

人脑胶质瘤中热休克蛋白 70、Caspase-3 的表达及临床意义

丁山 陈辉 骆健明 郭燕春 林岚 谢泽宇

(汕头大学医学院第二附属医院神经外科 广东 汕头 515041)

摘要 目的 探讨热休克蛋白 70、caspase-3 在人脑胶质瘤中的表达和临床意义。方法 收集 2008 年 7 月~2010 年 12 月汕头大学医学院第二附属医院神经外科手术获取的人脑胶质瘤组织标本 35 例,另选择 20 例脑外伤手术中切除的正常脑组织标本作为对照组。采用 EnVision 免疫组化方法检测脑胶质瘤组织和正常脑组织中热休克蛋白 70、caspase-3 的表达,并分析其与脑胶质瘤组织临床病理特征之间的关系。结果 HSP70 在胶质瘤组和对照组中的阳性表达率分别为 74.3%和 25.0%,胶质瘤组的 HSP70 表达明显高于对照组($P<0.05$)。caspase-3 在胶质瘤组和对照组中的阳性表达率分别为 34.3%和 80.0%,胶质瘤组的 caspase-3 阳性表达率均明显低于对照组($P<0.01$)。HSP70 和 caspase-3 的阳性表达与胶质瘤的病理学分级、术后复发情况密切相关($P<0.05$)。相关分析表明,胶质瘤组织中 HSP70 阳性表达率和 caspase-3 表达呈负相关($r=-0.568, P<0.05$)。结论 胶质瘤组织中 HSP70 呈高表达,而 caspase-3 表达下调,两者均在胶质瘤浸润、复发等恶性演进过程中发挥重要作用;HSP70 可能通过某些途径抑制 caspase-3 表达来抑制胶质瘤恶性细胞的凋亡发生。

关键词 脑胶质瘤;热休克蛋白 70;Caspase-3;免疫组织化学

中图分类号 R739.4 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)26-5088-03

The Expression and Clinical Significance of HSP70 and Caspase-3 in Gliomas

DING Shan, CHEN Hui, LUO Jian-ming, GUO Yan-chun, LIN Lan, XIE Ze-yu

(Department of Neurosurgery, The second Hospital Of Shantou Medical University, Shantou, 515041, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression and clinical significance of HSP70 and caspase-3 in gliomas. **Methods:** The expression of HSP70 and caspase-3 protein was detected with immunohistochemical EnVision plus non-biotin technique in 35 cases of gliomas and 20 cases of normal cerebral tissue. The correlation with clinicopathologic characteristic were analyzed. **Results:** The positive expression rates of HSP70 protein in gliomas(74.3%) were significantly higher than that in normal cerebral tissue(25.0%) and the positive expression rates of caspase-3 protein in gliomas(34.3%) were significantly lower than that in normal cerebral tissue(80.0%) ($P<0.01$). The expression of HSP70 and caspase-3 were positively related to tumor clinical stage and recurrence ($P<0.01$). HSP70 expression was negatively correlated with caspase-3 ($r=-0.568, P<0.05$). **Conclusion:** HSP70 showed high expression and the expression of caspase-3 decreased in gliomas. HSP70 and caspase-3 play an important role in metastasis and recurrence in gliomas. HSP70 inhibits apoptosis control of tumor cells of gliomas through inhibiting the expression of caspase-3.

