

◇临床医学◇

葡萄糖调节蛋白和环氧合酶-2 在肝癌组织中的表达及其相关性研究

赵玮,范璐璐,于汉卿,孙国平

(安徽医科大学第一附属医院肿瘤科,安徽 合肥 230022)

摘要:目的 研究葡萄糖调节蛋白(GRP78)和环氧合酶-2(COX-2)在肝癌组织中表达及与临床病理资料的关系。**方法** 采用免疫组化法检测 144 例肝癌组织芯片中 GRP78 和 COX-2 的表达情况。**结果** 肝癌组织中 GRP78、COX-2 的阳性表达率分别为 47.22%、56.94%;GRP78 与乙肝病毒感染史、丙氨酸氨基转移酶(ALT)差异有统计学意义($P < 0.05$),但与性别、年龄、肝硬化病史、甲胎蛋白(AFP)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、肿瘤大小、分期、分化程度差异无统计学意义($P > 0.05$),COX-2 的表达与肿瘤组织分化程度差异有统计学意义($P < 0.025$),与性别、年龄、肝硬化病史、乙肝病毒感染史、AFP、AST、ALT、ALP、肿瘤大小、分期差异无统计学意义($P > 0.05$);COX-2 与 GRP78 蛋白的表达呈正相关($r = 0.204, P < 0.025$)。**结论** COX-2 的表达与肝癌组织分化程度显著相关,GRP78 阳性表达的肝癌组织中 COX-2 的表达升高,两者在肝癌组织中的关系密切。

关键词:葡萄糖调节蛋白;环氧合酶-2;肝癌;免疫组织化学法

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.02.017

Expression and its correlation of GRP78 and COX-2 in hepatocellular carcinoma tissues

ZHAO Wei, FAN Lulu, YU Hanqing, SUN Guoping

(Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230022, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of glucose-regulated protein78 (GRP78) and Cyclooxygenase-2 (COX-2) in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues, and their clinical significance. **Methods** The expression of GRP78 protein and COX-2 were detected by Immunohistochemical staining in 144 cases of hepatocellular carcinoma tissues microarray. **Results** The positive expression rate of GRP78 and COX-2 in hepatocellular carcinoma tissues were 47.22% and 56.94% respectively. GRP78 was significantly correlated with HBV infection and ALT ($P < 0.05$), while it was not related with sex, age, cirrhosis of liver, AFP, AST, ALT, ALP, the size, stage and differentiation of tumor. COX-2 expression was significantly associated with the tumor differentiation ($P < 0.025$). No significant difference was found between increased COX-2 and other tested items ($P > 0.05$). The expression of COX-2 was positively correlated with the expression of GRP78 ($r = 0.204, P < 0.025$). **Conclusion** The expression of COX-2 was correlated with differentiation of hepatocellular carcinoma tissue. COX-2 expression is high in hepatocellular carcinoma which GRP78 expression is positive, so that the relationship between the two are very close.

Key words: GRP78; COX-2; Hepatocellular carcinoma; Immunohistochemical

原发性肝癌(HCC)是最常见的恶性肿瘤之一,全世界每年新诊断的病人超过 50 万人,我国是肝癌的高发区,统计分析显示 2012 年在发展中国家新发生的肝癌病人中我国占 50%^[1],该肿瘤侵袭性强、分期晚及放化疗治疗不敏感使其在所有肿瘤中的病死率居高不下,每年我国的肝癌病死率仅次于

肺癌,居第二位,因此亟待找到增加抗肝癌治疗疗效的新途径。

内质网应激(ERS)诱导的凋亡抵抗是肝癌病人化疗过程中产生耐药的机制之一^[2],葡萄糖调节蛋白(GRP78)是热休克家族成员,它作为 ERS 诱导的未折叠蛋白反应(UPR)的标志蛋白可促进蛋白的正确折叠和装备,从而促进肿瘤细胞存活。环氧合酶-2(COX-2)是产生前列腺素的关键限速酶,它具有抑制肿瘤细胞凋亡作用,目前国内外关于 GRP78 和 COX-2 蛋白在肝癌组织中表达情况及其的相关性研究较少,同时为了进一步了解肝细胞癌

