DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.16.025
第26卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 16
2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

文章编号:1000-5404(2004)16-1485-03

论著

胃癌组织中 gp96 和增殖细胞核抗原的表达及其临床意义

赵永亮,余佩武,蔡志民,雷 晓,吴 淼,饶 芸,周立新 (第三军医大学西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨 gp96 在胃癌组织中的表达及其在胃癌发生、发展中的作用。方法 采用免疫组化及原位杂交技术检测 50 例人胃癌及其癌旁正常组织 gp96 的表达,免疫组化检测增殖细胞核抗原(PCNA)的表达。结果 gp96 在癌旁正常组织中存在较低的表达,在胃癌组织中表达比癌旁正常组织显著增高($P<0.01$);而且表达高低与胃癌的临床分期、分化程度及有无淋巴结转移有显著差异($P<0.05$);PCNA 的表达与 gp96 的表达相关,PCNA 表达高者 gp96 的表达也增高,二者呈显著正相关($r=0.744$, $P=0.021$, $P<0.05$)。结论 gp96、PCNA 在胃癌组织中的表达密切相关,可能在胃癌的发生、发展中起重要作用。

关键词:gp96;增殖细胞核抗原;免疫组化;原位杂交;胃癌
中图法分类号:R392.12;R730.23;R735.2 文献标识码:A

Expressions of gp96 and PCNA in human gastric cancer tissues and the clinical significance

ZHAO Yong-liang, YU Pei-wu, CAI Zhi-min, LEI Xiao, WU Miao, RAO Yun, ZHOU Li-xin (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of gp96 and its roles in the genesis and progression in human gastric cancer. Methods The gp96 expression in gastric cancer tissues and the tumor-adjacent tissues in 50 patients with gastric cancer was detected by SABC immunohistochemical method and *in situ* hybridization. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was also detected by immunohistochemical. Results Low level of gp96 expression was found in the tumor-adjacent tissues, but it increased significantly in human gastric cancer tissues ($P<0.05$). The expression of gp96 was significantly associated with the clinical stage, differentiation, and metastasis of gastric cancer. PCNA expression was positively correlated with pg96 expression ($P<0.05$). Conclusion The expression of gp96 is closely associated with PCNA expression in human gastric cancer tissues, suggesting that they might play an important role in the genesis and progression of human gastric cancer.

Key words: gp96; PCNA; immunohistochemistry; *in situ* hybridization; gastric cancer

胃癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一,其预后较差。新近的研究表明,肿瘤的发生不仅与细胞的增殖有关,而且与热休克蛋白在肿瘤组织的表达有关。gp96 是热休克蛋白(heat shock protein, HSPs)家族成员之一,它在肿瘤发生发展及肿瘤免疫治疗中的作用成为近年来研究的热点[1]。作者对 50 例胃癌组织及癌旁正常组织中 gp96 和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达进行了研究,旨在探讨 gp96 在胃癌发生、发展中的作用和对预后的提示意义。现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

收集我院 2002 年 2 月至 2002 年 10 月行外科手术切除的 50 例新鲜胃癌标本,以及同一患者距肿瘤约 3~5 cm 的癌旁正常组织。患者年龄 28~79 岁,中位年龄 58 岁,其中男性 31 例,女性 19 例。经病理学证实,高分化腺癌 7 例,中分化腺癌 24 例,低分化腺癌 19 例。按照国际抗癌联盟(UICC)TNM 分期标准,Ⅰ期 6 例,Ⅱ期 18 例,Ⅲ期 19 例,Ⅳ期 7 例。全部标本均分为两部分:一部分用 10%福尔马林固定和常规石蜡包埋,行免疫组化检测;另一部分制备冰冻切片,进行原位杂交检测。冰冻切片制备:新鲜配制并过滤固定液(DEPC 处理的 PBS,含 4%多聚甲醛,pH 7.5),将切下的组织置固定液中,于 4 ℃浸泡 2 h,然后置于蔗糖溶液(DEPC 处理的 PBS,含 30%蔗糖)中浸泡过夜,直至组织沉到容器底部;将组织贮存在-80 ℃;进行切片