Key words: Gliomas; Heat-shock 70; Cyserinly aspartate-specific protease 3; Immunohistochemistry

Chinese Library Classification(CLC): R739.4 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)26-5088-03

前言

胶质瘤占中枢神经系统肿瘤的第一位,多呈浸润性生长,目前的治疗效果不理想,致使患者生存期短、病死率高,严重危害人类的健康。虽然近年来对胶质瘤的发生和发展机理进行了大量相关的基础和临床研究,但患者的预后仍不令人满意。因此,胶质瘤的基础与临床研究均面临着严峻的挑战^[1-2]。热休克蛋白(heat shock proteins, HSP)是细胞在各种应激原诱导下所产生的一组进化上高度保守的蛋白质家族^[3-4],其中 HSP70 是 HSP 家族中最受学者们关注的蛋白之一,它在正常细胞中水平较低,但在应激状态时诱导性最显著、合成量最多、表达水平最高,特别是恶性肿瘤细胞常常高表达,推测 HSP70 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^[5-7]。天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶(cyserinly aspartate-specific protease, caspase)家族蛋白酶是细胞凋亡的核心机制,其中 caspase-3 是整个凋亡级联反应的一个关键调节节点^[8-9],其表达减弱或缺失可导致细胞的异常增殖和恶性转化,被认为与肿瘤发生发展、生物学行为及其预后有较密切关系。本研究应用免疫组织化学方法检测 HSP70 和 caspase-3 在人脑胶质瘤组织中的表达,旨在探讨两者在胶质瘤发病演变过程中的作用机制。

1 对象和方法

1.1 对象

收集 2008 年 7 月~2010 年 12 月汕头大学医学院第二附属医院神经外科手术获取的人脑胶质瘤组织标本 35 例,术前均未行化疗及免疫治疗。男性 20 例,女性 15 例,年龄 48.6±4.2(25~72)岁,病理分级依照 2000 年世界卫生组织(WHO)关

作者简介: 丁山(1976-)男,硕士研究生,副主任医师,研究方向:神经外科疾病的诊断与治疗,电话:13829608960

(收稿日期:2012-05-08 接受日期:2012-05-31)

于颅内肿瘤的分类标准Ⅰ级5例,Ⅱ级12例,Ⅲ级7例,Ⅳ级11例。对35例胶质瘤患者均进行的术后电话随访、信件回访及门诊复诊,随访时间是10个月~3年,平均19个月,复发16例,未复发19例。另选择20例脑外伤手术中切除的正常脑组织标本作为对照组。

1.2 试剂与方法

兔抗人HSP70多克隆抗体(工作液浓度为1:150)、caspase-3山羊抗人多克隆抗体(工作液浓度为1:100)、DAB显色试剂盒和EnVision试剂盒均购自福州迈新生物技术公司。所有组织标本均用10%甲醛固定,常规石蜡包埋,连续切片,分别进行HE、免疫组织化学EnVision法检测。免疫组化检测步骤严格按照说明书进行。结果判断:细胞浆内呈现棕色或淡棕色颗粒为HSP90和caspase-3表达阳性。采用半定量计数法,染色强度:未见染色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。阳性细胞数:0分,未见细胞染色;1分,染色细胞≤25%;2分,染色细胞介于26%~50%;3分,染色细胞介于51%~75%;

4分,染色细胞>75%。上述两项评分相加,0~2分为阴性,3~7分为阳性。

1.3 统计学方法

应用SPSS 13.0版统计软件进行统计学处理。计数资料多个样本率的比较和两个样本率之间的比较采用 χ^2 检验;相关性检验采用Spearman等级相关性检验分析数据。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 胶质瘤和正常脑组织中HSP70和caspase-3的表达情况

HSP70在胶质瘤组和对照组中的阳性表达率分别为74.3%和25.0%,胶质瘤组的HSP70表达明显高于对照组($P<0.05$)。caspase-3在胶质瘤组和对照组中的阳性表达率分别为34.3%和80.0%,胶质瘤组的caspase-3阳性表达率均明显低于对照组($P<0.01$),见表1。

2.2 HSP70和caspase-3的表达与胶质瘤的临床病理特征的相关性

表1 胶质瘤和正常脑组织中HSP70和caspase-3的表达比较[n(%)]

Table 1 The expression of HSP70 and caspase-3 in gliomas [n(%)]

Groups	n	The positive expression of HSP70	The positive expression of caspase-3
Gliomas group	35	26(74.3)	12(34.3)
Control group	20	5(25.0)	16(80.0)

