

GRP78 在食管鳞状细胞癌、不典型增生及正常食管鳞状上皮组织中的表达

郝鹏程¹ 李自亨¹ 魏煜程^{2△} 高海庆¹ 王 栋¹

(1 山东省荣军总医院 山东 济南 250013 2 青岛大学医学院附属医院胸外科 山东 青岛 266003)

摘要 目的 检测葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated proteins 78, GRP78)在同一食管癌患者食管的鳞状细胞癌、不典型增生及正常鳞状上皮组织中的表达,研究 GRP78 与食管鳞状细胞癌发生发展的关系。方法 取 90 例食管鳞状细胞癌患者的病变组织,其病理切片中正常鳞状上皮组织、不典型增生组织和鳞状细胞癌组织均存在,用免疫组化的方法,检测 GRP78 在 3 种不同组织中表达的情况,分析 GRP78 与性别、年龄、浸润深度、分化程度、分期及淋巴结转移等参数之间的关系。结果 GRP78 在食管正常鳞状上皮组织、不典型增生组织、鳞状细胞癌组织中的阳性表达率分别为 7.8%、85.6%、47.8%,GRP78 在正常食管组织、不典型增生组织、食管鳞癌组织 3 组中表达的差异有显著性意义(P<0.01)。鳞状细胞癌组织中 GRP78 表达阴性者,年龄较阳性者大,GRP78 表达与肿瘤分化程度、分期、淋巴结转移等有明显相关性。结论 GRP78 在食管正常细胞向恶性细胞转化的过程中可能扮演了重要角色,检测 GRP78 的表达可能有助于对食管鳞状细胞癌的预防及早期诊断。

关键词 食管癌;鳞状细胞癌;不典型增生;葡萄糖调节蛋白;免疫组化

中图分类号 R735.1 文献标识码 A 文章编号 :1673-6273(2011)19-3669-03

The Expression of GRP78 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma, Atypical Hyperplasia, and Normal Esophageal Squamous Epithelial Tissue

HAO Peng-cheng¹, Li Zi-heng¹, WEI Yi-cheng^{2△}, GAO Hai-qing¹, WANG Dong¹
(1 Department of Thoracic Surgery, Shandong Rongjun Hospital, Jinan250012, China;

2 Department of Thoracic Surgery, Affiliated Hospital, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of glucose regulated protein 78 (GRP78) in esophageal squamous cell carcinoma, atypical hyperplasia, and normal esophageal squamous epithelial tissue, and the role of GRP78 in the development of esophageal squamous cell carcinoma. **Methods:** Esophageal squamous cell carcinoma, atypical hyperplasia, and normal esophageal squamous epithelial tissues from 90 patients with esophageal squamous cell carcinoma were employed in the study. The expressions of GRP78 in different tissues were detected using immunohistochemistry analysis. In addition, the relationships between GRP78 expression and gender, age, differentiation, invasion, disease stage, and lymphoid node metastasis were analyzed. **Results:** The positive ratio of GRP78 expression in normal esophageal squamous epithelial tissue, atypical hyperplasia, and esophageal squamous cell carcinoma were 0%, 85.6%, and 47.8%. The GRP78 expressions in different tissues were significantly different (p<0.01). Negative GRP78 expression was more often found in older patients. GRP78 expression was positively correlated with differentiation, disease stage and lymphoid node metastasis. **Conclusion:** GRP78 may play an important role in the transition of normal esophageal squamous cells to malignant cells. To determine the expression of GRP78 may be helpful for the prevention and early diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma.

Key words: Esophageal carcinoma; squamous cell carcinoma; Atypical hyperplasia; Glucose regulated protein; Immunohistochemistry