基金项目:国家自然科学基金(81272739,81572430,81402040);高等学校博士学科点专项科研基金(20113420110002)

通信作者:孙国平,男,教授,博士生导师,研究方向:肿瘤个体化治疗, E-mail: Sunguoping@ahmu.edu.cn

凋亡抵抗的发生发展机制,本研究采用高通量、平行组织芯片技术,应用免疫组化法检测并探讨其相关性和临床意义。

1 资料与方法

1.1 标本 搜集 2001—2007 年间在安徽医科大学第一附属医院病理科确诊的 144 例有完整资料的肝癌组织,且所有病人术前未行放和(或)化疗、免疫治疗及中药抗肿瘤治疗,制作组织芯片。男性 119 例,女性 25 例,年龄 21 ~ 84 岁,中位年龄 50 岁;按照国际抗癌联盟的 AJCC 分期(2010 年标准),I 期 3 例,II 期 111 例,III 期 26 例,IV 期 4 例,癌肿最大横径线 > 5 cm 者 86 例,≤ 5 cm 者 58 例;根据 WHO 标准肿瘤分化分为:低分化 39 例,中分化 61 例,高分化 44 例。所有组织均常规 10% 福尔马林固定、石蜡包埋。

1.2 主要试剂 一抗 GRP78 单克隆抗体(货号 AB108615),工作浓度 1:100,购于美国 Abcam 公司;一抗 COX-2 单克隆抗体(货号 AB1160112),稀释浓度 1:100,购于美国 Cayman 公司;通用型二步法二抗试剂(PV6000)盒、进口山羊血清工作液、浓缩型二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒等购于北京中杉金桥有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 组织芯片制备 设计芯片微陈列,制作微缩组织切片(TMA)受体蜡块,据 HE 切片对石蜡标本中代表性的点挑选出合适的取材部位,组织芯片机分别对受体及相应部位的供体蜡块打孔,孔径 1 ~ 1.5 mm,将供体依次组织芯转移到 TMA 受体蜡块孔中;二次蜡块包埋后制成组织芯片蜡块。

1.3.2 免疫组化染色 免疫组织化学 SP 法进行免疫组化染色:组织芯片 4 μm 连续切片,常规脱蜡、水化,柠檬酸钠缓冲液微波加热抗原修复,3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,10% 山羊血清室温孵育;滴加一抗工作液,4 ℃ 冰箱过夜,复温后滴加通用型 2 抗孵育(PV6000),显微镜下控制 DAB 避光显色,苏木素复染后中性塑胶封片。使用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。

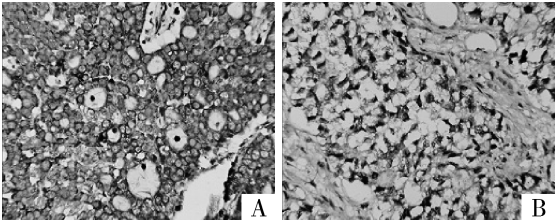
1.4 结果判定 由 2 位有经验的病理科医生采用双盲法对免疫组化结果进行判定。染色强度结合阳性细胞数判断 GRP78、COX-2 免疫组化结果。按染色强度评分:染色强度与背景色对比,0 分无色,1 分浅黄色,2 分棕黄色,3 分棕褐色;按阳性细胞所占比例打分:< 5% 为 0 分,≥ 5% ~ < 25% 为

1 分,≥ 25% ~ < 50% 为 2 分,≥ 50% 计为 3 分,两项得分乘积 0 ~ 1 分为阴性,2 ~ 3 分为 +,4 ~ 5 分为 ++,≥ 6 分为 + + +,本试验将 + ~ + + + 均视为阳性。

