

· 论著 ·

葡萄糖调节蛋白 78 kD 和热休克蛋白 20 在左半及右半结肠癌差异表达的初步研究

裴海平 李小龙 朱红 曾亮 黄林生

【摘要】目的 分析左半结肠癌与右半结肠癌肿瘤组织中差异蛋白表达情况。**方法** 收集人左半结肠癌和右半结肠癌组织标本各 7 例, 提取组织蛋白并进行二维凝胶电泳、质谱分析及生物信息学分离, 鉴定二者中差异表达蛋白质。应用免疫组织化学 SP 法检测葡萄糖调节蛋白 78 kD (GRP78) 和热休克蛋白 20 (HSP20) 在 50 例左半和 50 例右半结肠癌组织中的表达情况。**结果** 筛选并成功鉴定出左半和右半结肠癌中 16 种差异表达蛋白质; 与右半结肠癌比较, 左半结肠癌 10 种蛋白表达上调, 6 种蛋白表达下调, 其中 GRP78 在左半结肠癌中表达上调, HSP20 在左半结肠癌中表达下调。免疫组织化学检测示, GRP78 在左半和右半结肠癌组织的阳性表达率分别为 78% (39/50) 和 56% (28/50), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); HSP20 在左半和右半结肠癌的阳性表达率分别为 34% (17/50) 和 72% (36/50), 差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$)。GRP78 表达与肿瘤分化程度、浸润层次、TNM 分期、有无淋巴结转移以及有无肝转移有关 ($P < 0.05$), 而 HSP20 的表达与肿瘤大体形态、TNM 分期以及有无淋巴结转移有关 ($P < 0.05$)。**结论** 左半结肠癌和右半结肠癌的蛋白质组存在差异, 这些可能是左半与右半结肠癌生物学行为存在差异的原因。

【关键词】 左半结肠肿瘤; 右半结肠肿瘤; 葡萄糖调节蛋白 78 kD; 热休克蛋白 20; 蛋白质组学

Preliminary study on glucose regulated protein 78 kD and heat shock protein 20 differential expression between left-sided colon carcinoma and right-sided colon carcinoma PEI Hai-ping, LI Xiao-long, ZHU Hong*, ZENG Liang, HUANG Lin-sheng. *Department of Oncology, Xiangya Hospital, Central-South University, Changsha 410009, China

Corresponding author: ZHU Hong, Email: zhuhong0719@126.com

【Abstract】Objective To analyze the differential protein expression of left-sided colon cancer and right-sided colon cancer. **Methods** Tissue samples of left-sided colon cancer ($n=7$) and right-sided colon cancer ($n=7$) were collected. Tissue protein was abstracted and two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was used to examine the gel images. Peptide mass fingerprints (PMF) was acquired by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and the proteins were identified by data searching with bioinformatics. Immunohistochemical SP method was used for the detection of glucose regulated protein 78 kD (GRP78) and heat shock protein 20 (HSP20) in left-sided colon cancer ($n=50$) and right-sided colon cancer ($n=50$) tissues. **Results** Sixteen differentiating protein spots were identified. Compared with right-sided colon cancer, 10 proteins including GRP78 up-regulated and 6 proteins including HSP20 down-regulated in left-sided colon cancer. Immunohistochemical detection showed that in left and right sided colon cancer, the positive expression rate of GRP78 was 78% (39/50) and 56% (28/50) and the positive expression rate of HSP20 was 34% (17/50) and 72% (36/50), respectively, and the differences were statistically significant (both

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2013.01.020

基金项目: 国家自然科学基金(30872463)

作者单位: 410008 长沙, 中南大学湘雅医院普通外科(裴海平、李小龙、黄林生), 肿瘤科(朱红); 湖南省肿瘤医院病理科(曾亮)

通信作者: 朱红, Email: zhuhong0719@126.com

$P<0.05$)。The positive rate of GRP78 was associated with tumor differentiation, infiltration layer, TNM staging, lymph node metastasis, and liver metastasis, while the positive rate of HSP20 was associated with tumor gross morphology, TNM staging, and lymph node metastasis ($P<0.05$)。

Conclusions There are differentially expressed proteins between left-sided colon cancer and right-sided colon cancer, especially for GRP78 and HSP20, which may be the cause leading to the biological differences between left-sided and right-sided colon cancer.