作者简介:赵永亮(1969-),男,山东省泰安县人,博士研究生,主治医师,主要从事胃肠道肿瘤外科及生物治疗方面的研究。电话:(023)68754000-73074

收稿日期:2003-09-18;修回日期:2003-11-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

时，将组织升温至－20 ℃，在低温恒温器中切成 25 μm 厚切片。

1.2 方法

gp96 的表达采用免疫组化(SABC)法和原位杂交技术进行检测，试剂包括山羊抗人 gp96 多克隆抗体(美国 santa cruz biotechnology, Inc)，生物素化的兔抗山羊 IgG，SABC 试剂盒(武汉 Boster Inc)，gp96 寡核苷酸探针和地高辛标记的 gp96 原位杂交检测试剂盒(武汉 Boster Inc)。PCNA 检测采用免疫组化 SABC 试剂盒和鼠抗人 PCNA 抗体(武汉 Boster Inc)。实验中用 PBS 代替一抗作空白对照。按试剂盒说明书操作。

1.3 结果判断

gp96 免疫组化为胞浆呈棕黄色颗粒，依染色强度分级：＋＋＋深棕色，＋＋浅棕色，＋黄色，－未着色；原位杂交阳性部分为胞浆呈蓝紫色，采用 Tiger 图像分析仪分析，计算阳性表达的光密度值，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。PCNA 免疫组化以细胞核呈现棕色作为阳性，阴性细胞经苏木精复染后胞核呈蓝色，计数每 500 个肿瘤细胞中的阳性细胞数，计算出各例标本 PCNA 组化阳性细胞百分率，并将其分为 4 级：＜25% 为 －；25%～50% 为 ＋；51%～75% 为 ＋＋；＞75% 为 ＋＋＋。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 11.0 软件进行秩和检验及 t 检验，其相关性采用 Spearman 等级相关分析。

2 结果

2.1 gp96 在胃癌组织中的表达

胃癌组织和癌旁正常组织内均表达 gp96，免疫组化和原位杂交的结果相似。在癌旁正常粘膜中可见 gp96 较弱的阳性着色，主要分布于粘膜腺体细胞的胞质内；在胃癌组织可见到明显的阳性染色，位于癌细胞的胞质内，并可在胞核区见到未被染色的空核。胃癌组织 gp96 的表达显著高于癌旁正常组织($P=0.000$)(图 1、2)，不同分化程度的胃癌组织之间，gp96 的表达存在显著差异($P<0.05$)；临床 III、IV期显著高于 I 、II 期($P<0.05$)；有淋巴结转移者显著高于无淋巴结转移者($P<0.05$)；而 gp96 的表达在性别、年龄及肿瘤部位之间无显著差异($P>0.05$)，见表 1。

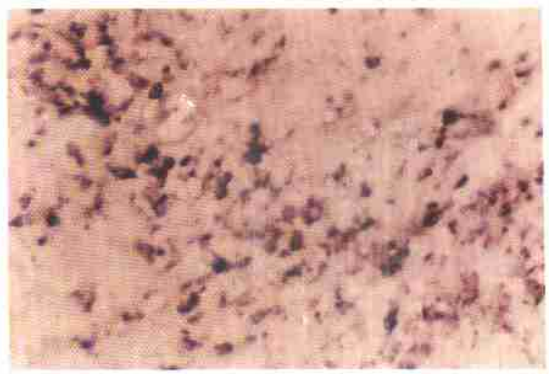


图 2 胃癌组织 **gp96** 原位杂交染色 (ISH× 400)

Fig 2 *In situ* hybridization for gp96 in gastric cancer tissues (ISH× 400)

表 1 **gp96** 在胃癌组织中的表达

Tab 1 Expression of gp96 in gastric cancer tissues

Group	*n*	gp96 protein level			gp96 mRNA
		＋	＋＋	＋＋＋	($\bar{x}\pm s$)
Histological differentiation					
Well	7	3	4	0	0.92±0.27
Moderate	24	3	11	10	1.27±0.31△
Poor	19	1	10	8	1.50±0.38#△△
Stage of tumor					
I	6	3	2	1	1.20±0.31
II	18	2	12	4	
III	19	2	9	8	1.41±0.41▲
IV	7	0	2	5	
Lymph node metastasis					
Without	19	5	10	4	1.21±0.33
With	31	2	15	14	1.44±0.40*

