论著

文章编号:1000-5404(2012)04-0294-04

Hsp70-2及14-3-3zeta在膀胱尿路上皮癌中的表达及临床意义

郭 毅,唐 伟,罗华铭,何 犇 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院泌尿外科)

[摘要] **目的** 检测 Heat shock protein 70-2(Hsp70-2)及14-3-3zeta在膀胱尿路上皮癌(bladder urothelial carcinoma, BUC)组织中的表达,探讨两者在肿瘤发展中的作用及临床意义。**方法** 收集人膀胱尿路上皮癌标本48例,膀胱尿路上皮癌旁组织标本20例,利用免疫组织化学S-P法、Western blot和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测Hsp70-2、14-3-3zeta在蛋白水平和mRNA水平的表达,分析两者与膀胱尿路上皮癌的病理分级、临床分期等因素间的关系。**结果** 3种检测方法均显示Hsp70-2、14-3-3zeta在癌旁组织中低表达,在膀胱尿路上皮癌组织中高表达,其表达量随病理分级程度及浸润深度增高而增高,组间比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。Hsp70-2与14-3-3zeta蛋白在膀胱尿路上皮癌中的表达均增高,两者呈正相关($r=0.516$, $P<0.05$)。**结论** Hsp70-2与14-3-3zeta在膀胱尿路上皮癌组织中高表达,与病理分级,临床分期呈正相关,且两者之间也呈正相关,提示两者在肿瘤发生、发展过程中起重要作用。

[关键词] 膀胱肿瘤;HSP70热休克蛋白质类;14-3-3蛋白质类

[中图法分类号] R394.3;R737.14;R730.23 [文献标志码] A

Over-expression and clinical significance of Hsp70-2 and 14-3-3zeta in bladder urothelial carcinoma

Guo Yi, Tang Wei, Luo Huaming, He Ben (Department of Urology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To identify the expression of heat shock protein 70-2 (Hsp70-2) and 14-3-3 zeta in bladder urothelial carcinoma (BUC) and analyze their clinical significances. **Methods** The expression of Hsp70-2 and 14-3-3zeta was detected in 48 specimens with pathological identified BUC collected in our department from March 2010 to July 2011, and 20 paracancerous tissues collected in the same period by immunohistochemistry (IHC), Western blotting and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), The results were analyzed with their clinical pathological parameters. **Results** The results indicated that Hsp70-2 and 14-3-3 zeta were mildly or moderately expressed in paracancerous tissues, but highly expressed in BUC specimens ($P<0.05$). The expression levels were positively related with pathological grades and invasion depths ($P<0.05$). Positive relation was found in the expression of Hsp70-2 and 14-3-3 zeta in paracancerous urothelial tissues ($r=0.516$, $P<0.05$). **Conclusion** Hsp70-2 and 14-3-3zeta are over-expressed in BUC, which have positive correlation with pathological grades and clinical stage. Their expression is positively correlated, suggesting that they may play important roles in tumorigenesis and progression.

[**Key words**] bladder neoplasms; HSP70, heat-shock proteins; 14-3-3 proteins

Corresponding author: Tang Wei, Tel: 86-23-89011122, E-mail: tangwei2060@yahoo.com.cn

膀胱癌是泌尿系最为常见的肿瘤,其中90%以上为尿路上皮癌,具有高复发率及死亡率的特点,癌组织的生长、扩散、浸润、转移都会涉及不同基因的表达,但其具体机制目前仍不十分清楚。研究[1-2]表明Hsp70-2在睾丸生精细胞中特异高度表达,介导精原细胞联合丝复合体的退化,对精子的形成起重要作用。Hsp70-2在其他正常组织中低表达甚至不表达,这一特性为其成为肿瘤标志物奠定基础[3]。Daugaard等[4]发现Hsp70-2作用于细胞周期G_1期,其缺失可导致细胞周

