

CHOP/GADD153 在食管鳞状细胞癌中的表达及临床意义

陈 海¹, 吴 勇², 于在诚¹, 汪 渊³

摘要 目的 探讨内质网应激相关蛋白 CHOP/GADD153 在食管鳞状细胞癌中的表达及临床意义, 并分析其与临床病理特征的关系。方法 食管鳞状细胞癌组织及距癌组织 5 cm 以上的手术远端切缘的食管鳞状上皮组织各 87 例, 应用组织芯片、免疫组化法及 Western blot 法检测 CHOP/GADD153 蛋白的表达, 并分析其表达与患者性别、年龄、分化程度、浸润深度、病理分期及淋巴转移等临床病理特征之间的关系。
结果 食管鳞状细胞癌组织中 CHOP/GADD153 的表达在蛋

2014-03-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 812772399)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院普胸外科, 合肥 230022

²淮南新华医疗集团北方医院普胸外科, 淮南 232082

³安徽医科大学分子生物学实验室, 省部共建重要遗传病基因资源利用重点实验室, 合肥 230032

作者简介: 陈 海 男 医师 硕士研究生;

于在诚 男, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yuzacheng@tom.com;

汪 渊 男 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: aydesm-1@163.com

白水平明显高于食管正常鳞状上皮组织($P < 0.01$), 且其高表达与食管鳞状细胞癌的浸润深度、分化程度、病理分期及淋巴转移密切相关($P < 0.01$), 而与患者性别及年龄无关。

结论 CHOP/GADD153 参与食管鳞状细胞癌的发生、发展, 其表达水平随着食管鳞状细胞癌组织恶性程度的增高而增高, 可能作为衡量食管鳞状细胞癌恶性程度的一种有潜在价值的分子标志物。

关键词 内质网应激; CCAAT 增加子结合蛋白; 食管肿瘤; 鳞状细胞癌

中图分类号 R 735.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)08-1136-05

食管癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 尽管内镜检查能够发现部分早期病变患者, 但是大部分患者确诊即是中晚期, 预后差^[1]。CHOP/GADD153, 又称 CCAAT 增强子结合蛋白(CCAAT enhancer binding protein, C/EBP ξ)、DNA 损伤诱导转录因子 3 (DNA damage inducible transcript 3, DDIT3), 属于

Three-dimensional finite element analysis of rapid tooth movement through reducing resistance and distraction

Liang Zhihong¹, Xue Junjie^{2,3}, Wang Hongjun¹

(¹Prophylactico-therapeutic Institution of Hongkou District, Shanghai 200081; ²Dept of Orthodontics, State Key Laboratory of Oral Disease, West China Hospital of Stomatology, Chengdu 610041; ³Dept of Orthodontics, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000)

Abstract Objective This research used three-dimensional finite element analysis to compare the canine distal movement and forced distribution of teeth and periodontal tissue in three ways. **Methods** This research established three-dimensional finite element models under the conventional condition to move the canine (model 1), rapid canine movement through distracting osteogenesis of the periodontal ligament (model 2), rapid canine movement through reducing resistance and distracting method (model 3), then carried strength on buccal and palatal sides of teeth. **Results** The biggest displacement quantity on canine: model 2 > model 3 > model 1; the biggest equivalent stress: model 2 < model 1 < model 3; the biggest principal stress: model 1 < model 2 < model 3; the biggest shear stress: model 2 < model 1 < model 3. **Conclusion** In the process of canine distal movement, reducing bone resistance especially distal alveolar crest of canine, can accelerate the tooth moving speed effectively. And the two ways successfully avoid the loss of anchorage. While, the canine has distal motion tendency under the action of force, doctors should take appropriate measures to control it in clinical work.

