

· 临床检验研究论著 ·

GRP78 蛋白在结肠癌组织中的表达与意义

周臣敏¹, 董浦江², 付小利³

(1. 重庆市綦江区人民医院, 重庆 401420; 2. 重庆医科大学附属第一医院, 重庆 400016;

3. 重庆市潼南县人民医院, 重庆 402660)

摘要:目的 探讨葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)在结肠癌组织中的表达及意义。方法 用蛋白免疫印迹法(Wester blot)检测 82 例结肠癌组织、17 例结肠良性增生组织、及 33 例正常肠组织的 GRP78 及癌组织中血管内皮生长因子(VEGF)、转移相关基因 1(MTA1)、Ezrin 的表达情况。免疫组化 SABC 法测定肿瘤组织微血管密度。结果 GRP78 在结肠癌组织中的表达明显高于结肠良性增生组织及正常结肠组织($P < 0.05$), GRP78 高表达组结肠癌组织的 VEGF、MTA1、Ezrin 表达量高于其他两组($P < 0.05$), GRP78 高表达组结肠癌组织肿瘤细胞转移率及血管密度明显高于其他两组($P < 0.05$)。结论 GRP78 在结肠癌组织中的表达呈增高趋势, 参与了结直肠癌的发生过程。GRP78 高表达与结肠癌细胞转移有关。

关键词: GRP78 蛋白; 结肠癌

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.10.015

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)10-1234-02

Expression and Significance of GRP78 in Colon cancer

Zhou Chenmin¹, Dong Pujiang², Fu Xiaoli³

(1. People's Hospital of Qijiang District, 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 glucose regulated protein 78kD(GRP78) in colon cancer. **Methods** Western blot was used to detect the expression level of GRP78 in 82 cases of colon cancer tissue, 17 cases of benign hyperplasia tissue and 33 cases of normal mucous membrane, meanwhile, vascular endothelial growth factor(VEGF), MTA1, Ezrin was detected in colon cancer tissue. The density of blood vessels in colon cancer was detected by immunohistochemistry SABC technique. **Results** The expression of GRP78 in the cancer tissue was significantly higher than that of the benign hyperplasia tissue and normal colorectal membrane($P < 0.05$). VEGF, MTA1, Ezrin in GRP78-higher-expression group were higher than that in other two group($P < 0.05$), transfer rate of tumor cells and density of blood vessels in GRP78-higher-expression group were higher than that in other two group($P < 0.05$). **Conclusion** The expression level of GRP78 shows a increase trend when cancer develop from normal tissue, benign hyperplasia tissue to carcinoma. GRP78 is involved in the development of colorectal carcinoma. The GRP78 protein is highly expressed, which may play a key role in colon cancer cell metastasis.

Key words: GRP78; colon cancer

葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78kD, GRP78)属于热休克蛋白 70 家族的一员^[1]。近年来研究发现, GRP78 在多种肿瘤组织中呈高表达, 与肿瘤的发生有关^[2-3]。本研究应用蛋白免疫印迹法(Wester blot)检测 GRP78 及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、转移相关基因 1(metastasis associated genes, MTA1)、Ezrin 在结肠癌组织中的表达情况, 探讨其在结肠癌组织中表达的意义及与肿瘤转移的关系。

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、重庆市肿瘤医院结肠癌及良性增生(腺瘤、息肉)、距癌肿 5 cm 以上的正常组织。其中结肠癌组织 82 例、良性增生组织 17 例、正常肠组织 33 例。82 例结肠癌患者中男 60 例, 女 22 例; 年龄 32~75 岁。病理学类型均为腺癌, 病理切片证实无肠周淋巴结转移者 32 例, 已发生转移者 50 例。取上述组织大约 0.5 g, 置 -80 °C 低温冰箱保存。同时取上述组织约 0.5 g 经 10% 甲醛固定, 常规石蜡包埋, 5 μm 厚连续切片。所有患者术前皆未接受放疗。