△：$t=2.294$，$P=0.029$，$P<0.05$ △△：$t=3.617$，$P=0.001$，$P<0.01$，*vs* well；#：$t=2.213$，$P=0.035$，$P<0.05$，*vs* moderately；▲：$t=2.059$，$P=0.045$，$P<0.05$，*vs* I /II；*：$t=2.203$，$P=0.032$，$P<0.05$ *vs* without

2.2 PCNA 在胃癌组织中的表达

胃癌组织中 PCNA 均有不同程度的阳性表达，且阳性表达分布呈明显异质性(图 3)。在正常组织中偶有表达，胃癌组织的表达明显高于癌旁正常组织，两组存在显著差异($P<0.05$)；淋巴结转移阳性组高于淋巴结转移阴性组，二者有非常显著性差异($P<0.01$)；临床 III、IV期明显高于临床 I 、II 期($P<0.05$)；不同分化程度癌组织之间相差显著($P<0.05$)，见表 2。



图 1 胃癌组织 **gp96** 免疫组化染色 (SABC× 400)

Fig 1 Immunohistochemical staining for gp96 in gastric cancer tissues (SABC× 400)

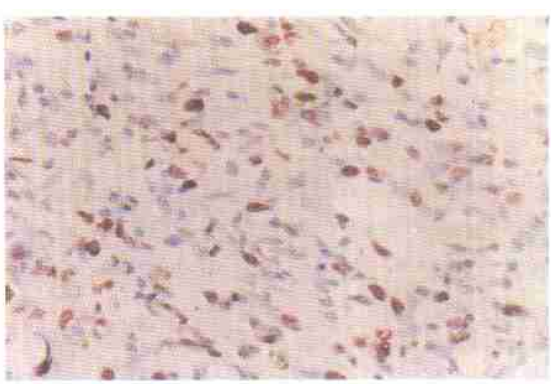


图 3 胃癌组织 **PCNA** 免疫组化染色 (SABC× 400)

Fig 3 Immunohistochemical staining for PCNA in gastric cancer tissues (SABC× 400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　PCNA 在胃癌组织中的表达

Tab 2　Expression of PCNA in gastric cancer tissues

Group	*n*	PCNA			
		−	+	++	+++
Histological differentiation					
Well	7	3	2	2	0
Moderate	24	6	11	6	1△
Poor	19	1	7	7	4#△△
Stage of tumor					
Ⅰ	6	3	1	2	0
Ⅱ	18	5	8	4	1
Ⅲ	19	2	9	5	3
Ⅳ	7	0	1	4	2▲
Lymph node metastasis					
Without	19	7	7	4	1
With	31	3	12	11	5*

△: $Z=2.315$, $P=0.021$, $P<0.05$, △△: $Z=-2.750$, $P=0.006$, $P<0.01$, *vs* well; #: $Z=1.999$, $P=0.046$, $P<0.05$, *vs* moderately; ▲: $Z=2.414$, $P=0.016$, $P<0.05$, *vs* Ⅰ/Ⅱ; *: $Z=-2.317$, $P=0.021$, $P<0.05$, *vs* without

2.3　胃癌组织 gp96、PCNA 表达的相互关系

经 Spearman 相关性检验, 胃癌组织 gp96 的表达与 PCNA 的表达呈显著正相关($r=0.744$, $P=0.021$, $P<0.05$)。

3　讨论

gp96 存在于细胞的内质网中, 其主要生物学功能是结合其它新生或异常蛋白质分子, 介导其折叠、装配和跨膜转运, 作为分子伴侣在体内发挥重要的生物学作用[2]。gp96 与肿瘤的关系越来越受到人们的关注, 研究表明肿瘤细胞中 gp96 的表达比正常组织明显增高, 在肿瘤的发生、发展中可能起重要作用。