表2 HSP70和caspase-3的表达与胶质瘤的临床病理特征的相关性

Table 2 The correlation between the expression of HSP70 and caspase-3 with clinicopathologic characteristic

	n	The positive expression of HSP70	The positive expression of caspase-3
Age			
<50 years	20	15(75.0)	7(35.0)
≥50 years	15	11(73.3)	5(33.3)
Sex			
Male	19	14(73.7)	7(36.8)
Female	16	12(75.0)	5(31.3)
The size of tumor			
≤3cm	7	5(71.4)	2(28.6)
3~5cm	15	11(73.3)	5(33.3)
>5cm	13	10(76.9)	5(38.5)
The site of tumor			
Lobi frontalis	20	15(75.0)	7(35.0)
Lobi temporalis	10	7(70.0)	3(30.0)
Lobi parietalis	5	4(80.0)	2(40.0)
Pathological grade			
I~II	17	10(58.8) a	8(47.1)a
III~IV	18	16(88.9)	4(22.2)
Recurrence of postoperative			
Recurrence	16	15(93.8)a	3(25.0)a
Non-recurrence	19	11(57.9)	9(47.4)

Note: a $P<0.05$.

关性

HSP70 和 caspase-3 的阳性表达与胶质瘤的病理学分级、术后复发情况密切相关($P<0.05$) ,而与患者年龄、性别以及肿瘤大小无关($P>0.05$) ,见表 2。

2.3 胶质瘤组织中 HSP70 和 caspase-3 表达的相关性

Spearman 等级相关分析表明,胶质瘤组织中 HSP70 阳性表达率和 caspase-3 表达呈负相关 ($r=-0.568$, $P<0.05$)。提示 HSP70 表达增高可以抑制肿瘤细胞凋亡。

3 讨论

目前临床对人脑胶质瘤的治疗效果一直不能令人满意,这与胶质瘤生长呈浸润性、术后极易复发等恶性生物行为有关。脑胶质瘤的发生、发展是一个多基因网络调控的复杂过程,至今人们对其具体发生机制尚不完全清楚。因此,进一步深入研究胶质瘤发生发展及其恶性生物行为的分子机制非常必要,具有重要的临床意义^[10-11]。

HSP 是细胞应激原诱导产生的一组高度保守的蛋白质,最初是在高温环境下细胞中发现的,之后研究逐渐证明了 HSP 受感染、氧自由基、缺血、中毒以及恶变等各种细胞应激原诱导而产生。在肿瘤形成及肿瘤细胞不断增殖的过程中,肿瘤细胞产生大量的异常蛋白,这些异常蛋白质的存在刺激 HSPs 的大量合成,同时肿瘤形成的环境状况是缺氧、酸中毒和营养缺乏等,也可诱导肿瘤细胞表达 HSPs^[12]。HSP70 是 HSP 家族成员中结构独特、功能活跃的分子伴侣,在多数恶性肿瘤中呈异常表达,可能对恶性肿瘤的发生发展、生物学行为及其预后有重要影响^[13-15]。但目前国内有关胶质瘤发生演进过程中 HSP70 表达的相关报道尚少见。

Caspase 家族是细胞凋亡过程中的核心环节,绝大多数的细胞凋亡依赖于 caspase 基因的激活与超常表达。caspase-3 是 caspase 家族中最重要的凋亡“关键蛋白酶”,在引发内源性和外源性凋亡通路中发挥重要作用。一旦 caspase-3 的活性受到抑制而引起细胞凋亡障碍,细胞增殖及凋亡调控出现紊乱,可能与多种肿瘤的发生、发展有直接或间接的关系^[16-18]。