1.2 试剂与仪器 鼠抗人 GRP78、VEGF、MTA1、Ezrin、β-actin 抗体, 兔抗人 VIII 因子抗体、生物素化鼠抗兔抗体、兔抗鼠抗体(美国 Santa Cruz 公司), 电泳试剂盒、发光试剂盒、蛋白提取液、SABC 免疫组化试剂盒(武汉博士得公司), 电泳仪、电转仪及图像分析系统(美国 Bid-Rad 公司)。

1.3 方法

1.3.1 组织蛋白提取 将组织置玻璃匀浆管内, 按 1 mg/15 μL 比例加蛋白提取液, 按蛋白提取液说明书进行操作。用分光光度法测定蛋白提取液中蛋白含量, 并调节蛋白含量使均为 2 mg/μL。

1.3.2 GRP78、VEGF、MTA1、Ezrin、β-actin 蛋白表达测定 取上述组织液经 100 g/LSDS-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 3 份。GRP78、VEGF、MTA1、Ezrin 表达水平的相对值(表达系数)为 GRP78、VEGF、MTA1、Ezrin 蛋白积分光密度与 β-actin 蛋白积分光密度的比值。

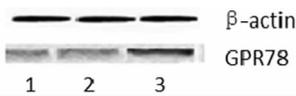
1.3.3 肿瘤组织微血管计数 采用 SABC 免疫组化法, 第一

抗体为兔抗人 VIII 因子抗体,工作浓度 1 : 100;第二抗体为生物素化鼠抗兔抗体。严格按试剂盒说明书操作。用已知阳性乳腺癌组织作阳性对照,以 PBS 缓冲液代替第一抗体作阴性对照。200 倍放大,取上、中、下、左、右 5 个区域 10 个视野计数微血管数,求其均数。

1.4 统计学处理 实验数据采用 SPSS11.0 统计软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间蛋白表达系数、血管密度的比较采用 *t* 检验;GRP78 蛋白未表达、低表达、高表达结肠癌组间肿瘤细胞转移率相关分析用 Spearman 秩相关分析。以图像分析系统扫描无数者为未表达;低于表达系数均数加一个标准差者为低表达;高于表达系数均数加一个标准差者为高表达。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GRP78 在结肠癌、良性增生、正常结肠组织中的表达 GRP78 在结肠癌、良性增生、正常结肠组织中表达的部分结果(图 1)。其表达系数分别为:正常结肠组织 0.23 ± 0.11 ,良性增生组织 0.41 ± 0.20 ,二者比较差异有统计学意义($P < 0.05$);结肠癌组织 1.19 ± 0.35 ,与正常和良性增生组织比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

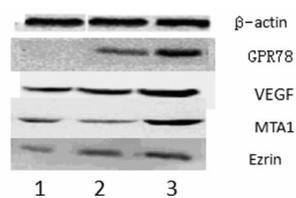


1:正常结肠组织;2:良性增生组织;3:结肠癌组织。

图 1 GRP78 蛋白表达情况

2.2 GRP78 蛋白未表达、低表达、高表达结肠癌组织,癌细胞转移率分别为:0%(0/8)、42.5%(17/40)、97.1%(33/34)。高表达组与低表达、未表达组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 3 种蛋白在 GRP78 未表达、低表达、高表达结肠癌组织中的表达 VEGF、MTA1、Ezrin 在 GRP78 未表达、低表达、高表达结肠癌组织中表达的部分结果(图 2)。其表达系数见表 1,可见 GRP78 蛋白高表达组的 VEGF、MTA1、Ezrin 表达均显著高于未表达及低表达组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。



1:未表达结肠癌;2:低表达结肠癌;3:高表达结肠癌。

图 2 未表达、低表达、高表达 GRP78 蛋白结肠癌组织中 3 种蛋白的表达

表 1 3 种蛋白的表达系数($\bar{x} \pm s$)

