

# HSP60 在大肠腺瘤和大肠癌中表达的临床病理研究 A Clinical Pathological Study on Expressions of HSP60 in Colorectal Carcinoma and Premalignant Lesion

陆爱权,雷树勇,刘景龙

LU Ai-quan, LEI Shu-yong, LIU Jing-long

(武警广西总队医院病理科,广西南宁 530003)

(Department of Pathology, Guangxi Provincial Corps Hospital, Chinese People's Armed Police Forces, Nanning, Guangxi, 530003, China)

**摘要:**选择大肠癌手术切除癌组织标本 56 份及同组病例距癌组织外缘 3cm 内的癌旁组织标本 20 份,采用免疫组织化学 Elivision Plus 二步法检测正常大肠黏膜、癌旁组织、大肠腺瘤和大肠癌中热休克蛋白 60(HSP60) 的表达。结果 HSP60 在正常大肠黏膜、癌旁组织、大肠腺瘤、大肠癌中表达阳性率分别为 27.78%, 40%, 77.78%, 80.36%。各组间比较, HSP60 表达的阳性率具有显著性差异 ( $\chi^2 = 23.314, P = 0.000$ )。HSP60 在大肠癌中的表达可能在大肠癌发生发展中发挥作用,特别在大肠癌恶性演进中以及预后预测中具有重要意义,其可能可以作为独立的生物标志物。

**关键词:**热休克蛋白 60 表达 阳性率 大肠癌

**中图分类号:**R735.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-7378(2007)02-0110-03

**Abstract:** By means of Elivision Plus immunohistochemistry method, the heat shock protein 60 (HSP60) expression in colorectal carcinoma, premalignant lesion and normal tissues is tested. The results show that the positivity rates of HSP60 in colorectal carcinoma, carcinogenesis and malignant are 27.78%, 40%, 77.78%, 80.36%, respectively. There are sharp differences in HSP60 expression between the colorectal carcinoma group and the normal group. These results suggest that expressions of HSP60 might play a role in progression of carcinoma and prognosis and might be expected to become independent biomarker.

**Key words:** heat shock protein 60, expression, positivity rates, colorectal carcinoma

热休克蛋白(Heat Shock Protein, HSPs)是细胞受到各种刺激后产生的一类高度保守的蛋白质,热休克蛋白广泛参与机体的各种生物和病理过程<sup>[1]</sup>。按分子量大小热休克蛋白分为 5 个家族:HSP100、HSP90、HSP70、HSP60 和小分子量 HSP 家族<sup>[2]</sup>。热休克蛋白与肿瘤的发生、发展、生物学行为及其预后有着密切的关系<sup>[3]</sup>,国内外学者对其极为关注。但是,以往对 HSP70 等在肿瘤的表达研究报道较多, HSP60 的肿瘤的表达研究甚少。因此,我们应用免疫组化方法研究大肠癌组织 HSP60 表达与临床病

理参数间的关系,探讨 HSP60 在大肠癌表达的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选择我院大肠癌手术切除癌组织标本 56 份及同组病例距癌组织外缘 3cm 内的癌旁组织标本 20 份。56 份标本中,31 份来源于男性,25 份来源于女性,患者平均年龄 56.2 岁;肿瘤发生部位:结肠 27 份,直肠 29 份,有淋巴结转移 24 份;组织分型:高分化腺癌 21 份,中分化腺癌 22 份,低分化癌 13 份,结肠腺瘤 22 份,正常粘膜组织 20 份。

