

# 胃癌中葡萄糖调节蛋白 78 的表达及其临床病理学意义

贺正希<sup>1</sup>, 唐慧岚<sup>1</sup>, 陈景飞<sup>1</sup>, 陈文琳<sup>1</sup>, 蒋炜峥<sup>1</sup>, 谢远杰<sup>2\*</sup>

(1. 南华大学医学院 2009 级临床医学专业临床改 1 班, 湖南 衡阳 421001;

2. 南华大学医学院组织胚胎学教研室)

**摘要:** **目的** 检测葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 在胃癌组织中的表达, 分析其临床病理学意义, 探讨 GRP78 在胃癌发生发展中的作用。 **方法** 收集 48 例不同临床分期及不同分化程度胃腺癌及 28 例癌旁正常胃黏膜组织标本, 分别应用 RT-PCR、Western Blotting 和免疫组化检测 GRP78 mRNA 和蛋白质的表达。 **结果** 与正常胃黏膜组织相比, 胃癌组织中 GRP78 mRNA 及蛋白表达水平显著增加 ( $P < 0.05$ )。免疫组化检测 GRP78 阳性表达定位于胞浆, 在正常胃黏膜组织中 GRP78 阳性表达率为 10.7% (3/28), 高、中分化与低分化胃癌组织阳性表达率分别为 59.4% (19/32) 和 93.8% (15/16); 直径  $\geq 5$  cm 的胃癌组织中 GRP78 阳性表达率 (88.9%, 16/18) 高于直径  $< 5$  cm 的胃癌组织 (60%, 18/30), III、IV 期 (TNM 分期) 病例胃癌组织中 GRP78 阳性表达率 (90.5%, 19/21) 高于 I、II 期病例 (55.6%, 15/27); 5 年内病情复发或者死亡病例胃癌组织中 GRP78 阳性表达率 (82.8%, 24/29) 高于 5 年内病情无复发病例 (52.6%, 10/19); 淋巴结转移胃癌组织中 GRP78 阳性表达率 (96.2%, 25/26) 明显高于非淋巴结转移胃癌组织 (40.9%, 9/22), 各组间差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。 **结论** GRP78 在胃癌组织中高表达, 其表达水平与胃癌肿瘤大小、分化程度、淋巴结转移、临床分期及预后密切相关。

**关键词:** 胃癌; 葡萄糖调节蛋白 78; 分化; 淋巴结转移; 临床分期

中图分类号: R735.2 文献标识码: A

## The Expression and Clinical Pathological Significances of GRP78 in Human Gastric Cancer Tissues

HE Zhengxi, TANG Huilan, CHEN Jingfei, et al

(Class One for Clinical Medical Reform in Grade 2009 of Medical School, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the role of GRP78 in the development of gastric carcinoma by analysis of the expression of GRP78 in gastric carcinoma tissue. **Methods** 48 cases of human gastric carcinoma tissue with different clinical period and differentiation degree and 28 cases of normal gastric tissue were selected. The mRNA and protein of GRP78 were detected by RT-PCR, Western blotting and immunohistochemistry, respectively. **Results** Compared with normal gastric epithelial tissue, the expression of GRP78 at mRNA and protein level in gastric carcinoma tissue increased significantly, which were showed by RT-PCR and Western Blotting ( $P < 0.05$ ). GRP78 protein was mainly distributed in cytoplasm showed by immunohistochemistry. The positive rate of GRP78 in normal gastric tissue, well or moderately-differentiated and poorly-differentiated gastric cancer tissue were 10.7% (3/28), 59.4% (19/32) and 93.8% (15/16), respectively. The positive rate of GRP78 in gastric carcinoma tissue with diameter  $\geq 5$  cm was 88.9% (16/18), at III, IV period in TNM staging was 90.5% (19/21), and with recurrence or death less than 5 years was 82.8% (24/29), which were higher than that with diameter  $< 5$  cm (60%, 18/30), at I, II period (55.6%, 15/27), and with relapse-free in five years (52.6%, 10/19), respectively. The

收稿日期: 2014-08-06; 修回日期: 2014-11-20

基金项目: 本项目受 2012 年湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目及 2012 年地方高校国家级大学生创新创业训练计划项目 (201210555017) 资助。

\* 通讯作者, E-mail: charlesking8888@163.com.

positive rate of GRP78 in gastric carcinoma tissue with lymphatic metastasis was 96.2% (25/26), which was much higher than that of without lymphatic metastasis (40.9%, 9/22). **Conclusion** The expression of GRP78 in gastric cancer tissue increased, and GRP78 was involved in the development and progression of gastric cancer, which was highly related to tumor size, differentiation, lymph node metastasis, clinical stage and prognosis of gastric cancer.

