论著

文章编号:1000-5404(2005)06-0560-03

HSP70和HSP90α在人膀胱癌中的表达及意义

唐 伟,李家兵 (重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

提 要:目的 探讨热休克蛋白70(heat-shock protein 70, HSP70)和热休克蛋白90α(heat-shock protein 90α, HSP90α)在膀胱癌中的表达及临床意义。**方法** 应用免疫组化技术检测HSP70、HSP90α和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)在50例膀胱癌组织和14例正常膀胱粘膜组织的表达。**结果** 膀胱癌中HSP70、HSP90α阳性表达率分别为56%(28/50)和66%(33/50)。HSP70和HSP90α在膀胱癌病理分级、临床分期、生存率等方面具有显著性差异($P<0.05$)。HSP70、HSP90α和PCNA在膀胱癌中表达呈正相关。**结论** HSP70、HSP90α与膀胱癌细胞分化,肿瘤的浸润深度有关,在膀胱癌发生和发展中起重要作用。HSP70、HSP90α可以作为判断膀胱癌预后的新指标。

关键词: 热休克蛋白;膀胱肿瘤;增殖细胞核抗原

中图法分类号: R341; R392.31; R737.14 **文献标识码:** A

Expressions of HSP70 and HSP90α in human bladder transitional cell carcinoma and the clinical significance

TANG Wei, LI Jia-bing (Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of heat-shock protein 70 (HSP70) and HSP90α in bladder transitional cell carcinoma (BTCC) and its clinical significance in the malignancy of BTCC. **Methods** Immunohistochemical method was used to detect HSP70, HSP90α, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in 50 cases of BTCC and 14 cases of normal bladder muscosa served as the controls. **Results** The positive expression rates of HSP70 and HSP90α in BTCC were 56% (28/50) and 66% (33/50), respectively. They were significantly correlated with the pathological grade, clinical stages, and prognosis. The expressions of HSP70 and HSP90α were significantly correlated to the expression of PCNA. **Conclusion** Expressions of HSP70 and HSP90α are closely associated with the differentiation of BTCC and its depth of invasion, which may play an important role in the genesis and development of BTCC. HSP70 and HSP90α can be used as a useful molecular marker for prognosis of BTCC.

Key words: heat-shock protein; bladder neoplasm; proliferating cell nuclear antigen

膀胱癌是威胁人类生命的第四大恶性肿瘤,占全部恶性肿瘤死亡率的3.5%。20世纪末以来人们对其发病机制的研究报道较多,但目前仍不十分清楚。热休克蛋白(heat-shock protein, HSP)在许多肿瘤中呈高表达,且与肿瘤的发生、增殖、分化等密切相关。而HSP与膀胱癌之间的关系尚不明确,研究甚少。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)标志物可反映肿瘤细胞的增殖状态和所处的细胞周期,与DNA复制和细胞增殖有关。我们应用免疫组化方法研究HSP70和HSP90α在膀胱癌中的表达,并与PCNA相对比,观察两者的相关性,以进一步了解HSP70和HSP90α在膀胱癌发生、发展中的作用以及临床意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料

1994-1997年重庆医科大学附属第一医院泌尿外科手术切除膀胱移行细胞癌50例,男35例,女15例,年龄18~82岁,平均年龄66岁。其中行经尿道膀胱肿瘤电切术(TURBt)23例,膀胱部分切除21例,膀胱全切6例。按WHO肿瘤分级标准:Ⅰ级15例,Ⅱ级21例,Ⅲ级14例;UICC.TNM标准分期:T_{is}~T_1 32例,T_2~T_4 18例。42例获5年随访资料,所有术前均未行放疗和化疗。正常膀胱粘膜14例作为对照,取自非膀胱癌患者且无非典型增生的手术标本。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 兔抗人HSP90α多克隆抗体,鼠抗人PCNA单克隆抗体及两步法EnVision™检测试剂盒均为中国福建迈新生物技术公司产品。鼠抗人HSP70单克隆抗体为北京中山生

作者简介:唐 伟(1963-),男,重庆市人,副教授,主要从事泌尿系统肿瘤方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)89011009,E-mail: tangwei2060@yahoo.com.cn

收稿日期:2004-11-23;修回日期:2005-02-25

物技术有限公司产品。

1.2.2　免疫组织化学染色方法　所有标本均经 10% 甲醛固定，石蜡包埋，4 μm 连续切片。采用免疫组化 EnVision™ 两步法，严格按照试剂盒说明进行。微波枸橼酸盐抗原修复及 DAB 显色。已知的膀胱癌阳性片作为阳性对照，PBS 液代替一抗作为阴性对照。

