

GRP94 和 CD8 在宫颈病变组织中的表达及意义 *

庄玉玉 严 沁 姜飞洲 王清莹 周 珑 万小平[△]

(上海交通大学附属国际和平妇幼保健院 妇产科 上海 200030)

摘要 目的 :探讨葡萄糖调节蛋白 94(glucose-regulated protein94 ,GRP94)和 CD8 在宫颈病变组织中的表达及与 HPV 感染的关系。方法 :采用免疫组化 S-P 法检测 32 例原发性宫颈癌、27 例宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia ,CIN)及 40 例慢性宫颈炎组织中 GRP94 和 CD8 的表达及定位 ;采用 western blot 技术检测 6 例宫颈癌及 6 例正常宫颈组织中 GRP94 和 CD8 的表达。结果 :①在宫颈癌、CIN2/3、CIN1 及慢性宫颈炎组织中 ,GRP94 的阳性表达率分别为 87.5 %、82.4 %、40 %和 22.5 % ,CD8 的阳性表达率分别为 28.1 %、64.7 %、90 %和 97.5 % ,GRP94 在宫颈癌和 CIN2/3 中的表达均显著高于慢性宫颈炎和 CIN 1 组织 (P 均 <0.05) ,CD8 在宫颈癌组的表达显著低于慢性宫颈炎组、CIN1 组及 CIN2/3 组(P 均 <0.05)。②Western blot 结果示 GRP94 在宫颈癌组织中的表达显著高于正常宫颈组织(P<0.01) ,CD8 在宫颈癌组织中的表达显著低于正常宫颈组织(P<0.01)。③GRP94 的表达与宫颈癌分化程度、有无脉管侵袭有关(P<0.05) ,而与年龄、病理类型、临床分期及有无淋巴结转移无关(P>0.05) ,CD8 的表达与有无脉管侵袭有关(P<0.05) ,而与年龄、病理类型、临床分期、分化程度及有无淋巴结转移无关(P>0.05)。④宫颈病变组织中 ,GRP94 的表达与 HPV 感染呈正相关 (rs =0.377 ,P=0.000) ,CD8 的表达与 HPV 感染呈负相关 (rs =-0.395 ,P=0.000) ,GRP94 与 CD8 的表达呈负相关(rs =-0.608 ,P=0.000)。结论 :GRP94 表达可能是宫颈 CIN 进展及宫颈癌预后判断的重要预测指标。
关键词 :子宫颈肿瘤 ,GRP94 ,CD8 ,免疫组织化学 ,Western blot
中图分类号 :R737.33 **文献标识码** :A **文章编号** :1673-6273(2011)17-3233-07

Expression and Significance of GRP94 and CD8 in the Pathological Tissues of Cervix*

ZHUANG Yu-yu, YAN Qin, JIANG Fei-zhou, WANG Qing-ying, ZHOU Long, WAN Xiao-ping[△]

(Department of Obstetrics and Gynecology, Shanghai Jiao Tong University Affiliated International Peace Maternity and Child Health Hospital, Shanghai 200030, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of glucose-regulated protein 94 (GRP94) and CD8 in the pathological tissues of cervix and their relationship with HPV infection. **Methods:** S-P immunohistochemical staining was used to detect the expression and localization of GRP94 and CD8 in cervical tissues, which contained 32 cases of cervical cancer, 27 cases of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and 40 cases of chronic cervicitis ; Western blot was used to detect the exprssion of GRP94 and CD8 in 6 cervical cancer and 6 normal cervical tissues. **Results:** ① In cervical cancer, CIN2/3, CIN1 and chronic cervicitis tissue the positite expression rates of GRP94 were 87.5%, 82.4%, 40% and 22.5%, respectively, while the positite expression rates of CD8 were 28.1%, 64.7%, 90% and 97.5%, respectively; The expression of GRP94 in cervical cancer and CIN2/3 were significantly higher than that in chronic cervicitis and CIN1 (P<0.05); The expression of CD8 in cervical cancer was significantly lower than that in chronic cervicitis, CIN1 and CIN2/3 (P<0.05). ② The expression level of GRP94 in cervical cancer was significantly higher than that in normal cervical tissue (P<0.01); The expression of CD8 in cervical cancer was significantly lower than that in normal cervical tissue (P<0.01). ③ GRP94 protein expression had close relationship with differentiation and vessel invasion (P<0.05), but no relationship with age, clinical stage, histological type and lymph node metastasis (P>0.05). CD8 protein expression had close relationship with vessel invasion (P<0.05), but no relationship with age, clinical stage, histological type, differentiation and lymph node metastasis (P>0.05). ④ In cervical tissue, GRP94 expression was positively correlated with HPV infection (rs =0.377, P=0.000); CD8 expression was negatively correlated with HPV infection (rs =-0.395, P=0.000); GRP94 was negatively correlated with CD8 (rs =-0.608, P=0.000). **Conclusion:** GRP94 may serve as potential predictors for progression of CIN and prognosis of cervical cancer.