### 1.2 方法

标本经 4% 中性甲醛固定,常规石蜡包埋,切片

收稿日期:2007-03-15

作者简介:陆爱权(1956-),男,副主任医师,主要从事临床病理研究。

厚 4 μm,切片作免疫组织化学染色。免疫组织化学染色法:采用免疫组织化学 Elivision Plus 二步法;试剂:鼠抗人 HSP60 单克隆抗体和即用型第二代免疫组化 ElivisionTM Plus 广谱试剂盒(福州迈新公司出品),染色方法严格按试剂盒的说明进行,即:(1)石蜡切片脱蜡和水化后,用 PBS 液(pH 值 7.4)冲洗 3 次,每次 3min。(2)柠檬酸高压修复,PBS 液冲洗 3 次,每次 3min。(3)每张切片加 2 滴 3% 双氧水,室温下孵育 10min,PBS 液冲洗 3 次,每次 3min。(4)除去 PBS 液,每张切片加 50 μl,置于冰箱 4℃ 过夜。(5)PBS 液冲洗 3 次,每次 5min,除去 PBS 液,每张切片加 50 μl 聚合增强剂(试剂 A),室温下孵育 20min,PBS 液冲洗 3 次,每次 3min。(6)除去 PBS 液,每张切片加 50 μl 酶标抗/兔聚合物增强剂(试剂 B)室温下孵育 30min,PBS 液冲洗 3 次,每次 3min。(7)除去 PBS 液,每张切片加 50 μl 新鲜配制的 DAB,显微镜下观察 3~5min。(8)自来水冲洗,苏木素淡染,自来水冲洗,PBS 液反蓝,常规脱水,封片。

1.3 结果判断方法

阳性结果判定以细胞浆出现棕黄色染色或伴有胞核棕黄色颗粒为阳性细胞。由两人分别计数 20 个高倍视野的阳性细胞,根据阳性细胞表达率分为阴性(-),阳性细胞 < 5%;弱阳性(+),阳性细胞 < 6%~30%;中等程度阳性(++),阳性细胞 < 30%~60%;强阳性(+++),阳性细胞 > 60%。以中等程度阳性和强阳性为过表达标准。

1.4 统计学方法

应用 SASS 计算机软件进行数据统计,并进行  $\chi^2$  检验。

2 结果

镜下正常粘膜组织大部分腺上皮未见 HSP60 表达,个别阳性表达主要分布在粘膜表面上皮(图 1),阳性率为 11.11%;癌旁组织 HSP60 表达主要分布在粘膜腺体和腺沟(图 2),阳性率为 15%;腺瘤的 HSP60 表达主要分布在腺体,以腔缘面多见(图 3),阳性率 77.78%;癌细胞的 HSP60 表达阳性率为 80.36%,图 4 中癌细胞 HSP60 表达呈较深的棕黄色细小颗粒状。HSP60 在各组织的表达情况及在肠癌的分化程度见表 1 和表 2。

表 1 中 4 个组织间比较,阳性率有极显著性差异 ( $\chi^2 = 23.314, P = 0.000$ ),粘膜组织与腺瘤组间比较有显著性差异 ( $\chi^2 = 9.028, P = 0.003$ ),粘膜



图 1 正常粘膜组织表面上皮的 HSP60 表达

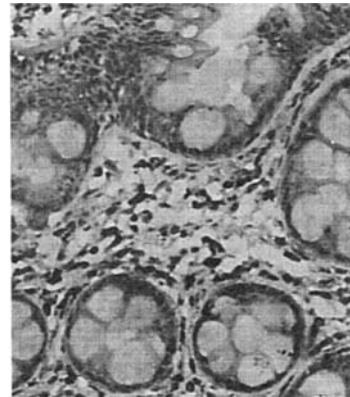


图 2 癌旁组织粘膜腺体和腺沟的 HSP60 表达

表 1 HSP60 在各组粘膜组织的表达

病变类型	例数	HSP60 的表达强度				阳性率 (%)	过表达率 (%)
		-	+	++	+++		
粘膜组织	18	13	3	2	0	27.78	11.11
癌旁组织	20	12	5	3	0	40.00	15.00
腺瘤	18	4	7	4	3	77.78	38.89
癌	56	11	11	18	16	80.36	60.71