1.2.3　结果判定　HSP70、HSP90α 阳性结果判定：光镜下细胞核和(或)胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性细胞。400 倍显微镜下每张载玻片计数 5 个视野，每个视野 100 个细胞，计算阳性细胞百分率：< 5%(-)；5% ~ 25%(+)；25% ~ 50%(++)；≥ 50%(+++)。PCNA 阳性结果判定：胞核染色为棕黄色为阳性细胞，标本中阳性反应细胞百分数 < 50% 为低表达，≥ 50% 为高表达或过度表达。

1.3　统计学处理

应用 SPSS 12.0 软件作 χ^2 检验、确切概率法和 Spearman 等级相关分析。

2　结果

2.1　HSP70、HSP90α 和 PCNA 在膀胱癌组织和正常膀胱粘膜的表达

HSP70、HSP90α 阳性信号主要位于细胞核和(或)胞浆，呈棕黄色颗粒(图 1、2)。HSP70 阳性表达率在正常膀胱粘膜组织为 14.29%(2/14)，在膀胱癌组织中为 56%(28/50)，两者相比有非常显著性差别($\chi^2 = 7.643$，$P < 0.01$)；HSP90α 阳性表达率在正常膀胱粘膜中为 21.43%(3/14)，在膀胱癌组织中为 66%(33/50)，两者相比有非常显著性差别($\chi^2 = 8.829$，$P < 0.01$)。PCNA 蛋白定位于细胞核，胞核染色为棕黄色(图 3)，50 例膀胱癌组织中有 30 例 PCNA 过度表达，过度阳性表达率 60%，正常膀胱粘膜中未见 PCNA 过度阳性表达。两者相比有非常显著性差别($\chi^2 = 15.812$，$P < 0.01$)。

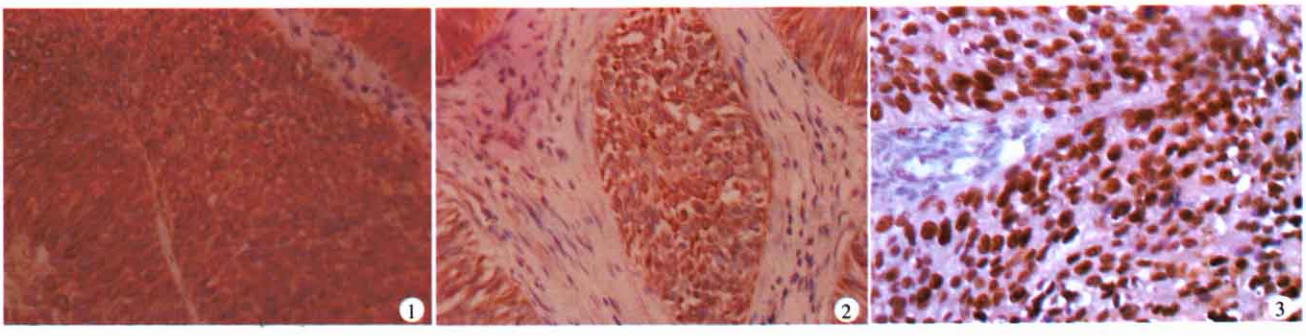


图 1　HSP70 在膀胱癌中的表达　(EnVision™ × 200)

Fig 1　Positive staining of HSP70 in bladder transitional cell carcinoma　(EnVision™ × 200)

图 2　HSP90α 在膀胱癌中的表达　(EnVision™ × 200)

Fig 2　Positive staining of HSP90α in bladder transitional cell carcinoma　(EnVision™ × 200)

图 3　PCNA 在膀胱癌中的表达　(EnVision™ × 400)

Fig 3　Positive staining of PCNA in bladder transitional cell carcinoma　(EnVision™ × 400)