Key words: Uterine cervical neoplasms; GRP94; CD8; Immunohistochemistry; Western blot

Chinese Library Classification: R737.33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)17-3233-07

前言

宫颈癌是全世界范围内女性第二大常见的恶性肿瘤 ,严重

威胁着妇女的身心健康。目前 HPV 感染是公认的宫颈癌及癌前病变发生的主要病因^[1]。性生活活跃期妇女感染 HPV 的终生累积率为 50 %-80 %^[1] ,但临床上感染 HPV 病毒的女性并非全

* 基金项目 :上海市科委基础研究重点项目(10JC1415600)

作者简介 :庄玉玉(1984-) ,女 ,硕士 ,主要研究方向 :妇科肿瘤 电话 :15900736259 E-mail :zhuangyuyu2008@sina.com

△通信作者 :万小平 E-mail :wanxiaoping61@126.com

(接受日期 :2011-03-21 接受日期:2011-04-17)

部发展为宫颈癌,大部分 HPV 感染是一种良性临床行为并能被宿主的免疫系统所清除,仅极少部分持续性或高危型 HPV 感染者进展为宫颈癌^[1],究其原因,除与 HPV 感染类型及毒力强弱有关之外,宿主因素如遗传易感性、免疫监视系统的状态等可能在宫颈癌的发生发展中起了重要作用。

葡萄糖调节蛋白 94(glucose-regulated protein 94, GRP94), 又称热休克蛋白 gp96 (heat shock protein gp96, HSPgp96), 属 HSP90 家族, 是内质网中含量最丰富的糖蛋白。除可作为分子伴侣参与蛋白质的折叠、转运以及分泌外, GRP94 还具有抗凋亡作用和免疫调节功能^[2]。CD8 是细胞毒 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)的重要表面标志, CTL 是机体抗病毒、抗肿瘤最主要的效应细胞^[3]。本研究采用免疫组化 S-P 法以及 western blot 技术检测宫颈病变组织中 GRP94 和 CD8 的表达, 分析二者与 HPV 感染的相关性, 探讨二者在宫颈癌 HPV 感染免疫耐受、免疫逃逸过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 临床资料

59 例宫颈肿瘤石蜡包埋组织来源于 2010 年 2 月至 2010 年 10 月在上海国际和平妇幼保健院接受手术治疗且有完整临床病理资料的患者, 其中宫颈癌组织 32 例(按病理类型: 宫颈鳞癌 27 例, 腺癌 5 例; 按 FIGO 分期: Ⅰ期 24 例, Ⅱ期 7 例, Ⅲ期 1 例; 按分化程度: 高分化 7 例, 中分化 20 例, 低分化 5 例; 按淋巴结转移: 有淋巴结转移 7 例, 无淋巴结转移 25 例; 按脉管侵袭: 脉管侵袭阳性 23 例, 阴性 9 例), 患者年龄 27-60 岁, 平均年龄 45 岁; 宫颈癌前病变组织 27 例(CIN1 10 例, CIN2/3 17 例), 患者年龄 22-63 岁, 平均年龄 46 岁。所有病变均做 HE 切片经病理专家复检确认。所有患者术前均未行放化疗。所有患者术前均行 HPV 检测。选取同期因子宫肌瘤等良性病变行手术治疗的 40 例慢性宫颈炎组织 (HPV 阳性 20 例, HPV 阴性 20 例)作为正常对照组, 患者年龄 27 岁-63 岁, 平均年龄 43 岁。12 例新鲜宫颈组织中, 6 例宫颈癌组织取自 2010 年 9 月至 10 月于上海国际和平妇幼保健院接受手术治疗的, 患者年龄 32-52 岁, 平均年龄 42 岁。所有患者术前均未行放化疗。选取同期因子宫平滑肌瘤行全子宫切除的 6 例正常宫颈组织作为对照。组织离体后立即无菌取材, 癌组织取自病变中心处, 避免明显坏死区域, 将所取组织置入预冷的 PBS(PH 7.4)中清洗, 迅速置入液氮后转入 -80℃保存备用。所有病变均经术后病理证实。

1.2 主要试剂及仪器

兔抗人 GRP94 多克隆抗体 (美国 Abcam 公司)、兔抗人 CD8 多克隆抗体(美国 Abcam 公司)、兔抗人 β -actin 单克隆抗体 (美国 CST 公司) 以及 HRP 标记山羊抗兔 IgG(western blot 用)购自上海优宁维生物科技有限公司。S-P 免疫组化试剂盒购自上海明睿生物有限公司。RIPA 裂解液购自 Biomiga 公司。BCA 蛋白浓度定量试剂盒购自 Thermo Scientific 公司。ECL 化学发光试剂盒及 western 一抗二抗去除液购自上海碧云天生物技术有限公司。PVDF 膜购自美国 BIO-RAD 公司。半干电转印仪为 BIO-RAD 公司 Trans-blot SD 半干转印仪。

1.3 免疫组化

石蜡包埋组织 4 μ m 连续切片, 分别检测 GRP94 蛋白和 CD8 蛋白的表达。每组实验均设阳性和阴性对照, 以预实验筛选出的阳性切片作为阳性对照, PBS 代替一抗作为阴性对照。免疫组化染色采用 S-P 法。抗原修复采用高温加热法: 切片浸入柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)中, 电饭煲煮沸 10 分钟, 保温 10 分钟, 室温下自然冷却。兔抗人 GRP94 多克隆抗体按 1:400 稀释, 兔抗人 CD8 多克隆抗体按 1:200 稀释。实验步骤严格按照免疫组化试剂盒说明进行操作。

1.4 免疫组化结果判断

免疫组化染色结果采用盲法进行观察, 光学显微镜下每张切片选取 5 个高倍镜视野(400 $\times$), 光镜下观察切片上出现棕黄色颗粒记为阳性。染色结果按阳性染色细胞所占的百分比标记[4] 阴性(-), 无阳性细胞或阳性细胞 $\leq 5\%$, 弱阳性(+), 阳性细胞占 6%~25%, 染色较浅, 阳性(++), 阳性细胞占 26%~75%, 染色中等, 强阳性(+++), 阳性细胞 >75%, 染色较深。