[Key words] Left-sided colonic neoplasms; Right-sided colonic neoplasms; Glucose regulated protein 78 kD; Heat shock protein 20; Proteomics

结肠以脾区为界分为右半结肠和左半结肠^[1]。长期的临床观察发现左半结肠癌(left sided colon carcinoma, LSCC) 和右半结肠癌(right sided colon carcinoma, RSCC) 在临幊上表现出差异,如 RSCC 以全身症状、贫血等为主要表现,多见于老年人及女性^[2-3];低分化癌、黏液腺癌及印戒细胞癌亦多见于 RSCC^[4]。LSCC 以肠梗阻、便秘、腹泻便血等症状为主。这说明 LSCC 和 RSCC 可能在致癌途径和生物学行为方面存在较大差异。本研究通过蛋白质组学方法初步筛选 LSCC 和 RSCC 中的差异表达蛋白,并对其中的差异表达蛋白葡萄糖调节蛋白 78 kD (glucose regulated protein 78 kD, GRP78) 和热休克蛋白 20 (heat shock protein 20, HSP20) 在 LSCC 和 RSCC 差异表达情况进行分析。

资料与方法

一、标本选取

取人 RSCC、LSCC 组织各 7 例进行蛋白质组学分析,标本均取自中南大学湘雅医院 2009 年 7 月至 2009 年 9 月普通外科手术切除标本,为散发性结肠癌,术前未行放、化疗;术后病理确诊为中分化腺癌,AJCC 分期为Ⅱ~Ⅳ期,切缘均为阴性。患者年龄 38~78(中位年龄 59)岁。

另选择 2006 年 3 月至 2008 年 3 月中南大学湘雅医院及湖南省肿瘤医院收治的 100 例结肠癌患者肿瘤石蜡标本用于免疫组织化学(免疫组化)检测 GRP78、HSP20 蛋白表达情况,其中女性 45 例,男性 55 例;年龄 21~79(中位年龄 54)岁;AJCC 分期Ⅱ~Ⅳ期,均为散发性结肠癌,术前未行放、化疗,术后病理确诊为腺癌。100 例标本中,RSCC、LSCC 标本各 50 例,临床病理资料见表 1。

二、LSCC 及 RSCC 差异蛋白质的蛋白组学分析

1. 标本处理:取手术后新鲜的结肠癌组织,无菌状态下用生理盐水反复清洗,以去除血液及其他

异物,并尽可能剪去多余的组织。处理后的样品立即置于-80℃保存。

2. 组织总蛋白质的制备:组织裂解提取总蛋白采用 Total protein Extraction Kit, ProMab, Cat. No: SJ-200501。剪取约 0.5 mg 组织,置于组织匀浆器中,加入 1 ml 总蛋白提取液,匀浆 20 min 直到组织充分破碎,然后冰上放置 20 min 后,再匀浆 20 min;将匀浆液吸出放到 1.5 ml 离心管中,超声 3 次,每次 3 s。9000 r/min,离心 10 min;取适量上清置于新的 1.5 ml 离心管中,-20℃冻存。

3. 固相 pH 梯度双向凝胶电泳及质谱分析:主要按 IPGphor 等电聚焦系统指南和 Gorg 等的方法进行^[5]。对 7 例左侧结肠癌(LSCC)和 7 例右侧结肠癌(RSCC)组织进行双向凝胶电泳分析,相同条件下重复 3 次。电泳所得到的 2-DE 胶按蛋白质银染试剂盒的操作手册进行银染。然后进行凝胶图像分析,凝胶通过 Imagescanner 扫描仪以及 LabScan 扫描软件进行扫描获取图像,利用 PDQuest-V8.0.1 分析软件对图像进行分析。进一步制备质谱样品对差异表达的点进行质谱分析。应用辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析获得相应差异蛋白质点的肽质量指纹图谱(PMF),每个蛋白样品测定 3 次质谱峰。利用 PeptIdent 软件查询软件搜索 Uniprot 以及 Trembl 数据库,对搜索结果按匹配片段数,覆盖率等进行综合考虑判定所搜结果。

