

·临床研究·

GRP78 的表达与非小细胞肺癌生物学特性及预后的关系

于海丰 黄旭 甄春英 王永亮 叶磊光 刘宝刚[△]

(哈尔滨医科大学附属第三医院 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要 目的 探讨 GRP78 在非小细胞肺癌和癌旁组织中的表达情况,并研究其与生物学特征及临床预后的关系。方法 收集非小细胞肺癌术后切除标本 88 例,及其癌旁组织 20 例作为对照。采用免疫组织化学方法检测 GRP78 的表达。结果 GRP78 在非小细胞肺癌组织和癌旁组织中的表达有统计学差异。GRP78 的表达与非小细胞肺癌的临床分期、分化程度有关,而与患者性别、年龄和病理类型无关。非小细胞肺癌中 GRP78 高表达的患者生存时间短于 GRP78 低表达的患者。GRP78 的表达情况是影响非小细胞肺癌患者手术预后的独立危险因素。结论 非小细胞肺癌患者的 GRP78 的表达可能与肿瘤细胞的发生及发展有关,GRP78 可以作为一个预测非小细胞肺癌患者预后的分子标志物。

关键词 非小细胞肺癌;GRP78;预后

中图分类号 R734.2 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 22-4259-05

The Relationship between Expression of GRP78 and Its Biological Characteristic, Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer

YU Hai-feng, HUANG Xu, ZHEN Chun-ying, WANG Yong-liang, YE Lei-guang, LIU Bao-gang[△]

(The Third Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Heilongjiang Harbin 150081, China)

ABSTRACT Objective: To explore the expression of endoplasmic reticulum stress molecular chaperone GRP78 (glucose regulated protein, GRP78) in non-small cell lung cancer tissues and para-cancerous lung tissues. We investigated relationship between the expression of GRP78 and its biological characteristic, prognosis in non-small cell lung cancer. **Methods:** We collected 88 cases of surgically resected specimens in non-small cell lung cancer and 20 cases para-cancerous tissues for contrast. Immunohistochemistry method was used to detect the expression of GRP78 protein. **Results:** The expression of GRP78 in non-small cell lung cancer tissues and para-cancerous lung tissues had statistical significance. The levels of GRP78 expression were correlated with extent of differentiation, clinical stage, but not with patients' sex, age and pathologic features. GRP78 expression was independent prognostic factor of non-small cell lung cancer. **Conclusions:** The expression of GRP78 in non-small cell lung cancer tissues was related with non-small cell lung cancer development. GRP78 may be used as a molecular marker to prognosis of non-small cell lung cancer.

Key words: Non-small cell lung cancer; Glucose regulated protein 78; Prognosis

Chinese Library Classification (CLC): R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2012) 22-4259-05

前言

所周知,肺癌是严重威胁人类健康和生命的疾病。其发病率和死亡率在大多数国家和地区居于恶性肿瘤之首。我国肺癌发病率每年增长 26.9%,如不及时采取有效控制措施,预计到 2025 年,我国肺癌病人人数将达到 100 万,成为世界第一肺癌大国^[1]。因此,积极寻找一种能够预测肺癌发生及发展的分子标志物是降低肺癌发病率和死亡率的一个重要方法。

内质网是细胞加工蛋白质和储存钙离子的主要场所。当蛋白质在内质网内折叠受到抑制或者细胞内钙稳态失衡时,将引发内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)。越来越多的研究表明,ERS 在多种恶性肿瘤的发生和发展中起到非常重要

的作用^[2]。葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, GRP78) 作为内质网分子伴侣,在生理状态下,参与蛋白质的转运与折叠,促进正常细胞蛋白质的成熟,但是在应激状态下,如低糖、低氧、低钙等条件下,它作为内质网上的一种应激蛋白,大量表达,以保持细胞的稳定,延长细胞在不利应激下的存活期^[3]。研究发现 GRP78 在多种肿瘤的发生与发展中起着重要的作用,并与肿瘤细胞的侵袭和转移有关^[4],还与肿瘤化疗耐药相关^[5]。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集 2007 年 11 月 -2008 年 06 月在哈尔滨医科大学附属第三医院胸外科手术的 88 例非小细胞肺癌石蜡包埋肿瘤组织及 20 例癌旁石蜡包埋组织。其中男性 54 例,女性 34 例。年龄 ≥60 岁 28 例, <60 岁 60 例。临床分期 I 期 29 例, II 期 20 例, III 期 39 例。腺癌 52 例,鳞癌 36 例。低分化 32 例,中 - 低分化 21 例,中分化 18 例,高分化 18 例。生存时间以患者手术当