Key words distraction osteogenesis; three-dimensional finite element; malocclusion; tooth movement

C/EBP 家族成员 是内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)特异的转录因子,在生理状态下表达量较低,但当各种损伤引起未折叠蛋白或错误折叠蛋白增多、胞内 Ca^{2+} 稳态失衡而导致 ERS 反应时,CHOP 会被激活而呈现高表达^[2]。ERS 中 CHOP 介导的凋亡与许多疾病相关,如糖尿病、病毒感染、脑缺血、眼科疾病、肝病和帕金森病等^[3-4],尤其是其与肿瘤发生发展、浸润及转移的相互关系备受各国研究者的关注。近来国内外对 CHOP 在人类肿瘤中的研究颇多,陈俊榕等^[5]发现 CHOP 在伴高级别上皮内瘤变和恶变的腺瘤和腺癌组织阳性表达率均显著高于正常肠黏膜和早期腺瘤;Mertani et al^[6]发现乳腺癌细胞株中 CHOP mRNA 呈高表达,但有关 CHOP 在人类食管癌中的研究尚未见报道。该研究选取食管鳞状细胞癌组织及正常食管鳞状上皮组织各 87 例,分别应用组织芯片、免疫组化法及 Western blot 法检测 CHOP/GADD153 蛋白水平的表达,分析 CHOP/GADD153 的表达与临床病理特征的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2011 年 11 月~2012 年 4 月在安徽医科大学第一附属医院普胸外科 I、II 病区手术切除的食管鳞状细胞癌标本以及距癌组织 5 cm 以上的手术远端切缘的正常食管鳞状上皮组织标本各 87 例。患者术前均未接受放、化疗治疗,且术后全部病理切片均由我院病理科 2 位以上病理专家确诊。将所取标本迅速置于我院输血科 -80 ℃ 保存备用。87 例患者中,男 68 例,女 19 例,年龄 43~80 (62.0 ± 7.2) 岁。经术后病理检查确诊,其中分化程度 I 级(高分化)23 例、II 级(中分化)53 例、III 级(低分化)11 例;浸润深度:侵及黏膜层 5 例、侵及肌层 19 例、侵及纤维膜 63 例;食管癌分期标准采用国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)2009 年第 7 版制定的 TNM 分期: I ~ II 期 51 例、III ~ IV 期 37 例;有淋巴结转移 45 例、无淋巴结转移 42 例。

1.2 主要试剂 兔抗人 CHOP 多克隆抗体(sc-575)、鼠抗人多克隆抗体 β -actin 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;PV-6000 免疫组化检测试剂盒、浓缩型 DAB 试剂盒、HRP 标记的羊抗兔及羊抗鼠 IgG 购于北京中杉金桥生物技术有限公司;预染蛋白质分子质量标准购自加拿大 Fermentas 公司;SuperSignal[®] West Pico Trial Kit(ECL 显色试剂盒)

购自美国 PIERCE 公司;RIPA 裂解液(强)、PVDF 膜、BCA 试剂盒及一抗稀释液购自上海碧云天生物技术研究所。

1.3 方法

1.3.1 组织芯片的制备 食管癌标本手术离体后立即置于 10% 甲醛溶液固定,常规石蜡包埋、切片及组织病理诊断阅片。在 HE 染色切片的指引下通过显微镜对目标组织定位标记,每块蜡块与一个目标组织相对应,共计 175 个位点。利用组织芯片仪依次从原始蜡块上穿取直径 1.0 mm 的组织柱,插入每块具有 45 个点阵的受体蜡块中,经过融蜡、冷却之后制成组织芯片。所得组织芯片常规切片,并行 HE 染色,以 4 μm 厚连续切片备用。

1.3.2 免疫组化检测 CHOP/GADD153 蛋白的表达 切片常规脱蜡、水化、抗原修复等,滴加抗 CHOP/GADD153 抗体孵育过夜(兔抗人,1:100),滴加通用型 IgG 抗体-HRP 多聚体 30 min(羊抗兔/小鼠 IgG 多聚体),滴加 DAB 染色,自来水冲洗,苏木精复染,盐酸酒精分化,自来水反蓝,梯度酒精脱水,二甲苯透明树脂封片,显微镜下阅片,用已知 CHOP 阳性乳腺癌组织作阳性对照。相应癌旁正常食管鳞状上皮组织作阴性对照,一抗予 PBS 代替作阴性对照。阳性结果表现为棕黄色细颗粒分布于细胞核内,采用 Image Pro Plus 分析软件测定阳性细胞的平均吸光度值(average absorbance value, A)。每张切片随机测定 5 个区域的阳性细胞平均光密度(average optical density, AOD),以其均值反映 CHOP/GADD153 蛋白的表达水平。