2.2　HSP70、HSP90α 表达与膀胱癌病理分级和临床分期的关系

HSP70 的阳性表达率在病理分级间分别为：Ⅰ级 40%(6/15)，Ⅱ级 47.62%(10/21)，Ⅲ级 85.71%(12/14)，各病理分级之间 HSP70 阳性率有显著性差别($\chi^2 = 7.174$，$P < 0.05$)，Ⅰ级与Ⅲ级比较有显著性差别($P < 0.05$)，Ⅰ级和Ⅱ级与Ⅲ级比较有显著性差别($\chi^2 = 6.968$，$P < 0.05$)；在 T_{is} ~ T_1 期中 HSP70 阳性表达率为 40.63%(13/32)，T_2 ~ T_4 期中 HSP70 阳性表达率为 83.33%(15/18)，两组比较有非常显著性差别($\chi^2 = 8.528$，$P < 0.01$)。HSP90α 的阳性表达率在病理分级间分别为：Ⅰ级 40%(6/15)，Ⅱ级 66.67%(14/21)，Ⅲ级 92.86%(13/14)，各病理分级之间 HSP90α 阳性率有显著性差异($\chi^2 = 9.023$，$P < 0.05$)，Ⅰ级与Ⅲ级比较有显著性差别($P < 0.01$)，Ⅰ级和Ⅱ级与Ⅲ级比较有显著性差别($\chi^2 = 4.698$，$P < 0.05$)；在 T_{is} ~ T_1 期中 HSP90α 阳性表达率为 50%(16/32)，T_2 ~ T_4 期中 HSP90α 阳性表达率为 94.44%(17/18)，两组有显著性差别($\chi^2 = 10.141$，$P < 0.01$)。

2.3　膀胱癌中 HSP70，HSP90α 与 PCNA 表达的关系

结果见表 1。膀胱癌中 HSP70 的表达与 PCNA 的过度表达呈正相关($r = 0.358$，$P < 0.05$)。膀胱癌中 HSP90α 的表达与 PCNA 的过度表达也呈正相关($r = 0.312$，$P < 0.05$)。

表 1　HSP70、HSP90α 和 PCNA 在膀胱癌中表达的关系

Tab 1　Relationship of HSP70，HSP90α with PCNA expression in BTCC

PCNA	HSP70				HSP90α			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Low expression	12	4	3	1	10	6	2	2
High expression	10	3	7	10	7	9	6	8

2.4　随访

42 例获随访 5 年。其中 23 例 HSP70 表达阳性，19 例阴性表达，5 年生存率分别为 52.17%(12/23)和 89.47%(17/19)，差别有显著性意义($\chi^2 = 6.773$，$P < 0.01$)。27 例 HSP90α 表达阳性，15 例阴性表达，5 年生存率分别为 55.56%(15/27)和 93.33%

(14/15),差别有显著性意义($\chi^2 = 4.793$, $P < 0.05$)。

3 讨论

热休克蛋白是生物进化过程中高度保守的1组蛋白,广泛存在于原核和真核生物中。HSP作为"分子伴侣"(molecular chaperone),与具有不同功能的多种蛋白质在细胞中形成复合体,并通过其形成和解离而参与有关蛋白的折叠、亚基的组成、细胞内运输及降解等过程,从而调节靶蛋白的活性和功能,但又不参与靶蛋白的组成[1]。研究表明HSP在细胞周期调节、DNA损伤的控制、基因产物的代谢和癌变方面起着重要的作用[2]。HSP能与多种抑癌基因、癌基因产物结合,增强了肿瘤细胞抗凋亡能力,导致细胞增殖。如HSP70、HSP90与突变型P53蛋白稳定结构密切相关[3,4]。HSP70、HSP90在转录后水平选择性地与突变型P53蛋白结合,导致突变型P53复合体的积聚,半衰期延长,抑制细胞凋亡,促使肿瘤形成。HSP70可通过抑制细胞色素C的释放阻止一氧化氮诱导的巨噬细胞凋亡,也可以通过增加多形核白细胞的氧化活性抑制细胞凋亡[5,6]。酪氨酸激酶抑制剂格尔德霉素(GA)能通过破坏HSP90与$pp60^{v\text{-}src}$复合物的形成而使肿瘤细胞逆转。经HSP70、HSP90反义DNA处理的肿瘤细胞不仅表现生长抑制,而且诱导该细胞凋亡。由此,提示HSP70、HSP90作为一种重要的基因产物参与了恶性肿瘤细胞增殖的转录调控过程,两者在肿瘤细胞生长过程中发挥重要作用。