[通信作者] 唐 伟,电话:(023)89011122,E-mail: tangwei2060@yahoo.com.cn

期停滞,说明 Hsp70-2 在肿瘤细胞的形成过程中发挥重要作用,对细胞凋亡具有抑制作用。14-3-3zeta 是14-3-3 蛋白家族亚型之一,以二聚体形式作用于含特定 motifs 结构的蛋白,与其形成磷酸丝氨酸/磷酸苏氨酸连接基团,从而参与多种细胞信号通路的调节,影响细胞凋亡并调控细胞周期和细胞间黏附作用[5]。目前研究[6]表明,Hsp70-2 在膀胱癌中高表达,但 14-3-3zeta 在膀胱癌中的表达情况尚不清楚。本研究采用免疫组化、RT-PCR 和 Western blot 方法,检测 Hsp70-2 和 14-3-3zeta 在膀胱尿路上皮癌中的表达,探讨两者与肿瘤发生发展、浸润转移之间的关系,以及两者的相关性,旨在为膀胱癌的诊断治疗提供更为有效的判断指标。

1 资料与方法

1.1 临床资料

2010 年 3 月至 2011 年 7 月本科手术行全膀胱切除术尿路上皮癌病例 48 例,男性 39 例,女性 9 例,年龄 42 ~ 85(65.4 ± 9.5)岁,经病理检测证实为膀胱尿路上皮癌。病理分级根据世界卫生组织(WHO)2004 年分类标准:低级别组 21 例、高级别组 27 例。根据国际抗癌协会(UICC)TNM 分期:$T_{is\sim1}$ 29 例、$T_{2\sim4}$ 19 例。20 例对照标本取自膀胱癌旁组织。标本获取得到患者知情同意。

1.2 主要试剂

兔抗人 Hsp70-2 单克隆抗体(美国 Epitomics 公司),兔抗人 14-3-3zeta 多克隆抗体(美国 Assaybiotech 公司),山羊抗兔和抗鼠的二抗(北京中杉金桥生物工程公司),山羊抗兔免疫组化染色试剂盒(北京博奥森生物工程公司)。RNAiso Plus 总 RNA 提取剂 Trizol、逆转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit、PCRMIX、DL1000 DNA Marker 购自大连宝生物工程有限公司(TaKaRa 公司)。RIPA 裂解液、鼠抗人 β-actin 抗体、ECL 显影剂均购自碧云天生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学法检测 Hsp70-2、14-3-3zeta 蛋白的表达

组织标本经 10% 甲醛固定、石蜡包埋和 4 μm 连续切片,一抗工作液均以 1∶100 稀释,免疫组化采用 S-P 法,严格按照试剂盒说明进行,微波枸橼酸盐抗原修复,DAB 显色。每组实验均设置有阴性对照及阳性对照。Hsp70-2 及 14-3-3zeta 在光镜下以细胞质及细胞核出现棕黄色着色为阳性细胞,细胞质及细胞核无着色为阴性细胞。在 10 × 40 倍显微镜下保持相同光强度、数码相机关掉自动白平衡等功能、全部用手动设置等条件下拍照,运用 Image-Pro Plus 6.0(IPP)软件分析测量平均光密度(MOD),取 5 个视野的 MOD 均值做定量分析比较。

1.3.2 RT-PCR 检测组织 Hsp70-2 及 14-3-3zeta 两者 mRNA 水平

总 RNA 提取后,选取合格的 mRNA 作为模板进行反转录反应,RT-PCR 反转录条件严格按照 TaKaRa 说明书操作。引物序列均为上海生工合成,Hsp70-2 上游:5′-CATCAAGAGGAACACCACGAT-3′下游:5′-CTTGCTCAGACGACCTTTGTC-3′,扩增产物为 298 bp。14-3-3zeta 上游:5′-ATGTTGTAGGAGCCCGTAGGT-3′,下游:5′-TGCTTGTTGTGACTGATCGAC-3′,扩增产物为 296 bp。β-actin 上游:5′-CTGGGACGACATGGAGAAAA-3′,下游:5′-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3′,扩增产物为 564 bp。Hsp70-2、14-3-3zeta 及 β-actin 三者反应体系均为 94 ℃预变性 5 min,变性 94 ℃ 30 s、退火 59 ℃ 30 s、延伸 72 ℃ 40 s,35 个循环后 72 ℃ 7 min. 扩增产物经凝胶电泳后,在 Bio-Rad 凝胶成像分析系统上观察并拍照,并采用 Quantity One 软件进行图像分析。分别以 Hsp70-2 或 14-3-3zeta 扩增条带的灰度值/β-actin 灰度值作为目的基因 mRNA 相对表达量。