本研究表明, gp96 在胃癌组织中表达明显增强, 并且与组织学类型、肿瘤分期及有无淋巴结转移显著相关, 提示 gp96 的表达与胃癌的发生、发展存在着密切的关系。许多学者在乳腺癌、肺癌、肝癌等方面做的研究也表明, 这些肿瘤细胞 gp96 的表达比正常细胞明显增高[3,4]。Chen 等[5] 研究了大鼠食管腺癌与正常组织在蛋白和核酸水平的表达, 发现在大鼠食管腺癌 gp96 高表达, 在人类食管癌也发现 gp96 的高表达。Tanaka 等[6] 还用丁酸钠诱导肝癌细胞分化, 发现 gp96 mRNAs 的表达下调, 说明 gp96 基因的高表达是肿瘤细胞的重要特征, 与肿瘤发生、发展具有相关性。

PCNA 存在于细胞核内, 它是 DNA 合成酶 δ的辅助蛋白, 在 DNA 合成中起重要作用。肿瘤细胞增生活跃, 处于增殖状态, 特别是 S 期即 DNA 合成期细胞, 其 PCNA 表达明显增强, PCNA 可作为一项评估细胞增殖状态的指标。本研究结果显示, 肿瘤分化程度越差, 进展越晚及有淋巴结转移时, PCNA 的表达越强, 表明 PCNA 是细胞 DNA 合成必需的核蛋白, 是反映肿瘤细胞增殖的主要生物学指标。

本研究结果表明, 胃癌组织中 PCNA 表达高者 gp96 的表达也增高, 相关分析显示二者在胃癌组织中的表达密切相关。我们认为, 由于恶性肿瘤生长无节制, 生长迅速, 易造成肿瘤局部缺血、缺氧, 这些应激因素会刺激 gp96 的合成, 大量 gp96 可与肿瘤产生的异常蛋白分子紧密结合, 以保护新合成的蛋白分子的构型, 使肿瘤细胞逃避免疫监视, 从而使肿瘤细胞在不利的条件下仍然能够生存、增殖。因此, gp96 在肿瘤细胞表达水平的增加可以作为肿瘤细胞调整其抗原特性以适应生存的一种危险信号。肿瘤分化程度越差、恶性程度越高, PCNA 表达就越强, 生长增殖就越快, 而肿瘤生长越快, 越容易造成肿瘤局部缺血缺氧, 从而又刺激 gp96 合成增加, 发挥分子伴侣作用, 维持肿瘤细胞的正常功能, 使肿瘤得以不断增殖。gp96 通过影响增殖过程参与细胞周期、细胞间信号传导, 从而使肿瘤细胞逃避免疫监视而不断增殖, 提示胃癌组织中 gp96 的高表达可能是胃癌发生、发展的机制之一。

参考文献:

[1] Liu C, Ewing N, DeFilippo M. Analytical challenges and strategies for the characterization of gp96-associated peptides[J], Methods, 2004, 32(1): 32−37.

[2] Mazzaferro V, Coppa J, Carrabba M G. Vaccination with autologous tumor-derived heat-shock protein gp96 after liver resection for metastatic colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(9): 3235−3245.

[3] Wang Q, An L J, Chen Y H, *et al*. Expression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 in human lung cancer tissues and its clinical significance[J]. Chin Med J, 2001, 114(11): 18−29.

[4] Gazit G, Lu J, Lee A S. De-regulation of GRP stress protein expression in human breast cancer cell lines. Breast Cancer Res Treat[J]. 1999, 54(2): 135−146.

[5] Chen X X, Ding Y, Liu C G, *et al*. Overexpression of glucose-regulated protein 94 (Grp94) in esophageal adenocarcinomas of a rat surgical model and humans. Carcinogenesis, 2002, 23(1): 123−130.

[6] Tanaka K, Kondoh N, Shuda M. Enhanced expression of mRNAs of antisecretory factor-1, gp96, DAD1 and CDC34 in human hepatocellular carcinomas[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 30, 1536(1): 1−12.

（编辑　郭建秀）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net