1.3.3 Western blot 法检测 CHOP/GADD153 蛋白的表达 根据免疫组化的实验结果,选取典型病例 13 例,其中正常食管鳞状上皮 1 例,食管鳞状细胞癌 12 例,各取少量,匀浆器研碎,加入蛋白裂解液,提取、浓缩得到蛋白样本,具体步骤严格按说明书进行。蛋白样本电泳后,转到聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜)上,加入 5% 脱脂奶粉封闭液,室温下孵育 2 h,在水平摇床上振摇放置 2 h, PBST 漂洗 PVDF 膜 3 遍,加入 1:100 抗 CHOP/GADD153 抗体(兔抗人)4 ℃ 孵育过夜。弃去一抗, PBST 洗涤 3 遍。加入 1:1000 的通用型 IgG 抗体-HRP 多聚体(羊抗兔/小鼠 IgG 多聚体),室温振摇孵育 2~3 h 后,弃去二抗, PBST 洗涤 3 遍,不含 0.05% Tween-20 的 PBS 洗涤 1 遍,增强化学发光法(ECL)显影,曝光。以 β -actin 作为内参照,结果以灰度扫描,用相对吸光度值(即 CHOP/GADD153 条带吸光度值/ β -

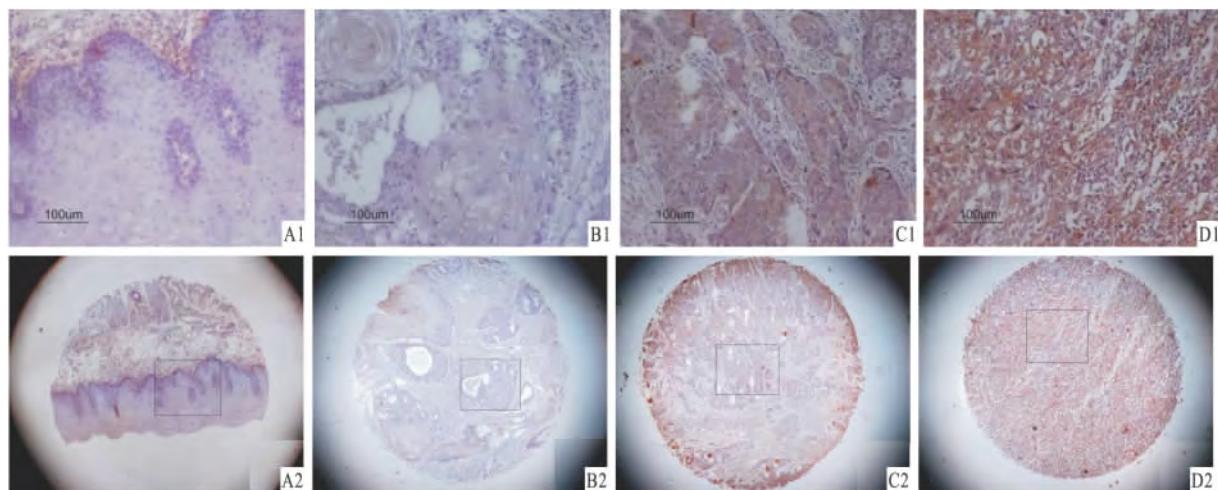


图1 免疫组化 CHOP/GADD153 在正常食管鳞状上皮及食管鳞状细胞癌组织中的表达

A:正常食管鳞状上皮;B:高分化食管鳞状细胞癌组织;C:中分化食管鳞状细胞癌组织;D:低分化食管鳞状细胞癌组织;1:SP × 200;2:SP × 40

actin 条带吸光度值) 表示 CHOP/GADD153 蛋白的相对表达强度。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 免疫组化法比较两组 CHOP/GADD153 蛋白表达 87 例食管鳞状细胞癌组织均存在核 CHOP 染色阳性, 87 例对照组出现弱阳性结果。食管鳞状细胞癌组织 CHOP/GADD153 蛋白表达水平 (0.37543 ± 0.05860) 较对照组 (0.28235 ± 0.06670) 明显升高 ($P < 0.01$)。见图 1。在 87 例食管鳞状细胞癌患者中, 68 例男性及 19 例女性 CHOP/GADD153 蛋白表达水平分别为 (0.38008 ± 0.05619) 和 (0.35881 ± 0.06547), 年龄 > 60 岁者 15 例, ≤ 60 岁者 72 例, 蛋白表达水平分别为 (0.38133 ± 0.04455)、(0.38972 ± 0.05944), 但蛋白表达水平在性别和年龄分组比较上差异均无统计学意义。当按肿瘤侵及深度(黏膜层、肌层、纤维膜)、分化程度(高分化、中分化、低分化)、淋巴结转移(阳性、阴性)及 TNM 分期进行分层分析时, 发现两组蛋白表达水平在各亚组比较差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 Western blot 法 Western blot 结果显示:食管鳞状细胞癌组织与正常食管鳞状上皮组织中均可检测到 CHOP/GADD153 的表达。见图 2。