作者简介 于海丰 (1976-),女,硕士研究生,研究方向:从事肺癌的内科治疗, E-mail: yhf3889118@163.com

△通讯作者 刘宝刚,电话:0451-86298295

E-mail: liubaogang1962@sina.com

(收稿日期 2012-02-05 接受日期 2012-02-29)

日为观察时间的零点,以随访截止日期或患者死亡日期为终点。随访率 100 %。

1.2 方法

采用免疫组织化学法(SABC法)石蜡切片常规脱蜡,水化。PBS液冲洗2次,每次5分钟。3%过氧化氢室温下浸泡10分钟,蒸馏水冲洗3次。石蜡切片高压抗原热修复5-10分钟后蒸馏水冲洗,PBS液冲洗3次,每次5分钟。每张切片滴加一抗(稀释比例1:100),4℃过夜,PBS液冲洗3次,每次5分钟。滴加二抗(稀释比例为1:800),室温1小时,PBS液冲洗3次,每次5分钟。DAB显色4分钟,蒸馏水冲洗。苏木素复染5分钟,蒸馏水冲洗。梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.3 结果判定

GRP78阳性细胞着色见于细胞浆,呈棕黄色。染色强度判定标准采用半定量积分法判定^[6]:每例均随机观察计数5个高倍视野($\times 400$),确定其每个视野的阳性率,取平均数,阳性细胞所占比例 $\leq 5\%$ 为0分,6%-25%为1分,26%-50%为2

分,51%-75%为3分, $>75\%$ 为4分;阳性细胞表达的着色深度:基本不着色为0分,浅黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。将两项积分相乘0-2分为阴性(-),3-4分为弱阳性(+),5-8分为中度阳性(++),9-12分为强阳性(+++),+~+++为阳性表达。本研究将 ≥ 3 分归为高表达, <3 分归为低表达,便于统计。

1.4 统计学处理

应用SPSS18.0统计软件进行统计学分析,计数资料采用 χ^2 。采用Kaplan-Meier法计算生存率,用Log-rank进行检验。采用Cox回归模型进行预后的单因素和多因素分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GRP78在肺癌组织和癌旁组织中的表达

88例非小细胞肺癌组织中GRP78高表达率是70.5%,20例癌旁组织中GRP78的高表达率是40.0%。两组比较差异有统计学意义($P<0.05$) (见表1)。

表1 GRP78在NSCLC组织和癌旁组织中的表达

Table 1 Expression of GRP78 between para-cancerous tissue and NSCLC

Group	Case	GRP78		χ^2	P
		High	Low		
Para-cancerous	20	8	12	6.63	0.01
NSCLC	88	62	26		

表2 GRP78的表达与生物学特征的关系

Table 2 The relationship between GRP78 expression and its biological characteristic

Factors	Case	GRP78		χ^2	P
		High	Low		
Gender				0.21	0.65
Male	54	39	15		
Female	34	23	11		
Age				2.7	0.1
≥ 60	28	23	5		
< 60	60	39	21		
NSCLC stage				12.91	0.002
I	29	15	14		
II	20	12	8		
III	39	35	4		
NSCLC history				1.26	0.26
Adenocarcinoma	52	39	13		
Squamous	36	23	13		
Cell differentiation				19.99	<0.001
Poorly differentiated	32	29	3		
Moderately- Poorly differentiated	20	17	3		
Moderately differentiated	18	8	10		
High differentiated	18	8	10		

2.2 GRP78 的表达与生物学特征关系

在 88 例 NSCLC 中,男性 54 例,女性 34 例,GRP78 高表达例数分别是 39 例、23 例,两者之间比较差异无统计学意义, (P>0.05)。年龄≥60 岁 28 例,年龄<60 岁 60 例,GRP78 高表达例数分别是 23 例、39 例,两组之间比较差异无统计学意义, (P>0.05)。在 NSCLC 中,其中腺癌 52 例,鳞癌 36 例。GRP78 高表达例数分别是 39 例、23 例, 两者之间比较差异无统计学意义, (P>0.05)。临床分期中,I 期 29 例,II 期 20 例,III 期 39 例。

GRP78 高表达例数分别是 15 例、12 例、35 例,三组之间比较差异有统计学意义 (P<0.05)。在 88 例 NSCLC 中,其中低分化 32 例,中 - 低分化 21 例,中分化 18 例,高分化 18 例。GRP78 高表达例数分别是 29 例、17 例、8 例,8 例,四组之间比较差异有统计学意义 (P<0.05) (见表 2)。

