

• 临床检验研究论著 •

GRP78 蛋白在肝癌组织中的表达及意义

周臣敏¹,董浦江²,付小利³

(1. 綦江区人民医院,重庆 401420;2. 重庆医科大学附属第一医院,重庆 400016;3. 潼南县人民医院,重庆 402660)

摘要:目的 探讨葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)在肝癌组织中的表达及意义。方法 用蛋白印迹法检测 73 例肝癌组织、23 例肝硬化组织、8 例正常肝组织的 GRP78 蛋白表达情况。SABC 免疫组化法测定肿瘤组织微血管密度。结果 GRP78 蛋白在肝癌组织中的表达明显高于肝硬化及正常肝组织,GRP78 蛋白高表达肝癌组织的转移率、微血管密度明显高于低表达组及未表达组($P < 0.01$)。结论 GRP78 蛋白在肝癌组织中的表达呈增高趋势,提示其参与了肝癌的发生过程,GRP78 蛋白高表达与肝癌细胞转移有关。

关键词: 肝肿瘤; 热休克蛋白质类; 免疫组织化学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.07.025

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)07-0809-02

Expression and Significance of GRP78 in liver cancer

Zhou Chen Min¹, Dong Pujiang², Fu Xiaoli³

(1. People's Hospital of Qijiang, Chongqing 401420, China; 2. The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. People's Hospital of Tongnan Country, Chongqing 402660, China)

Abstract: Objective To study the expression and significance of GRP78 protein in liver cancer. **Methods** The Western blot was carried out to detect the level of GRP78 protein from 73 liver cancer, 23 cirrhosis and 8 normal liver, and the density of blood vessels in liver cancer was studied by SABC immunohistochemistry. **Results** The expression of Grp78 in the cancer tissue was significantly higher than that of the cirrhosis and normal liver. transfer rate of tumor cells and density of blood vessels in higher expression of GRP78 group were higher than that in other two group ($P < 0.01$). **Conclusion** The expression of Grp78 showed a gradual increase tendency in the order of from normal tissue, the cirrhosis to carcinoma. Grp78 was involved in the development of liver carcinoma. The GRP78 protein was highly expressed might be play a key role in liver cancer cell metastasis.

Key words: liver neoplasms; heat-shock proteins; immunohistochemistry

葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)属于热休克蛋白 70 家族的一员^[1]。近年来研究证实 GRP78 在多种肿瘤组织中表达增高^[2-5]。本研究应用蛋白印迹杂交法检测了 Grp78 在肝癌组织中的表达情况,并探讨其与肝癌细胞转移的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集近一年本院及重庆医科大学附属一院手术切除的肝癌组织及其肝硬化组织 73 例,年龄 31~78 岁。23 例肝硬化样本取自距肝癌组织边缘 5 cm 外质地坚硬组织。8 例正常肝组织取自肝外伤手术组织。所有患者术前皆未接受放疗。

1.2 仪器与试剂 武汉博士得公司 SABC 免疫组化仪器及配套试剂。

1.3 方法

1.3.1 组织蛋白提取 用电子分析天平称取组织,将该组织置玻璃匀浆管内,按 1 mg/15 μ L 比例加蛋白提取液,按蛋白提取液说明书进行操作。

1.3.2 GRP78、 β -actin 蛋白表达测定 取上述组织液经 100 g/L SDS-PAGE 电泳后电转于 PVDS 膜,50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭,经一抗及二抗孵育后,化学发光法显色,图像分析系统拍摄并用 Quantity One 软件将特异条带灰度数字化。一式三份。GRP78 蛋白表达系数=GRP78 蛋白积分光密度/ β -actin 蛋白积分光密度。

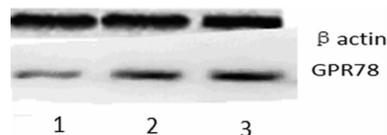
1.3.3 肿瘤组织微血管计数 采用 SABC 免疫组化法,严格按试剂盒说明书操作。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.5 统计软件, $P < 0.05$ 表示

