug sensitivity. **Methods** The research subjects were the cancer and adjacent tissues of 51 patients with gastric cancer who were treated at the First People's Hospital of Shangqiu City from January 2022 to January 2024. The expressions of GOLPH3, MLF1IP and NKD1 were detected by immunohistochemistry. Analyze the relationship between the expression of MLF1IP, NKD1 and GOLPH3 and the infiltration level of immune cells as well as the sensitivity to different drugs. **Results** Compared with adjacent tissues, the expression of GOLPH3, the level of macrophages, the expression of NKD1 and the expression of MLF1IP in gastric cancer tissues were higher, while the levels of CD8⁺T cells, B cells, CD4⁺T cells, neutrophils and dendritic cells were lower. The differences were statistically significant ($P<0.05$). The drug resistance of doxorubicin (ADM) and cisplatin (DDP) in gastric cancer tissues was higher than that of fluorouracil (5-FU) and mitomycin (MMC), and the difference was statistically

significant ($P<0.05$). NKD1, MLF1IP and GOLPH3 were negatively correlated with CD8⁺T cells, neutrophils, B cells, CD4⁺T cells and dendritic cells, and positively correlated with macrophages. Compared with the negative expressions of NKD1 and MLF1IP, the positive expressions of NKD1 and MLF1IP have higher drug resistance and lower sensitivity for MMC, DDP, 5-FU and ADM. Compared with the negative expression of GOLPH3, the positive expression of GOLPH3 had higher sensitivity and lower drug resistance in ADM, 5-FU, DDP and MMC, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** MLF1IP, NKD1 and GOLPH3 are highly expressed in gastric cancer tissues, closely related to the sensitivity of chemotherapy drugs, and can inhibit the infiltration of immune cells.

Key words: gastric cancer tissue; MLF1IP; GOLPH3; NKD1; immune cell infiltration; drug sensitivity

胃癌具有较高的抗凋亡能力,且生长、增殖及发展速度快,恶性程度较高,使抗肿瘤药物疗效下降,导致患者预后不良^[1]。裸角质层同源蛋白1(naked cuticle homolog 1, NKD1)属于Wnt/ β -Catenin信号通路抑制物,与肿瘤细胞内多种生物学功能具有相关性,在正常组织中也有表达,但表达水平低^[2]。骨髓增生异常白血病因子1相互作用蛋白(myelodysplastic leukemia factor 1-interacting protein, MLF1IP)在机体内具有多个经典结构功能域编码,由14个外显子构成,在胃癌中异常表达,其表达降低可抑制胃癌细胞增殖^[3]。高尔基体磷蛋白3(golgi phosphoprotein 3, GOLPH3)属于肿瘤细胞结构蛋白,可促进肿瘤细胞结构蛋白的合成速度,使肿瘤细胞异常分裂的风险升高^[4]。目前,有关MLF1IP、NKD1、GOLPH3表达情况与胃癌组织药物敏感度、免疫细胞浸润水平的关系尚缺乏深入研究。基于此,本研究通过探究MLF1IP、NKD1、GOLPH3表达情况与药物敏感度、免疫细胞浸润水平的关系,为临床治疗及效果预测提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2022年1月—2024年1月于商丘市第一人民医院胃肠肝胆外科三科接受治疗的51例胃癌患者(癌组织及癌旁组织)作为研究对象,其中包括男29例,女22例,平均年龄为(55.89 ± 5.23)岁;体质量指数为 $18\sim 24\text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$,平均体质量指数为(22.32 ± 0.24) $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$;肿瘤直径: $\geq 5\text{ cm}$ 31例, $< 5\text{ cm}$ 20例;TNM分期:Ⅲ/Ⅳ期18例,Ⅰ/Ⅱ期33例;分化程度:中/高分化21例,低分化30例;淋巴结转移情况:发生转移32例,未发生转移19例。

纳入标准:(1)胃癌患者均符合《胃癌早诊早治中国专家共识(2023版)》^[5]中的相关诊断标准;(2)临床资料完整;(3)患者及其家属均知情,并签署知情同意书。排除