**Key words:** gastric carcinoma; glucose regulatory protein 78 KD; differentiation; lymph node metastasis; clinical stage

葡萄糖调节蛋白 78 (Glucose regulatory protein 78 KD, GRP78) 是葡萄糖调节蛋白家族的重要成员, 又称为免疫球蛋白重链结合蛋白, 它作为一种分子伴侣参与蛋白质的折叠和转运, 是正常状态下促进蛋白质成熟、调节细胞机能的重要物质。细胞在低氧等条件下发生内质网应激, 诱导 GRP78 大量表达, 因此 GRP78 蛋白成为内质网应激的标志性蛋白质。近来研究发现在肝癌<sup>[1]</sup>、胃癌<sup>[2]</sup>、乳腺癌<sup>[3]</sup>等多种肿瘤细胞中 GRP78 表达增高, 表明 GRP78 的表达可能与肿瘤发生、发展有关, 但具体作用机制尚未阐明, 而且目前关于 GRP78 在胃癌组织中表达的临床病理意义存在分歧<sup>[4-6]</sup>。本研究通过 RT-PCR、免疫组化和 Western blotting 等方法分别检测 GRP78 mRNA 和蛋白质在胃癌组织中的表达, 分析其临床病理学意义, 初步探讨 GRP78 表达与胃癌的关系, 为进一步研究 GRP78 在胃癌发生、发展中的作用及其机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织标本和主要试剂

收集 2011 年 10 月 ~ 2013 年 10 月南华大学附属第一医院行胃癌根治术后并建立电话随访的 48 例病例标本 (一般病理特征见表 1), 癌旁正常胃黏膜组织 28 例 (癌旁 5 cm 以上), 其中高、中分化胃癌 32 例, 低分化胃癌 16 例; 伴淋巴结转移胃癌组织 26 例。手术标本取材后立即放入液氮罐保存, 每例组织标本各取一部分经甲醛固定, 制成石蜡切片, 组织标本其余部分分别用于提取蛋白质和 RNA。所有病例均经过病理学诊断证实, 且术前均未接受放化疗。蛋白裂解液、BCA 蛋白质定量试剂盒、蛋白 marker、SP 免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术公司。一步法 RT-PCR 试剂盒和 DNA marker 购自碧云天生物技术公司。PVDF 膜购自 Millipore, GRP78 兔抗人多克隆抗体、兔抗人  $\beta$ -actin 单抗购自博士德生物技术公司; DEPC 水和

Trizol 购自 Invitrogen, GRP78、 $\beta$ -actin 引物由上海华美生物工程公司合成。

### 1.2 RT-PCR 检测胃癌组织中 GRP78 mRNA 的表达

取保存在液氮中各组胃组织标本, 每例 100 mg, 采用 Trizol-氯仿抽提总 RNA, 按 RT-PCR 试剂盒 (Takara 公司) 说明合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, GRP78 Primer: fwd (5'-GCACCACCTACTCGTGGTT-3') rev (5'-ACCCAGGTGAGTATCTCCGTTAG-3'), 扩增片段长度为 656 bp, PCR 反应条件是: 94 °C 4 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 60 s, 70 °C 延伸 2 min, 36 个循环; 70 °C 延伸 6 min。 $\beta$ -actin Primer: fwd (5'-TGAGACCTTCAACACGCCG-3') rev (5'-ATGGTGATGACCTGCCCGTC-3'), 扩增片段长度为 378 bp, PCR 反应条件是: 94 °C 4 min; 94 °C 变性 45 s, 56 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 36 个循环; 72 °C 延伸 8 min。反应后各取终产物 10  $\mu$ L 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后, 用凝胶成像分析系统观察、分析实验结果, 分别测出各组胃组织中 GRP78 及  $\beta$ -actin 的积分吸光度 (A) 值, 计算两者的比值, 以此比值作为各组胃组织中 GRP78 mRNA 的相对表达量。