三、免疫组织化学(免疫组化)染色

将每例石蜡标本作 4 μm 连续切片,其中 1 张行苏木精-伊红染色以观察组织的病理特征。2 张分别以 GRP78/Bip 兔抗人多克隆抗体(英国 Abcam 公司)和 HSP20 兔抗人多克隆抗体(英国 Abcam 公司)作为一抗行 GRP78、HSP20 免疫组化染色(一抗浓度均为 1:100)。操作按照即用型免疫组织化学 UltraSensitiveTM SP 试剂盒(福州迈新生物公司)说

表 1 GRP78 和 HSP20 与 100 例结肠癌患者临床病理特征的关系[例(%)]

临床病理资料	例数	GRP78 阳性率(%)	χ^2	P 值	HSP20 阳性率(%)	χ^2	P 值
年龄(岁)			0.244	0.621		0.050	0.621
>60	52	36(69.2)			27(51.9)		
≤60	48	31(64.6)			26(54.2)		
性别			2.276	0.131		0.117	0.131
男	55	38(69.1)			30(54.5)		
女	45	37(82.2)			23(51.1)		
病变大体形态			1.841	0.175		4.678	0.175
巨块型	54	33(61.1)			24(63.0)		
溃疡缩窄型	46	34(73.9)			19(41.3)		
浸润深度			4.128	0.042		0.017	0.042
黏膜层及黏膜下层	24	12(50.0)			13(54.2)		
肌层及浆膜层	76	55(72.4)			40(52.6)		
分化程度			7.798	0.005		0.186	0.005
高中分化	66	38(57.6)			36(54.5)		
低分化	34	29(85.3)			17(50.0)		
TNM 分期			5.945	0.015		4.480	0.015
I~II	27	13(48.1)			19(70.4)		
III~IV	73	54(74.0)			34(46.6)		
淋巴结转移			4.311	0.038		4.180	0.038
无	29	15(51.7)			20(69.0)		
有	71	52(73.2)			33(46.5)		
肝脏转移			4.757	0.029		0.645	0.029
无	82	51(62.2)			45(54.9)		
有	18	16(88.9)			8(44.4)		

明书进行。以 PBS 缓冲液代替一抗染色的切片作为阴性对照。阳性对照为 abcam 公司随试剂提供的样片。结果判断:根据阳性细胞在全部癌细胞中所占比例以及阳性细胞染色强度判定。按显色细胞数记分:阳性细胞数小于 1/3 为 1 分,阳性细胞数 1/3~2/3 为 2 分,阳性细胞数大于或等于 2/3 为 3 分。按细胞显色深浅记分:无阳性反应细胞为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。两者之积为 0 者判断为(-),1~2 者判断为(+),3~4 者判断为(++) ,6~9 者判断为(+++),其中-为阴性,+~+++ 为阳性。

