论著

文章编号:1000-5404(2010)06-0554-04

热休克蛋白60在子宫颈癌组织中的表达及其临床意义

冯 骏[1],王利娟[2],韩晓兵[2],王星烨[1],苟文丽[2] (710061 西安,西安交通大学医学院第一附属医院:周围血管科[1],妇产科[2])

[摘要] **目的** 研究热休克蛋白60(heat shock protein, HSP60)在子宫颈癌中的表达及意义。**方法** 应用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫印迹分析法检测子宫颈癌手术切除组织57例,正常子宫颈组织57例,观察热休克蛋白60的表达与子宫颈癌发生发展的关系。**结果** ①正常子宫颈组织HSP60 mRNA表达明显少于子宫颈癌组织($t=2.65$, $P<0.05$)。②57例子宫颈癌组织和57例正常子宫颈组织中,HSP60的表达阳性检出率分别为:82.5%、19.3%;HSP60的过表达率为57.9%、7.0%。③HSP60在子宫颈癌组织的不同分期中表达差异无显著性($P>0.05$)。④子宫颈正常组织HSP60蛋白的表达水平明显低于子宫颈癌组织($t=3.132$, $P<0.05$)。**结论** HSP60的表达与子宫颈癌组织的发生密切相关。HSP60的表达与子宫颈癌组织的不同分期无关。

[关键词] 子宫颈癌;热休克蛋白60;逆转录聚合酶链反应

[中图法分类号] R341;R737.33;R730.23 **[文献标志码]** A

Expression and clinical significance of heat shock protein 60 in cervical carcinoma

Feng Jun[1], Wang Lijuan[2], Han Xiaobing[2], Wang Xingye[1], Gou Wenli[2] ([1] Department of Peripheral Vascular Branch, [2] Department of Gynecology and Obstetrics, First Affiliated Hospital, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi Province, 710061, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of heat shock protein (HSP) 60 and analyze the significance in cervical carcinoma. **Methods** The cervical tissue samples of 57 cases of cervical cancer and 57 normal cervical tissues were collected. The expression of HSP60 were detected by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The protein expressions of HSP60 were determined by Western blot analysis. To observe the relationship between HSP60 expression and the occurrence and development of cervical cancer. **Results** HSP60 mRNA expression in normal cervical tissue was significantly lesser than that in cervical cancer tissue ($t=2.65$, $P<0.05$). The positive rate of HSP60 expression in cervical cancer and normal cervix was 82.5% and 19.3% respectively. The over-expression rate of HSP60 was 57.9% and 7.0% respectively. The difference of HSP60 expression had no significance at different stages of cervical cancer tissue ($P>0.05$). The levels of HSP60 protein expression in normal cervical tissue was significantly lower than the expression in cervical cancer tissue ($t=3.132$, $P<0.05$). **Conclusion** The expression of HSP60 is closely related to the incidence of cervical cancer, but there is no relationship with different stages of cervical cancer.

[Key words] cervical cancer; heat shock protein 60; reverse transcription polymerase chain reaction

Supported by the Tackling Project of Science and Technology Research of Shaanxi Province (2005K09-G6). Corresponding authour: Gou Wenli, Tel: 86-29-85324028, E-mail: gouwenli128@sina.com

热休克蛋白60(heat shock protein, HSP60)的高表达在各种肿瘤或癌症的研究中获得证实,如肾上腺肿瘤,人类乳腺癌,大肠癌[1],结直肠癌[2],支气管癌[3,4],卵巢癌和前列腺癌[5]。最近的研究表明,过度表达的HSP60与子宫颈癌侵袭前病变关联密切。虽然HSP60在各种生物的活动中发挥重要作用,但其确切的作用仍然报道的甚少,HSP60与宫颈癌的关系尚有待研究。在这项研究中,我们利用蛋白质组学,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫印迹分析的方法调查的HSP60在宫颈癌组织的表达及评价HSP60与宫颈癌的预后的关系。

1 资料与方法

1.1 材料

均为西安交通大学医学院第一附属医院妇科住院诊断为子宫颈癌或子宫肌瘤并因未接受过任何治疗的初诊患者,共收集了57例正常子宫颈对照患者,年龄(46.73±15.8)岁;和57