Chinese Library Classification: R735.1 **Document code:** A

Article ID :1673-6273(2011)19-3669-03

前言

食管癌(esophageal carcinoma, EC)是全世界常见的恶性肿瘤之一,我国是高发国家,病理类型以鳞状细胞癌为主。食管癌发病率逐年上升,且早期诊断率低,预后较差,严重影响着人类的身体健康。食管癌的发病机制还没有完全阐明,它的发生、发展是一个多因素综合作用的结果。葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78) 也称为免疫球蛋白重链结合蛋白 (immunoglobulin heavy chain binding protein, BiP), 当前对葡萄糖调节蛋白的研究比较多。上世纪 70 年代末 Shiu 等人^[1] 在实验中诱导产生两种相对分子质量分别为 78 000 和 94 000 的蛋白,命名为 GRP78 和 GRP94。GRP78 是一种分子伴侣,协助蛋白质的折叠和转运,是内质网上的一种应激蛋白,在缺氧、低糖等应激条件下表达明显增加。越来越多的研究表明,GRP78 在某些肿瘤细胞中表达明显增高,并且在肿瘤细胞的化疗药物中起着重要作用。GRP78 通过影响凋亡效应器的作用来阻断化疗药物引起的细胞死亡,从而降低肿瘤对化疗药物的敏感性^[2]。王利菊等^[3]发现 GRP78 在非小细胞肺癌中高表达与肿瘤细胞对化疗药物耐药相关。目前在前列腺癌^[4]和乳腺癌^[5]的研究

cose-regulated protein 78, GRP78) 也称为免疫球蛋白重链结合蛋白 (immunoglobulin heavy chain binding protein, BiP), 当前对葡萄糖调节蛋白的研究比较多。上世纪 70 年代末 Shiu 等人^[1] 在实验中诱导产生两种相对分子质量分别为 78 000 和 94 000 的蛋白,命名为 GRP78 和 GRP94。GRP78 是一种分子伴侣,协助蛋白质的折叠和转运,是内质网上的一种应激蛋白,在缺氧、低糖等应激条件下表达明显增加。越来越多的研究表明,GRP78 在某些肿瘤细胞中表达明显增高,并且在肿瘤细胞的化疗药物中起着重要作用。GRP78 通过影响凋亡效应器的作用来阻断化疗药物引起的细胞死亡,从而降低肿瘤对化疗药物的敏感性^[2]。王利菊等^[3]发现 GRP78 在非小细胞肺癌中高表达与肿瘤细胞对化疗药物耐药相关。目前在前列腺癌^[4]和乳腺癌^[5]的研究

作者简介 郝鹏程(1975-) 男 主治医师,主要研究方向:胸部肿瘤分子生物学。E-mail:hpc750228@126.com 电话:18660795966
△通讯作者 魏煜程(1969-) 男 副主任医师。
E-mail:weiyuchengchest@163.com
(收稿日期 2011-07-05 接受日期 2011-07-31)

中也有相关报道,抑制 GRP78 的表达可能抑制肿瘤细胞生长,并提高肿瘤对化疗的敏感性。Pyrko 等^[8]在研究中发现用 SiRNA 抑制 GRP78 的高表达可以使恶性神经胶质瘤细胞对化疗药物敏感。虽然当前对 GRP78 在肿瘤中的研究很多,但关于 GRP78 在人类食管癌中的研究还很少。

本研究对 90 例食管鳞状细胞癌组织及其相应的不典型增生、正常食管鳞状上皮组织进行免疫组化 (Immunohistochemistry, IHC)染色,分别检测和分析它们的 GRP78 表达情况,探讨它与人类食管鳞状细胞癌发生、发展的关系。

1 材料与方法

1.1 组织标本

随机收集山东省立医院 2006 年 1 月至 2010 年 10 月 90 例原发性食管鳞状细胞癌病例手术标本的石蜡组织,要求患者手术前未行放、化疗和其他抗肿瘤治疗,要求病理切片中存在鳞状细胞癌、不典型增生和正常食管鳞状上皮组织,并且全部标本的病理切片均经两位病理学专家验证。食管鳞癌组织取于癌组织中质地均匀、无出血坏死处;食管不典型增生组织取材于癌旁组织;正常食管鳞状上皮组织取材于距癌组织 5cm 以上的手术远端切缘,均经显微镜下确认。男性 62 例,女性 28 例。平均年龄 59.45 ± 6.80 岁。经病理检查确诊,其中分化程度高分化)12 例,中分化 61 例,低分化 17 例。浸润深度侵及黏膜下 9 例,侵及浅肌层 22 例,深肌层 33 例,侵达纤维膜 26 例。TNM 分期 期 10 例, 期 58 例, 期 22 例, 期 0 例。无淋巴结转移 62 例,淋巴结转移 28 例。