标准:(1)合并其他恶性肿瘤者;(2)近期接受过放化疗治疗者;(3)合并严重脏器损伤者,如肝、肾等;(4)合并精神疾病者;(5)重度心脏病、高血压患者。

1.2 研究方法

1.2.1 免疫组化法检测MLF1IP、NKD1、GOLPH3表达

取二甲苯脱蜡,加5%双氧水,常温孵育10 min,加磷酸盐缓冲液,孵育5 min,冲洗3次,每次5 min。加5%山羊血清抗体封闭10 min,加一抗,4℃过夜孵育,冲洗3次,每次5 min。加二抗,37℃孵育30 min,冲洗3次,每次5 min。加工作液体(经第二代辣根酶标记),37℃孵育10 min,冲洗3次,每次5 min。显色,加酒精脱水,二甲苯透明,树胶封片,利用显微镜观察,根据着色强度及阳性细胞比例进行判断,两者总分 ≥ 3 分时记为阳性, < 3 分记为阴性。

1.2.2 免疫细胞浸润水平检测 将胃癌组织及癌旁组织所得到的免疫细胞调至 $2\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$,离心处理,加CD4⁺试剂40 μL 、CD19⁺试剂40 μL ,重悬,室温避光孵育15 min,加磷酸盐缓冲液洗涤,利用流式细胞仪(生产厂家:郑州今迈科技有限公司;型号:Accuri C6 Plus)检测CD8⁺T细胞、B细胞、中性粒细胞、树突状细胞、CD4⁺T细胞、巨噬细胞水平。

1.2.3 不同化疗药物的敏感度检测 取96孔培养板,加180 μL 单细胞悬液,分别加入 $9.6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 顺铂(cis-Diaminodichloroplatinum, DDP)、 $25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氟尿嘧啶(5-Fluorouracil, 5-FU)、 $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 阿霉素(adriamycin, ADM)、 $32\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丝裂霉素(mitomycin, MMC),各设置3个复孔,另设空白对照组(加180 μL 培养液),置于5% CO₂、37℃下培养48 h,取10 μL $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT,持续4 h培养,各孔加100 μL $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸异丙醇,静置10 min,利用酶标仪(生产厂家:山东优云谱光电科技有限公司;型号:YP-96)测定570 nm处吸光度值。取3孔平均值记为A,肿

瘤细胞抑制率=(A对照组-A药物组)/(A对照组+A空白组)×100%。敏感度判断标准为:低于30%记为不敏感(耐药),30%~50%之间记为中度耐药,超过50%记为高度耐药。

1.3 统计学分析

采用SPSS 20.0统计学软件进行数据分析,计量资料以($\bar{x}\pm s$)描述,组间比较行 t 检验;计数资料以百分比描述,2组间比较行 χ^2 检验,多组间比较行 Z 检验;利用Spearman分析NKD1、MLF1IP、GOLPH3表达与免疫细胞浸润水平的相关性。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

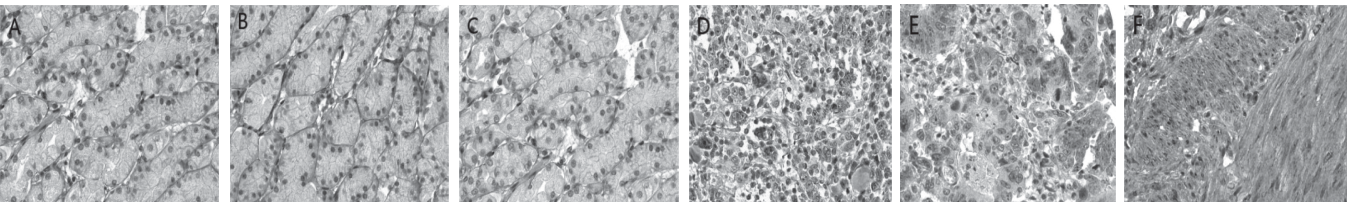
2 结果

2.1 胃癌组织及癌旁组织MLF1IP、NKD1、GOLPH3表达情况

胃癌组织MLF1IP、NKD1、GOLPH3表达高于癌旁组织,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表1、图1。

表1 对比胃癌组织及癌旁组织MLF1IP、NKD1、GOLPH3

表达情况				
组别	<i>n</i>	MLF1IP	NKD1	GOLPH3
胃癌组织	51	1.63±0.48	0.89±0.18	0.98±0.11
癌旁组织	51	1.17±0.33	0.06±0.04	0.48±0.05
<i>t</i>		5.340	32.146	29.551
<i>P</i>		< 0.001	< 0.001	< 0.001