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2005K09-G6)

[通信作者] 苟文丽,电话:(029)85324028, E-mail:gouwenli128@sina.com

例子宫颈癌患者,年龄(47.69±13.6)岁。宫颈活检的标本均源于子宫颈癌或子宫肌瘤的诊断。标本由临床病理专职人员切除后,放置在液态氮-80 ℃保存。子宫颈癌的标本分类按照国际妇产科联盟(FIGO,2000)的标准进行分期[6]:Ⅰ期17例,Ⅱ期28例,Ⅲ期6例,Ⅳ期6例。子宫颈癌的标本按病理组织分类为鳞状细胞癌(SCC)46例,腺癌8例和恶性混合性苗勒氏瘤3例。所有宫颈癌标本均为患者接受放射治疗和/或化疗前取得。正常子宫颈组织来自诊断为子宫肌瘤的妇女。所有标本的使用均得到患者的知情同意。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR测定HSP60 mRNA在子宫颈癌组织、正常子宫颈组织中的表达 分别提取结子宫颈癌组织和正常子宫颈组织中总RNA,采用杨森生物科技公司的RT-PCR试剂盒对HSP60基因及管家基因β-肌动蛋白进行扩增。引物序列:上游引物为5′-AGATGGAGTGGCTGTGCTGA-3′,下游引物为5′-CATCATAACCAACTTCTGAG-3′;β-肌动蛋白基因上游引物为5′-CGGGAAATCGTGCGGAC-3′,下游引物为5′-TCGCTCCAAC-CGACTGCT-3′。反应的方法为:在94 ℃预热5 min,进入30个循环(94 ℃,30 s;58 ℃,30 s;72 ℃,30 s),最后在72 ℃延伸7 min。PCR反应结束后,用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。使用自动凝胶成像系统观察扩增条带并采集图像。由点密度定量软件分析电泳图像的条带灰度,得到子宫颈癌组织及正常子宫颈组织中HSP60与β-肌动蛋白各自比值。以HSP60与β-肌动蛋白条带密度之比作为子宫颈癌组织及正常子宫颈组织中HSP60、β-肌动蛋白基因表达的相对水平。

1.2.2 免疫组化方法 测HSP在子宫颈癌组织、正常子宫颈组织中的表达 采用扬森生物科技公司的SABC试剂盒,HSP60一抗的稀释度为1∶100。DAB显色试剂盒采用扬森生物科技公司产品。结果以细胞质出现棕黄色染色颗粒判断为阳性。计数10个高倍视野的细胞数,并取其均数为判断标准,其中阳性细胞百分比<25%为阴性(-);阳性细胞百分比25%-50%为弱阳性(+);阳性细胞百分比51%~75%为中等强度阳性(++);阳性细胞百分比>75%为强阳性(+++)。中等强度阳性和强阳性为过表达。计数5个高倍视野的阳性细胞数,阳性细胞<25%为阴性(-);阳性细胞数比例大于25%为表达;阳性细胞数比例大于51%为过表达。表达率为有阳性表达的病例占总病例数的比值,过表达率为过表达的病例占总病例的比值。

1.2.3 Westernblot测定HSP60在子宫颈癌组织及正常子宫颈组织中的表达 提取子宫颈癌组织及正常子宫颈组织中总蛋白(其中buffer的组成为50 mmol/L Tris, pH=8.0; 150 mmol/L NaCl; 1% Triton X-100; 0.5% 蛋白酶和磷酸酶抑制剂的混合物),10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将所获得的蛋白质应用硝酸纤维素膜转膜(Bucks公司,英国),用5%脱脂奶粉加1倍的非离子活性剂磷酸盐缓冲液(PBST)(1.46 mmol/L $NaH_2PO_4H_2O$; 8.05 mmol/L Na_2HPO_4; 144.72 mmol/L NaCl; 5% Tween 20)封闭,4 ℃条件下过夜。然后与兔抗人HSP60、β-肌动蛋白多克隆抗体结合(1∶1 000稀释,1 h,室温),洗涤后与辣根过氧化物酶耦联羊抗兔抗体(1∶1 000稀释,1 h,室温),洗涤后DAB显色,利用数字图像分析系统量化分析条带灰度,采用自身灰度值校正,以目的基因的条带密度与管家基因β-肌动蛋白的密度比值表示蛋白的表达水平。