本组研究结果显示,胶质瘤组的 HSP70 表达明显高于对照组($P<0.05$) ,而胶质瘤组的 Caspase-3 阳性表达率均明显低于对照组($P<0.01$) ,说明 HSP70 和 caspase-3 均参与了胶质瘤的发生过程,推测在癌细胞形成的过程中,细胞内 HSP70 的积聚增多和 caspase-3 表达的下调,可能帮助癌细胞获得了逃避凋亡的能力,以调节和稳定了肿瘤细胞异常增殖。同时本研究结果还发现, HSP70 和 caspase-3 的阳性表达与胶质瘤的病理学分级、术后复发情况密切相关($P<0.05$) ,而与患者年龄、性别以及肿瘤大小无关($P>0.05$) ,表明 HSP70 和 caspase-3 不仅参与胶质瘤发生过程,还可能在胶质瘤浸润、复发等恶性演进过程中发挥重要作用,提示两者可作为反映胶质瘤恶性生物学行为和预后的分子标记物。

目前研究发现 HSP70 也参与了细胞凋亡的过程,最近不断有学者就 HSP70 在细胞凋亡途径中调节机制和作用阶段提出新的论据和见解^[19]。有研究认为 HSP70 高表达可抑制细胞色素 C 释放和阻止 caspase-3 水解激活过程,在 caspase 凋亡途径中发挥着关键作用^[20]。本组研究中相关性分析显示,胶质瘤组

组织中 HSP70 阳性表达率和 caspase-3 表达呈负相关($r=-0.568$, $P<0.05$)。提示 HSP70 作为 caspase 途径中强有力的抑制因子,其高表达可能通过阻止 caspase-3 水解激活而抑制肿瘤细胞的凋亡,但目前 HSP70 对 caspase-3 凋亡功能的具体调节机理仍不确定,仍有待进一步探讨。

参考文献(References)

- [1] 刘华亭,杨天明.神经胶质瘤的治疗策略[J].现代生物医学进展,2011,4(5):168-170
Liu Hua-ting, Yang Tian-ming. The therapy strategy of Glioma[J]. Progress in modern biomedicine, 2011, 4(5): 168-170
- [2] 李庆斌,李瑞岩,丛方方,等. MGMT 甲基化影响替莫唑胺对胶质母细胞瘤疗效的研究[J].现代生物医学进展,2012,10(8):81-85
Li Qing-bin, Li Rui-yan, Cong Fang-fang, et al. Effect of Promoter Hypermethylation of DNA Repair Gene O-6-methylguanine DNA Methyltransferase to the Treatment of Temozolomide in Glioblastoma[J]. Progress in modern biomedicine, 2012, 10(8): 81-85
- [3] PRATT WB, TOFT DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90 / hsp70-based chaperone machinery [J]. Exp Biol Med(Maywood), 2003, 228(2): 111-133
- [4] Takayama S, Reed JC, Homma S. Heat shock proteins as regulators of apoptosis[J]. Oncogene, 2003, 22: 9041-9047
- [5] 张滨,姜政.热休克蛋白 70 与肿瘤治疗的研究进展 [J].重庆医学,2007,36(24):2563-2566
Zhang Bin, Jiang Zheng. Research progress of HSP70 and treatment [J]. Chongqing Medicine, 2007, 36(24): 2563-2566
- [6] 吉艳荣,薄爱华,吉彦丽,等. MGMT 和 HSP70 在大肠癌中的表达及临床意义[J].现代肿瘤医学,2009,17(5):886-887
Ji Yan-rong, Bo Ai-hua, Ji Yan-li, et al. Expression and significance of MGMT and HSP70 in colorectal carcinoma [J]. Journal of Modern Oncology, 2009, 17(5):886-887
- [7] Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, et al. Heat shock protein-in cancer: chaperones of tumorigenesis[J]. Trends Biochem Sci, 2006, 31(3): 164-170
- [8] Boenem K, Mei BC, Detmis AM, et al. Sensing caspase 3 activity with quantum dot-fluorescent protein assemblies[J]. J Am Chem Soc, 2009, 131(11): 3828-3829
- [9] Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond [J]. Oncogene, 2008, 27 (48): 6194-6206
- [10] Schiff D, Brown PD, Giannini C. Outcome in adult low-grade gliomas: the impact of prognostic factors and treatment [J]. Neurology, 2007, 69(13): 1366-1373
- [11] Omum A M, Faivre S, Raymond E. Lessons learned in the development of targeted therapy for malignant gliomas [J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6: 1909-1919
- [12] Isobe N, Onodera H, Mori A, et al. Caspase-3 expression in human gastric carcinoma and its clinical significance [J]. Oncology, 2004, 66: 201-209
- [13] 胡文秀,杨成旺,欧阳晓辉,等.大肠癌组织中 HSP70 和 p53 蛋白的表达及其意义[J].肿瘤防治研究,2007,5:0363-0365
Hu Wen-xiu, Yang Cheng-wang, Ouyang Xiao-hui, et al. Expression and Significance of HSP70 and p53 Protein in Human Colorectal Carcinoma [J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2007, 5: 0363-0365