注:A.癌旁组织MLF1IP;B.癌旁组织NKD1;C.癌旁组织GOLPH3;D.胃癌组织MLF1IP;E.胃癌组织NKD1;F.胃癌组织GOLPH3;×400。

图1 胃癌组织及癌旁组织MLF1IP、NKD1、GOLPH3免疫组化图

2.2 对比不同病理状态下MLF1IP、NKD1、GOLPH3表达情况

MLF1IP、NKD1、GOLPH3表达在病灶直径方面,差异程度方面,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表2。无统计学意义($P>0.05$);在淋巴结转移、TNM分期、分化

表2 对比不同病理状态下MLF1IP表达情况[n(%)]

项目		TNM 分期		分化程度		淋巴结转移		病灶直径	
		Ⅲ / Ⅳ期	低分化	中 / 高分化	发生	未发生	≥ 5cm	< 5cm	
MLF1IP	阳性 (<i>n</i> =29)	15 (51.72)	14 (48.28)	13 (44.83)	16 (55.17)	22 (75.86)	7 (24.14)	19 (65.52)	10 (34.48)
	阴性 (<i>n</i> =22)	18 (81.82)	4 (18.18)	17 (77.27)	5 (22.73)	10 (45.45)	12 (54.55)	12 (54.55)	10 (45.45)
	χ^2	4.961		5.437		4.948		0.632	
	<i>P</i>	0.026		0.020		0.026		0.427	
NKD1	阳性 (<i>n</i> =31)	16 (51.61)	15 (48.39)	14 (45.16)	17 (54.84)	23 (74.19)	8 (25.81)	19 (61.29)	12 (38.71)
	阴性 (<i>n</i> =20)	17 (85.00)	3 (15.00)	16 (80.00)	4 (20.00)	9 (45.00)	11 (55.00)	12 (60.00)	18 (90.00)
	χ^2	5.934		6.092		4.432		2.765	
	<i>P</i>	0.015		0.014		0.035		0.096	
GOLPH3	阳性 (<i>n</i> =39)	21 (53.85)	18 (46.15)	20 (51.28)	19 (48.72)	28 (71.79)	11 (28.31)	25 (64.10)	14 (35.90)
	阴性 (<i>n</i> =12)	12 (100.00)	0 (0.00)	11 (91.67)	1 (8.33)	4 (33.33)	8 (66.67)	6 (50.00)	6 (50.00)
	χ^2	6.658		4.699		4.278		0.288	
	<i>P</i>	0.010		0.030		0.039		0.591	

2.3 对比胃癌组织及癌旁组织免疫细胞浸润水平

与癌旁组织相比,胃癌组织CD8⁺T细胞、中性粒细胞、B细胞、树突状细胞、CD4⁺T细胞水平低,巨噬细胞水平高,差异有统计学意义($P<0.05$),见表3。

表3 对比胃癌组织及癌旁组织免疫细胞浸润水平

组别	<i>n</i>	B 细胞	CD8 ⁺ T 细胞	CD4 ⁺ T 细胞	巨噬细胞	中性粒细胞	树突状细胞
胃癌组织	51	13.28±1.24	2.38±0.85	0.38±0.22	21.13±9.46	1.58±0.71	4.26±1.67
癌旁组织	51	16.19±0.27	2.79±0.91	0.82±0.23	17.28±7.84	2.49±0.91	6.79±2.94
<i>t</i>		16.376	2.351	9.873	2.278	5.630	5.344
<i>P</i>		< 0.001	0.021	< 0.001	0.028	< 0.001	< 0.001

2.4 分析胃癌组织对不同化疗药物的敏感度检查结果

结果显示,胃癌组织对5-FU、MMC耐药性低于ADM、DDP,差异有统计学意义($P<0.05$),见表4。

表4 分析胃癌组织对不同化疗药物的敏感度检查结果[*n*(%)]

