

◇ 临床医学研究 ◇

HSP90 α 、HSP90 β 在人胃癌组织中的表达吴梦婕¹ 张 红¹ 姚元春² 秦 蓉¹

摘要 目的 探讨 HSP90 α 、HSP90 β 蛋白与 mRNA 在人胃癌组织中的表达及其与胃癌生物学行为的关系。方法 采用免疫组化 SP 法检测两者蛋白在胃癌组织及癌旁正常组织的表达。采用 RT-PCR 法检测两者的 mRNA 在胃癌组织及癌旁正常组织的表达。结果 HSP90 α 、HSP90 β 主要定位于细胞质,其阳性率分别为 82.9% 和 80.0% ($P < 0.01$),与胃癌分化、浸润、分期、转移相关。HSP90 α 、HSP90 β mRNA 在胃癌中的表达明显高于癌旁正常组织 ($P < 0.01$),并与胃癌的分化、分期、淋巴结的转移相关。结论 HSP90 α 、HSP90 β 蛋白在胃癌组织中的阳性表达以及其与胃癌生物学行为的关系提示 HSP90 α 、HSP90 β 可能作为判断胃癌恶性程度的重要指标。HSP90 α 、HSP90 β mRNA 的高表达,且两者均与胃癌的发生、发展关系密切,可能与胃癌组织中的转录调控相关。

关键词 HSP90 α ; HSP90 β ; 免疫组织化学; 逆转录聚合酶链式反应; 胃肿瘤

中图分类号 R 735.2; R 341.32; R 342.22

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)12-1754-05

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是一类在生物进化过程中高度保守并广泛存在于原核及真核生物中的一种蛋白,主要功能是维持细胞蛋白质结构的稳定,提高细胞对应激的耐受性,使细胞维持正常的生理功能。其家族中最突出的成员为 HSP90 α 和 HSP90 β 亚型(现在也分别叫做 HSPC1 和 HSPC3),由 2 个不同基因表达^[1]。HSP90 与肿瘤的关系,特别是与胃癌关系的研究少见报道。该研究采用免疫组化 SP 法和 RT-PCR 法检测胃癌组织和胃黏膜正常组织中 HSP90 α 和 HSP90 β 蛋白和 mRNA 的表达水平;通过分析两者与胃癌临床病理参数之间的关系,探讨两者在胃癌发生、发展中的作用,为胃癌的早期诊断和预后治疗提供理论上的依据,同时为找到新型的抗肿瘤药物提供新的思路。

2014-08-12 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:090413118)

作者单位:¹安徽医科大学基础医学院病理学教研室,合肥 230032

²吉首大学医学院病理学教研室,吉首 416000

作者简介:吴梦婕,女,硕士研究生;

张 红,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:

ayzhanghong2013@126.com

The effect of Liangjun oral solution treatment on the SOD activity & IL-8 content and ultrastructural change of gastric mucosa in a rat experimental model injured by reflux liquid

Yu Wenyong, Ding Xiping, Hu Wen, et al

(Dept of Gastroenterology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To study the influence of SOD & IL-8 and ultrastructural changes on rat bile reflux mucosa model with liangjun oral solution treating. **Methods** The bile reflux gastritis rats model was established by home-made reflux solution gavage, observing the differences of SOD activity & IL-8 content and ultrastructural changes between liangjun oral solution treating group and the control group. **Results** Gastric mucosal SOD activity reduced in control group ($P < 0.05$), IL-8 content increased ($P < 0.05$). We found the injury of close connection among gastric mucosal cells, mitochondria swelling, rough endoplasmic reticulum expansion, microvilli shorter or lost by transmission electron microscope. Compared with control group, liangjun oral solution could increase experimental bile reflux gastritis rats gastric mucosal SOD activity and reduced the content of IL-8, and significantly repaired the ultrastructure of gastric mucosa in rats. **Conclusion** Liangjun oral solution could increase the SOD activity, reduce the content of IL-8, repair damaged ultrastructure and prevent gastric mucosa of rat model.