3 讨论

食管癌是我国常见的上消化道恶性肿瘤, 发病

表1 CHOP/GADD153 的表达与食管鳞状细胞癌患者临床病理特征的关系

项目	例数	AOD	t 值	P 值
性别				
男	68	0.38008 ± 0.05619	1.642 043	0.104 276
女	19	0.35881 ± 0.06547		
年龄(岁)				
> 60	15	0.38133 ± 0.04455	0.768 551	0.454 930
≤ 60	72	0.38972 ± 0.05944		
分化程度				
低	11	0.48455 ± 0.03182	3.235 800*	0.002 133*
中	53	0.38114 ± 0.02867	6.893 940#	0.000 042#
高	23	0.31010 ± 0.02302		
淋巴结转移				
阳性	45	0.34625 ± 0.04554	3.354 780	0.001 643
阴性	42	0.40670 ± 0.05516		
侵及深度				
黏膜层	5	0.27498 ± 0.02070	6.533 740&	0.002 835&
肌层	19	0.32120 ± 0.01222	6.107 560△	0.003 637△
纤维膜	63	0.39976 ± 0.04876		
TNM 分期				
I ~ II	51	0.35078 ± 0.04522	3.657 120	0.003 464
III ~ IV	36	0.41035 ± 0.05813		

* 中分化与低分化比较; #高分化与低分化比较; & 侵及肌层与侵及黏膜层比较; △侵及纤维膜与侵及黏膜层比较

率和死亡率均较高。目前普遍认为食管癌变是一个涉及多因素、多阶段、多基因变异积累及相互作用的复杂过程, 食管癌的发生、发展过程涉及大量基因表达水平的改变, 如癌基因的激活和抑癌基因的失活^[7]。随着医疗水平的迅猛发展, 食管癌的手术切除率明显提高, 手术死亡率明显下降, 但是食管癌患者的长期预后仍不容乐观, 目前食管癌患者的 5 年生存率仍难以超过 35%。造成这一现象的主要原

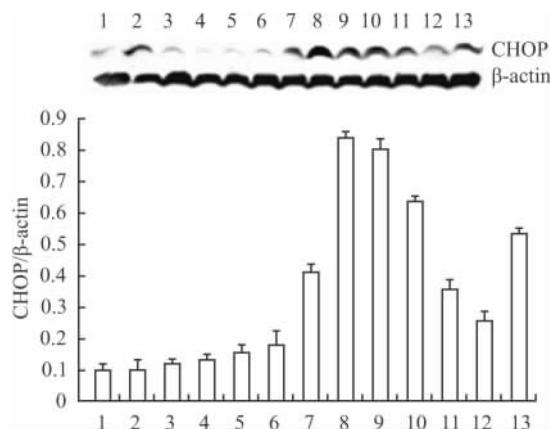


图2 Western blot法检测CHOP/GADD153在正常食管鳞状上皮与食管鳞状细胞癌组织中的表达

1:正常鳞状上皮;2~13:食管鳞状细胞癌(2:男性;3:女性;4:>60岁;5:≤60岁;6:肿瘤侵犯黏膜层;7:肿瘤侵犯肌层;8:肿瘤侵犯纤维层;9:低分化鳞癌;10:中分化鳞癌;11:高分化鳞癌;12:有淋巴结转移;13:无淋巴结转移)

因是食管癌患者早期无明显的特异性症状,大多数首次就诊的食管癌患者已经为进展期患者,临床治疗效果往往较差。近年来,随着分子生物学的迅速发展,研究者发现一些与食管癌发生、发展的分子生物学指标,如鳞状上皮细胞癌抗原(squamous cell carcinoma antigen,SCCA)、癌胚抗原(carcinoembryonic antigen,CEA)、神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase,NSE)、细胞角蛋白片段抗原21-1(cytokeratin fragment antigen 21-1,Cyfra21-1)、糖类抗原19-9(carbohydrate antigen 19-9,CA19-9)、组织多肽特异抗原(tissue polypeptide specific antigen,TPS)、细胞质胸苷激酶1(thymidine kinase 1,TK1)等,可用于食管癌的辅助诊断、疗效检测,但尚不能用于食管癌的早期诊断^[8~11]。

