

HSP90 α / β 蛋白在胃癌组织中的表达及临床意义

雷 艳^{1,2}, 张志伟^{1*}, 刘重元¹, 肖 娟³, 张先锋³, 伍石华⁴, 周华茂⁵

(1. 南华大学医学院肿瘤研究所; 肿瘤细胞与分子病理学湖南省高校重点实验室, 湖南 衡阳 421001;
2. 郴州市第一人民医院中心医院消化内科; 3. 南华大学附属第二医院耳鼻喉科;
4. 邵阳医学高等专科学校附属医院病理科; 5. 南华大学附属南华医院疼痛科)

摘要: **目的** 观察热休克蛋白 90 α / β (heat shock protein 90 α / β , HSP90 α / β) 在胃癌组织中的表达及临床意义, 为胃癌的早期诊断与分子病理分型提供有价值的实验资料。 **方法** 采用免疫组织化学染色结合组织芯片, 观察 HSP90 α / β 蛋白质在正常胃黏膜组织、癌旁组织及胃癌组织中的表达; 然后分析 HSP90 α / β 蛋白质在胃癌组织中表达的临床意义。 **结果** 免疫组织化学染色结果显示, 胃癌组织中 HSP90 α / β 蛋白质表达的阳性率高于正常胃黏膜组织和癌旁组织 ($P < 0.05$); 癌旁组织中表达的阳性率高于正常胃黏膜组织 ($P < 0.05$); 淋巴结转移患者组织中表达的阳性率高于无淋巴结转移者 ($P < 0.05$); III ~ IV 期患者组织中表达的阳性率高于 I ~ II 期 ($P < 0.05$)。 **结论** HSP90 α / β 蛋白质的表达与胃癌组织的发生、分化程度、淋巴结转移及 TNM 分期有关, 即随着胃癌组织分化程度的降低、淋巴结转移的发生及 TNM 分期的增加而表达升高。

关键词: 胃癌; HSP90 α / β 蛋白质; 临床意义

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A

The Clinical Significance and Expression of HSP90 α / β Protein in Gastric Cancer Tissue

LEI Yan, ZHANG Zhiwei, LIU Zhongyuan, et al

(Cancer Research Institute, University of South China; Key Laboratory of Cancer Cellular and Molecular Pathology in Hunan Province, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To verify clinical significance of the expression of heat shock protein 90 α / β (HSP90 α / β) protein in gastric cancer tissue and provide valuable experiment data for gastric cancer patients on early diagnosis and clinical pathology grouping. **Methods** The expression of HSP90 α / β protein was observed by immunohistochemistry staining in normal gastric mucosa tissue, cancer side tissue and gastric cancer tissue. Then the clinical pathology significance of the expression of HSP90 α / β protein was analyzed. **Results** The immunohistostaining results showed that the expression positive rate of HSP90 α / β protein was higher in gastric cancer tissue than that in normal gastric mucosa and cancer side tissue ($P < 0.05$), in cancer side tissue than that in normal gastric mucosa tissue ($P < 0.05$), in lymphaden metastatic gastric cancer tissue than that in no lymphaden metastatic gastric cancer tissue ($P < 0.05$) and in III ~ IV period patient gastric cancer tissue than that in I ~ II period ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of HSP90 α / β protein was related with gastric cancer effluence, gastric cancer differentiation level, lymphaden metastasis and TNM classification of gastric cancer. As the differentiation level of gastric cancer tissue decreased, lymphaden metastasis of gastric cancer and TNM classification increased, the expression rate of HSP90 α / β protein was also heightened.

Key words: gastric cancer; HSP90 α / β protein; clinical significance

收稿日期: 2015-06-11; 修回日期: 2015-10-25

基金项目: 湖南省自然科学衡阳联合基金 (No. 12JJ9033); 湖南省自然科学基金 (No. 13JJ3079); 湖南省科技厅项目 (No. 2013SK3118; 2014SK3081; 2014sk3073); 湖南省高校创新平台基金 (No. 12K094, No. 13K082); 衡阳市科技局项目 (2013KJ02; 2013KJ12; 2013KJ28)。

* 通讯作者, E-mail: nhdzzw@qq.com.