Key words liangjun oral solution; SOD; IL-8; ultrastructure

1 材料与方法

1.1 标本来源

1.1.1 免疫组化标本来源 收集 2011~2012 年安徽医科大学第一附属医院病理科胃癌存档病例 80 例, 病例术前均未接受放疗和化疗。病例按 WHO 胃癌组织学分级及分期标准归类。实际有效病例在 HSP90 α 中为 70 例, 其中男 46 例, 女 24 例; 年龄 31~80(63.23 \pm 3.27) 岁; 在 HSP90 β 中有效病例为 75 例, 其中男 47 例, 女 28 例; 年龄 31~80(62.56 \pm 3.15) 岁。另外, 取癌旁正常的胃黏膜组织 30 例作为对照组。染色结果均由两位病理医师进行阅片诊断核实。

1.1.2 RT-PCR 标本来源 收集 2012 年 6 月~11 月经安徽医科大学第一附属医院普外科进行手术治疗的胃癌切除标本 32 例, 患者术前均未接受放疗和化疗, 其中男 22 例, 女 10 例; 年龄 33~80(60.25 \pm 3.10) 岁。每例标本留取距癌组织 5 cm 以上手术远端切缘正常胃黏膜组织 32 例, 将所取标本迅速置液氮冷冻, -80 $^{\circ}$ C 低温保存, 以备检测。

1.2 主要试剂 羊抗人 HSP90 α 多克隆抗体(浓缩型, 工作浓度 1:50)、羊抗人 HSP90 β 多克隆抗体(浓缩型, 工作浓度 1:50) 均购自武汉博奥森公司; SP-9000 免疫组化染色试剂盒及浓缩型 DAB 试剂盒均购自北京中杉生物技术有限公司; TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; RT-PCR 试剂盒购自美国 Thermo 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组化 具体操作参照 SP 试剂盒说明书进行, DAB 显色, 苏木精复染, 封片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 用已知阳性组织切片作为阳性对照。判断标准^[2] 采用半定量积分法判定, 每张切片均随机观察计数 5 个高倍视野(\times 400), 取平均数。根据阳性细胞在所观察的细胞中占的比例分为: 阳性细胞数 \leq 5% 为 0 分, 6%~25% 为 1 分, 26%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, >75% 为 4 分; 根据显色的程度来判断阳性程度: 基本不着色为 0 分, 浅黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。将两项积分相乘: 0~2 分为阴性(-), 3~4 分为弱阳性(+), 5~8 分为中度阳性(++), 9~12 分为强阳性(+++). +~+++ 均为判断为阳性表达。将 \geq 3 分归为阳性(+), 便于统计。

1.3.2 RT-PCR 取约 100 g 组织放置研组织匀浆器中, 按照 TRIzol 试剂盒说明提取总 RNA, 逆转录

为 cDNA, 所检测基因引物序列如下(上海生物工程有限公司合成): 目的基因 HSP90 α 的上游引物: 5'-GAACTGGCGGAAGATAAAGAGA-3', 下游引物: 5'-TCTGGTTCTCCTTCATTCTGGT-3', 预计扩增片段大小为 218 bp。HSP90 β 的上游引物: 5'-TGGTGTTCGCTTTTATTCTGC-3', 下游引物: 5'-CTACTTCTTTGACCCGCCTCT-3', 预计扩增片段大小为 190 bp。GAPDH 上游引物: 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTG-3', 下游引物为 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3', 预计扩增片段大小为 108 bp。PCR 扩增反应条件如下: HSP90 α 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 180 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s 循环 30 周期, 72 $^{\circ}$ C 延伸 600 s 后终止扩增。HSP90 β 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 180 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s 循环 30 周期, 72 $^{\circ}$ C 延伸 600 s 后终止扩增。PCR 反应结束后, 各样品分别取 6 μ l 与 2 μ l 溴酚蓝上样缓冲液混合, 加入 2.5% 琼脂糖凝胶加样孔中, 恒压 100 V, 电泳缓冲液 1 \times TBE, 电泳 35 min, 然后在凝胶成像仪中观察结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 计数资料采用频数和百分数(%) 表示, 采用 χ^2 检验; 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组数据采用 *t* 检验, 3 组及以上采用方差分析, 组间比较采用 LSD-*t* 法进行两两比较, 等级资料采用秩和检验。