### 1.3 Western blotting 检测胃癌组织中 GRP78 蛋白的表达

提取各组胃组织标本的总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 样品和上样缓冲液以 4:1 混合, SDS-PAGE 电泳后, 经半干转膜仪转到 PVDF 膜上, 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入 GRP78 兔抗人多克隆抗体 (1:300) 和  $\beta$ -actin 抗体 (1:1 000), 37 °C 孵育 2 h, HRP 标记 II 抗孵育 1 h, TBST 洗脱 3 次, ECL 化学发光显影, 采用 Quantity One 软件测定各条带的吸光度值, 分别以各条带与  $\beta$ -actin (内参照) 吸光度的比值表示各组 GRP78 蛋白的相对含量。

### 1.4 SP 免疫组化检测胃癌组织中 GRP78 蛋白的表达

石蜡切片常规脱蜡至水, 免疫组化操作步骤按试剂盒说明进行。3%  $H_2O_2$  孵育 10 min 以阻断内源性过氧化物酶, 10% 枸橼酸盐缓冲液热修复抗原,

PBS 洗后正常羊血清封闭 30 min,滴加 1:80 GRP78 兔抗人多克隆抗体,4 ℃ 孵育过夜,PBS 清洗 3 min × 3 次,滴加生物素化的羊抗兔 II 抗,37 ℃ 孵育 30 min,PBS 清洗 5 min × 3 次,经 DAB 显色,镜下控制显色时间,苏木精复染,脱水,中性树脂封片,阴性对照以 PBS 代替 I 抗,每张切片至少随机观察 5 个高倍视野,按照阳性细胞所占比例记分:≤5% 为 0 分;6%~24% 为 1 分;25%~50% 为 2 分;>50% 为 3 分。同时根据染色强度记分为:无黄色为 0 分;淡黄色为 1 分;黄色或深黄色为 2 分;褐色或深褐色为 3 分。两项指标的积分相加结果:≤1 分为阴性,>2 分为阳性。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计学软件处理各组数据。计

量数据用均数 ± 标准差表示,多组数据间的比较行单因素方差分析,计数资料用百分比(%)表示,样本率的比较行  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 胃癌组织中 GRP78 mRNA 及其蛋白的表达

RT-PCR 检测结果显示(图 1),正常胃黏膜组织中 GRP78 mRNA 相对表达量( $0.10 \pm 0.02$ )明显低于胃癌组织( $0.97 \pm 0.10$ , $P < 0.05$ )。Western Blotting 检测结果显示(图 2),GRP78 蛋白在正常胃黏膜组织中相对含量( $0.13 \pm 0.03$ )明显低于胃癌组织( $0.87 \pm 0.08$ ),差异有显著性( $P < 0.05$ )。

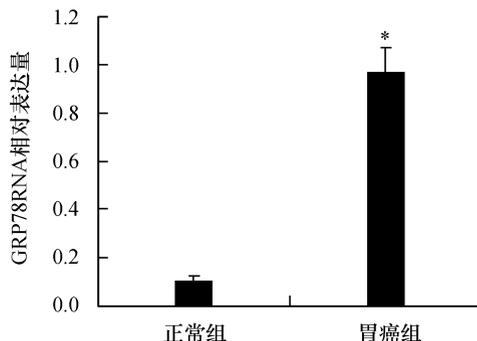
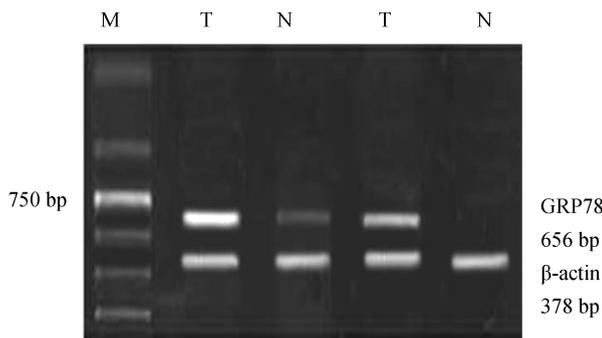