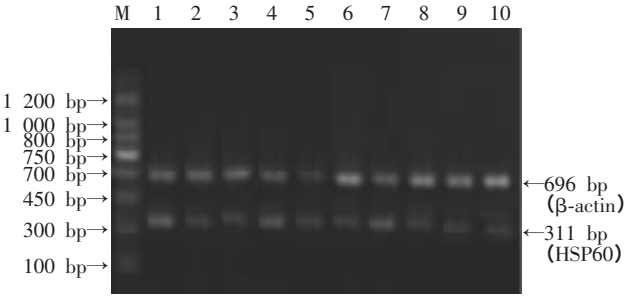
1.3 统计学方法

应用SPSS 15.0统计软件进行统计学处理。计数资料采用χ^2检验,计算出HSP60、β-肌动蛋白条带密度之比的$\bar{x}\pm s$。计量资料采用t检验。

2 结果

2.1 HSP60 mRNA表达的半定量分析

HSP60的电泳图可见在311 bp处有产物条带,图中无杂带,说明反应体系良好。目的片段被正确扩增。子宫颈癌组织及正常子宫颈组织中HSP60 mRNA的表达产物与β-肌动蛋白在电流图中的条带密度之比见图1。HSP60 mRNA表达水平在正常子宫颈组织为0.587±0.217,在子宫颈癌组织为0.869±0.234,说明正常子宫颈组织HSP60 mRNA表达明显少于子宫颈癌组织,差异具有统计学意义($t=2.65$, $P=0.018$, $P<0.05$)。

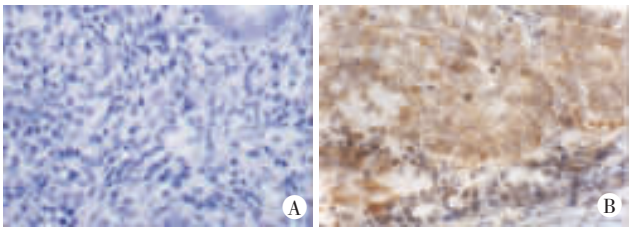


M:DL2000A DNA标准;1,3,5,7,9为正常子宫颈组织;2,4,6,8,10为子宫颈癌组织

图1 RT-PCR检测结子宫颈癌及正常组织中HSP60 mRNA的表达

2.2 HSP60蛋白水平的表达与组织分类、临床分级的关系

HSP60表达产物位于细胞质,呈现棕黄色染色颗粒,在子宫颈癌组织中可见其表达高于正常子宫颈组织(图2)。子宫颈癌组织中HSP60蛋白的表达明显增高,与正常子宫颈组织比较,差异有统计学意义(子宫颈癌组织为82.5%,正常子宫颈组织为19.3%,$\chi^2=14.83$, $P<0.05$);子宫颈癌组织与正常子宫颈组织之间HSP60的过表达率比较,差异亦有统计学意义(子宫颈癌组织为57.9%,正常子宫颈组织为7.0%,$\chi^2=11.78$, $P<0.05$)。



A:正常子宫颈组织(×100);B:子宫颈癌组织(×400)

图2 免疫组化观察HSP60在正常子宫颈组织与子宫颈癌组织中表达 (SABC)

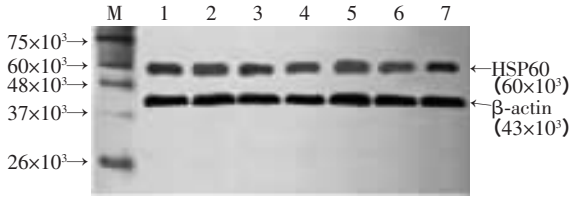
与病理类型和临床分级的关系:HSP60在子宫颈癌Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ期的表达率和过表达率差异均无统计学意义。见表1。