胃癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤,其发病率居消化道肿瘤第一位^[1]。内镜检查及活检是目前胃癌诊断的主要方法之一,但因早期胃癌临床症状不典型,许多患者就诊时已为胃癌晚期,致使患者临床预后差,因此早期诊断仍是防治胃癌的关键。至今,一些胃癌相关的蛋白质分子被不断的揭示,如 CEA、CA19-9 和 CA72-4 等,为早期胃癌的诊断提供了可能^[2]。本课题组前期应用定量蛋白质组学技术筛选获得了 238 个胃癌相关差异表达蛋白质^[3-4],从中选取差异倍数大的胃癌相关蛋白 HSP90 α / β 进行检测与分析,为胃癌的早期诊断提供实验资料。

1 材料与方法

1.1 病例资料 组织芯片(包括正常胃黏膜组织、癌旁组织及胃癌组织)由湘潭市第一人民医院病理科赠送。该组织芯片包括自 2003 年~2009 年湘潭市第一人民医院胃癌患者手术切除标本 81 例,其中女性 25 例,男性 56 例,患者平均年龄为 55 岁(27~81 岁);49 例胃癌肿块 >3.0 cm,32 例 $\leq$ 3.0 cm;胃癌组织包括胃高分化腺癌 5 例、中分化腺癌 17 例、低分化腺癌 59 例;无淋巴结转移者 26 例、淋巴结转移者 55 例;根据 WHO 的 TNM 分期,I~II 期 32 例,III~IV 期 49 例。组织芯片中正常胃黏膜组织对照为 34 例胃癌患者距癌灶 10 cm 以上胃黏膜组织。胃癌组织芯片包括 5 $\times$ 10 个点阵,芯片中最底一排的右侧最后一孔为空白标记孔,以确定组织排列的方向。上述所有组织均经病理确诊,所有患者术前均未进行化、放疗。

1.2 主要试剂 抗 HSP90 α / β 蛋白抗体购自美国 Santa Cruz 公司;DAB 显色试剂盒和 S-P 免疫组织化学染色试剂盒购自福建迈新生物技术有限公司。

1.3 免疫组织化学染色检测蛋白质的表达 采用免疫组织化学染色法(S-P 法)观察 HSP90 α / β 蛋白质在正常胃黏膜组织、癌旁组织和胃癌组织中的表达,实验设立阳性对照(由福建迈新生物有限公司提供)和阴性对照(PBS 替代一抗体),步骤如下:(1)将组织芯片置于二甲苯中充分脱蜡,不同浓度的酒精水化。(2)将组织芯片置于 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH6.0)中 92~98 $^{\circ}$ C 5 min。(3)滴加 3% 过氧化物酶 37 $^{\circ}$ C 15 min。(4)滴加非免疫的动物血清封闭 37 $^{\circ}$ C 10 min。(5)滴加一抗(1:1 000)4 $^{\circ}$ C 过夜。(6)滴加二抗(1:2 000)37 $^{\circ}$ C 15 min。

(7)滴加链霉菌抗生物素蛋白—过氧化物酶溶液 37 $^{\circ}$ C 15 min。(8)DAB 显色后,复染、透明、封片,显微镜下观察与蛋白质在不同组织中的表达情况。

1.4 不同组织中 HSP90 α / β 蛋白质表达结果的判定 显微镜下观察 HSP90 α / β 蛋白质的表达部位与染色情况,蛋白质阳性表达显示强度分为黄色、棕褐色。随机选取组织芯片中每例组织的 5 个不同高倍镜视野,记数每个视野中总细胞数与蛋白质阳性表达细胞数,重复计数 3 次,取平均值作为细胞数,计算不同组织中 HSP90 α / β 蛋白质的阳性表达率。不同组织中 HSP90 α / β 蛋白质表达结果的判定,根据显色的强度与组织中细胞的阳性表达率综合计分。显色强度计分为:无显色为 1 分,黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;细胞阳性表达率计分为: $\leq$ 10% 为 1 分;11%~50% 为 2 分; $\geq$ 50% 为 3 分。将显色强度分值 $\times$ 细胞阳性表达率分值所得数据,其中 1 分为阴性“-”;2~5 分为阳性“+”, $\geq$ 6 分为强阳性“++”,另外细胞阳性表达率 >10% 者也为蛋白质表达阳性。