(下转第 5067 页)

- [2] Sarlomo-Rikala M, Kovatich A J, Barusevicius A, et al. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34 [J]. *Mod Pathol*, 1998, 11(8):728-734
- [3] West RB, Corless CL, Chen X, et al. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status [J]. *Am J Pathol*, 2004, 165(1):107-113
- [4] Kang GH, Kim KM, Noh JH, et al. WT-1 expression in gastrointestinal stromal tumors [J]. *Pathology*, 2010, 42(1):54-57
- [5] Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors [J]. *Science*, 1998, 279(5350):577-580
- [6] Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors [J]. *Science*, 2003, 299(5607):708-710
- [7] Reith JD, Goldblum JR, Lyles RH, et al. Extragastric stromal tumors: an analysis of 48 cases with emphasis on histologic predictors of outcome [J]. *Mod Pathol*, 2000, 13(5):577-585
- [8] 张颖, 陈世耀, 纪元, 等. 胃肠道间质瘤临床病理特征和预后因素分析 [J]. *胃肠病学*, 2006, 1(6):346-348
Zhang Ying, Chen Shi-yao, Ji Yuan, et al. Clinicopathologic characteristics and prognostic factors for gastrointestinal stromal tumors [J]. *Chin J Gastroenterol*, 2006, 11(6):346-348
- [9] González-Cámpora R, Delgado MD, Amate AH, et al. Old and new immunohistochemical markers for the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors [J]. *Anal Quant Cytol Histol*, 2011, 33(1):1-11
- [10] Novelli M, Rossi S, Rodríguez-Justo M, et al. DOG1 and CD117 are the antibodies of choice in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors [J]. *Histopathology*, 2010, 57(2):259-270
- [11] Stilidi IS, Arkhiri PP, Anurova OA, et al. Gastrointestinal stromal tumors: clinico-morphological features, pathogenesis and modern treatment strategies [J]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*, 2010, (2):46-52
- [12] Yang YD, Cho H, Koo JY, et al. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance [J]. *Nature*, 2008, 455(7217):1210-1215
- [13] Espinosa I, Lee CH, Kim MK, et al. A novel monoclonal antibody against DOG1 is a sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors [J]. *Am J Surg Pathol*, 2008, 32(2):210-218
- [14] Lieq B, Hornick JL, Corless CL, et al. Monoclonal antibody DOG1.1 shows higher sensitivity than KIT in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors, including unusual subtypes [J]. *Am J Surg Pathol*. 2009, 33(3):437-446
- [15] Bing Z, Pasha TL, Acs G, et al. Cytoplasmic overexpression of WT-1 in gastrointestinal stromal tumor and other soft tissue tumors [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2008, 16(4):316-321
- [16] Acín-Gándara D, Pereira-Pérez F, Castaño-Pascual A, et al. Gastrointestinal stromal tumors: diagnosis and treatment [J]. *Cir Cir*, 2012, 80(1):44-51
- [17] Verweil J, Casali PG, Zalcberg J, et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumors with high-dose imatinib: randomised trial [J]. *Lancet*, 2004, 364(9440):1127-1134
- [18] Zhang XH, Wu H, He YL, et al. Clinical analysis of imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumor [J]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*, 2012, 15(3):243-246
- [19] González-Cámpora R, Delgado MD, Amate AH, et al. Old and new immunohistochemical markers for the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors [J]. *Anal Quant Cytol Histol*, 2011, 33(1):1-11
- [20] Jiang XL, Yang H, Li K, et al. Expression of DOG-1 in gastrointestinal stromal tumor and its diagnostic application [J]. *Chinese Journal of Pathology*, 2011, 40(5):315-318