1.5 Western blot

取新鲜标本 50 mg, 匀浆器中加入 0.5 ml RIPA 裂解液抽提总蛋白, 运用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定提取的蛋白浓度。采用 5%和 8%的 SDS-PAGE 浓缩胶和分离胶电泳, 每孔上样量含蛋白 60 μ g, 最后一个泳道加入彩虹 Marker。电泳完毕后以半干转膜法将蛋白转印于 PVDF 膜上, 以含 5%脱脂奶粉的 TBST 于 37℃摇床封闭 2 h, 分别加入以封闭液稀释的兔抗人 GRP94 多克隆抗体(1:1000 稀释)和兔抗人 CD8 多克隆抗体(1:200 稀释)4℃过夜。TBST 洗膜后加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:2000 稀释)37℃摇床反应 1 h, TBST 洗膜, 加入 ECL 化学发光液, 暗室 X 光片压片曝光、显影、定影。将 PVDF 膜用 Western 一抗二抗洗脱液在室温下洗 5 分钟, 用 5%的脱脂奶粉重新封闭, 弃去封闭液, 用兔抗人 β -actin 单克隆抗体(1:1000 稀释), 山羊抗兔的二抗重复上述的杂交及 X 光片的曝光、显影和定影过程。用 Quantity One 凝胶软件分析系统分析计算各条带灰度值, 以目标蛋白质/ β -actin 的灰度比值(Ratio)表示目的条带的相对表达水平。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件。GRP94 与 CD8 在各组中表达阳性率的比较采用行 $\times$ 列表, 进行 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法计算; 各指标间表达强度的相关关系采用 Spearman 等级相关分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。Western blot 实验数据以表示, 进行 t 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学检测 GRP94 和 CD8 在宫颈病变组织中的表达

GRP94 蛋白的阳性信号主要定位于宫颈鳞癌细胞、腺癌细胞和 CIN2/3 上皮内瘤变细胞的胞浆, 呈弥漫性棕黄色染色。而在慢性宫颈炎组及 CIN1 组中基本无表达(图 1)。GRP94 在宫颈癌、CIN2/3、CIN1 及慢性宫颈炎组的阳性表达率分别为 87.5%、82.4%、40%和 22.5%, 其中, 宫颈癌组的表达较慢性宫颈炎组和 CIN1 组显著增加, 差异均具有统计学意义($P=0.000$ 、 $P=0.001$); CIN2/3 组的表达较慢性宫颈炎组及 CIN1 组显著增加, 差异均具有统计学意义($P=0.000$ 、 $P=0.013$); 宫颈癌组与

CIN2/3 组之间的表达差异无统计学意义($P>0.05$) ;CIN 1 组与 a)。慢性宫颈炎组织中 ,HPV(+)组与 HPV(-)组表达差异无统
慢性宫颈炎组之间的表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)(图 2 , 计学意义($P>0.05$)(图 2 b)。

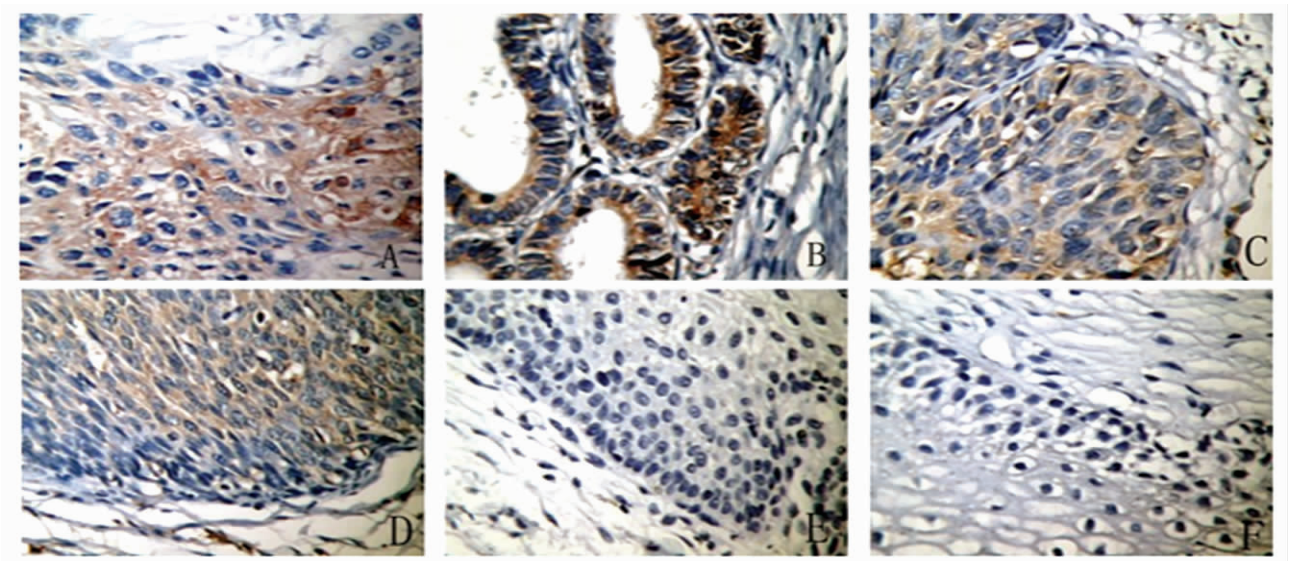


图 1 免疫组化示 GRP94 在宫颈病变组织中的表达(S-P 法 ,400 $\times$)。A :宫颈鳞癌组织 ;B :宫颈腺癌组织 ;C :CIN3 ;D :CIN2-3 ;E :CIN1 ;F :慢性宫颈炎组织
Fig1 Immunohistochemistry for GRP94 in the pathological tissues of cervix (S-P, 400 $\times$). A: squamous cell carcinoma; B: adenocarcinoma; C: CIN3; D: CIN2-3; E: CIN1; F: chronic cervicitis