化疗药物	<i>n</i>	高度敏感度	中度敏感度	无敏感 (耐药性)
5-FU	51	12 (23.53)	32 (62.75)	7 (13.73)
MMC	51	21 (41.18)	22 (43.14)	8 (15.69)
ADM	51	11 (21.57)	20 (39.22)	20 (39.22)
DDP	51	21 (41.18)	13 (25.49)	17 (33.33)
<i>Z</i>		8.196	14.811	13.008
<i>P</i>		0.042	0.002	0.005

2.5 MLF1IP、NKD1、GOLPH3表达与免疫细胞浸润水平的相关性

MLF1IP、NKD1、GOLPH3表达与中性粒细胞、CD8⁺T 细胞呈正相关,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表5。
细胞、树突状细胞、B细胞、CD4⁺T细胞呈负相关,与巨噬

表5 MLF1IP、NKD1、GOLPH3表达与免疫细胞浸润水平的相关性

指标	B 细胞		CD8 ⁺ T 细胞		CD4 ⁺ T 细胞		巨噬细胞		中性粒细胞		树突状细胞	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
MLF1IP	-0.354	< 0.001	-0.462	< 0.001	-0.359	< 0.001	0.391	< 0.001	-0.518	< 0.001	-0.518	< 0.001
NKD1	-0.368	< 0.001	-0.439	< 0.001	-0.461	< 0.001	0.349	< 0.001	-0.564	< 0.001	-0.464	< 0.001
GOLPH3	-0.346	< 0.001	-0.497	< 0.001	-0.419	< 0.001	0.408	< 0.001	-0.549	< 0.001	-0.491	< 0.001

2.6 MLF1IP、NKD1、GOLPH3表达与药物敏感度的关系

MLF1IP阳性表达对5-FU、MMC、ADM、DDP耐药性高于MLF1IP阴性表达;NKD1阳性表达对DDP、MMC、5-FU、ADM耐药性高于NKD1阴性表达;GOLPH3阳性表达对MMC、5-FU耐药性高于GOLPH3阴性表达,而对DDP、ADM的耐药性低于阴性表达,差异有统计学意义($P<0.05$),见表6。

表6 MLF1IP、NKD1、GOLPH3表达与药物敏感度的关系[*n*(%)]

指标		5-FU		MMC		ADM		DDP	
		耐药	敏感	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药	敏感
MLF1IP	阳性 (<i>n</i> =29)	7 (24.14)	22 (75.86)	8 (27.59)	23 (79.31)	16 (55.17)	13 (44.83)	13 (44.83)	16 (55.17)
	阴性 (<i>n</i> =22)	0 (0.00)	22 (100.00)	0 (0.00)	22 (100.00)	4 (18.18)	16 (72.73)	4 (18.18)	18 (81.82)
	χ^2		4.286		4.825		6.062		3.997
	<i>P</i>		0.038		0.028		0.014		0.046
NKD1	阳性 (<i>n</i> =31)	7 (22.58)	24 (77.42)	8 (25.81)	25 (80.65)	16 (51.61)	15 (48.39)	14 (45.16)	16 (51.61)
	阴性 (<i>n</i> =20)	0 (0.00)	20 (100.00)	0 (0.00)	20 (100.00)	4 (20.00)	16 (80.00)	3 (15.00)	17 (85.00)
	χ^2		4.501		3.976		5.097		5.362
	<i>P</i>		0.031		0.046		0.024		0.021
GOLPH3	阳性 (<i>n</i> =39)	2 (5.13)	37 (94.87)	3 (7.69)	36 (92.31)	11 (28.21)	28 (71.79)	9 (23.08)	30 (76.92)
	阴性 (<i>n</i> =12)	5 (41.67)	7 (58.33)	5 (41.67)	7 (58.33)	8 (66.67)	4 (33.33)	8 (66.67)	4 (33.33)
	χ^2		7.490		5.646		4.278		6.007
	<i>P</i>		0.006		0.018		0.039		0.014

3 讨论

胃癌的发病原因包括环境、幽门螺旋杆菌感染、遗传因素、癌前病变等,其发生、侵袭、进展属于复杂的生物学过程,且有多信号通路、多因素、多种基因突变参与,因此,深入研究胃癌分子机制具有重大意义^[6-7]。

MLF1IP与多种蛋白质相互作用,促进或抑制胃癌转移和生长,其水平越高,阳性表达越显著,当其过度表达时可减少免疫细胞浸润^[8]。本研究中,与癌旁组织相比,胃癌组织中MLF1IP表达显著升高,且与免疫细胞浸润水平、药物敏感度之间存在相关性。