指标	未表达组	低表达组	高表达组
VEGF	0.21 ± 0.10	0.38 ± 0.11	$1.10 \pm 0.41^\Delta$
MTA1	0.15 ± 0.10	0.19 ± 0.08	$0.92 \pm 0.41^\Delta$
Ezrin	0.09 ± 0.05	0.28 ± 0.15	$0.52 \pm 0.21^\Delta$

Δ : $P < 0.01$,与未表达组和低表达组比较。

2.4 GRP78 蛋白未表达、低表达、高表达结肠癌组织中微血管计数 分别为 7.62 ± 3.22 、 10.33 ± 4.21 、 19.65 ± 7.26 ,高表达组与低表达和未表达组分别比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨 论

GRP78 蛋白是主要分布于细胞内质网中的热休克蛋白 70 家族成员之一,它通过阻止内质网内新生肽聚集^[4-5],参与未折叠蛋白反应调控^[6],启动内质网应激相关性细胞凋亡^[7],参与内质网钙稳态的调节发挥其生物功能^[8]。由于肿瘤细胞的糖代谢加速,糖降解活性增加,实体肿瘤生长速度加快等因素,导致内质网中的低糖环境及错误折叠蛋白质的积聚,激发未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)。适应 UPR 的一种重要反应是诱导内质网中分子伴侣 GRP78 的表达,有研究证实 GRP78 的表达是肿瘤发生发展的主要生存因子^[9],且 GRP78 在多种肿瘤组织中表达增高^[10-12]。本研究显示,在正常结肠组织、结肠良性增生组织及癌组织中,GRP78 的表达呈现逐渐增高的趋势,表明 GRP78 在结肠癌的发生中起一定的作用,提示它不仅可以作为标志物指示结肠癌的发生,也可以作为其治疗的靶点。

VEGF 是血小板源性生长因子家族成员,主要参与新生血管和淋巴管的形成^[13],肿瘤组织中大量新生血管及淋巴管的出现有利于肿瘤细胞转移。有文献报道,GRP78 高表达可促进肿瘤组织血管生成^[3],本实验中 GRP78 高表达组的 VEGF 表达及微血管密度明显高于 GRP78 低表达及未表达组($P < 0.01$),显示高表达的 GRP78 与 VEGF 参与了促进肿瘤组织血管生成,至于 GRP78 高表达促进肿瘤组织血管生成是否通过 VEGF 环节需进一步研究。MTA1 蛋白与组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)结合,募集 HDACs 到目标基因的启动子区域,通过去除组蛋白的乙酰基,重塑染色质结构而不利于转录,直接或间接下调某些抑制肿瘤浸润和转移的基因转录。还可以改变细胞角蛋白丝的组装及细胞骨架蛋白的定位,使细胞更具侵袭与转移的表型^[14]。Ezrin 蛋白为膜-细胞骨架连接蛋白,过表达可参与到肿瘤转移的多个环节,如从原发灶脱落、侵入周边组织、侵入脉管系统、穿过基膜、选择性的在靶器官增殖形成转移灶等^[15]。GRP78 对肿瘤细胞的转移也是至关重要,它在转移性肿瘤细胞系及转移性淋巴结中表达上调,在异种移植模型中敲除 GRP78 基因可抑制肿瘤细胞的体外侵袭、生长和转移^[16]。肿瘤细胞转移是涉及多种基因的多步骤过程。本实验中,GRP78 蛋白高表达组发生肿瘤细胞转移的比例明显高于其他两组,该组的 MTA1 蛋白、Ezrin 蛋白表达显著高于其他两组,VEGF 表达亦高于其他两组,加之该组肿瘤细胞的微血管密度明显高于其他两组。显示 GRP78 高表达蛋白组的结肠癌组织中癌细胞在高表达的 GRP78 蛋白与其他多种促进肿瘤细胞转移基因蛋白等因素作用下,进入了癌细胞转移这一发展阶段。