1.3.3 Western blot 检测组织 Hsp70-2 及 14-3-3zeta 蛋白水平

严格按照操作说明书采用 RIPA 裂解液抽提组织蛋白,用 BCA 法检测蛋白浓度。提取的总蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后,250 mA 恒流湿转 90 min 将蛋白由凝胶转到 PVDF 膜上,经 5% 的脱脂奶粉封闭 1.5 h,一抗工作液 4 ℃孵育过夜(Hsp70-2 稀释比例 1∶4 000,14-3-3zeta 及 β-actin 稀释比例 1∶1 000),TBST 洗涤后,加入 1∶4 000 稀释的二抗溶液,室温 1.5 h;洗涤后 ECL 化学发光,显影,定影,采用 Quantity One 软件分析条带的灰度值。

1.4 统计学分析

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 统计软件,免疫组化、RT-PCR 及 Western blot 结果均采用独立样本的 t 检验,相关性分析采用 Spearman 检验。

2 结果

2.1 Hsp70-2 蛋白与 14-3-3zeta 蛋白在膀胱尿路上皮癌及癌旁组织的表达

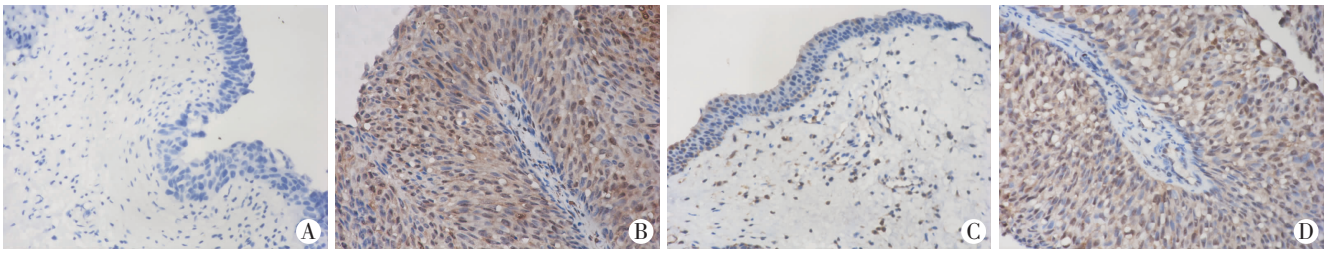
Hsp70-2 蛋白和 14-3-3zeta 蛋白阳性染色颗粒呈棕黄色,位于细胞质及细胞核。癌旁组织组呈低表达,肿瘤组呈高表达,两者 MOD 值行 t 检验,差异有统计学意义($P < 0.01$)。Hsp70-2 蛋白和 14-3-3zeta 蛋白在肿瘤低级别组/高级别组、非浸润($T_{is\sim1}$)组/浸润组($T_{2\sim4}$)中两者间均有显著差异($P < 0.05$,表 1,图 1)。Hsp70-2 和 14-3-3zeta 的相关性分析结果表明在本实验中两者在膀胱尿路上皮癌中的表达呈正相关($r = 0.516$,$P < 0.05$)。

2.2 Hsp70-2 与 14-3-3zeta mRNA 在膀胱尿路上皮癌及癌旁组织中的表达

RT-PCR 检测 Hsp70-2 mRNA 和 14-3-3zeta mRNA 在膀胱尿路上皮癌组织中的光密度值明显高于癌旁组织($P < 0.05$),且在膀胱尿路上皮癌组织低级别组与高级别组、非浸润组($T_{is\sim1}$)与浸润组($T_{2\sim4}$)中的表达水平呈明显升高趋势,组间比较差异有显著性($P < 0.05$,表 1,图 2)。