1.2 主要试剂

鼠抗人 GRP78 单克隆抗体购自上海瑞齐生物科技有限公司。免疫组化染色超敏试剂盒 (S-P 法)和 DAB 显色试剂盒均购自上海凯博生物有限公司。

1.3 免疫组织化学染色

将石蜡包埋的组织制成 $4\mu m$ 的连续切片,行免疫组化染色,将切片脱蜡至水化,高温高压修复;将抗体稀释至 1:100,取已知阳性组织作阳性对照,PBS 替代一抗作阴性对照。DAB 显色,用苏木精复染、脱水、透明,最后封片。

1.4 结果判断标准

光学显微镜下观察切片,GRP78 阳性着色见于细胞质中,出现棕黄色颗粒为阳性。根据阳性细胞数分别标记为:无阳性细胞或仅有单个表达的细胞为阴性(-),阳性细胞数小于 20% 为弱阳性(+),阳性细胞数 20%-70%为阳性(++),阳性细胞数大于 70%为强阳性(+++)。

1.5 统计学处理

所有数据应用 SPSS 17.0 软件包进行统计学处理,GRP78 表达强度差异采用 χ^2 检验分析。

2 结果

2.1 GRP78 在各食管组织的表达情况

免疫组织化学显示,GRP78 阳性信号定位于细胞质中,呈棕黄色颗粒。正常食管鳞状上皮组织、食管不典型增生组织、食管鳞状细胞癌组织 3 者之间,在细胞阳性表达率分别为 7.8%、85.5%、48.78%,经 χ^2 检验有统计学差异 ($P<0.01$,表 1)。

表 1 GRP78 在不同食管组织中的表达情况
Table 1 The expression of GRP78 in different esophagus tissues

Groups	Positive number	Negative number	Positive rate(%)
Normal esophageal squamous epithelial tissue	7	83	7.8%
Atypical hyperplasia	77	13	85.6%
Esophageal squamous cell carcinoma	43	47	47.8%

Note: $P<0.01$ normal esophagus with atypical hyperplasia; $P<0.01$ normal esophagus with Esophageal squamous cell carcinoma; $P<0.01$ atypical hyperplasia with Esophageal squamous cell carcinoma

2.2 食管鳞癌组织中 GRP78 表达与临床病理参数之间的关系

食管鳞癌组织中 GRP78 表达阳性病例的平均年龄为 (63.56 ± 5.81) 岁,GRP78 表达阳性病例的平均年龄为 (57.85 ± 4.5) 岁;前者的发病年龄较大 ($P<0.05$)。食管鳞癌组织细胞中 GRP78 表达与性别、肿瘤浸润深度无关,与分化程度、分期和淋巴结转移有明显相关 (表 2)。

3 讨论

从 Shiu 等人^[1]在实验中诱导产生 GRP78 以来,从酵母到人类体内均发现 GRP78 的存在。现在越来越多的研究证明人类肿瘤与 GRP78 的高表达相关。1999 年 Gazit 等^[7]发现在乳腺癌细胞株中 GRP78 表达水平显著增高;同一年 Koomagi 等^[8]

发现在人类非小细胞肺癌中 GRP78 表达明显上调;2000 年 Fernandez 等^[9]发现在人类乳腺癌标本中 GRP78 表达水平明显高于正常乳腺组织,近年来 GRP78 在结肠癌^[10]、肝癌^[11]、前列腺癌^[12]、成神经细胞瘤^[13] 中的高表达都有文献报道。但关于 GRP78 在食管癌中表达的研究的报道至今还很少,2008 年 Rupert 等^[14]报道了在食管腺癌中 GRP78 高表达。

本研究随机选取 90 例人食管鳞状细胞癌手术标本,用免疫组化的方法检测了 GRP78 在食管鳞状细胞癌组织、不典型增生及正常食管鳞状上皮组织中表达情况。我们发现在食管鳞癌发生、发展的不同时期 GRP78 的表达有明显规律性。在正常食管组织中 GRP78 基本上呈阴性表达,而在食管不典型增生组织中 GRP78 呈强阳性表达,阳性率在 80 %以上。然而在鳞癌

组织中 GRP78 呈阳性表达，阳性率为 50 %左右。3 组间 GRP78 蛋白的表达具有显著性差异，提示 GRP78 可能参与食管正常细胞向恶性细胞转化的过程,其具体机制需要进一步的研究。本研究发现 GRP78 高表达与人类食管鳞状细胞癌的分