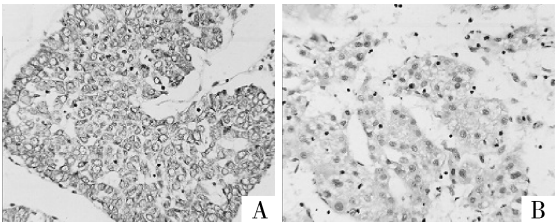
1.5 统计学方法 数据使用 SPSS16.0 软件进行统计学处理。GRP78 和 COX-2 蛋白的表达与临床病理参数的关系采用 χ^2 等非参数检验比较。GRP78 与 COX-2 相关性分析采用 Person 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GRP78、COX-2 在肝癌组织中的表达及分布 GRP78 蛋白阳性信号为黄色或棕黄色颗粒,主要定位于细胞质和胞膜(图 1),COX-2 阳性显色为黄色或棕黄色颗粒,弥漫分布定位于细胞质(图 2)。144 例肝癌组织中,GRP78 阳性表达 68 例(47.22%),COX-2 阳性表达 82 例(56.94%)。



A. 阳性表达 B. 阴性表达
图 1 GRP78 在肝癌组织中的表达(SP × 400)



A. 阳性表达 B. 阴性表达
图 2 COX-2 在肝癌组织中的表达(SP × 400)

2.2 肝癌组织中 GRP78、COX-2 蛋白表达与病人临床病理特征的关系 GRP78 与乙肝病毒感染史、丙氨酸氨基转移酶(ALT)差异有统计学意义($P < 0.05$),但与性别、年龄、肝硬化病史、甲胎蛋白(AFP)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、肿瘤大小、分期、分化程度差异无统计学意义($P > 0.05$);COX-2 的表达与肿瘤组织分化程度差异有统计学意义($P < 0.025$),与性别、年龄、肝硬化病史、乙肝病毒感染史、AFP、AST、ALT、ALP、肿瘤大小、分期差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 肝癌组织中 GRP78、COX-2 蛋白表达与病人临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	COX -2 蛋白表达/例		表达率/%	P 值	GRP78 蛋白的表达/例		表达率/%	P 值
		阴性	阳性			阴性	阳性		
性别					0.433				0.426
女	25	9	16	64.00		15	10	40.00	
男	119	53	66	55.46		61	58	48.73	
年龄/岁					0.560				0.247
≤60	108	45	63	58.33		54	54	50.00	
>60	36	17	19	52.77		22	14	38.88	
肝炎病史					0.155				0.027
无	23	13	10	43.47		17	6	26.08	
有	121	49	72	59.50		59	62	51.23	
肝硬化病史					0.329				0.355
无	81	32	49	60.49		40	41	50.61	
有	63	30	33	52.38		36	27	42.85	
AFP					0.841				0.724
阴性	55	23	32	58.18		28	27	49.09	
阳性	89	39	50	56.17		48	41	46.06	
AST					0.736				0.317
阴性	72	32	40	55.55		35	37	53.18	
阳性	72	30	42	58.33		41	31	43.05	
ALT					0.194				0.047
阴性	70	34	36	51.42		31	39	55.71	
阳性	74	28	46	58.97		45	29	39.19	
ALP					0.073				0.343
阴性	83	41	42	50.60		41	42	50.60	
阳性	61	21	40	65.57		35	26	42.62	
肿瘤大小/cm					0.167				0.219
≤5	58	29	29	50.00		27	31	53.44	
>5	86	33	53	61.62		49	37	43.02	
分化程度					0.003				0.243
高分化	44	27	17	38.63		20	24	54.54	
中分化	61	25	36	59.01		35	26	42.62	
低分化	39	10	29	74.35		21	18	50.00	
AJCC 分期					0.216				0.980
I	3	3	0	0.00		1	2	66.66	
II	111	48	63	56.75		60	51	45.94	
III	26	9	17	65.38		11	15	57.69	
IV	4	2	2	50.00		4	0	0.00	

2.3 肝癌中 COX-2 蛋白和 GRP78 蛋白表达的相关性 在 144 例肝癌组织中,GRP78 阳性且 COX-2 也为阳性的 46 例(67.64%),明显高于 GRP78 阴性且 COX-2 为阳性的为 36 例(47.37%),相关性分析显示:COX-2 与 GRP78 蛋白的表达呈正相关($r = 0.204, P = 0.014$),见表 2。