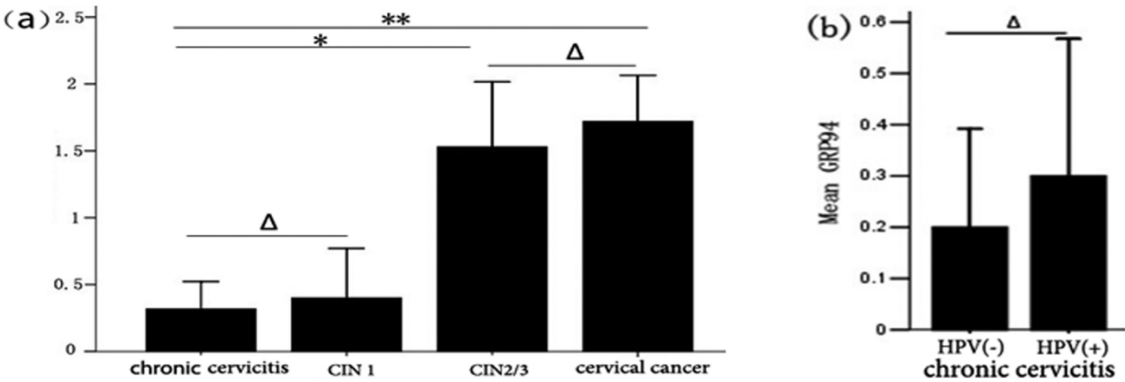


图 2 GRP94 在不同宫颈病变组织中的表达情况。(a) GRP94 在宫颈癌组的表达较慢性宫颈炎组及 CIN 1 组显著增加(** $P<0.01$) ;CIN2/3 组的表达较慢性宫颈炎组及 CIN 1 组显著增加(* $P<0.05$) ;宫颈癌组与 CIN2/3 组之间的表达差异无统计学意义(Δ $P>0.05$) ;CIN 1 组与慢性宫颈炎组之间的表达差异无统计学意义(Δ $P>0.05$)。(b) HPV(+)与 HPV(-)宫颈炎组 GRP94 之间的表达差异无统计学意义(Δ $P>0.05$)

Fig 2 Expression of GRP94 in various pathological tissues of cervix. (a):Compared with chronic cervicitis and CIN1, the expression of GRP94 in cervical cancer are significantly increased (** $P<0.01$); compared with chronic cervicitis and CIN1,CIN2/3are significantly increased (* $P<0.05$); no statistic significance between CIN2/3 and cervical cancer (Δ $P>0.05$); no statistic significance between chronic cervicitis and CIN1(Δ $P>0.05$). (b): no statistic significance between the experssion of GRP94 in HPV(+)and HPV(-)chronic cervicitis(Δ $P>0.05$)

CD8 主要表达于淋巴细胞的包膜及胞浆(图 3)。CD8 在宫颈癌、CIN2/3、CIN1 及慢性宫颈炎组织中的阳性表达率分别为 28.1 %、64.7 %、90 %和 97.5 % ,其中 ,宫颈癌组的表达较慢性宫颈炎组、CIN1 组及 CIN2/3 组均显著降低($P=0.000$ 、 $P=0.001$ 、 $P=0.022$) ,CIN2/3 组的表达较慢性宫颈炎组及 CIN1 组显著降低($P=0.000$ 、 $P=0.027$)。CIN1 组与慢性宫颈炎组的表达差异无统计学意义($P>0.05$)。(图 4 a)。慢性宫颈炎组中 ,HPV(+)组 CD8 表达较 HPV(-)组略增加 ,但差异无统计学意义($P>0.05$) (图 4 b)。

2.2 Western blot 检测 GRP94 和 CD8 在宫颈癌及正常宫颈组织中的表达

GRP94 在宫颈癌及正常宫颈组织中的平均相对表达水平分别为 3.46 ± 1.14 和 0.22 ± 0.15 ($F=14.38$ $P=0.004$)。CD8 在宫颈癌及正常宫颈组织中的平均相对表达水平分别为 0.58 ± 0.53 和 2.46 ± 1.29 ($F=3.487$ $P=0.091$)。宫颈癌组 GRP94 的表达显著高于正常宫颈组($P=0.001$) ;宫颈癌组 CD8 的表达显著低于正常宫颈组($P=0.008$)(图 5)。