表1 子宫颈癌组织与正常子宫颈组织中HSP60表达水平的比较

病理分型	n	HSP60的表达水平(例)				表达率(%)	过表达率(%)
		−	+	++	+++		
Ⅰ期	17	3	4	6	4	82.4	58.8
Ⅱ期	28	5	7	10	6	82.1	57.1
Ⅲ期	6	1	1	2	2	83.3	66.7
Ⅳ期	6	1	2	1	2	83.3	50.0
正常子宫颈组织	57	46	7	2	2	19.3	7.0
子宫颈癌组织	57	10	14	19	14	82.5	57.9

2.3 Western blot 实验结果

Western blot 电泳结果 HSP60 显示 60×10^3 的棕色电泳条带,在 43×10^3 处可见内参照 β-肌动蛋白条带,大小与预期结果相同(图3)。比较发现子宫颈癌组织条带较正常子宫颈组织密度高。Western blot 电泳结果半定量分析显示:子宫颈正常组织 HSP60 蛋白的表达水平明显低于子宫颈癌组织($t=3.132$, $P<0.05$)。



M:SM0441 protein 标准; 1、3、5、7 为子宫颈癌组织; 2、4、6 为正常子宫颈组织

图3 Western blot 检测 HSP60 蛋白在子宫颈癌组织与正常子宫颈组织的表达

3 讨论

对全世界女性癌症而言,子宫颈癌发病率和致死率最高[7],并且子宫颈癌发生、发展和预后的因素尚不明确。子宫颈癌是一种病毒引起的疾病,其病情的发生、发展与人乳头状瘤病毒(HPV)[8]的 DNA 进入宿主的基因组并且破坏了 E2 基因有关。在病毒的作用下,癌基因的表达结果为 E6 和 E7。E6 和 E7 分别抑制肿瘤抑制基因,如 p53 基因与视网膜母细胞瘤,最终导致 DNA 的破坏和子宫颈癌的发生。

Hwang 等[9]采用20例子宫颈癌患者标本与20例正常组织做对照,采用 RT-PCR 与 Westernblot 的方法进行研究发现:HSP60 的过度表达与子宫颈癌的发生密切相关。本研究 RT-PCR 结果显示:正常子宫颈组织 HSP60 mRNA 表达明显少于子宫颈癌组织,差异有统计学意义($t=2.65$, $P<0.05$)。免疫组化结果表明,子宫颈癌组织中 HSP60 蛋白的表达率与过表达率均比正常子宫颈组织高($\chi^2=14.83$, $P<0.05$)。Westernblot 结果也表明了子宫颈正常组织 HSP60 蛋白的表达水平明显低于子宫颈癌组织。说明热休克蛋白60的表达模式可能与子宫颈癌的发生关系密切,与国外的研究结果一致。

线粒体参与细胞生命的各种过程,也包括细胞向肿瘤细胞的转化[10]。异常刺激可以导致线粒体超微结构的异常,引起机体代谢的紊乱、生化改变和线粒体 DNA 的突变[11]。在正常细胞中,热休克蛋白60主要定位于线粒体基质和外线粒体膜,HSP60 与线粒体病变关系紧密[12]。热休克蛋白(HSPs)按其分子量分组,如 HSP100, HSP90, HSP70, HSP60,小 HPSs 等。热休克蛋白是一种保护性蛋白,普遍存在于各个脏器,在细胞中有多种功能,如基因的规律表达,DNA 复制,信号转导,分化,凋亡和细胞衰老或存活。热休克蛋白同样保护细胞免于各种伤害,如缺血、缺氧、各种突发的温度改变。热损伤、线粒体损伤、线粒体 DNA 的破坏都可以诱导热休克蛋白60的分泌增加。人类热休克蛋白60通过 HSP60/HSP10 和线粒体内的 pro-caspase-3 的相互作用而导致热休克蛋白60释放进入细胞质,触发细胞凋亡。一般认为,DNA 损伤诱导细胞周期停滞、细胞凋亡、或 DNA 突变导致癌症,包括蛋白的表达水平的变化[9]。Cappello[1,13],张文利等[14]研究发现 HSP 家族在结直肠癌组织中的表达明显增高,Castle[15]和 Kim 等[16]采用免疫组化的方法研究子宫颈癌的癌前病变和正常组织,证明在癌前病变组织中 HSP 的表达也是明显增高,本研究结果表明无论在 mRNA 水平还是在蛋白质水平子宫颈癌 HSP60 的表达均明显增高,说明 HSP60 在肿瘤的发生中有着重要的意义。在本研究中,我们比较热休克蛋白基因在宫颈癌和宫颈正常组织的蛋白表达水平,证明热休克蛋白60参与了宫颈癌的发生、发展过程。