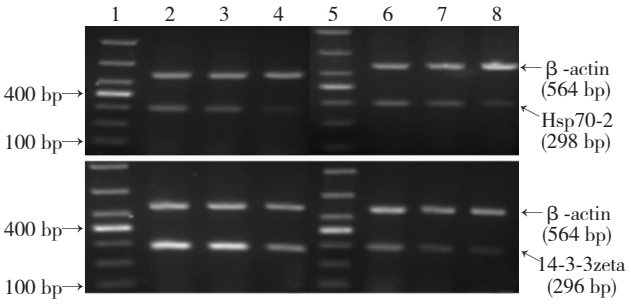
表1 免疫组化、RT-PCR及Western blot分析Hsp70-2与14-3-3zeta在膀胱尿路上皮癌组织中表达（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	Hsp70-2						14-3-3zeta					
		IHC	P值	RT-PCR	P值	Western blot	P值	IHC	P值	RT-PCR	P值	Western blot	P值
癌旁对照组	20	13.16±11.15	0.000	0.22±0.15	0.000	1.11±0.95	0.012	7.68±5.55	0.000	0.66±0.43	0.003	0.24±0.30	0.000
肿瘤组	48	37.83±20.13		0.54±0.36		1.81±1.13		58.90±15.69		1.04±0.53		1.47±1.25	
病理分级													
低级别组	21	29.62±12.61	0.011	0.42±0.29	0.026	1.42±0.79	0.036	52.12±11.28	0.007	0.86±0.39	0.027	1.04±0.82	0.034
高级别组	27	44.21±22.66		0.64±0.38		2.11±1.28		64.18±16.77		1.18±0.58		1.81±1.43	
临床分期													
（$T_{is\sim1}$）组	29	29.36±12.51	0.000	0.44±0.26	0.016	1.49±0.71	0.016	54.97±12.83	0.030	0.90±0.43	0.039	1.12±0.72	0.012
（$T_{2\sim4}$）组	19	50.75±22.87		0.70±0.44		2.29±1.47		64.91±18.00		1.24±0.60		2.02±1.66	



A：Hsp70-2在癌旁组织中表达；B：Hsp70-2在膀胱尿路上皮癌中表达；C：14-3-3zeta在癌旁组织中表达；D：14-3-3zeta在膀胱尿路上皮癌中表达

图1 免疫组化观察各组Hsp70-2与14-3-3zeta在膀胱尿路上皮癌中的表达（S-P × 400）

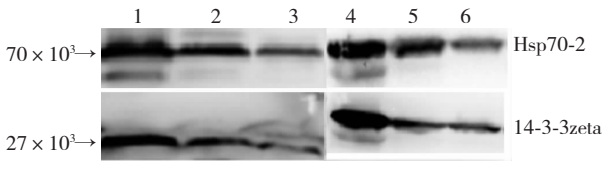


1、5：标准；2：高级别组；3：低级别组；4、8：癌旁对照组；6：浸润组；7：非浸润组

图2 RT-PCR检测各组Hsp70-2、14-3-3zeta mRNA的表达

2.3 Western blot检测Hsp70-2与14-3-3zeta蛋白在膀胱尿路上皮癌及癌旁组织的表达

Western blot检测Hsp70-2蛋白和14-3-3zeta蛋白分别在70×10^3和27×10^3处出现条带，在癌旁对照组其蛋白表达均明显低于肿瘤组（$P < 0.05$）。在低级别组/高级别组，非浸润组（$T_{is\sim1}$）/浸润组（$T_{2\sim4}$）组中其表达率随病理分级程度及浸润深度增高而增高，且差异有显著（$P < 0.05$），与免疫组化及RT-PCR结果一致。见表1，图3。