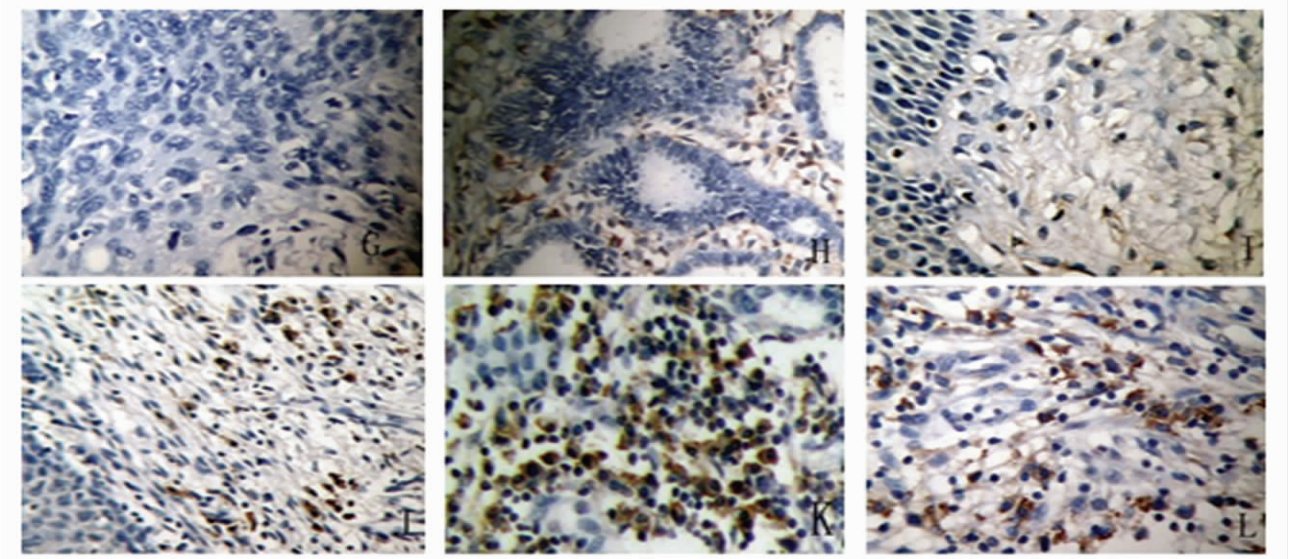


图3 免疫组化示 CD8 在宫颈病变组织中的表达(S-P 法 ,400×)。G :宫颈鳞癌组织 ; H :宫颈腺癌组织 ; I :CIN3 ;J :CIN1 ;K :HPV(+)宫颈炎组织 ;L :HPV(-)宫颈炎组织

Fig 3 Immunocytochemistry for CD8 in the pathological tissues of cervix (S-P, 400×).G: squamous cell carcinoma; H:adenocarcinoma; I: CIN3; J: CIN 1; K: HPV (+) chronic cervicitis; L: HPV (-) chronic cervicitis

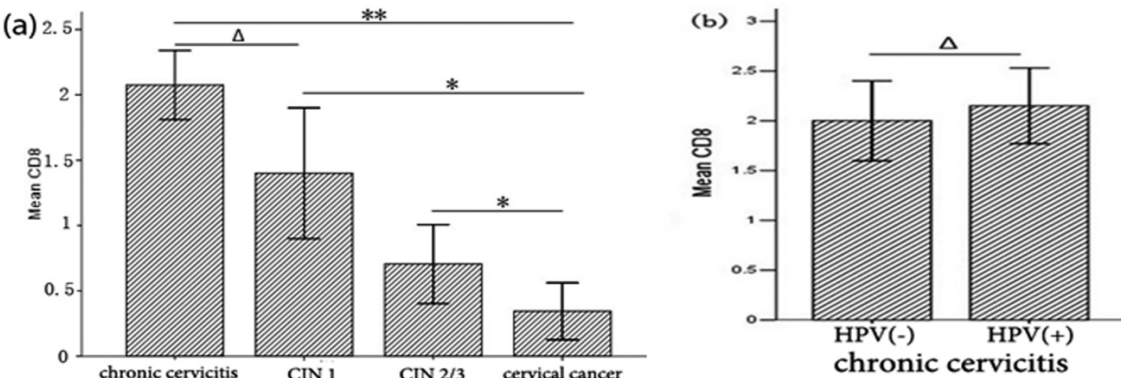


图4 CD8 在不同宫颈病变组织中的表达情况。(a) CD8 在宫颈癌组的表达较慢性宫颈炎组、CIN1 组及 CIN2/3 组均显著降低(*P<0.05) ,CIN2/3 组的表达较慢性宫颈炎组及 CIN1 组均显著降低(*P<0.05)。CIN1 与慢性宫颈炎组织中的表达无差异(Δ P>0.05)。(b) HPV(+)与 HPV(-)慢性宫颈炎组之间的表达差异无统计学意义(Δ P>0.05)

Fig 4 Expression of CD8 in various pathological tissues of cervix. (a): compared with chronic cervicitis and CIN, the expression of CD8 in cervical cancer are significantly decreased (*P<0.05); compared with chronic cervicitis and CIN1, CIN2/3 are significantly decreased (*P<0.05); no statistic significance between CIN1and chronic cervicitis (Δ P>0.05). (b): no statistic significance between the experssion of CD8 in HPV (+) and HPV (-) chronic cervicitis (Δ P>0.05)