1.5 统计学处理 所有数据采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析,采用 χ^2 检验和方差分析蛋白质表达与临床资料的关系,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学染色观察 HSP90 α / β 蛋白质的表达 采用免疫组织化学染色观察组织芯片中 HSP90 α / β 蛋白质在正常胃黏膜组织、癌旁组织及胃癌组织中的表达,结果显示 HSP90 α / β 蛋白质主要在细胞浆中表达(图 1)。

2.2 HSP90 α / β 蛋白质在胃癌组织中的表达分析 HSP90 α / β 蛋白质在正常胃黏膜组织、癌旁组织及胃癌组织中的阳性表达率分别为 11.76% (4/34)、30.77% (8/26) 和 65.43% (53/81)。胃癌组织中 HSP90 α / β 蛋白质的阳性表达率高于正常胃黏膜组织和癌旁组织,癌旁组织中该蛋白质的阳性表达率高于正常胃黏膜组织(表 1, $P < 0.05$)。高、中和低分化腺癌中该蛋白质的阳性表达率分别为 40.00% (2/5)、58.82% (10/17) 和 69.49% (41/59)。患者无淋巴结转移与淋巴结转移的胃癌组织中阳性表达率分别为 42.31% (11/26) 和 69.09% (38/55),淋巴结转移者该蛋白的阳性表达率高于

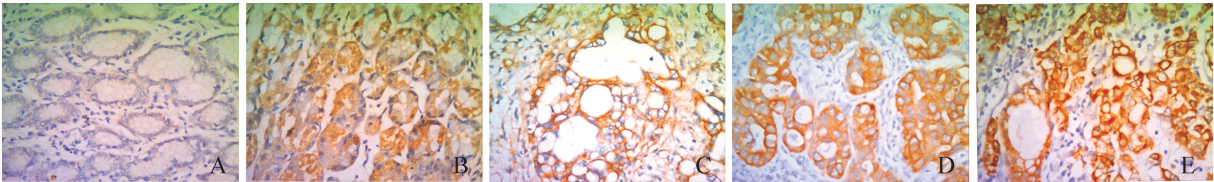


图1 免疫组织化学染色观察 HSP90α/β 蛋白质的表达(400 ×) A:正常胃黏膜;B:癌旁组织;C:高分化腺癌;D:中分化腺癌;E:低分化腺癌

无淋巴结转移者(表1, $P < 0.05$)。胃癌组织中Ⅰ~Ⅱ期和Ⅲ~Ⅳ期阳性表达率分别为56.25%(18/32)和79.59%(39/49),Ⅲ~Ⅳ期患者组织中该蛋白的阳性

表达率高于Ⅰ~Ⅱ期(表1, $P < 0.05$)。结果显示,随着胃癌分化程度的降低、淋巴结转移的发生及TNM分期的增加,HSP90α/β蛋白质的阳性表达率则升高。

表1 HSP90α/β蛋白质的阳性表达分析

指标		n	HSP90α/β 蛋白质表达		阳性率(%)	χ ²
			-	+~+++		
性别	男性	56	26	30	53.57	
	女性	25	12	13	52.00	
正常胃黏膜		34	30	4	11.76	
癌旁组织		26	18	8	30.77 ^a	
胃癌组织	高分化腺癌	5	3	2	40.00 ^a	4.12
	中分化腺癌	17	9	10	58.82 ^a	5.36
	低分化腺癌	59	19	41	69.49 ^{ab}	10.47
肿块大小	> 3.0 cm	49	17	32	65.31	27.83, 10.44
	≤3.0 cm	32	11	21	65.66	
淋巴结转移	无	26	15	11	42.31	5.3
	有	55	17	38	69.09 ^c	
TNM 分期	Ⅰ~Ⅱ	32	13	18	56.25	4.3
	Ⅲ~Ⅳ	49	10	39	79.59 ^d	