2 结果

2.1 HSP90 α 、HSP90 β 蛋白在胃癌及癌旁正常胃黏膜组织中的表达及分布 HSP90 α 蛋白阳性染色主要定位于癌细胞的细胞质, 少量定位于细胞核, 阳性颗粒呈棕褐色; HSP90 β 蛋白阳性染色主要定位于癌细胞的细胞质, 阳性颗粒呈棕褐色。见图 1。HSP90 α 、HSP90 β 在胃癌组织中的蛋白阳性表达率明显高于正常胃黏膜组织, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见表 1。

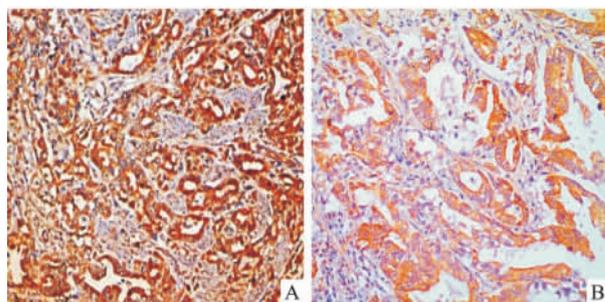


图1 胃癌组织中 HSP90 α 、HSP90 β 的蛋白表达 SP \times 200
A: HSP90 α 中分化腺癌; B: HSP90 β 中分化腺癌

表1 HSP90α和HSP90β蛋白在胃癌组织和正常胃黏膜组织中的表达情况

项目	组织 (n)	阴性	阳性	阳性率 (%)	χ ² 值	P 值
HSP90α	胃癌(70)	12	58	82.90	18.367	<0.01
	正常(30)	18	12	40.00		
HSP90β	胃癌(75)	15	60	80.00		
	正常(30)	17	13	43.30		

2.2 HSP90α、HSP90β 蛋白的表达与胃癌临床病理参数之间的关系 HSP90α、HSP90β 蛋白在胃癌组织中的阳性表达率明显高于其在癌旁正常组织中的表达,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 两者在胃癌组织中,均与淋巴结的转移、临床分期相关 ($P < 0.05$),均与患者肿瘤大小、年龄、性别无关; 另外 HSP90α 蛋白表达与肿瘤的浸润相关、HSP90β 蛋白表达与分化程度相关 ($P < 0.05$),见表 2。

2.3 HSP90α、HSP90β mRNA 的表达 应用 Bio-Rad 自带软件 (quantity one) 测定同一样本目的片段和 GAPDH 的灰度值,并对各组样本的目的片段与 GAPDH 灰度值比值进行统计,不同分化级别胃癌组织中 HSP90α 和 HSP90β mRNA 的表达情况见图 2。

HSP90α、HSP90β mRNA 在不同分化级别胃癌中的表达情况,以对照组作为对照。RT-PCR 结果显示: 正常组织微量表达,胃癌组织表达明显; 在高分化、中分化及低分化胃癌组织中 mRNA 的表达量逐渐上升,中低分化的表达高于高分化胃癌组织; 淋巴结转移中的患者 mRNA 明显高于无淋巴结转移的患者,肿瘤临床分期中 mRNA 表达 III ~ IV 明显高于 I ~ II 期患者。见图 2。

RT-PCR 结果显示,胃癌组织和癌旁组织中,都有 HSP90α 和 HSP90β mRNA 的表达,但是 HSP90α 和 HSP90β mRNA 在癌旁组织中阳性表达较弱,在胃癌组织的表达较明显高,两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$); HSP90α、HSP90β mRNA 表达中,中分化阳性表达明显高于高分化,两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$),低分化表达明显高于高分化,两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$),并且随着胃癌分化程度的提高,其表达水平呈下降趋势; 淋巴结转移中的 mRNA 表达明显高于淋巴结转移阴性组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 在肿瘤临床分期中 III ~ IV 患者 mRNA 表达明显高于 I ~ II 期患者,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ $P < 0.01$)。见表 3、图 2。