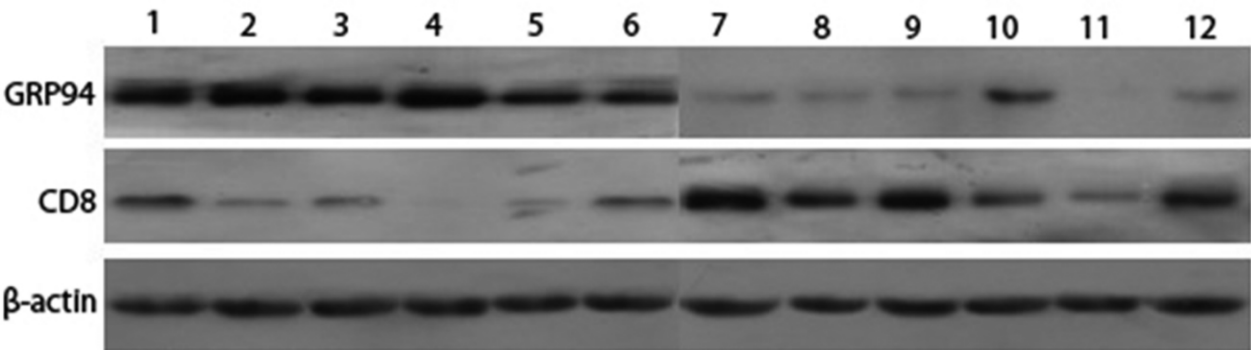


图5 Western blot 检测 GRP94 和 CD8 在宫颈癌及正常宫颈组织中的表达情况。1-6 :宫颈癌组织 ;7-12 :正常宫颈组织

Fig 5 Western blotting analysis for GRP94 and CD8 levels in cervical cancer and normal cervical tissue.samples . 1-6: cervical cancer tissue; samples 7-12: normal cervical tissue

2.3 GRP94、CD8 的表达与宫颈癌临床病理参数之间的关系 (x²=10.612 ,P=0.007) ;与组织学类型、年龄、临床分期无关(P 均 >0.05)。CD8 的表达与有无脉管侵袭有关 ,脉管侵袭阳性组较脉管侵袭阴性组表达显著降低(x²=6.693 ,P=0.021) ;与组织学类型、年龄、临床分期、分化程度、有无淋巴结转移无关(P 均 >0.05)。见表 1。

GRP94 的表达与宫颈癌细胞的分化程度有关 ,随宫颈癌细胞分化程度的降低 ,其表达显著增加(x²=13.653 ,P=0.008) ;与有无淋巴结转移无关(x²=1.633 ,P=0.724) ,但却与肿瘤有无脉管侵袭有关 ,脉管侵袭阳性组较脉管侵袭阴性组表达显著增加

表 1 GRP94、CD8 的表达与宫颈癌临床病理参数的关系
Tab 1 Associations between expressions of GRP94 and CD8 in cervical cancer and clinicopathologic paramenters

Group	N	Expression of GRP94				x ²	P	Expression of CD8				x ²	P
		-	+	++	+++			-	+	++	+++		
Histological type						4.656	0.126					0.424	1.000
SCC	27	4	8	11	4			19	6	2	0		
Adenocarcinoma	5	0	0	2	3			4	1	0	0		
Age						1.788	0.708					0.365	1.000
≥ 45	18	2	4	9	3			13	4	1	0		
<45	14	2	4	4	4			10	3	1	0		
Clinical Stage						3.596	0.927					2.471	0.849
	24	4	6	9	5			16	6	2	0		
	7	0	2	3	2			6	1	0	0		
	1	0	0	1	0			1	0	0	0		
Differentiation						13.653	0.008*					7.197	0.071
High	7	2	2	1	2			3	2	2	0		
Moderate	20	2	6	11	1			15	5	0	0		
Low	5	0	0	1	4			5	0	0	0		
Lymph node metastasis						1.633	0.724					2.788	0.238
Positive	7	0	2	4	1			7	0	0	0		
Negative	25	4	6	9	6			16	7	2	0		
Vessel invasion						10.612	0.007*					6.693	0.021*
Positive	23	3	2	12	6			16	7	0	0		
Negative	9	1	6	1	1			7	0	2	0		

Note: P 值为 Fish's 精确检验结果 ,*P<0.05

2.4 宫颈病变组织中 GRP94、CD8 表达与 HPV 感染相关性 颈病变组织中 ,GRP94 的表达与 HPV 感染呈正相关(rs=0.377 , P=0.000)。CD8 的表达与 HPV 感染呈负相关(rs=-0.395 ,P=0.000)。见表 2。

99 例标本中检出 HPV 阳性者共 71 例 ,其中慢性宫颈炎组 20 例 (50 %) ,CIN1 组 6 例 (60 %) ,CIN 2/3 组 16 例(94.1 %) ,宫颈癌组 29 例(90.6 %)。Spearman 等级相关分析显示 ,宫

表 2 宫颈病变组织中 GRP94、CD8 的表达与 HPV 感染的相关性
Tab 2 Correlation between expressions of GRP94 and CD8 in the pathological tissues of cervix and HPV infection

Group	N	Expression of GRP94				rs	Expression of CD8				rs
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
						0.377 (P=0.000*)					-0.395 (P=0.000*)
HPV(-)	28	20	6	2	0		3	5	13	7	
HPV(+)	71	24	18	20	9		28	25	11	7	

Note:Spearman test. *P <0.05

2.5 GRP4 与 CD8 表达的相关性

GRP94 在慢性宫颈炎组织、CIN 组织及宫颈癌组织中的表达逐渐增加 ,而 CD8 在慢性宫颈炎组织、CIN 组织及宫颈癌组织中的表达逐渐降低。Spearman 等级相关分析显示 GRP94 与

CD8 在宫颈肿瘤组织中表达呈负相关(rs=-0.448 P=0.000)。宫颈癌组织中GRP94 与 CD8 的表达呈负相关 (rs=-0.401 ,P=0.023)。见表 3。

表 3 宫颈癌组织中 GRP94 与 CD8 表达的相关关系
Tab 3 Correlation between expressions of GRP94 and CD8 in cervical cancer tissues