总之,我们在正常宫颈组织和宫颈癌组织比较了热休克蛋白60 mRNA 水平、蛋白表达,并确认热休克蛋白60在宫颈癌组织过度表达。结果表明,热休克蛋白60参与了宫颈癌的发生过程。由于对涉及癌症发生、发展机制的热休克蛋白60的表达调控仍不清楚,仍需要更多的研究以澄清热休克蛋白60和子宫颈癌发展之间的关系。

参考文献:

[1] Cappello F, Bellafiore M, Palma A, *et al*. 60KDa chaperonin (HSP60) is over-expressed during colorectal carcinogenesis[J]. Eur J Histochem 2003, 47(2): 105 – 110.

[2] 王祥峰, 张连阳, 何渝军, 等. 结直癌患者血清及粪便中热休克蛋白60检测的临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(13): 1334 – 1336.

[3] Cappello F, Di-Stefano A, D'Anna S E, *et al*. Immunopositivity of heat shock protein 60 as a biomarker of bronchial carcinogenesis[J]. Lancet Oncol, 2005, 6(10): 816.

[4] Cappello F, Di-Stefano A, David S, *et al*. Hsp60 and Hsp10 down-regulation predicts bronchial epithelial carcinogenesis in smokers with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Cancer, 2006, 107(10):

2417－2424.
[5] Cappello F, Rappa F, David S, *et al*. Immunohistochemical evaluation of PCNA, p53, HSP60, HSP10 and MUC-2 presence and expression in prostate carcinogenesis[J]. Anticancer Res, 2003, 23(2B): 1325－1331.
[6] 卿毅, 王东, 雷新, 等. APE1在宫颈癌的表达及其与铜-252中子放疗预后的关系. 四川大学学报:医学版, 2009, 40(1): 123－128.
[7] Charvet I, Meda P, Genet M, *et al*. Optical diagnosis of cervical dysplasia[J]. Bull Cancer, 2004, 91(1): 45－53.
[8] Munoz N, Bosch F X, de-Sanjose S, *et al*. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer[J]. N Engl J Med, 2003, 348(6): 518－527.
[9] Hwang Y J, Lee S P, Kim S Y, *et al*. Expression of heat shock protein 60 kDa is upregulated in cervical cancer[J]. Yonsei Med J, 2009, 50(3): 399－406.
[10] Czarnecka A M, Campanella C, Zummo G, *et al*. Mitochondrial chaperones in cancer: from molecular biology to clinical diagnostics [J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(7): 714－720.
[11] Eng C, Kiuru M, Fernandez M J, *et al*. A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(3): 193－202.
[12] Hansen J J, Bross P, Westergaard M, *et al*. Genomic structure of the human mitochondrial chaperonin genes: HSP60 and HSP10 are localised head to head on chromosome 2 separated by a bidirectional promoter[J]. Hum Genet, 2003, 112(1): 71－77.
[13] Cappello F, David S, Rappa F, *et al*. The expression of HSP60 and HSP10 in large bowel carcinomas with lymph node metastase[J]. BMC Cancer, 2005, 5: 139.
[14] 张文利, 高雪芹, 韩金祥, 等. HSP60、HSP70、HSP90α在结直肠癌组织中的表达及其与病理组织学分级的关系[J]. 癌症, 2009, 28(6): 612－618.
[15] Castle P E, Ashfaq R, Ansari F, *et al*. Immunohistochemical evaluation of heat shock proteins in normal and preinvasive lesions of the cervix[J]. Cancer Lett, 2005, 229(2): 245－252.
[16] Kim J Y, Shin H J, Kim T H, *et al*. Tumor-associated carbonic anhydrases are linked to metastases in primary cervical cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2006, 132(5): 302－308.