1：高级别组；2：低级别组；3、6：癌旁对照组；4：浸润组；5：非浸润组

图3 Western blot检测各组Hsp70-2、14-3-3zeta蛋白的表达

3 讨论

热休克蛋白（heat shock protein，Hsp）是一大类进化上高度保守的蛋白质，其中Hsp70是细胞内含量最多的热休克蛋白类家族[7]，除了分子伴侣功能外，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[8-10]。Hsp70-2是Hsp70的成员之一，在睾丸生精细胞中特异高度表达，对精子的生成起重要作用[1-2]。Hsp70-2在乳腺癌[3]、宫颈癌[11]、膀胱癌[6]等多种恶性肿瘤中高表达，且与肿瘤生长、转移、浸润程度呈正相关。Daugaard等[4]通过敲除Hsp70-2，发现细胞停滞于G_1期，且细胞形态发生衰老凋亡样改变。也有报道表明Hsp70-2可影响溶酶体膜的稳定性，其缺失可发生Cathepsin依赖的细胞凋亡及Bcl-2抵抗的细胞凋亡[12]。这些实验均说明Hsp70-2在肿瘤的形成过程中扮演重要角色。本研究发现，在膀胱尿路上皮癌组织中Hsp70-2表达较癌旁组织明显增高，且与病理分级和临床分期有关，与文献[6]报道结论一致，由此可证实Hsp70-2的过表达在膀胱尿路上皮癌的发生、发展及浸润转移中起着重要作用。

14-3-3蛋白家族是一类保守的磷酸丝氨酸/磷酸苏氨酸连接蛋白，人类有7个亚型（β、ε、γ、η、σ、τ、ζ）。有研究报道14-3-3zeta蛋白可激活P13K/Akt通

路,使 MDM2 磷酸化,致 p53 在蛋白水平发生降解,抑制 p53 诱导的细胞凋亡,从而促进肿瘤的发生[13]。14-3-3zeta 蛋白还可作用于细胞分裂周期蛋白 Cde25,调控细胞周期,也能抑制 T/E/Y-cadhefin 等细胞黏附分子的表达,促进肿瘤细胞的浸润和转移[14]。14-3-3zeta 在多种恶性肿瘤中特异表达,如乳腺癌[13]、胃癌[15]、肺癌[16]、肝癌[17]等,现少见有关 14-3-3zeta 在膀胱癌中表达的报道。本实验表明:在基因水平和蛋白水平,14-3-3zeta 在膀胱尿路上皮癌中表达明显增高,且其表达与肿瘤细胞分化、侵润程度呈正相关,而癌旁对照组中呈低表达,说明 14-3-3zeta 在膀胱尿路上皮癌的发生、发展过程中起作用。本实验还发现,14-3-3zeta 在膀胱尿路上皮癌低级别组及非侵润组中的表达远高于对照癌旁组,说明在膀胱癌的早期 14-3-3zeta 就已经发生作用,使其可以成为我们早期诊断膀胱尿路上皮癌的标志物。

Rohde 等[3]研究发现:在 HeLa 细胞中转染 Hsp70-2 siRNA 48 h 后与转染 Hsp70-2siRNA 错配组相比较,可发现 14-3-3zeta 表达明显受到抑制(-5.8 倍),说明 Hsp70-2 正向调控 14-3-3zeta。本研究结果显示:Hsp70-2 与 14-3-3zeta 在膀胱尿路上皮癌中高表达,通过 Spearman 相关性分析提示两者呈正相关。当有害应激 Hsp70 增高时抑制 JNK 激活,使 14-3-3zeta(Ser184A)发生磷酸化受到阻碍,Bax 不与 14-3-3zeta 解离,抑制 Bax 向线粒体转移以减弱线粒体膜通透性,从而保护线粒体内凋亡起始因子,抑制其释放[10]。推测 Hsp70-2 和 14-3-3zeta 也是通过 JNK 相互起作用,但具体机制还有待研究。