综上所述,GRP78 蛋白在结肠癌的发生、发展过程中起着重要作用,高表达的 GRP78 蛋白与结肠癌细胞转移有关,下调 GRP78 表达有望成为结肠癌治疗中一个新的靶点。

参考文献

[1] Daugaard M, Rohde M, Jaattela M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions[J]. FEBS Lett, 2007, 581(19): 3702-3710.
 [2] Fu Y, Lee AS. Glucose regulated proteins in Cancer progression, drug resistance and immunotherapy[J]. Cancer Biol Ther. 2006, 5(7): 741-744.
 [3] 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 (下转第 1237 页)

也出现 SOD 活力明显降低,脂质过氧化物含量明显增高。国外的一些研究也表明增强 SOD 活性的表达水平能保护机体免受一些急性或慢性氧化损伤,包括动脉粥样硬化^[7-8]。同时也有研究发现缺乏 SOD 会引起血管的异常性(增强血管收缩和内皮的功能障碍)和损伤血管发生^[9-12]。

本研究结果显示,心、脑血管疾病组 SOD 活性与对照组 SOD 活性比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。因脑血管疾病、心血管疾病时组织缺血缺氧,产生大量自由基,SOD 代表清除自由基的能力,在缺血与灌注时,血脑屏障开放,SOD 进入脑细胞浆或脑组织,细胞外间隙,发挥清除自由基的作用^[13]。肾脏疾病时,肾小球滤过功能降低,人体代谢产生毒素不能完全排除,自由基产生增多,而自由基与 SOD 活性成负相关,所以,SOD 活性下降。肿瘤、烧伤患者抗氧化能力减弱,使得 SOD 活性下降。肝脏疾病时患者肝脏受到损害,肠源性内毒素在肝内不能被肝脏枯否式细胞吞噬而导致内毒素血症,内毒素使肝内自由基产生增多^[14],另外肝硬化患者抗氧化能力减弱,说明对肝硬化患者治疗加强抗氧化治疗。DM 患者 SOD 活性与对照组 SOD 活性比较差异无统计学意义($P > 0.05$),与相关报道研究结果不一致,因本文 DM 病例较少,分析结果有待进一步研究。

综上所述,SOD 与上述疾病关系密切,可能是这些疾病新的观察指标,测定血中 SOD 浓度对监测某些疾病的病情及治疗具有重要的价值。然而,其确切的机制至今尚未清楚,还有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] 戴国奎,关若萍,梁炳富,等. 广州地区健康成年人血清超氧化物歧化酶(SOD)水平调查[J]. 国际医药卫生导报,2011,17(3):2952-2955.
- [2] 施益军,成亦江,吴延虎,等. 依达拉奉对心肌缺血再灌注损伤保护作用临床研究[J]. 实用临床医药杂志,2006,10(2):50-52.
- [3] 杨琳,廖明芳,季欣然,等. 超氧化物歧化酶在医学领域的研究现状[J]. 现代生物医学进展,2010,10(2):396-398.
- [4] 罗招凡,劳伟思,梁伟南,等. 血清同型半胱氨酸和 SOD 水平与急

性脑梗死的相关性研究[J]. 中国卫生检验杂志,2011,21(10):2463-2464.