(上接第 5090 页)

- [14] 姚媛, 赵瑞力, 马荣炜, 等. 甲状腺乳头状癌 Survivin、MMP-2、HSP70 表达及其临床意义 [J]. *武警医学*, 2009, 20(6):532-534
Yao Yuan, Zhao Rui-li, Ma Rong-wei, et al. Expression and clinical significance of survivin, MMP-2, and HSP70 in thyroid papillary cancer [J]. *Medical Journal of the Chinese People's Armed Police Forces*, 2009, 20(6):532-534
- [15] 李三峰, 丁伟. HSP70 与 p53 蛋白在肝细胞癌组织中的表达及相关性研究 [J]. *肿瘤基础与临床*, 2009, 22(6):468-471
Li San-feng, Ding Wei. The Expression and Correlation of HSP70 and p53 Protein in Hepatocellular Carcinoma [J]. *Journal of Basic and Clinical Oncology*, 2009, 22(6):468-471
- [16] 黄凌燕, 张建中, 曲娜. 凋亡基因 Caspase-3 在乳腺癌中的表达及其临床意义 [J]. *宁夏医学杂志*, 2009, 31(10):865-867
Huang Ling-yan, Zhang Jian-zhong, Qu Na. Expression of Caspase3 and its clinical significance in breast cancer [J]. *Ningxia Medical Journal*, 2009, 31(10):865-867
- [17] 邱芳, 彭松林, 戴显伟. C-FIAP、bcl-xs 和 Caspase-3 在乳腺癌中的表达及其临床意义 [J]. *现代肿瘤医学*, 2008, 16(7):1145-1148
Qiu Fang, Peng Song-lin, Dai Xian-wei. Expression of c-FLIP, bcl-xS and caspase-3 in human breast cancer, and clinical significance [J]. *Journal of Modern Oncology*, 2008, 16(7):1145-1148
- [18] 徐虹, 全培良, 周云, 等. 宫颈癌变过程中 caspase-3、Fas / FasL 的表达及其临床意义 [J]. *河南医学研究*, 2008, 17(1):29
Xu Hong, Quan Pei-liang, Zhou Yun, et al. The expression and clinical significance of Caspase-3 and Fas/FasL in cervical carcinogenesis [J]. *Henan Medical Research*, 2008, 17(1):29
- [19] 新燕, 张荣繁, 王晓娟, 等. Survivin 反义 RNA / Hsp70 双基因转染对 HepG2 细胞的影响 [J]. *现代肿瘤医学杂志*, 2008, 16(5):694
Xin Yan, Zhang Rong-fan, Wang Xiao-juan, et al. The effects of survivin antisense RNA and HSP70 on HepG2 cell [J]. *Journal of Modern Oncology*, 2008, 16(5):694
- [20] 黄晓兵, 侯梅. 热休克蛋白 70 与肿瘤细胞凋亡 [J]. *四川肿瘤防治*, 2003, 16(1):53-55
Huang Xiao-bin, Hou Mei. HSP70 and apoptosis of tumor [J]. *Sichuan Journal of Cancer Control*, 2003, 16(1):53-55