化程度、淋巴结转移、病理分期相关,而与患者性别及浸润深度无关。GRP78 表达随分化程度的降低而增高,有淋巴转移的显著高于无淋巴转移的；病理分期晚的 GRP78 表达明显高于病理分期早的。

表 2 食管鳞状细胞癌组织中 GRP78 的表达与临床病理参数的关系

Table 2 Relation ship between expression of GRP78 and clinical parameters of esophagus squamous cell carcinoma tissues

Item	Groups	n	Positive number	Positive rate(%)	P
Gender	Male	68	32	47.06	P>0.05
	Female	22	10	45.46	
Infiltration depth	Inferiormucousmembrane	9	4	44.44	P>0.05
	Superficialmuscular layer	22	10	45.45	
	Deep muscular layer	33	17	51.52	
	Fibrousmembrane	26	15	57.69	
Differentiation level	Well differentiated	12	4	33.33	P<0.05
	Midrange differentiated	51	19	37.25	
	Poorly differentiated	27	15	55.56	
Staging of tumor (TNM)	stage	10	4	40	P<0.01
	stage	58	23	39.66	
	stage	22	16	72.73	
Lymphatica metastasis	Yes	28	20	71.43	P<0.01
	No	62	23	37.09	

总之,研究表明 GRP78 在食管鳞状细胞癌中高表达,与食管鳞状细胞癌的分化、进展、转移有密切的关系,可作为一种有价值的分子标志物。检测 GRP78,可以为食管癌的早期预防和早期诊断服务。

参 考 文 献 (Rererence)

[1] Shi RP, Pastan IH. Properties and purification of a glucose-regulated protein from chick embryo fibroblasts [J]. Biochim Bopphys Acta, 1979, 576 (1) : 141-150

[2] Dong D, Ko B, Baumeister P, et al. Vascular targeting and antiangiogenesis agents induce drug resistance effector GRP78 within the tumor microenvironment [J]. Cancer Res, 2005, 65 (13) : 5785-5791

[3] 王利菊, 王琪, 王镇山, 等. 非小细胞肺癌体外化疗药物敏感性与 GRP78 表达的相关性 [J]. 中国肺癌杂志, 2006, 9(6) : 483-487

[4] Pootrakul L, Datar RH, Shi SR, et al . Expression of stress response protein Grp78 is associated with the development of castration-resistant prostate cancer [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12 (20 Pt 1): 5987-5993

[5] Lee E, Nichols P, Sp icer D, et al. GRP78 as a novel predictor of responsiveness t o chemotherapy in breast cancer [J]. Cancer Res,2006, 66 (16) : 7849-7853

[6] Pyrko P, SchÊ nthal 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

[7] Gazit G, Lu J, Lee AS . De-regulation of GRP stress protein expression

in human breast cancer cell lines [J]. Breast Cancer Res Treat, 1999, 54 (1): 135-146

[8] Koomagi R, Mattern J, Volm M. Glucose2related protein (GRP78) and its relationship to the drug2resistance proteins P170, GST2 p i,LRP56 and angiogenesis in non-small cell lung carcinomas [J]. Anticancer Res, 1999, 19 (5B): 4333-4336

[9] Fernandez PM, Tabbara SO, Jacobs LK, et al. Over expression of the glucose2regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions [J]. Breast Cancer Res Treat, 2000, 59 (1): 15-26

[10] Xing X, LaiM, Wang Y, et al. Over expression of glucose-regulated protein 78 in colon cancer [J]. Clin Chim Acta, 2006, 364 (12 2): 308-315

[11] Li m SO, Park SG, Yoo JH, et al . Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) inhepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dys plastic nodules [J]. World J Gastr oenterol, 2005, 11 (14) : 2072-2079

[12] Daneshmand S, QuekML, Lin E, et al. Glucose regulated protein GRP78 is up2regulated in prostate cancer and correlates with recurrence and survival [J]. Hum Pathol, 2007, 38 (10): 1547-1552

[13] HsuWM, Hsieh FJ, Jeng Y M, et al. GRP78 expression correlates with histologic differentiation and favorable prognosis in neuroblastic tumors [J]. Int J Cancer, 2005, 113 (6): 920-927

[14] Langer R, FeithM, Siewert JR, et al. Expression and clinical significance of glucose regulated proteins GRP78 (BiP) and GRP94(GP96) in human adenocarcinomas of the esophagus [J]. BMC Cancer, 2008, 8 (10) : 70