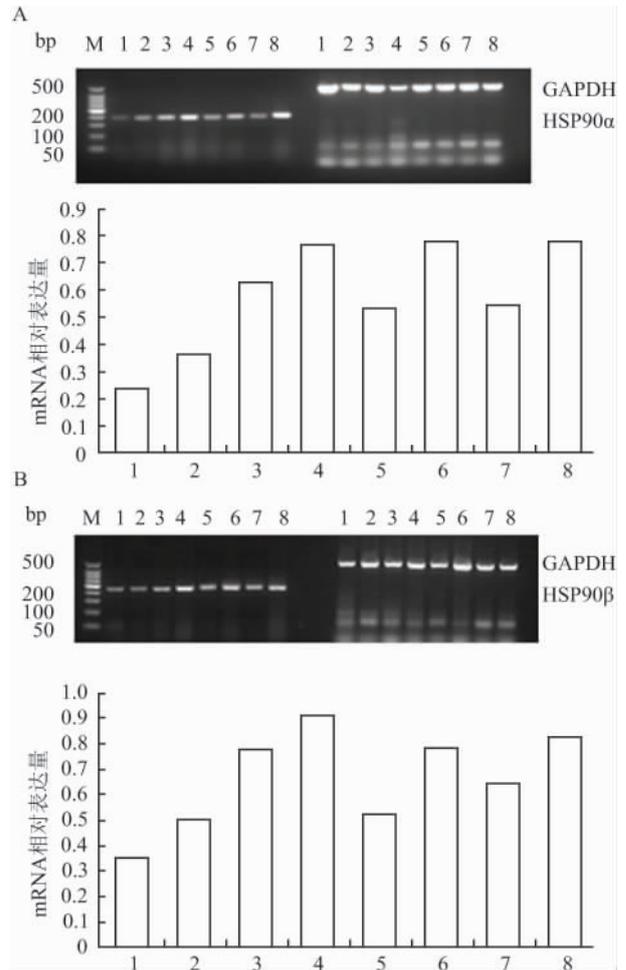


图2 HSP90α mRNA、HSP90β mRNA 不同级别胃癌中表达情况

M: Marker; A: HSP90α; B: HSP90β; 1: 对照组; 2: 高分化; 3: 中分化; 4: 低分化; 5: 淋巴结转移阴性; 6: 淋巴结转移阳性; 7: I ~ II 期; 8: III ~ IV 期

3 讨论

研究^[3-4]表明,HSP 在多种恶性肿瘤(例如乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌和前列腺癌等)中均呈高水平表达。在恶性肿瘤生长过程中,HSP 通过调控使细胞凋亡的线粒体、死亡受体信号转导通路、应激信号转导通路以及生长信号转导通路等多种机制,参与肿瘤细胞的生长和增殖^[5],而 HSP90 的作用在这些癌基因通路中占重要组成部分^[6]。随着对 HSP 在肿瘤的不断深入研究,HSP90 与胃癌的研究也备受关注。

通过免疫组化方法检测的结果,分析两者蛋白与胃癌生物学行为的关系,发现 HSP90α 蛋白表达随着肿瘤浸润深度的增大而增高,HSP90β 蛋白的

表2 HSP90α、HSP90β 蛋白在胃癌组织和正常胃黏膜组织中的表达情况(n)

项目	n	HSP90α						n	HSP90β					
		-	+	++	+++	Z 值	P 值		-	+	++	+++	Z 值	P 值
性别														
男	46	8	8	20	10	-1.379	0.168	47	10	6	20	11	-0.248	0.804
女	24	4	2	8	10			28	5	4	12	7		
年龄(岁)														
<60	29	7	3	12	7	-0.877	0.380	32	6	3	14	9	-0.825	0.409
≥60	41	5	7	16	13			43	9	7	18	9		
肿瘤大小(cm)														
<5	27	8	3	10	6	-1.598	0.110	44	8	6	20	10	-0.114	0.910
≥5	43	4	7	18	14			31	7	4	12	8		
分化程度														
高中	36	5	7	14	10	-0.086	0.931	35	2	5	17	11	-2.527	0.012
低	34	7	3	14	10			40	13	5	15	7		
浸润深度														
T ₁ ~ T ₂	28	10	3	9	6	-2.331	0.020	32	9	4	13	6	-1.396	0.163
T ₃ ~ T ₄	42	2	7	19	14			43	6	6	19	12		
淋巴结转移														
无	20	8	2	7	3	-2.542	0.011	27	10	3	9	5	-2.255	0.024
有	50	4	8	21	17			48	5	7	23	15		
TNM 分期														
I ~ II	45	4	6	20	15	-2.203	0.028	29	10	4	10	5	-2.210	0.027
III ~ IV	25	8	4	8	5			46	5	6	22	13		