表 2 肝细胞癌中 COX-2、GRP78 表达的相关性分析

COX-2	GRP78		Pearson 相关系数 r 值	P 值
	阴性	阳性		
阴性	40	22	0.204	0.014
阳性	36	46		

3 讨论

内质网是由生物膜构成的互相通连的片层隙

状或小管状系统,除哺乳动物红细胞外,可见于各种细胞,一方面构成了胞内物质的运输通路,更为重要的另一方面它是细胞内糖、脂类及蛋白质合成及修饰的重要场所。当缺氧、营养缺乏等细胞内或细胞外因素导致错误折叠或未折叠蛋白在内质网腔聚集及钙平衡紊乱,即可诱导ERS。为了消除应激调节细胞内稳态失衡,内质网启动细胞保护机制UPR。定位于内质网的 GRP78 作为伴侣蛋白在 UPR 中起重要作用,它可抑制形成错误折叠蛋白和保持内质网中钙离子的平衡状态^[3]。GRP78 在所有正常组织中低表达,但在多肿瘤组织中高表达并在肿瘤细胞的抗凋亡过程中扮演着重要的角色^[4],肿瘤细胞快速增殖和血液供应相对不足导致细胞乏氧、葡萄糖氨基酸缺失、酸中毒等,可诱发 ERS,启动 UPR 致使

GRP78 表达上调,从而抑制细胞凋亡^[5]。研究表明,与癌旁组织相比,肝癌组织 GRP78 明显增高,差异有统计学意义,并且显示出更差的预后^[6]。本组研究发现 GRP78 蛋白在肝癌组织中高表达(阳性率 47.22%)并与乙型肝炎病史、ALT 表达显著相关。基础研究显示乙肝病毒感染可活化 UPR 上调 GRP78^[7],可能是其促进肝癌的发生,使肝癌逐渐恶化的原因之一,但其具体机制有待进一步研究。

然而持续或严重的内质网应激可通过活化内质网特异的促凋亡因子 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)^[8-9],叉头框蛋白 O1(Foxo1)^[10]和半胱氨酸蛋白酶-12^[11]等机制导致细胞凋亡。同样的在肿瘤细胞中,过度 ERS 亦可诱导肿瘤细胞凋亡^[12]。因此通过活化增强 ERS 的 UPR 效应促进肿瘤细胞凋亡,可能成为抗肿瘤治疗的有效手段之一,但文献报道肝癌细胞即使处于过度内质网应激状态下也并未显示出细胞凋亡率的明显增加,表明肝癌细胞可能在 ERS 下产生了生存通路^[13]。

环氧合酶(COX)有 2 种同工酶 COX-1 和 COX-2,其中 COX-2 是诱导酶其代谢产物前列腺素 E2 可刺激细胞增殖、抑制细胞凋亡,在正常细胞生理状态下不表达,但在细胞内外刺激物(如内毒素、细胞因子等)广泛刺激下 COX-2 会迅速产生。研究表明 ERS 时可诱导细胞 COX-2 的表达增高^[14],且多数研究已证实 COX-2 可在多种肿瘤组织中高表达如肺癌、肠癌、乳腺癌等,它可促进肿瘤细胞增殖、血管发生及抑制凋亡作用。本研究表明 COX-2 在肝癌组织中高表达(阳性率 56.94%),与肿瘤分化程度呈显著相关,肝癌组织分化程度越高,COX-2 的阳性表达率越高,与 Yang 等^[15]的研究一致,可能因 COX-2 的高表达促进了核因子 κ -p65 上调从而促进肝癌细胞分化,也有相关研究显示 COX-2 的表达与乙肝病毒感染,肝硬化^[16]、肿瘤临床分期有关^[17]。