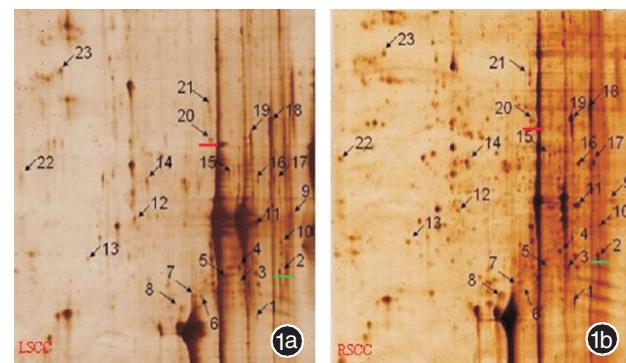
四、统计学方法

使用 SPSS 15.0 统计软件包,主要统计方法包括 χ^2 检验,GRP78、HSP20 两者的相关性比较采用 Spearman 等级相关检验。

结 果

一、人 LSCC 和 RSCC 组织的二维凝胶电泳和质谱分析及生物信息学分析结果

分析两组凝胶图谱发现,两组差异表达蛋白质点数 55 个,见图 1。



注:图中的数字表示不同的蛋白质点,其中 2 号为 GRP78,20 号为 HSP20

图 1 LSCC 和 RSCC 的二维电泳凝胶图谱 1a. LSCC; 1b. RSCC

MALDI-TOF-MS 分析示,有意义的蛋白点 16 个。与 RSCC 比较,LSCC 中表达增加的蛋白有 10 个,包括蛋白质二硫化异构酶 A1,葡萄糖调节蛋白 78 kDa,热休克蛋白 60,抑制素,含硫氧还蛋白域的蛋白 5,

T-复合蛋白1 ϵ 亚单位,应急蛋白70,异柠檬酸脱氢酶,蛋白质二硫化异构酶A3,巨噬细胞加帽蛋白;LSCC表达降低的蛋白有6个,包括ATP合成酶 β 亚单位,延伸因子,热休克蛋白 β 1,载脂蛋白A-I,转甲状腺素蛋白,热休克蛋白20。在本研究中最为关注的是LSCC中表达上调的GRP78和下调的HSP20,见图2。

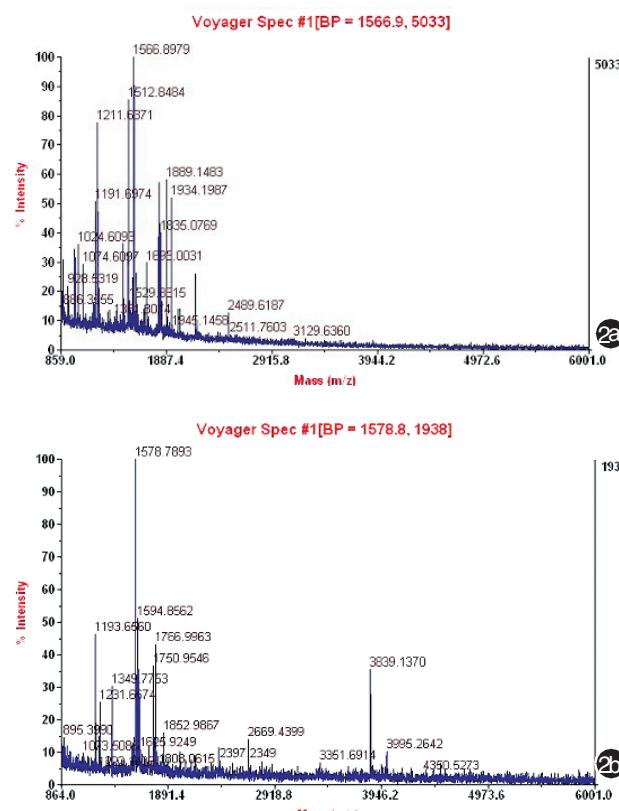


图2 LSCC 和 RSCC 的 MALDI-TOF-MS 分析结果 2a. GRP78 蛋白;
2b. HSP20 蛋白

二、免疫组化检测GRP78和HSP20的表达情况

1. GRP78和HSP20在100例结肠癌组织和癌旁组织的表达情况:GRP78蛋白主要在细胞的细胞质中表达,结肠癌组织表达阳性率为78%(78/100),而癌旁组织中表达阳性率为32%(32/100),两者比较,差异有统计学意义($\chi^2=24.502, P<0.05$)。HSP20蛋白主要在细胞的细胞质中表达,结肠癌组织表达阳性率为53%(53/100),而癌旁组织中表达阳性率为41%(41/100),两者比较,差异无统计学意义($\chi^2=2.890, P=0.089$)。