NKD1过表达介导Wnt/PCP信号途径,经调控上皮细胞、黏附蛋白活性,维持细胞极性,与肿瘤的发生发展过程密切相关,且其表达水平升高与胃癌细胞侵袭、迁移之间联系密切^[9]。研究显示^[10],NKD1通过Wnt/ β -Catenin发挥其功能,结合散乱蛋白家族Dvl蛋白、EF序列,使 β -Catenin在细胞核中呈异常表达。本研究中,胃癌组织中NKD1表达显著高于癌旁组织,并与胃癌组织药物敏感度及免疫浸润水平之间存在相关性。

GOLPH3可激活AKT信号通路,使患者半胱氨酸蛋白酶Caspase发生磷酸化失活,对肿瘤细胞凋亡进行抑制,使其浸润进一步加重,对胃癌患者治疗方面产生负面影响^[11]。研究显示^[12],胃癌组织中GOLPH3呈高表达,与胃癌化疗药物耐药之间具有相关性,是胃癌耐药的一条重要途径。本研究中,胃癌组织GOLPH3与癌旁组织相比,其表达显著升高,同时与免疫细胞浸润及药敏性之间具有相关性。

综上所述,胃癌组织中GOLPH3、NKD1、MLF1IP表达与免疫细胞浸润、药物敏感度之间存在密切联系。在临床针对胃癌的治疗当中,可以此作为临床效果评估的一项重要依据。但本次所选取样本量较少,对实验结果存在一定局限性,后期应扩大样本量,进行深入研究,为临床治疗提供应用价值。

参考文献

[1] 阳涛涛,陈杰,田宋君,等. STAT-3及其相关蛋白在胃癌组织中的表达及其与临床病理特征的关系[J]. 肿瘤药学,2022,

12(3):381-386.

[2] 冯砚平,王楠,王伟佳. WT1、NKD1基因在急性髓系白血病中的表达及其与预后的关系[J]. 检验医学与临床,2021,18(11):1534-1537.

[3] 张治国,康文玉. MLF1IP在膀胱尿路上皮癌组织中的表达及其临床意义[J]. 医学临床研究,2022,39(3):432-434.

[4] 翟俊,肖学文. GOLPH3、Livin蛋白表达水平与胃癌患者临床病理特征的相关性研究[J]. 医学临床研究,2021,38(1):22-24.

[5] 中华医学会肿瘤学会早诊早治学组. 胃癌早诊早治中国专家共识(2023版)[J]. 中华消化外科杂志,2024,23(1):23-36.

[6] 王长庭,苏志明,曾伟龙. 钙蛋白酶小亚基-1和细胞核增殖抗原在胃癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中华实验外科杂志,2021,38(5):915-918.

[7] Ucaryilmaz Metin C, Ozcan G. Comprehensive bioinformatic analysis reveals a cancer-associated fibroblast gene signature as a poor prognostic factor and potential therapeutic target in gastric cancer[J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 692.

[8] 李杰,侯玮,张燕,等. MLF1IP、SIRT6在胃癌组织中的表达及意义[J]. 临床肿瘤学杂志,2023,28(10):920-923.

[9] 连俊,李苗,伍玉容,等. 超声弹性成像参数在浸润性乳腺癌诊断中的应用及其与组织NKD1、HER-2表达量的关系[J]. 海南医学,2022,33(14):1852-1855.

[10] Wu H, Becraft PW. Comparative transcriptomics and network analysis define gene coexpression modules that control maize aleurone development and auxin signaling[J]. Plant Genome, 2021, 14(3): 20126.

[11] Ouyang J, Song F, Li H, et al. miR-126 targeting GOLPH3 inhibits the epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer BGC-823 cells and reduces cell invasion[J]. Eur J Histochem, 2020, 64(4): 3168.

[12] 李奇,翟春宝,田利军,等. 结直肠癌中S100P、环氧化酶-2、高尔基体磷蛋白3的表达情况及与肿瘤分期、侵袭深度的关系研究[J]. 中华生物医学工程杂志,2022,28(2):222-226.

(收稿日期:2024-06-14)