(**收稿**:2009-09-23;**修回**:2009-12-06)
(编辑 邓强庭)

文章编号:1000-5404(2010)06-0557-01

个案与短篇

早期腰大池持续引流联合侧脑室枕角穿刺尿激酶灌注治疗脑室出血

徐全华[1],沈光建[2] (551700 贵州 毕节,贵州省毕节地区医院神经外科[1];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经外科[2])

[关键词] 脑室出血;侧脑室枕角穿刺;腰大池引流术
[中图法分类号] R743.34 **[文献标志码]** B

我院自2005年2月至2009年5月运用早期腰大池持续引流联合侧脑室枕角穿刺尿激酶灌注治疗脑室出血共26例,取得满意疗效,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

男性18例,女性8例,年龄14～72岁,平均43岁,病程2 h至2 d,平均1.5 d,所有患者入院查体均伴有不同程度的意识障碍,GCS评分13～15分4例,9～12分8例,6～8分9例,3～5分5例,并发癫痫1例,高热2例,去脑强直3例。根据病史及头颅CT均诊断定为自发性脑室出血,其中高血压脑出血23例,脑动静脉畸形出血2例,原因不明1例,脑室铸形出血16例,侧脑室后角出血10例,均伴四脑室出血,8例并发梗阻性脑积水。

1.2 治疗方法

患者入院后立即术前准备,于局麻下行腰大池持续引流联合侧脑室枕角穿刺术。选择$L_{3\sim4}$或$L_{2\sim3}$间隙穿刺置管,向椎管内腰骶方向置入硬膜外麻醉管5～6 cm,见血性脑脊液流出即接无菌引流袋后,立即关闭引流管(以免脑脊液快速流出导致脑疝),并用长宽胶布从穿刺点到颈部沿脊柱方向固定于背部。再行侧脑室枕角穿刺:患者取仰卧位头偏向一侧,常规消毒铺巾,以枕外粗隆上5～6 cm,中线旁开3 cm处为定位穿刺点,2%利多卡因5 ml局麻,切开头皮达颅骨并钻孔1个,电凝并切开硬膜后予脑室引流管1根置入患侧脑室约5～6 cm,即见血性脑脊液流出,固定引流管,外接脑室引流器。返回病房后取仰卧位,将脑室外引流器放置于距穿刺点上方10～15 cm后开放脑室外引流管,让脑脊液均匀缓慢流出以防脑脊液流出过快致颅压骤降引起再发出血。待颅内压降至安全水平(150～200 mmH_2O)后,即可开放腰大池引流管。脑室外引流管应抬高10～15 cm,腰大池引流袋早期固定于腋中线水平0～5 cm,5～7 d后可调至腋中线5～10 cm。引流量约为每天200～500 ml。复查头颅CT,予尿激酶(2～5)×10^4 U+生理盐水5 ml,从脑室引流管内缓慢推入,夹闭引流管1～2 h后开放,每日1～2次,根据复查头颅CT的结果重复使用等剂量尿激酶灌注后夹管,至引流液色变淡或CT扫描复查脑室内血肿大部分或基本消失后试夹管24～48 h,临床症状无变化后拔除脑室引流管,一般5～7 d即可拔除,本组病例几乎无堵管,2例患者堵管,临时用生理盐水5 ml加尿激酶(1～3)×10^4 U冲洗后即通畅。腰大池引流管持续开放,根据引流情况可每日行1～2次等量生理盐水注入,一是置换血性脑脊液,二也能防止堵管,待引流液变清或复查CT血肿基本消失后一般7～12 d即可拔除。

2 结果

本组26例患者中存活24例,死亡2例,1例43岁男性患者出血原因不明死于早期脑疝,1例14岁女性脑动静脉畸形患者引流过程中死于颅内感染。其他患者5～12 d后脑脊液明显变清,1例脑积水患者经行V－P术后恢复良好。

[通信作者] 徐全华,电话:(0857)8294092,E-mail:xuquanhua9099@163.com

(下转562页)