表 2 HSP60 在肠癌不同分化程度的表达

分化程度	例数	HSP60 的表达				阳性率 (%)
		-	+	++	+++	
高分化	21	6	4	6	5	71.43
中分化	22	4	5	7	6	81.82
低分化	13	1	2	5	5	92.31
淋巴结转移						
有	24	2	5	8	9	91.67
无	32	9	6	10	7	71.88
癌浸润程度						
累及肌层	33	9	9	7	8	72.73
累及浆膜层	23	2	2	11	8	91.30

组织与癌组间比较有极显著性差异 ( $\chi^2 = 17.185, P = 0.000$ ),癌旁组织与腺瘤组间比较有显著性差异 ( $\chi^2 = 5.546, P = 0.019$ ),癌旁组织与癌组间比较有极显著性差异 ( $\chi^2 = 11.373, P = 0.001$ )。

表 2 中不同分化组间比较,阳性率无显著性差

异 ( $\chi^2 = 2.446, P = 0.294$ ), 淋巴结转移有无组间比较, 阳性率无显著性差异 ( $\chi^2 = 3.694, P = 0.055$ ), 癌浸润程度组间比较, 阳性率无显著性差异 ( $\chi^2 = 3.223, P = 0.073$ )。

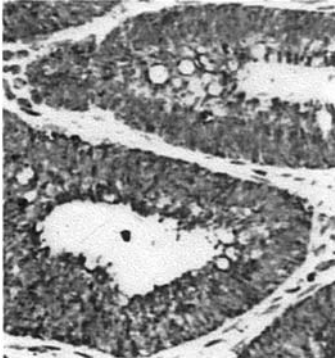


图3 腺瘤腺体腔缘面的HSP60表达



图4 癌细胞HSP60表达

### 3 讨论

热休克蛋白是一类生物进化上最保守的蛋白质, 又称应激蛋白, 在正常细胞中表达很低, 在高热、乙醇中毒、病毒感染、氨基酸类似物储积、DNA损伤、缺氧、重金属离子过多、细胞内出现变性自身蛋白等应激因素影响下, 细胞内HSPs表达增强, 使细胞耐受应激损伤, 维持细胞内环境的稳定, 这是细胞的一种自身保护; 它的作用通过与具有不同功能的多种蛋白质在细胞中形成复合体而参与有关蛋白质的折叠, 亚基的组成, 细胞内运输及蛋白质降解等过程, 从而调节靶活性和功能<sup>[4~6]</sup>。这一称为分子伴侣的作用逐渐被人们所了解。最近的研究发现HSP与细胞的转化和恶变关系密切, 癌基因转化的细胞和人类恶性肿瘤的细胞系中HSP呈过表达<sup>[7]</sup>。陈志芬等<sup>[8]</sup>研究报道HSP60在胃癌组织中表达增强。这

是由于胃癌和其它肿瘤一样具有无限增殖的能力, 癌细胞中存在原癌基因的突变、扩增、激活及抑癌基因突变、失活和缺失, 因而导致HSP在癌组织中过表达<sup>[9,10]</sup>。癌组织中HSP的过表达与具有拮抗肿瘤凋亡的能力有关。自从细胞凋亡在肿瘤发病学和治疗学的意义受到广泛重视, 学者们研究发现, 肿瘤细胞能通过过度表达拮抗凋亡的蛋白质而生存<sup>[11]</sup>; 乳腺癌过表达HSP90与肿瘤的进展有关, 其机制与HSP90能够通过激活Akt并导致抑癌基因P53失活来抑制肿瘤细胞凋亡<sup>[12]</sup>。

目前, 肿瘤与HSP的关系还不十分清楚, 这有待于进一步研究。但是, 肿瘤不断地增殖过程中, 合成代谢增强的状态下需要大量的HSP来调节和稳定这一异常增殖, 同时由于肿瘤组织生长旺盛, 相对缺血、缺氧, 细胞内环境的改变, 肿瘤细胞在应激状态下诱导HSP的过度表达已经有所了解。比如, 本次研究发现, 肠粘膜, 癌旁组织, 腺瘤和癌组织, HSP60的表达呈逐渐增强, 尤其癌组织表达最强, 提示HSP的表达在结肠癌发生、发展发挥重要的作用, HSP60可能可以作为独立的生物标志物, 检测HSP60对大肠癌的诊断及预后具有很大意义。