差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GRP78 表达 GRP78 在肝癌、肝硬化、正常肝组织中表达的部分结果见图 1。其表达系数分别为(0.57 \pm 0.17)、(0.27 \pm 0.11)、(0.19 \pm 0.10)。肝癌组的 GRP78 的表达明显高于肝硬化、正常肝组织($P < 0.01$)。



1: 正常肝组织; 2: 肝硬化组织; 3: 肝癌组织。

图 1 GRP78 蛋白表达情况

2.2 肝癌组织癌细胞转移分布 GRP78 蛋白未表达、低表达、高表达肝癌组织发生癌细胞转移分别为:0%(0/11);34%(11/32);90%(27/30)。高表达组明显高于低表达、未表达组($P < 0.01$)。

2.3 微血管计数比较 GRP78 蛋白未表达、低表达、高表达肝癌组织中微血管计数结果分别为:(6.82 \pm 2.52)、(10.93 \pm 3.91)、(18.62 \pm 6.96),高表达组明显高于低表达及未表达组($P < 0.01$)。

3 讨论

GRP78 属于热休克蛋白家族,GRP78 与肿瘤等疾病的发生发展密切相关^[6]。GRP78 是肿瘤发展的主要生存因子^[7]。本研究在正常组织、肝硬化及癌组织中,Grp78 的表达呈现逐

渐增高的趋势,提示它可以作为新的标志物指示肝癌的发生。GRP78 对肿瘤细胞的转移也是至关重要的^[8-9],本实验 GRP78 高表达组的肿瘤细胞转移率亦明显增高,显示 GRP78 高表达与肝癌细胞转移有关。实验结果显示 GRP78 高表达组的肿瘤组织微血管密度亦明显增高,这与 Dong 等^[10]报道一致,而微血管密度增高有利于肿瘤细胞转移。

综上所述 GRP78 蛋白在肝癌的发生、发展过程中起着重要作用,高表达的 GRP78 蛋白与肝癌细胞转移有关,下调 GRP78 表达有望成为肝癌治疗中一个新的辅助靶点^[11-12]。

参考文献

[1] Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions[J]. FEBS Lett, 2007, 81(19): 3702-3710.

[2] Liu Y, Burgos JS, Deng Y, et al. Degradation of the endoplasmic reticulum by autophagy during endoplasmic reticulum stress in Arabidopsis[J]. Plant Cell, 2012, 24(11): 4635-4651.

[3] Xing X, Li Y, Liu H, et al. Glucose regulated protein 78 (GRP78) is overexpressed in colorectal carcinoma and regulates colorectal carcinoma cell growth and apoptosis[J]. Acta Histochem, 2011, 113(8): 777-782.

[4] Fu Y, Lee AS. Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(7): 741-744.

[5] Daneshmand S, Quek ML, Lin E, et al. Glucose-regulated protein GRP78 is up-regulated in prostate cancer and correlates with recurrence and survival[J]. Hum Pathol, 2007, 38(10): 1547-1552.

[6] Fels DR, Koumenis C. The PERK/eIF2alpha/ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(7): 723-728.

[7] Yu Z, Wang H, Zhang L, et al. Both p53-PUMA/NOXA-Bax-mitochondrion and p53-p21cip1 pathways are involved in the CDglyTK-mediated tumor cell suppression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 386(4): 607-611.

[8] Slotta-Huspenina J, Berg D, Bauer K, et al. Evidence of prognostic relevant expression profiles of heat-shock proteins and glucose-regulated proteins in oesophageal adenocarcinomas [J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41420.

[9] Zhang J, Jiang Y, Jia Z, et al. Association of elevated GRP78 expression with increased lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer [J]. Clin Exp Metastasis, 2006, 23(7/8): 401-410.

[10] Dong D, Ni M, Li J, et al. Critical role of the stress chaperone GRP78/BiP in tumor proliferation, survival, and tumor angiogenesis in transgene-induced mammary tumor development [J]. Cancer Res, 2008, 68(2): 498-505.

[11] Ding WX, Ni HM, Gao W, et al. Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival[J]. J Biol Chem, 2007, 282(7): 4702-4710.