图 1 RT-PCR 检测胃组织中 GRP78 mRNA 表达水平 T:正常胃组织;N:胃癌组织 M:DNA marker;与正常组织比较,\* $P < 0.05$

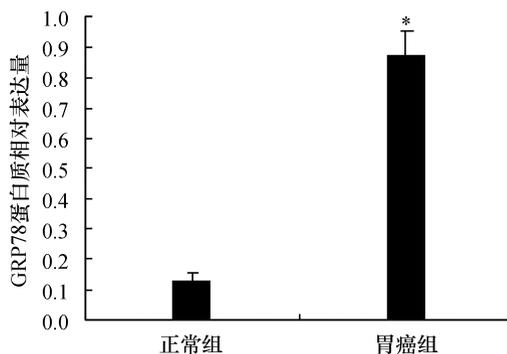
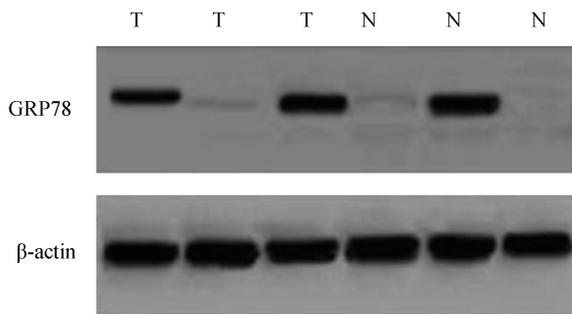


图 2 Western blotting 检测胃组织中 GRP78 蛋白表达水平 T:正常胃组织;N:胃癌组织;与正常组比较,\* $P < 0.05$

### 2.2 胃癌组织 GRP78 蛋白的免疫组化表达

GRP78 阳性染色为棕黄色,位于胞浆(图 3)。在正常胃黏膜组织中的阳性表达率 10.7% (3/28),高、中分化与低分化胃癌组织阳性表达率分别为 59.4% (19/32) 和 93.8% (15/16);在直径 ≥ 5 cm 的

胃癌组织中 GRP78 阳性表达率(88.9%,16/18)高于直径 < 5cm 的胃癌组织(60%,18/30),TNM 分期 III、IV 期病例胃癌组织中 GRP78 阳性表达率(90.5%,19/21)高于 I、II 期病例(55.6%,15/27);5 年内病情复发或者死亡病例胃癌组织中

GRP78 阳性表达率(82.8%, 24/29) 高于 5 年内病情无复发病例(52.6%, 10/19); 淋巴结转移胃癌组织中 GRP78 阳性表达率 96.2% (25/26) 明显高于非淋巴结转移胃癌组织 40.9% (9/22), 各组间差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。胃癌组织中 GRP78 蛋白表达情况分析见表 1。

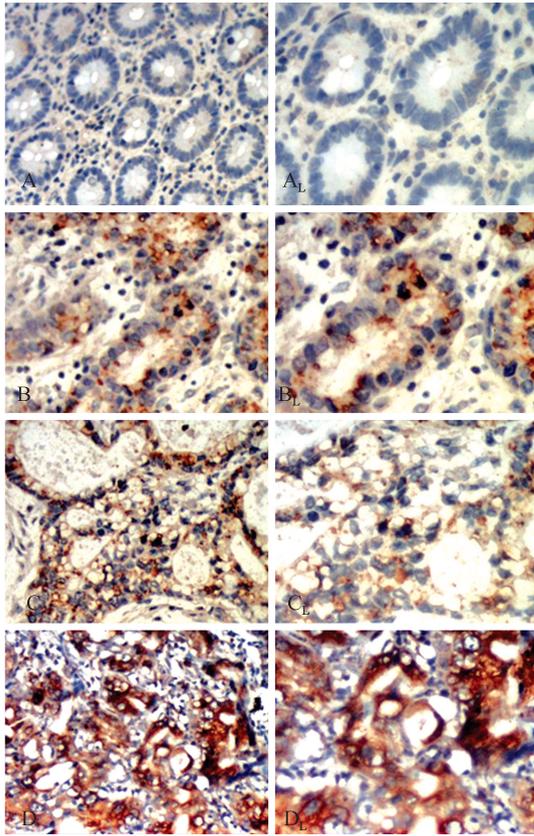


图 3 免疫组化 SP 法检测 GRP78 在胃组织中的表达 A: 正常胃组织; B: 高分化胃癌组织; C: 中分化胃癌组织; D: 低分化胃癌组织 AL、BL、CL、DL(400 $\times$ ): 分别为 A、B、C、D(200 $\times$ ) 的局部放大