CHOP/GADD153是ERS特异的转录因子^[12~13]与各种细胞活动如增殖、分化、能量代谢、凋亡相关。正常情况下,CHOP主要存在于细胞质内,表达甚微,当细胞处于应激状态下时被活化并转位到细胞核内^[14]削弱Bcl-2的抗凋亡功能,从而导致ER膜上Bax和Bak构象变化并寡聚化,破坏膜的完整性,导致内钙外流,从而使细胞质内Ca²⁺浓度升高,诱发细胞凋亡。本实验通过对食管鳞状细胞癌组织和正常食管鳞状上皮组织CHOP/GADD153蛋白的检测显示,食管鳞状细胞癌中CHOP/GADD153的表达明显高于食管正常鳞状上皮,提示在正常黏膜癌变过程中ERS被激活。本研究显示CHOP/GADD153的表达与肿瘤的浸润深

度、分化程度、病理分期及有无淋巴结转移相关,而与患者的性别及年龄无关。CHOP/GADD153的表达程度随着浸润深度的增加而增高;随着分化程度的降低而增高;病理分期晚的表达高于病理分期早的;有淋巴结转移的明显高于无淋巴结转移。以上结果均显示,CHOP/GADD153参与了食管鳞状细胞癌的发生、发展,表达水平随着食管鳞状细胞癌组织恶性程度的增高而增高,其作用贯穿于肿瘤的生长、进展、侵袭及转移过程中,因此可能成为衡量食管鳞状细胞癌恶性程度的一种有潜在价值的分子标志物。王苏美等^[15]发现鼻咽癌组织中CHOP高表达于胞质及细胞核,鼻咽炎组织中CHOP仅弱阳性低表达于胞质;Conn et al^[16]发现神经母细胞瘤中CHOP亦有表达。

另外,研究^[17~18]显示抗肿瘤药物可通过上调CHOP基因的表达来诱导肿瘤细胞凋亡;同时CHOP的过表达在增敏化疗药物中也起到了关键作用。如芬维A胺和前列腺素A类似物clavulone可诱导神经母细胞瘤和人类肝癌细胞、血癌细胞凋亡,均与激活CHOP介导的ERS相关凋亡途径有关^[19];CHOP基因沉默能明显降低肿瘤细胞对化疗药的敏感性,甲基硒酸作为ERS的诱导剂能将紫杉烷类化疗药的抗癌活性提高,实验中观察到了CHOP的高表达。这也进一步揭示了CHOP/GADD153在恶性肿瘤发生发展过程中发挥重要作用,然而提高CHOP的表达对治疗食管癌的影响尚有待进一步的研究。

参考文献

- [1] Lao-Sirieix P, Fitzgerald R C. Screening for oesophageal cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol* 2012 9(5):278~87.
- [2] Zha L, Fan L, Sun G, et al. Melatonin sensitizes human hepatoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. *J Pineal Res* 2012 52(3):322~31.
- [3] Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, et al. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes[J]. *J Clin Invest* 2002 109(4):525~32.
- [4] Silva R M, Ries V, Oo T F, et al. CHOP/GADD153 is a mediator of apoptotic death in substantia nigra dopamine neurons in an *in vivo* neurotoxin model of parkinsonism[J]. *J Neurochem*, 2005, 95(4):974~86.
- [5] 陈俊榕,李初俊,杨惠玲,等.结直肠腺瘤及癌变组织CHOP蛋白表达与细胞凋亡的相关性研究[J].中国病理生理杂志,2011,27(5):875~82.
- [6] Mertani H C, Zhu T, Goh E L, et al. Autocrine human growth hormone(hGH) regulation of human mammary carcinoma cell gene expression. Identification of CHOP as a mediator of hGH-stimulated