与正常胃黏膜组织比较,a; $P < 0.05$;与癌旁组织比较,b; $P < 0.05$;与无淋巴结转移比较,c; $P < 0.05$;与TNM分期Ⅰ~Ⅱ期比较,d; $P < 0.05$

3 讨 论

胃癌的发生、发展涉及多基因参与、多阶段演进的复杂病理学过程。随着蛋白质组学技术的不断更新,许多未知胃癌相关蛋白质不断被发现,为寻找胃癌早期诊断的蛋白质提供了大量的资料,使获得胃癌早期诊断的分子标志物提供了可能。目前已有许多胃癌相关的蛋白质分子已经被证实,如CA19-9^[5]、CEA^[6]、Span-1^[7]等,但是至今仍无用于胃癌早期诊断的蛋白质。本课题组前期采用显微切割与定量蛋白质组学技术相结合,筛选获得了一系列胃癌相关的蛋白,选取其中差异倍数较大且胃癌相关的蛋白质HSP90α/β,分析该蛋白质在胃癌中的表达情况及临床意义,为胃癌的早期诊断及预后评估等提供有价值的实验资料。

1962年,Ritossa在研究果蝇唾液腺时发现,热

应激环境下大部分蛋白质合成均被抑制,但有一组特殊蛋白质合成却被激活,即热休克蛋白(heat shock protein,HSP)^[8]。有研究表明HSP与肿瘤的发生、发展、耐药及预后关系密切,许多研究证实HSP在乳腺癌、肺癌、结直肠癌、鼻咽癌等组织中均高表达,该蛋白对肿瘤的诊断和预后评估具有重要的意义^[9-10]。热休克蛋白90α/β(heat shock protein 90α/β,HSP90α/β)属于热休克蛋白家族成员之一,普遍存在于各物种中,其蛋白质结构高度保守,为细胞生存所必需的分子伴侣(molecular chaperon)蛋白之一^[11]。HSP90蛋白分子量约90kD,是一种疏水性蛋白,常以二聚体形式存在并发挥作用,应激情况下该蛋白的疏水性增加形成寡聚体。HSP90蛋白作为分子伴侣,具有广泛的蛋白结合谱,如激酶、磷酸酶、热休克因子-1、多种核受体、钙调素、肌动蛋白、蛋白酶体、微管蛋白和钙激活蛋白酶等^[12]。HSP90

蛋白可在应激(几乎所有细胞理化环境改变及机体的疾病与创伤)情况下被诱导性高表达,其功能具有在应激条件下纠正细胞内蛋白质发生的错误折叠,对细胞应激过程中具有重要的保护作用。HSP90 蛋白作为分子伴侣,通过低亲和力的结合与解聚,维持相关蛋白质的稳定构象,参与蛋白质折叠、装配、转位与损伤修复等,使细胞信号分子形成与维持正确构象发挥细胞内信号传导功能^[13]。另外,HSP90 蛋白质也参与细胞周期、细胞凋亡等调控过程^[14-16]。本结果显示,胃癌组织中 HSP90 α/β 蛋白质表达水平较正常胃黏膜组织与癌旁组织高,且低分化胃癌组织较高分化胃癌组织阳性表达率高,以及癌旁组织较正常胃黏膜组织高,结果与以往许多研究者在多种肿瘤中的基本一致,根据 HSP90 α/β 蛋白质作为分子伴侣,参与正常细胞与肿瘤细胞中的多种信号途径的传递,参与细胞周期、凋亡等多种功能,结合本实验结果,推测 HSP90 α/β 蛋白质的高表达在胃黏膜癌变过程发挥着重要的生物学功能,该蛋白的高表达对维持细胞内众多蛋白分子的稳定生物学功能尤为重要,尤其是涉及细胞增殖、凋亡与细胞周期的蛋白质。深入揭示 HSP90 α/β 蛋白质在胃癌中的调控分子机制,对阐明胃癌发病的分子机制可能具有非常重要的意义。HSP90 α/β 蛋白有望成为胃癌早期诊断、治疗与临床预后评估分子标记物,以及胃癌治疗时非常有效的分子靶标。