### 3 讨 论

胃癌的发生、发展是遗传、环境、饮食及幽门螺杆菌(HP)感染等多因素共同作用的结果, 但胃癌发生、发展的具体分子机制仍未明确<sup>[7]</sup>。肿瘤从根本上说属于基因病, 探讨相关基因及其蛋白质在胃癌组织中的表达, 分析其临床病理学意义, 不仅为进一步研究相关基因在胃癌发生、发展中的作用提供实验基础, 同时也有助于揭示胃癌发生、发展的分子机制。

近期研究表明, GRP78 在人类多种肿瘤组织中高表达, 而且其表达水平与肿瘤的恶性程度、转移能

表 1 胃癌组织中 GRP78 蛋白表达与临床病理特征分析

项目	<i>n</i>	GRP78 阳性例数	GRP78 阴性例数	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
性别					
男	37	28	9		
女	11	6	5	1.832	0.176
年龄(岁)					
<60	23	16	7		
$\geq 60$	25	18	7	0.034	0.853
肿瘤直径(cm)					
<5	30	18	12		
$\geq 5$	18	16	2	4.545	0.033
分化程度					
高、中分化	32	19	13		
低分化	16	15	1	6.101	0.014
淋巴结转移					
无	22	9	13		
有	26	25	1	17.604	0.000
TNM 分期					
I ~ II	27	15	12		
III ~ IV	21	19	2	6.972	0.008
5 年内病情进展					
无复发	19	10	9		
复发或死亡	29	24	5	5.043	0.025

力及细胞凋亡有关, 抑制 ERK 通路能阻断 GRP78 上调表达, 从而促进内质网应激诱导的胃癌细胞凋亡<sup>[8]</sup>。GRP78 的高表达与肿瘤内皮细胞的耐药有关<sup>[9]</sup>, 并且对血管生成也有一定的促进作用<sup>[10]</sup>。虽然目前关于 GRP78 是通过何种机制参与肿瘤的发生发展尚未完全明确, 但其在多种肿瘤的高表达足以说明 GRP78 蛋白在肿瘤的发生、发展中扮演重要角色。因此, GRP78 蛋白可能成为判断肿瘤细胞分化程度和临床分期的有价值的分子标记物<sup>[11]</sup>。

多篇文献报道表明, 在胃癌组织中 GRP78 表达明显高于正常胃黏膜组织<sup>[4,6,12-13]</sup>, 但目前关于 GRP78 在胃癌组织中表达的临床病理意义存在分歧, 姚元春等<sup>[4]</sup>认为 GRP78 高表达与胃癌肿瘤的大小、浸润、转移、分期有关, 但与胃癌的分化程度无关, 而余先祥等<sup>[5]</sup>认为 GRP78 高表达仅与胃癌的分化程度有密切关系, 而与胃癌肿瘤的大小、浸润、转移等无关。本实验研究结果显示, GRP78 在胃癌手术标本中的表达显著高于正常组织, 男性胃癌患者 GRP78 蛋白表达阳性率稍高于女性, <60 岁胃癌患者稍高于  $\geq 60$  岁患者, 但差异无统计学意义, 表明 GRP78 蛋白表达与胃癌患者年龄及性别无关。但本实验研究结果还显示, 不同分化程度的胃癌组织中 GRP78 表达的水平不同, 低分化胃癌组织中