综上所述,Hsp70-2 与 14-3-3zeta 在膀胱尿路上皮癌中高表达,其表达量与肿瘤细胞分化、侵润程度呈正相关,且 Hsp70-2 正向调控 14-3-3zeta。故 Hsp70-2 与 14-3-3zeta 两者在膀胱尿路上皮癌发生、发展过程中起重要作用,可成为肿瘤早期诊断、判断预后的新指标,为肿瘤的药物靶向治疗提供新途径。

参考文献:

[1] Feng H L, Sandlow J I, Sparks A E. Decreased expression of the heat shock protein hsp70-2 is associated with the pathogenesis of male infertility[J]. Fertil Steril, 2001, 76(6): 1136-1139.

[2] Zhu D, Dix D J, Eddy E M. HSP70-2 is required for CDC2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes[J]. Development, 1997, 124(15): 3007-3014.

[3] Rohde M, Daugaard M, Jensen M H, *et al*. Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms [J]. Genes Dev, 2005, 19(5): 570-582.

[4] Daugaard M, Jaattela M, Rohde M. Hsp70-2 is required for tumor cell growth and survival[J]. Cell Cycle, 2005, 4(7): 877-800.

[5] Aitken A. 14-3-3 proteins: A historic overview[J]. Semin Cancer Biol, 2006, 16(3): 162-172.

[6] Garg M, Kanojia D, Seth A, *et al*. Heat-shock protein 70-2 (HSP70-2) expression in bladder urothelial carcinoma is associated with tumour progression and promotes migration and invasion[J]. Eur J Cancer, 2010, 46(1): 207-215.

[7] Sarto C, Binz P A, Mocarelli P. Heat shock proteins in human cancer [J]. Electrophoresis, 2000, 21(6): 1218-1226.

[8] Mosser D D, Caron A W, Bourget L, *et al*. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis[J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(9): 5317-5327.

[9] Gabai V L, Meriin A B, Mosser D D, *et al*. Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance[J]. J Biol Chem, 1997, 272(29): 18033-18037.

[10] Stankiewicz A R, Lachapelle G, Foo C P, *et al*. HSP70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation[J]. J Biol Chem, 2005, 280(46): 38729-38739.

[11] Garg M, Kanojia D, Saini S, *et al*. Germ cell-specific heat shock protein 70-2 is expressed in cervical carcinoma and is involved in the growth, migration, and invasion of cervical cells[J]. Cancer, 2010, 116(16): 3785-3796.

[12] Daugaard M, Kirkegaard-Sorensen T, Ostenfeld M S, *et al*. Lens epithelium-derived growth factor is an Hsp70-2 regulated guardian of lysosomal stability in human cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67(6): 2559-2567.

[13] Danes C G, Wyszomierski S L, Lu J, *et al*. 14-3-3 zeta down-regulates p53 in mammary epithelial cells and confers luminal filling [J]. Cancer Res, 2008, 68(6): 1760-1767.

[14] Niemantsverdriet M, Wagner K, Visser M, *et al*. Cellular functions of 14-3-3 zeta in apoptosis and cell adhesion emphasize its oncogenic character[J]. Oncogene, 2008, 27(9): 1315-1319.

[15] Jang J S, Cho H Y, Lee Y J, *et al*. The differential proteome profile of stomach cancer: identification of the biomarker candidates[J]. Oncol Res, 2004, 14(10): 491-499.

[16] Fan T, Li R, Todd N W, *et al*. Up-regulation of 14-3-3zeta in lung cancer and its implication as prognostic and therapeutic target[J]. Cancer Res, 2007, 67(16): 7901-7906.

[17] Choi J E, Hur W, Jung C K, *et al*. Silencing of 14-3-3ζ over-expression in hepatocellular carcinoma inhibits tumor growth and enhances chemosensitivity to cis-diammined dichloridoplatium [J]. Cancer Lett, 2011, 303(2): 99-107.

(**收稿**:2011-10-16;**修回**:2011-11-28)

(编辑 龙 亮)