[12] Wang C, Jiang K, Gao D, et al. Clusterin Protects Hepatocellular Carcinoma Cells from Endoplasmic Reticulum Stress Induced Apoptosis through GRP78[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55981.

(收稿日期:2012-11-06)

(上接第 808 页)

AST 生物参考区间 (ALT ≤ 51 U/L、AST ≤ 35 U/L) 与女性 (ALT ≤ 36 U/L、AST ≤ 30 U/L) 比较差异有统计学意义 (P < 0.01)。

3 讨 论

ALT、AST 是肝脏损害的敏感指标,能反应肝细胞的损害,本研究发现不同性别研究对象间血清 ALT、AST 活性有明显差异。这可能和男性与女性在生活习惯以及生理激素水平的差异有关^[4],因此,本研究血清 ALT 参考区间:男性不大于 51 U/L、女性不大于 36 U/L;AST 参考区间为:男性不大于 35 U/L、女性不大于 30 U/L。Elinav 等^[5]研究表明,年龄与 ALT 活性相关性曲线呈倒“U”型,且 ALT 活性最高峰出现在 40~55 岁。本研究与参考文献^[6]报道相似。Park 等^[7]、王坤英等^[8]报道血清 ALT 升高与代谢综合征密切相关。ALT 活性随着年龄增加而呈递增趋势,50 岁以后 ALT 活性最高,这除了与男性相同的病理因素相关外,还可能与女性绝经后激素水平的变化有关。

本研究中 AST 活性与 ALT 的规律有较大差异,男性 AST 各个年龄差异无统计学意义,女性 AST 随年龄也呈现出递增趋势,这很有可能与 AST 大部分存在于线粒体中,只有肝细胞损伤较严重时,AST 的升高才比较明显有关。本参考区间统计只是采用美国 Beckman DXC800 全自动生化分析仪,可能存在一定的局限性,其参考范围仅供参考^[9-12]。

参考文献

[1] 魏有仁. 参考值的几个基本问题[J]. 中国实验诊断学, 1997, 1(1): 44-45.

[2] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 上海: 上海科技文献出版社, 2004: 13.

[3] 杨振华. 临床(医学)实验室质量管理-ISO 15189[J]. 临床检验杂志, 2002, 20(U08): 79-84.

[4] Prati D, Taioli E, Zanella A, et al. Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels[J]. Ann Intern Med, 2002, 137(1): 1-10.

[5] Elinav E, Ben-Dov IZ, Ackerman E, et al. Correlation between serum alanine aminotransferase activity and age: an inverted U curve pattern [J]. Am J Gastroenterol, 2005, 100(10): 2201-2204.

[6] 刘敏, 张云, 马骢, 等. 北京地区 35332 例健康体检人群 10 项生化指标分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(5): 1120-1123.

[7] Park HS, Han JH, Choi KM, et al. Relation between elevated serum alanine aminotransferase and metabolic syndrome in Korean adolescents [J]. Am J Clin Nutr, 2005, 82(5): 1046-1051.

[8] 王坤英, 刘平华, 杨玲, 等. 西双版纳州健康人群血清丙氨酸氨基转移酶参考区间调查[J]. 检验医学, 2009, 24(5): 361-363.

[9] 尹利民, 贾蔚, 饶迪, 等. 昆明地区健康成人血清丙氨酸氨基转移酶及天门冬氨酸氨基转移酶参考区间调查[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(8): 911-912.

[10] 杨宏云, 李海霞, 王学晶, 等. 健康人群丙氨酸氨基转移酶及天门冬氨酸氨基转移酶参考区间初步调查[J]. 检验医学, 2010, 25(10): 761-764.

[11] 车骊强, 贾葵, 李生菊, 等. 西宁地区适龄健康献血人群正常 ALT 参考值范围的调查报告[J]. 青海医药杂志, 2005, 35(4): 51-52.

[12] 李伟华, 刘玉振, 李伍升. 郑州地区合格无偿献血者的 ALT 参考值范围调查[J]. 中国输血杂志, 2005, 18(5): 417-418.

(收稿日期:2012-11-02)