2. GRP78和HSP20在LSCC及RSCC标本中的表达情况:GRP78在LSCC和RSCC的阳性表达率分别为78%(39/50)和56%(28/50),两者比较,

差异有统计学意义($\chi^2=10.945, P=0.001$)。HSP20在LSCC和RSCC的阳性表达率分别为34%(17/50)和72%(36/50),两者比较,差异有统计学意义($\chi^2=28.984, P<0.05$)。

3. GRP78和HSP20与结直肠癌患者临床病理特征的关系:GRP78表达与肿瘤的分化程度、浸润层次、TNM分期、有无淋巴结转移以及有无肝转移有关($P<0.05$),而HSP20表达与肿瘤的肿瘤大体形态、TNM分期以及有无淋巴结转移有关($P<0.05$),见表1。

4. GRP78和HSP20在结肠癌组织中表达的相关性:100例结肠癌标本中,GRP78和HSP20表达一致的共45例,Spearman等级相关性分析示两者无明显相关($r=-0.115, P=0.255$),见表2。

表2 本组100例结肠癌组织中GRP78与HSP20表达的相关性(例)

GRP78	例数	HSP20		r值	P值
		阴性(49例)	阳性(51例)		
阴性	32	13	19		
阳性	68	36	32	-0.115	0.255

讨 论

结直肠癌是常见的恶性肿瘤,其各肠段的发病率依次为直肠、乙状结肠、盲肠、升结肠、降结肠及横结肠,但近年来有向右半结肠发展的趋势^[6]。其原因目前尚不能用分子遗传学原因解释,可能与饮食、环境、生活方式以及医疗水平的提高有关。本研究应用蛋白组学及免疫组化方法对左、右半结肠癌的生物学行为差异及可能的分子机制进行了初步研究。

本研究通过建立左半和右半结肠癌的蛋白质组表达谱,发现了LSCC和RSCC的差异表达蛋白,并成功鉴定出16种有意义的差异表达蛋白质。结合相关文献,发现在LSCC中HSP60、HSP70等大分子热休克蛋白表达上调,在RSCC中HSP27、HSP20等小分子热休克蛋白表达上调。这提示HSP在左半结肠癌发生、发展、及生物学行为等的差异中可能扮演不同的角色。

GRP78又名免疫球蛋白重链结合蛋白(Bip),属于HSP70家族的成员之一,参与众多的细胞生理过程^[7]。大量文献报道,GRP78在内质网应激中起到保护细胞免于损伤的重要作用。本研究结果显示,GRP78在结肠癌组织及癌旁组织均有表达,在

癌组织中表达较癌旁组织上调,这与之前在其他恶性肿瘤如肝癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、胃癌等中的研究结果一致^[8-9]。通过对 GRP78 与结肠癌标本的临床病理资料进行统计学分析,发现 GRP78 蛋白表达与肿瘤的分化程度、TNM 分期、有无淋巴结转移以及有无肝转移有关。这说明 GRP78 在结肠癌的发生、发展及转移侵袭过程中可能起到重要的作用。在本研究中,GRP78 在 LSCC 组织中表达(78%)较 RSCC 组织(56%)上调,鉴于这样的结果,我们认为,GRP78 在结肠癌尤其是 LSCC 的侵袭过程中发挥了重要的作用。最近,越来越多的研究证明,GRP78 的高表达与肿瘤细胞的耐药性有关^[10]。根据本研究的结果,我们认为,相对于 RSCC, LSCC 可能更容易对抗肿瘤药物产生耐药,这值得我们进行更深入的研究。