GRP78 表达阳性率明显高于中、高分化胃癌,且低分化癌多呈强阳性表达,而在高、中分化癌中多呈弱阳性或阳性表达(图 3)。肿瘤直径  $\geq 5$  cm 的胃癌组织中 GRP78 蛋白质表达阳性率明显高于肿瘤直径  $< 5$  cm 的胃癌组织,淋巴结转移胃癌组织中 GRP78 表达阳性率明显高于无淋巴结转移的胃癌组织,Ⅲ、Ⅳ期患者胃癌组织中 GRP78 表达阳性率明显高于 I、II 期患者,表明 GRP78 蛋白质表达不仅与胃癌细胞分化程度有关,而且与肿瘤体积大小、淋巴结转移及临床分期密切相关。组织缺氧容易导致内质网应激,诱导 GRP78 的产生。由于肿瘤组织内本身存在缺氧、低糖的状况,而随着胃癌细胞恶性生长,肿瘤体积越大,肿瘤组织内缺氧、应激更明显,从而导致 GRP78 表达越高。淋巴结转移胃癌组织中 GRP78 表达阳性率明显高于无淋巴结转移的胃癌组织,提示 GRP78 可能具有促进胃癌淋巴结转移的作用,然而关于 GRP78 促进胃癌淋巴结转移的分子机制尚未明确。由于临床分期与胃癌肿瘤大小及淋巴结转移密切相关,因此不难理解Ⅲ、Ⅳ期患者胃癌组织中 GRP78 表达阳性率明显高于 I、II 期患者。本研究显示,根治术后 5 年内无复发的患者胃癌组织中 GRP78 表达阳性率明显低于 5 年内复发或死亡的患者,表明 GRP78 蛋白质表达与患者预后密切相关。进一步研究 GRP78 蛋白在胃癌发生、发展过程中的作用机制,有助于揭示胃癌发病的分子机制,为抑制 GRP78 基因表达作为胃癌防治的新靶点提供实验依据。

#### 参考文献:

[1] Jiang X, Kanda T, Nakamoto S, et al. Involvement of androgen receptor and glucose-regulated protein 78 kDa in human hepatocarcinogenesis[J]. *Exp Cell Res*, 2014, 323(2):326-336.

[2] Yang L, Yang S, Liu J, et al. Expression of GRP78 predicts taxane-based therapeutic resistance and recurrence of human gastric cancer[J]. *Exp Mol Pathol*, 2014, 96(2):235-241.

[3] Heng YZ, Cao ZG, Hu X, et al. The endoplasmic reticulum

stress markers GRP78 and CHOP predict disease-free survival and responsiveness to chemotherapy in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 145(2):349-358.

- [4] 姚元春,张红,赖丽琴. GRP78、GRP94 蛋白和 mRNA 在人胃癌组织中的表达及临床意义[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(2):152-155.
- [5] 余先祥,谢本俊,张林杰. 胃癌组织中 GRP78 的表达与临床病理特征的相关性分析[J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(6):681-683.
- [6] Yang L, Yang SY, Ji JM, et al. GRP78 expression in gastric cancer and its clinical significance[J]. *Zhong hua Zhong Liu Za Zhi*, 2013, 35(11):837-842.
- [7] Grabsch HI, Tan P. Gastric cancer pathology and underlying molecular mechanisms[J]. *Dig Surg*, 2013, 30(2):150-158.
- [8] Zhang LJ, Chen S, Wu P, et al. Inhibition of MEK blocks GRP78 up-regulation and enhances apoptosis induced by ER stress in gastric cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2009, 274(1):40-46.
- [9] Visioli F, Wang Y, Alam GN, et al. Glucose-regulated protein 78 (Grp78) confers chemoresistance to tumor endothelial cells under acidic stress[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6):e101053.
- [10] Dong D, Stapleton C, Luo B, et al. A critical role for GRP78/BiP in the tumor microenvironment for neovascularization during tumor growth and metastasis[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(8):2848-2857.
- [11] Thornton M, Aslam MA, Tweedle EM, et al. The unfolded protein response regulator GRP78 is a novel predictive biomarker in colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(6):1408-1418.
- [12] Bai Z, Ye Y, Liang B, et al. Proteomics-based identification of a group of apoptosis-related proteins and biomarkers in gastric cancer[J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(2):375-383.
- [13] Wu JY, Cheng CC, Wang JY, et al. Discovery of tumor markers for gastric cancer by proteomics[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e84158.

(此文编辑:蒋湘莲)