#### 参考文献:

- [1] SARTO C, BINZ P A, MOCARELLI P. Heat shock proteins in human cancer [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21 (6):1218-1226.
- [2] KIM K K, KIM R, KIM S H. Crystal structure of a small heat-shock protein [J]. *Nature*, 1998, 394 (6693):595-599.
- [3] LU A L, XU C S. Effects of heat shock on change of HSP70/HSP68, acid and alkaline phosphatases before and after eat partial hepatectomy [J]. *World Jgastroenterol*, 2000, 6(4):730-733.
- [4] PIURA B, RABINOVICH A, YAVELSKY V, et al. Heat shock proteins and malignancies of the female genital [J]. *Harefuah*, 2002, 141(11):1009-1010.
- [5] DARIMONT B D. The HSP90 chaperone complex: A potential target for cancer therapy [J]. *World J Gastroenterol*, 1999, 5(2):195-198.
- [6] LIU XL, XIAO B, YU ZC, et al. Down-regulation of HSP90 could change cell cycle distributor and increase drug sensitivity of tumor cells [J]. *World J Gastroenterol*, 1999, 5(2):199-208.

(下转第116页)

富,种类繁多,独具特色,还有抗癌、抗白血病等药用植物尚处于自发状态,亟需研究进行有效开放利用。

### 3.6 提高科技含量,建立无公害药材栽培基地

政府部门要将依靠科技开发药用植物资源列为主要工作内容之一。对农民进行文化知识和科学技术普及教育,选派有经验的科技人员深入农村,指导农户科学化、规范化栽培药用植物。以科技为先导,以当地资源为依托,建建立药用植物栽培 GAP(生产质量管理规范)基地。种植出优质,环保的药用植物,来保证药材高产、优质。逐步实现专业化、系列化、商品化的药用植物规模化、产业化生产发展格局。

### 3.7 加强现代中药创新平台的建设

国家(省)科技管理部门和省药监等应集中一定

人力、物力和财力,有重点地加强高校和科研单位现代中药创新平台的基础建设,加强对广西药用植物开发和利用的研究,使其尽快开发出以广西药用资源为原料的具有自主知识产权的现代中成药,增加中药材的附加值,使资源优势转化为商品优势。

#### 参考文献:

- [1] 余丽莹, 缪剑华. 广西药用植物资源保护概况[EB/OL]. (2006-09-11). <http://www.cbcf.org.cn/jsjl/021.htm>.
- [2] 黄海斌. 广西中草药资源亟待合理开发利用[EB/OL]. (2005-08-29). <http://www.gxny.gov.cn/2005/0829/144857-1.html>.

(责任编辑:邓大玉)

(上接第 112 页)

- [7] WHITESELL L, MIMNAUGH E G, DE COSTA B, et al. Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(18): 8324-8328.
- [8] 陈志芬, 邓长生, 夏冰, 等. HSP60 和 CD44V6 在胃腺癌中的表达及其意义[J]. *World Chin J Digestol*, 2001, 9(9): 988-991.
- [9] XU Q, LUEF G, WEIMANN S, et al. Staining of endothelial cells and macrophages in atherosclerotic lesions with human heat-shock protein-reactive antisera[J]. *Arterioscler Thromb*, 1993, 13(12): 1763-1769.
- [10] BARRIOS C, TOUGNE C, POLLA BS, et al. Specificity of antibodies induced after immunization of mice with the mycobacterial heat shock protein of 65 kD[J]. *Clin Exp Immunol*, 1994, 98(2): 224-228.
- [11] TSUJIMOTO Y. Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria[J]. *Biosci Rep*, 2002, 22(1): 47-58.
- [12] BEIAKOFF J, WHITESELL L. HSP90 an emerging target for breast cancer therapy[J]. *Anticancer Drugs*, 2004, 15(7): 651-662.

(责任编辑:邓大玉)