- human mammary carcinoma cell survival [J]. *J Biol Chem* 2001, 276(24):21464-75.
- [7] Zhang X M, Guo M Z. The value of epigenetic markers in esophageal cancer [J]. *Front Med China* 2010, 4(4):378-84.
- [8] 高鼎亮,范钟麟,王学红. 鳞状细胞癌抗原、癌胚抗原、糖类相关抗原 19-9 在食管癌中的表达及意义 [J]. *社区医学杂志*, 2011, 9(6):36-8.
- [9] 曹红江, 华. 血清鳞状上皮细胞癌相关抗原、癌胚抗原、神经元特异性烯醇化酶及细胞角蛋白 19 片段抗原检测在食管癌诊断中的价值 [J]. *医学检验* 2013, 10(14):96-100.
- [10] 陈俊强, 陈明强, 李云英等. 食管癌患者血清中组织多肽特异抗原的表达及临床意义 [J]. *肿瘤研究与临床* 2005, 17(5):33-4.
- [11] Li Z, Wang Y, He J, et al. Serological thymidine kinase 1 is a prognostic factor in oesophageal, cardiac and lung carcinomas [J]. *Eur J Cancer Prev* 2010, 19(4):313-8.
- [12] Szegezdi E, Logue S E, Gorman A M, et al. Mediators of endoplasmic reticulum stress induced apoptosis [J]. *EMBO Rep*, 2006, 7(9):880-5.
- [13] Yokouchi M, Hiramatsu N, Hayakawa K, et al. A typical bidirectional regulation of cadmium-induced apoptosis via distinct signaling of unfolded protein response [J]. *Cell Death Differ* 2007, 14(8):1467-74.
- [14] Ron D, Habener J F. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription [J]. *Genes Dev*, 1992, 6(3):439-53.
- [15] 王苏美, 张惠忠, 马志建等. CHOP 在鼻咽癌中的表达及其意义 [J]. *分子诊断与治疗杂志* 2012, 4(2):84-8.
- [16] Conn K J, Gao W W, Ullman M D, et al. Specific up-regulation of GADD153/CHOP in 1-methyl-4-phenyl-pyridinium-treated SH-SY5Y cells [J]. *J Neurosci Res* 2002, 68(6):755-60.
- [17] Ma J, Qiu Y, Yang L, et al. Desipramine induces apoptosis in rat glioma cells via endoplasmic reticulum stress-dependent CHOP pathway [J]. *J Neurooncol* 2011, 101(1):41-8.
- [18] Akatsu Y, Saikawa Y, Kubota T, et al. Predictive value of GADD153, p21 and c-Jun for chemotherapy response in gastric cancer [J]. *Cancer Sci* 2007, 98(5):707-15.
- [19] Chiang P C, Chien C L, Pan S L, et al. Induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis by a marine prostanoid in human hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol* 2005, 43(4):679-86.

Expression and clinical significance of CHOP/GADD153 in human esophageal squamous cell carcinoma

Chen Hai¹, Wu Yong², Yu Zaicheng¹, et al

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

²Dept of Thoracic Surgery, Northern Hospital of Huainan Xinhua Medical Group, Huainan 232082)

Abstract **Objective** To investigate the expression and clinical significance of C/EBP-homologous protein or growth arrest and DNA damage-inducible gene 153 (CHOP/GADD153) related to endoplasmic reticulum stress (ERS) in human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), and to evaluate its correlation with clinical pathological characteristics of ESCC. **Methods** Eighty-seven specimens of human ESCC and eighty-seven adjacent normal specimens of above 5 cm from the distal edge of the tumor were included. CHOP/GADD153 protein expression was examined by tissue microarray, immunohistochemical techniques and Western blot respectively. The relationship between CHOP/GADD153 expression with clinical parameters of patients, such as gender, age, tumor differentiation, tumor infiltration depth, tumor pathological stage, and lymphatic metastasis was analyzed. **Results** CHOP/GADD153 protein expression levels in human ESCC were significantly higher than those in the normal esophageal tissues ($P < 0.01$). CHOP/GADD153 expression in ESCC tissues was correlated with the infiltration depth, grade of differentiation, pathological stage of tumors, and lymphatic metastasis ($P < 0.01$), but not with gender or age. **Conclusion** CHOP/GADD153 participates in the development, progress of ESCC, and its expression is positively associated with the malignancy of carcinoma. CHOP/GADD153 may be taken as a potential biomarker in evaluating the malignancy of ESCC.

Key words endoplasmic reticulum stress; CCAAT enhancer binding protein; esophagus neoplasms; esophageal squamous cell carcinoma