Group	Expression of GRP94				Total	rs	P
	-	+	++	+++			
Expression of CD8	-	1	6	9	7	-0.401	0.023*
	+	2	1	4	0		
	++	1	1	0	0		
	+++	0	0	0	0		
	Total	4	8	13	7		

Note: Spearman test. *P<0.05

3 讨论

GRP94 是一类重要的分子伴侣 ,在缺血、缺氧、葡萄糖缺乏、细菌和病毒感染等应激条件下 ,非折叠蛋白反应(UPR)增加可使得 GRP94 的表达明显增加。一方面 ,GRP94 与抗原肽形成复合物可启动适应性免疫应答 ,复合物被专业抗原提呈细胞 (APCs) 捕获后经 CD91 提呈至 MHC- Ⅱ 类分子 ,进而提呈至 CD8+T 细胞激活 CTL 反应 ,发挥抗病毒及抑癌作用^[2,5] ;另一方面 ,过表达的 GRP94 可通过自分泌 / 旁分泌途径刺激细胞生长、促进血管生成 ,并可作为某些信号分子的受体接收信息并向胞内传递 ,使得肿瘤细胞能够在不利环境中继续生存 ,从而促进肿瘤的发生发展^[2,6]。克罗恩病患者中 ,粘附侵袭性大肠杆菌 (AIEC)可利用患者回肠粘膜过表达的 GRP94 作为宿主细胞受体而侵入回肠粘膜上皮细胞 ,GRP94 表达增加的患者具有 AIEC 遗传易感性 ,被认为是克罗恩病的高危人群^[7]。宫颈癌中 ,早期研究表明 GRP94 高水平表达是宫颈癌细胞株抗放射线治疗的分子机制之一^[8]。Bolhassani A 等研究发现 ,在 HPV16E7 抗体反应阳性的宫颈鳞癌血清标本中 ,GRP94 分子片段 NT-gp96 及 CT-gp96 显著增加 ,GRP94 分子片段可能成为宫颈鳞癌的诊断标志物^[9]。本研究发现 ,GRP94 在慢性宫颈炎组、CIN1 组、CIN2/3 组以及宫颈癌组的阳性表达率分别为 22.5 %、40 %、82.4 %和 87.5 % ,GRP94 在宫颈癌组及 CIN2/3 组的表达显著高于慢性宫颈炎组及 CIN 1 组(P 均 <0.05) ,这说明随着病变进展 ,GRP94 的表达逐渐增加 ,其表达增加可能与高级别宫颈上皮内瘤变及宫颈癌的发生发展密切相关。此外 ,低分化宫颈癌组 GRP94 的表达显著高于中分化 + 高分化组 (x²=13.653 P<0.01) ,脉管侵袭阳性组表达显著高于脉管侵袭阴性组(x²=10.612 P<0.01) ,提示 GRP94 可能对宫颈癌的预后判断有一定意义。同时 ,本研究还发现 GRP94 的表达与 HPV 感染呈正相关(rs=0.377 P<0.01) ,提示 GRP94 的表达可能与 HPV 病毒的遗传易感性相关 ,GRP94 高表达的 HPV 感染者可能是宫颈癌的高危人群。

宫颈癌的发生发展具有明显的阶段性 ,是一个渐进演变的

过程。过去认为浸润性宫颈癌是从 CIN1、CIN2、CIN3 逐步发展而来。现临床研究表明 ,CIN1 代表的是一种慢性 HPV 感染 ,其 HPV DNA 是游离的 ,可产生完整的病毒颗粒并脱落^[10]。在免疫功能正常的女性中 ,约 60 %-80 %的 CIN1 可自行消退^[10-11] ,仅约 2 %的 CIN1 可进一步进展为 CIN2/3 或宫颈癌^[10] ,CIN2/3 病变多为持续性病变 ,其进展为浸润性宫颈癌的风险较大 ,但仍有约 6 %-50 %的 CIN2/3 可自行消退^[10,12]。因此 ,早期预测 CIN 病变进展对于避免年轻 CIN 患者的过度治疗具有重要意义。结合本实验结果 ,GRP94 在 CIN1 组及慢性宫颈炎组的表达显著低于 CIN2/3 组及宫颈癌组(P<0.05) ,提示 GRP94 的表达可能与 CIN 病变的进展相关 ,CIN1 组 GRP94 表达阳性者可能有进一步进展为 CIN2/3 或宫颈癌的风险。

机体抗肿瘤免疫的主要方式是细胞免疫 ,许多特异性抗病毒和抗肿瘤的免疫应答取决于抗原特异性 CD8+CTL 的保护作用^[13]。CD8+T 细胞既可通过分泌穿孔素 - 颗粒酶直接杀伤靶细胞 ,也可通过 Fas/FasL 途径诱导靶细胞凋亡 ,从而发挥抗病毒抗肿瘤作用^[14]。CD8+T 细胞表达的异常可导致患者免疫功能的失常。本研究发现 ,CD8 在慢性宫颈炎组、CIN1 组、CIN2/3 组以及宫颈癌组的阳性表达率分别为 97.5 %、90 %、64.7 %和 28.1 % ,宫颈癌组和 CIN2/3 组的表达显著低于慢性宫颈炎组及 CIN1 组(P 均 <0.05) ,宫颈癌组的表达显著低于 CIN2/3 组 (P<0.05) ,且 CD8 的表达与 GRP94 表达及 HPV 感染均呈负相关(P<0.05)。这些结果表明 ,随着宫颈病变的进展 ,CD8 的表达逐渐减少甚至缺失 ,其抗病毒抗肿瘤的作用受到抑制。宫颈组织中 ,脉管侵袭阳性组 CD8 的表达显著低于脉管侵袭阴性组(P<0.05) ,提示 CD8 表达的减少可能与患者的不良预后相关。此外 ,研究发现 HPV(+)慢性宫颈炎组 CD8 的表达略高于 HPV(-)慢性宫颈炎组 ,但差异并无统计学意义(P>0.05)。