表3 HSP90α、HSP90β mRNA 的表达与胃癌临床因素之间的关系($\bar{x} \pm s$)

项目	n	HSP90α/ GAPDH mRNA		t/F 值	P 值	HSP90β/ GAPDH mRNA		t/F 值	P 值
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$			$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$		
组织									
胃癌组织	32	0.23 ± 0.10		-9.791	<0.001	0.36 ± 0.11		-9.214	<0.001
癌旁组织	32	0.68 ± 0.24				0.79 ± 0.24			
分化程度									
高	2	0.28 ± 0.07				0.21 ± 0.14			
中	16	0.63 ± 0.22*	5.223	0.012		0.78 ± 0.20*	9.570	0.001	
低	14	0.77 ± 0.21**				0.92 ± 0.24**			
浸润深度									
T ₁ ~ T ₂	14	0.61 ± 0.20		-1.466	0.153	0.72 ± 0.28		-1.251	0.221
T ₃ ~ T ₄	18	0.73 ± 0.25				0.82 ± 0.17			
淋巴结转移									
无	15	0.53 ± 0.22		-3.450	0.002	0.53 ± 0.09		-5.058	<0.001
有	17	0.78 ± 0.19				0.79 ± 0.18			
TNM 分期									
I ~ II	14	0.54 ± 0.20		-3.274	0.003	0.65 ± 0.23		-2.486	0.019
III ~ IV	18	0.78 ± 0.21				0.83 ± 0.18			

与高分化比较: * P<0.05, ** P<0.01

表达随着分化程度的降低而增高,该结果与在乳腺癌及肿瘤细胞研究^[7]结果相近。说明 HSP90α 与细胞增殖相关,而 HSP90β 与细胞的分化相关。HSP90α 蛋白阳性表达结果与研究^[8]结果基本一致; HSP90β 蛋白阳性表达结果与许玲^[9]在胃癌中的研究结果并不完全一致: HSP90β 蛋白的高表达

与肿瘤的浸润相关。笔者认为可能是由于在肿瘤分化过程中,一方面抑制细胞凋亡和分化,另一方面还对肿瘤细胞增殖过程起到了推进作用,但是同样与肿瘤的发生密切相关。分泌型 HSP90 在不同的细胞外环境中具有不同的下游靶点^[6],这也可能是结果不完全一致的原因。HSP90α、HSP90β 蛋白的高表达与胃癌的生物学行为相关,可以作为肿瘤的标志物。

RT-PCR 的检测结果显示,从分子水平上证实 HSP90α、HSP90β mRNA 在胃癌组织中的高表达。这种高表达一方面由于 HSP90α、HSP90β 蛋白的表达提高,同时编码该蛋白的 mRNA 也升高,导致 HSP90α、HSP90β 的转录活性被激活引起,另一方面可能是由于 HSP 的合成受转录水平受热休克因子(heat shock transcription factor, HSF)调控,在应激、缺氧、肿瘤生长因子的刺激下诱导两者 mRNA 快速过量表达,在肿瘤的发生、发展过程中,癌基因和抑癌基因之间的拮抗或者协同等多种因素作用,导致两者肿瘤细胞的增殖和转化中发挥重要作用,引起的 mRNA 异常表达。从基因的表达的分子水平上来看, HSP90α 和 HSP90β 在胃癌组织中的 mRNA 表达与免疫组化蛋白的表达结果并不完全一致,可能是由于在真核生物中,与基因的转录和调控有关,