在本研究中,未接受任何治疗的肝癌病人组织研究显示 COX-2 表达与 GRP78 的表达呈显著正相关,提示在肝癌的发生发展中,COX-2 与内质网应激存在着密切的关系,肝癌中 COX2 的表达上调可能是内质网应激凋亡抵抗的重要因素之一,更进一步的加深了对肝癌 ERS 凋亡抵抗的认识,下调 GRP78 可能减少 COX-2 的表达从而抑制肿瘤生长,靶向阻断 COX-2 的表达可能增强肝癌细胞对放化疗的敏感性而促进肝癌细胞凋亡,为肝癌的治疗提供新的思路,但仍需更多的基础与临床研究进一步证实。

参考文献

- [1] FERLAY J,SOERJOMATARAM I,DIKSHIT R,et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. Int J Cancer, 2015, 136 (5): E359-E386.
- [2] WANG WA,GROENENDYK J,MICHALAK M. Endoplasmic reticulum stress associated responses in cancer[J]. Biochim Biophys Acta,2014,1843(10):2143-2149.
- [3] MISRA UK,MOWERY Y,KACZOWKA S,et al. Ligation of cancer cell surface GRP78 with antibodies directed against its COOH-terminal domain up-regulates p53 activity and promotes apoptosis [J]. Mol Cancer Ther,2009,8(5):1350-1362.
- [4] PFAFFENBACH KT,LEE AS. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress [J]. Curr Opin Cell Biol,2011,23(2):150-156.
- [5] LEE AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications [J]. Trends Biochem Sci,2001,26(8):504-510.
- [6] LUK JM,LAM CT,SIU AF,et al. Proteomic profiling of hepatocellular carcinoma in Chinese cohort reveals heat-shock proteins (Hsp27,Hsp70,GRP78) up-regulation and their associated prognostic values [J]. Proteomics,2006,6(3):1049-1057.
- [7] YEGANEH B,REZAEI MOGHADAM A,ALIZADEH J,et al. Hepatitis B and C virus-induced hepatitis: Apoptosis, autophagy, and unfolded protein response [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(47):13225-13239.
- [8] TAJIRI S,OYADOMARI S,YANO S,et al. Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP [J]. Cell Death Differ, 2004, 11(4): 403-415.
- [9] 秦勤,李元海. GRP78 与 CHOP 在缺血再灌注损伤中的作用 [J]. 安徽医药,2015,19(2):209-212.
- [10] FUKUNAGA K,ISHIGAMI T,KAWANO T. Transcriptional regulation of neuronal genes and its effect on neural functions: expression and function of forkhead transcription factors in neurons [J]. J Pharmacol Sci,2005,98(3):205-211.
- [11] LIU HJ,YANG JP,WANG CH,et al. Endoplasmic reticulum in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the rabbit [J]. Neurol Sci,2009,30(3):227-232.
- [12] RASHEVA VI,DOMINGOS PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis [J]. Apoptosis,2009,14(8):996-1007.
- [13] ZHANG LJ,CHEN S,WU P,et al. Inhibition of MEK blocks GRP78 up-regulation and enhances apoptosis induced by ER stress in gastric cancer cells [J]. Cancer Lett,2009,274(1):40-46.
- [14] RASHEED Z,HAQQI TM. Endoplasmic reticulum stress induces the expression of COX-2 through activation of eIF2 α ,p38-MAPK and NF- κ B in advanced glycation end products stimulated human chondrocytes [J]. Biochim Biophys Acta,2012,1823(12):2179-2189.
- [15] YANG Y,ZHU J,GOU H,et al. Clinical significance of Cox-2, Survivin and Bcl-2 expression in hepatocellular carcinoma (HCC) [J]. Med Oncol,2011,28(3):796-803.
- [16] 李波,刘勇,苏松,等. 环氧合酶-2 与 P-糖蛋白在人肝癌细胞中的表达及其意义 [J]. 中华肝脏病杂志,2011,19(10):755-758.
- [17] GIANNITRAPANI L,INGRAO S,SORESI M,et al. Cyclooxygenase-2 expression in chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study [J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1155:293-299.

(收稿日期:2016-06-14,修回日期:2016-07-12)