本研究结果表明 ,在 HPV 感染初期 ,GRP94 在慢性宫颈炎组表达略增加 ,一度可激活 CD8+T 细胞产生细胞毒作用抑制 HPV 的感染 ,表现为 HPV(+)慢性宫颈炎组 CD8 的表达略高于 HPV(-)慢性宫颈炎组。但随着病变进展 ,在 CIN 组织及宫颈癌组织中 ,随着 GRP94 表达的增加 ,CD8 表达降低 ,至浸润

性宫颈癌时 CD8 几乎无表达。这说明随 HPV 感染增强及 GRP94 的表达的增加,CD8 表达逐渐缺失,造成局部呈免疫抑制状态,对 HPV 的免疫监视作用降低,从而使受 HPV 感染的宫颈细胞出现异常发育和永生性,最终导致宫颈癌的发生。Liu Z 等研究表明,在运用 GRP94 作为佐剂免疫小鼠时,小剂量的 GRP94 可导致 CTL 的激活,但随着 GRP94 剂量的增加,调节性 T 细胞(Treg)数目增加且功能显著增强,激活的 Treg 可废除 GRP94 所诱导的 CTL 反应,导致抗肿瘤作用减弱^[15],而注射小剂量的环磷酰胺可恢复由大剂量 GRP94 所导致的 CD8+T 细胞反应的缺失,因为小剂量的环磷酰胺具有选择性杀伤 Treg 的功能。这一研究从侧面解释了本次实验的结果,同时提示下调宫颈肿瘤患者 GRP94 的表达可能有助于改善患者的预后。

综上所述,本研究提示 GRP94 和 CD8 与 HPV 感染及宫颈肿瘤的发生发展密切相关,GRP94 高表达的 HPV 感染者可能是宫颈癌的高危人群,宫颈病变组织中 GRP94 的表达可能作为宫颈 CIN 进展及宫颈癌预后判断的重要预测指标,但 GRP94 在宫颈肿瘤发生发展过程中的具体作用机制尚需进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Garland SM, Smith JS. Human Papillomavirus Vaccines: Current Status and Future Prospects[J]. *Drugs*, 2010, 70(9):1079-1098
- [2] Fu Y, Lee AS. Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2006, 5 (7):741-744
- [3] Arens R, Schoenberger SP. Plasticity in programming of effector and memory CD8 T-cell formation [J]. *Immunol Rev*, 2010, 235 (1): 190-205
- [4] Liu MH, Wang MC, Gao N, et al. Expression and clinical significance of glucose regulated proteins GRP78 and GRP94 in human colon cancer[J]. *Chin J Cancer Res*, 2010, 22(1):42-48
- [5] Strbo N, Podack ER. Secreted heat shock protein gp96-Ig:an innovative vaccine approach [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2008, 59 (5): 407-416
- [6] Tramentozzi E, Montopoli M, Orso G, et al. Stable complexes formed by Grp94 with human IgG promoting angiogenic differentiation of HUVECs by a cytokine-like mechanism [J]. *Mol Immunol*, 2008, 45 (13):3639-3648
- [7] Rolhion N, Barnich N, Bringer MA, et al. Abnormally expressed ER stress response chaperone Gp96 in CD favours adherent-invasive *Escherichia coli* invasion[J]. *Gut*, 2010, 59(10):1355-1362
- [8] Kubota H, Suzuki T, Lu J, et al. Increased expression of GRP94 protein is associated with decreased sensitivity to X-rays in cervical cancer cell lines[J]. *Int J Radiat Biol*, 2005, 81(9):701-709
- [9] Bolhassani A, Zahedifard F, Taslimi Y, et al. Antibody detection against HPV16 E7 & GP96 fragments as biomarkers in cervical cancer patients[J]. *Indian J Med Res*, 2009, 130(5):533-541
- [10] Trimble CL, Piantadosi S, Gravitt P, et al. Spontaneous regression of high-grade cervical dysplasia: effects of human papillomavirus type and HLA phenotype[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(13):4717-4723
- [11] Ozaki S, Zen Y, Inoue M. Biomarker expression in cervical intraepithelial neoplasia: potential progression predictive factors for low-grade lesions[J]. *Hum Pathol*, 2011, Feb 10.[Epub ahead of print]
- [12] Øvestad IT, Gudlaugsson E, Skaland I, et al. The impact of epithelial biomarkers, local immune response and human papillomavirus genotype in the regression of cervical intraepithelial neoplasia grades 2-3 [J]. *J Clin Pathol*, 2011, 64(4):303-307
- [13] Egilmez NK, Kilinc MO. Tumor-resident CD8+ T-cell: the critical catalyst in IL-12-mediated reversal of tumor immune suppression[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2010, 58(6):399-405
- [14] Meiraz A, Garber OG, Harari S, et al. Switch from perforin-expressing to perforin-deficient CD8 (+) T cells accounts for two distinct types of effector cytotoxic T lymphocytes in vivo [J]. *Immunology*, 2009, 128(1):69-82
- [15] Liu Z, Li XH, Qiu LP, et al. Treg suppress CTL responses upon immunization with HSP gp96 [J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39 (11): 3110-3120