也可能与收集的标本列数不够有关。

综上所述,无论是在蛋白表达水平还是 mRNA 的表达水平上,通过检测 HSP90 α 、HSP90 β 表达量可以作为肿瘤生物学行为和化疗敏感性反应的生物指标。因此通过检测 HSP90 α 、HSP90 β 在胃癌中的高表达作为靶点,根据基因蛋白的表达水平进一步认识 HSP90 抑制剂的特异性以及与其他化疗药物的联合使用^[10],为肿瘤开发新型的有效的抗肿瘤疫苗给肿瘤患者带来了新的思路。

参考文献

- [1] Jego G, Hazoume A, Seigneuric R, et al. Targeting heat shock proteins in cancer[J]. *Cancer Lett*, 2013, 332(2): 275–85.
- [2] 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): 152–5.
- [3] Kang G H, Lee E J, Jang K T, et al. Expression of HSP90 in gastrointestinal stromal tumours and mesenchymal tumours[J]. *Histopathology*, 2010, 56(6): 694–701.
- [4] Soroka J, Wandinger S K, Mausbacher N, et al. Conformational switching of the molecular chaperone Hsp90 *via* regulated phosphorylation[J]. *Mol Cell*, 2012, 45(4): 517–28.
- [5] Li Y, Zhang T, Schwartz S J, et al. Sulfaphane potentiates the efficacy of 17-allylamino 17-demethoxygeldanamycin against pancreatic cancer through enhanced abrogation of Hsp90 chaperone function[J]. *Nutr Cancer*, 2011, 63(7): 1151–9.
- [6] Li W, Sahu D, Tsen F. Secreted heat shock protein-90 (Hsp90) in wound healing and cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(3): 730–41.
- [7] Zagouri F, Boumakis E, Koutsoukos K, et al. Heat shock protein 90 (hsp90) expression and breast cancer[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2012, 5(9): 1008–20.
- [8] 张剑军,徐惠绵,阎影,等. 热休克蛋白 70 和 90 α 在人胃癌组织中表达及其与胃癌生物学行为的关系[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2006, 13(7): 495–7.
- [9] 许玲. 胃腺癌中 HSP90 β 的表达情况与细胞增殖和肿瘤浸润转移的关系研究[D]. 山东大学, 2013.
- [10] Chadli A, Felts S J, Wang Q, et al. Celastrol inhibits Hsp90 chaperoning of steroid receptors by inducing fibrillization of the co-chaperone p23[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(6): 4224–31.

Expression and clinical significance of HSP90 α , HSP90 β protein and mRNA in human gastric carcinoma

Wu Mengjie¹, Zhang Hong¹, Yao Yuanchun², et al

(¹Dept of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of Pathology, Jishou University School of Medicine, Jishou 416000)

Abstract Objective To investigate the expression of protein and mRNA of HSP90 α , HSP90 β in human gastric carcinoma and normal mucosa, and to determine their relation to biological behaviors of gastric carcinoma. **Methods**

The protein expression of HSP90 α and HSP90 β in gastric carcinoma tissues and the adjacent normal tissues were detected by immunohistochemical SP method. The expressions of HSP90 α mRNA and HSP90 β mRNA in gastric carcinoma tissues and the adjacent normal tissues were detected by reversing transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. **Results** The positive expressions of HSP90 α and HSP90 β protein were mainly located in cytoplasm, the positive expression rates were 82.9% and 80.0% ($P < 0.01$) respectively. It was related to differentiation, depth of tumor invasion, stage, metastasis of gastric cancer. The expressions of HSP90 α and HSP90 β mRNA in gastric carcinoma were significantly higher than the adjacent normal tissues ($P < 0.01$), which was related to the differentiated degree, the stage and lymphatic metastasis. **Conclusion** The positive expressions of HSP90 α and HSP90 β protein in gastric carcinoma, as well as their relationship with biological behaviors of gastric carcinoma indicate that HSP90 α and HSP90 β act as critical indicators that contribute to the malignancy of gastric carcinoma. Both the high expressions of HSP90 α mRNA and HSP90 β mRNA, which are closely related to the occurring and development of gastric carcinoma, may have relationship with the transcriptional regulation in the gastric carcinoma tissues.

Key words HSP90 α ; HSP90 β ; immunohistochemistry; RT-PCR; gastric neoplasm