HSP20 是小分子热休克蛋白(sHSPs)10 种成员中的其中一个家族,在人类多种组织中都有表达。本研究发现,HSP20 在 TNM 分期为 I ~ II 期的结肠癌组织中的阳性表达率明显高于 III ~ IV 期,且在无淋巴结转移的结肠癌组织中明显高于有淋巴结转移的结肠癌组织。有研究表明,HSP20 在肝细胞癌细胞系中的表达相对于癌旁正常组织明显下调,并且 HSP20 表达水平与血管浸润情况,肿瘤大小以及肿瘤的 TNM 分期呈负相关^[11]。这与本研究结果一致。另外,在黑色素瘤、原发性肺细胞腺癌、神经胶质瘤中也有类似的发现^[12-13]。这表示,HSP20 蛋白的表达水平可以作为反映肿瘤进展情况的一种重要的指示因子。本研究结果显示,HSP20 在 RSCC 中的阳性表达显著高于 LSCC 组,鉴于 HSP20 对于人类肿瘤可能具有的抑制作用,我们认为,在 RSCC 中这种抑制作用可能更加显著,并有可能与 RSCC 和 LSCC 在临床表现及生物学行为上的差异密切相关。尽管对于 HSP20 在肿瘤中的作用机制仍不甚明了,进一步的研究可能对其具体作用加以阐释。

由于 GRP78 与 HSP20 都属于 HSP,且其各自抑制细胞凋亡的作用可能通过共同的信号通路,如 caspase、Bcl-2、Bax 等发挥作用。根据本研究的统计学分析,GRP78 与 HSP20 在结直肠癌组织中的表达无明显相关($r=-0.115, P=0.255$)。由于实验样本及实验方法的限制,GRP78 与 HSP20 之间的相互作用仍需要进一步的研究。

目前,越来越多的研究开始关注 LSCC 与 RSCC

在肿瘤发生、生物学行为上的差异。本研究关注的 GRP78 和 HSP20 在 LSCC 与 RSCC 中的差异表达,提示两者在 LSCC 与 RSCC 发病机制与生物学行为的差异中可能发挥重要作用,并可能与各自不同的耐药性、预后等密切相关。

志谢 感谢中南大学湘雅医院卫生部蛋白质组学重点实验室提供技术平台和支持

参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Trends in colorectal cancer incidence rates in the United States by tumor location and stage, 1992-2008. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2012, 21:411-416.
- [2] Distler P, Holt PR. Are right- and left-sided colon neoplasms distinct tumors? *Dig Dis*, 1997, 15:302-311.
- [3] Iacopetta B. Are there two sides to colorectal cancer? *Int J Cancer*, 2002, 101:403-408.
- [4] Nozoe T, Anai H, Nasu S, et al. Clinicopathological characteristics of mucinous carcinoma of the colon and rectum. *J Surg Oncol*, 2000, 75:103-107.
- [5] Görg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 2000, 21:1037-1053.
- [6] 万德森. 结直肠癌流行病学与预防. 中国中西医结合外科杂志, 2011, 17:3-7.
- [7] Ortiz C, Cardemil L. Heat-shock responses in two leguminous plants: a comparative study. *J Exp Bot*, 2001, 52:1711-1719.
- [8] Lee AS. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res*, 2007, 67:3496-3499.
- [9] Li J, Lee B, Lee AS. Endoplasmic reticulum-stress induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis(PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem*, 2006, 281:7260-7270.
- [10] Dong D, Ko B, Baumeister P, et al. Vascular targeting and antiangiogenesis agents induce drug resistance effector GRP78 within the tumor microenvironment. *Cancer Res*, 2005, 65: 5785-5791.
- [11] Noda T, Kumada T, Takai S, et al. Expression levels of heat shock protein 20 decrease in parallel with tumor progression in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*, 2007, 17: 1309-1314.
- [12] Yap YL, Lam DC, Luc G, et al. Conserved transcription factor binding sites of cancer markers derived from primary lung adenocarcinoma microarrays. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33:409-421.
- [13] Deighton RF, McGregor R, Kemp J, et al. Glioma pathophysiology: insights emerging from proteomics. *Brain Pathol*, 2010, 20:691-703.

(收稿日期:2012-01-05)