- [5] 林坚,杨焕斌,王彩霞. 补肾法对冠心病心绞痛 NO、NOS、SO D 的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2002,9(9):16-18.
- [6] Tomoda H, Morimoto K, Aoki N. Superoxide dismutase activity as predictor of myocardial reperfusion and salvage in acute myocardial infarction[J]. Am Heart J, 1996, 131(5):849-855.
- [7] Liu JQ, Zelko IN, Folz RJ. Reoxygenation-induced constriction in murine coronary arteries; the role of endothelial NADPH oxidase (gp91phox) and intracellular superoxide[J]. J Biol Chem, 2004, 279(23):24493-24497.
- [8] Tribble DL, Barcellos-Hoff MH, Chu BM, et al. Ionizing radiation accelerates aortic lesion formation in fat-fed mice via SOD-inhibitable processes[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19(6):1387-1392.
- [9] Baumbach GL, Didion SP, Faraci FM. Hypertrophy of cerebral arterioles in mice deficient in expression of the gene for CuZn superoxide dismutase[J]. Stroke, 2006, 37(7):1850-1855.
- [10] Didion SP, Ryan MJ, Didion LA, et al. Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice[J]. Circ Res, 2002, 91(10):938-944.
- [11] Groleau J, Dussault S, Haddad P, et al. Essential role of copper-zinc superoxide dismutase for ischemia-induced neovascularization via modulation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(11):2173-2181.
- [12] Kondo T, Reaume AG, Huang TT, et al. Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia[J]. J Neurosci, 1997, 17(11):4180-4189.
- [13] 印佳,王中,孙小欧. 依达拉奉治疗破裂颅内动脉瘤术后激发脑缺血的临床研究[J]. 苏州大学学报,2007,27(3):369-372.
- [14] 何浩明,冯岚,田小平,等. 肝硬化患者中 SOD、Lpo、GSH-PX 水平的变化[J]. 放射免疫学杂志,2000,13(1):56-57.

(收稿日期:2012-12-23)

(上接第 1235 页)

- development[J]. Cancer Res, 2008, 68(2):498-505.
- [4] Jin Y, Awad W, Petrova K, et al. Regulated release of ERdj3 from unfolded proteins by BiP[J]. EMBO J, 2008, 27(21):2873-2882.
- [5] Nouhi Z, Chevillard G, Derjuga A, et al. Endoplasmic reticulum association and N-linked glycosylation of the human Nrf3 transcription factor[J]. FEBS Lett, 2007, 581(28):5401-5406.
- [6] 卓德祥,唐朝枢,李载权. 内质网应激反应基因表达调控的多样性[J]. 医学分子生物学杂志,2006,3(1):32-35.
- [7] Lin JH, Li H, Yasumura D, et al. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response [J]. Science, 2007, 318(5852):944-949.
- [8] Lamb HK, Mee C, Xu W, et al. The affinity of a major Ca²⁺ binding site on GRP78 is differentially enhanced by ADP and ATP [J]. J Biol Chem, 2006, 281(13):8796-8805.
- [9] Lee LB, Lee AS. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis(PUMA) and NOXA by p53[J]. J Biol Chem, 2006, 281(11):7260-7270.
- [10] Pyrko P, Schanthal AH, Hofman FM, et al. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing

chemosensitivity in malignant gliomas[J]. Cancer Res, 2007, 67(20):9809-9816.

- [11] Rauschert N, Brandlein S, Holzinger E, et al. A new tumor-specific variant of GRP78 as target for antibody-based therapy[J]. Lab Invest, 2008, 88(4):375-386.
- [12] Gonzalez-Gronow M, Cuchacovich M, Llanos C, et al. Prostate Cancer cell proliferation in vitro is modulated by antibodies against glucose-regulated protein 78 isolated from patient serum [J]. Cancer Res, 2006, 66(23):11424-11431.
- [13] Kuroi K, Toi M. Circulating angiogenesis regulators in Cancer patients[J]. Int J Biol Markers, 2001, 16(1):5-26.
- [14] Hofer MD, Menke A, Genze F, et al. Expression of MTA1 promotes significantly with tumor grade and angiogenesis in human breast Cancer[J]. Cancer Sci, 2004, 90(2):455-462.
- [15] Bonilha VL, Rayborn ME, Saotome I, et al. Microvilli defects in retinas of ezrin knockout mice[J]. Exp Eye Res, 2006, 82(4):720-729.
- [16] Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(7):741-744.

(收稿日期:2012-12-28)