总之,本研究结果初步分析了 HSP90 α/β 蛋白质在胃癌组织中的表达情况,为后续寻找胃癌早期诊断、治疗及临床预后评估的分子标记物提供了有价值的实验资料,然而,基于胃癌发生与发展的复杂性和不同个体间的遗传学差异,且本研究时样本量小,因此临床采用前仍需后续大样本的进一步分析与评估。

参考文献:

- [1] 陈万青,张思维,郑荣寿,等. 中国肿瘤登记地区 2007 年肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤,2011,20(3): 162-169.
- [2] Duraes C, Almeida GM, Seruca R, et al. Biomarkers for gastric cancer: prognostic, predictive or targets of therapy [J]. Virchows Arch, 2014, 464(3): 367-378.
- [3] 赵强,张志伟,刘重元,等. PKC α -Annexin A2-S100A10 在胃癌组织中的表达及意义[J]. 世界华人消化杂志,

- 2014, 22(13): 1793-1800.
- [4] 陈苏琼. LCM 结合定量蛋白质组学技术筛选胃癌组织差异表达蛋白质[C]. 衡阳: 南华大学, 2011: 1-68.
- [5] Kwon OK, Yu W, Chung H. Prognostic value of postoperative CA19-9 normalization in patients with advanced gastric cancer [J]. Hepatogastroenterology, 2013, 60(122): 240-243.
- [6] Sisik A, Kaya M, Bas G, et al. CEA and CA 19-9 are still valuable markers for the prognosis of colorectal and gastric cancer patients [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(7): 4289-4294.
- [7] Kubo N, Ohira M, Sakurai K, et al. SPan-1 is a useful prognostic marker for patients with stage IV gastric cancer who underwent palliative gastrectomy: a retrospective multivariate study [J]. World J Surg, 2013, 37(7): 1681-1687.
- [8] Sharp FR, Zhan X, Liu DZ. Heat shock proteins in the brain: role of Hsp70, Hsp 27, and HO-1 (Hsp32) and their therapeutic potential [J]. Transl Stroke Res, 2013, 4(6): 685-692.
- [9] Kim HS, Kang D, Moon MH, et al. Identification of pancreatic cancer-associated tumor antigen from HSP-enriched tumor lysate-pulsed human dendritic cells [J]. Yonsei Med J, 2014, 55(4): 1014-1027.
- [10] Rappa F, Farina F, Zummo G, et al. HSP-molecular chaperones in cancer biogenesis and tumor therapy: an overview [J]. Anticancer Res, 2012, 32(12): 5139-5150.
- [11] Li J, Buchner J. Structure function and regulation of the hsp90 machinery [J]. Biomed J, 2013, 36(3): 106-117.
- [12] Barrott JJ, Haystead TA. Hsp90, an unlikely ally in the war on cancer [J]. FEBS J, 2013, 280(6): 1381-1396.
- [13] Hong DS, Banerji U, Tavana B, et al. Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 (HSP90): lessons learned and future directions [J]. Cancer Treat Rev, 2013, 39(4): 375-387.
- [14] Jackson SE. Hsp90: structure and function [J]. Top Curr Chem, 2013, 328: 155-240.
- [15] Fan XX, Li N, Wu JL, et al. Celastrol induces apoptosis in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cells via caspases-dependent pathways and Hsp90 client protein degradation [J]. Molecules, 2014, 19(3): 3508-3522.
- [16] Lorenz OR, Freiburger L, Rutz DA, et al. Modulation of the Hsp90 chaperone cycle by a stringent client protein [J]. Mol Cell, 2014, 53(6): 941-953.

(此文编辑: 蒋湘莲)