根据HSP90是否含有丰富的谷氨酰胺片段而分为HSP90α和HSP90β两类,两者同源性高达84%。在病毒转化和化学诱导的肿瘤细胞中,HSP90α表达水平明显升高,而HSP90β基本不变。有学者报道在胰腺癌中,HSP90α呈选择性高表达,HSP90β为组成型表达。本结果研究表明HSP70、HSP90α在正常膀胱组织中有阳性表达,阳性表达率分别为14.29%、21.43%,但在膀胱癌组织中表达明显增强,阳性表达率为56%,66%。提示膀胱癌是HSP70、HSP90α高表达肿瘤。HSP70、HSP90α在膀胱癌中的高表达一方面介导错配蛋白的降解,协调肿瘤细胞蛋白的快速代谢平衡,另一方面介导癌基因与抑癌基因产物的构象成熟、跨膜转运,通过影响增殖过程,参与了细胞周期、细胞间信号转导,使肿瘤细胞得以无限增殖。说明细胞内HSP70、HSP90α表达增加与膀胱癌的发病过程密切相关。Lebret等[7]亦指明HSP在膀胱上皮癌变中起到重要作用。

有关资料研究表明HSP的表达有助于评估许多肿瘤(如卵巢癌、乳腺癌、大肠癌等)的病理分级、临床分期和预后[8~10]。本研究结果显示,随肿瘤细胞分化程度的降低,HSP70、HSP90α阳性表达率均明显增高;浅表性膀胱癌($T_{is} \sim T_1$) HSP70、HSP90α阳性表达率显著低于浸润性膀胱癌($T_2 \sim T_4$);HSP70、HSP90α阳性表达组5年生存率显著低于阴性组,且本研究膀胱癌标本中HSP70、HSP90α的表达与PCNA的过度表达有正相关关系。因此,可以认为HSP70、HSP90α表达可以反映膀胱癌细胞分化状态及恶性程度,与肿瘤浸润深度有关,可以作为预后一项较有价值的评估指标。Cardillo等[11]及Syrigos等[12]的实验结果同样支持本实验结论。

综上所述,膀胱癌是HSP70、HSP90α高表达肿瘤,HSP70、HSP90α与膀胱癌发生发展密切相关;检测HSP70、HSP90α在膀胱癌的表达有助于对膀胱癌恶性程度和预后的判定。

参考文献:

[1] Zhu X, Zhao X, Burkholder W F, *et al*. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK[J]. Science, 1996, 272(5268): 1606 - 1614.

[2] Yano M, Naito Z, Tanaka S, *et al*. Expression and roles of heat shock proteins in human breast cancer[J]. Jpn J Cancer Res, 1996, 87(9): 908 - 915.

[3] Jolly C, Morimoto R I. Role of the heat shock response and molecular chaperones in. oncogenesis and cell death[J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(19): 1564 - 1572.

[4] Blagosklonny M V, Toretsky J, Bohen S, *et al*. Mutant conformation of p53 translated *in vitro* or *in vivo* requires functional HSP90[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(16): 8379 - 8383.

[5] Klein S D, Brune B. Heat-shock protein 70 attenuates nitric oxide-induced apoptosis in RAW macrophages by preventing cytochrome c release[J]. Biochem J, 2002, 362(Pt 3): 635 - 641.

[6] Hashiguchi N, Ogura H, Tanaka H, *et al*. Enhanced expression of heat shock proteins in activated polymorphonuclear leukocytes in patients with sepsis[J]. J Trauma, 2001, 51(6): 1104 - 1109.

[7] Lebret T, Watson R W, Fitzpatrick J M. Heat shock proteins: their role in urological tumors[J]. J Urol, 2003, 169(1): 338 - 346.

[8] Elpek G O, Karaveli S, Simsek T, *et al*. Expression of heat-shock proteins hsp27, hsp70 and hsp90 in malignant epithelial tumour of the ovaries[J]. APMIS, 2003, 111(4): 523 - 530.

[9] Thanner F, Sutterlin M W, Kapp M, *et al*. Heat-shock protein 70 as a prognostic marker in node-negative breast cancer[J]. Anticancer Res, 2003, 23(2A): 1057 - 1062.

[10] Lazaris A C, Theodoropoulos G E, Davaris P S, *et al*. Heat shock protein 70 and HLA-DR molecules tissue expression. Prognostic implications in colorectal cancer[J]. Dis Colon Rectum, 1995, 38(7): 739 - 745.

[11] Cardillo M R, Sale P, Di Silverio F. Heat-shock protein-90, IL-6 and IL-10 in bladder cancer[J]. Anticancer Res, 2000, 20(6B): 4579 - 4583.

[12] Syrigos K N, Harrington K J, Karayiannakis A J, *et al*. Clinical significance of heat shock protein-70 expression in bladder cancer[J]. Urology, 2003, 61(3): 677 - 680.

(编辑 汪勤俭)