2.3 预后分析

应用 Kaplan-Meier 法计算患者的生存时间与 GRP78 表达程度的关系,结果显示两组生存率具有显著性差异 (P<0.001) (见图 1)。

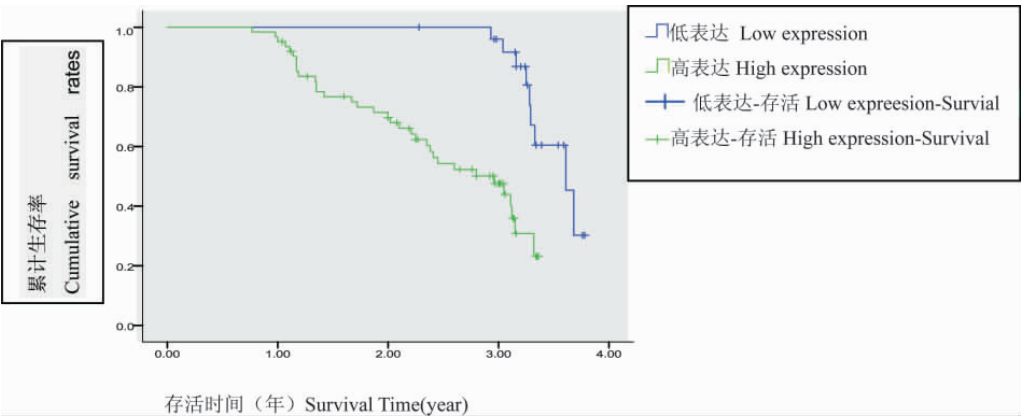


图 1 生存率曲线图

Fig.1 Kaplan-Meier survival analysis for GRP78

表 3 Cox 单因素回归结果

Table 3 The result of Cox univariate analysis

Factors	Case	OR	95 %CI	P
Gender		0.88	0.46~1.66	0.69
Male	54			
Female	34			
Age		1.24	0.65~2.37	0.51
≥60	28			
<60	60			
NSCLC stage				0.035
I	29	1		
II	20	1.84	0.77~4.38	0.17
III	39	2.78	1.27~6.08	0.01
NSCLC history		0.62	0.33~1.15	0.62
Adenocarcinoma	52			
Squamous	36			
Cell differentiation				0.002
Poorly differentiated	32	4.7	1.77~12.51	0.002
Moderately- Poorly differentiated	20	2.45	0.82~7.34	0.11
Moderately differentiated	18	1.28	0.4~4.04	0.68
High differentiated	18	1		
GRP78		5.15	2.2~12.02	<0.001
Lower	26			
High	62			

2.4 NSCLC 生存时间与单因素的分析结果

应用 Cox 单因素回归分析性别、年龄、临床分期、病理类型、分化程度、GRP78 的表达程度与非小细胞肺癌患者的生存时间的关系,显示临床分期、分化程度、GRP78 的表达程度与生

存时间有关 ($P<0.05$) (见表 3)。

2.5 NSCLC 术后生存的 COX 模型分析结果

应用 Cox 多因素回归分析发现,GRP78 的表达程度是 NSCLC 独立预后的影响因素 ($P=0.005$) (见表 4)。

表 4 Cox 多因素回归结果

Table 4 The result of Cox multivariate analysis

Factors	Case	OR	95 % CI	P
NSCLC stage				0.71
I	29	1		
II	20	1.42	0.52~3.9	0.5
III	39	1.03	0.40~2.68	0.95
Cell differentiation				0.062
Poorly differentiated	32	2.63	0.83~8.34	0.1
Moderately- Poorly differentiated	20	1.26	0.36~4.37	0.72
Moderately differentiated	18	0.71	0.18~2.70	0.61
High differentiated	18	1		
GRP78		3.91	1.50~10.19	0.005
Low	26	26		
High	62	62		

3 讨论

大约 60 %~80 %的肺癌患者早期无特异性临床表现,确诊时已经是晚期,常规的手术、化疗及放疗等手段难以延长患者的生存期,致使肺癌患者的总体五年生存率仅为 10%-16%^[7,8]。其中非小细胞肺癌占肺癌发病率的 70% -80%。近几年肿瘤学及分子生物学研究均发现,内质网应激反应与肿瘤发生有关^[9]。GRP78 也被称作免疫球蛋白重链结合蛋白^[10] (the immunoglobulin heavy chain binding protein, Bip),能够转运内质网腔内的错误折叠蛋白质,使细胞在应激条件下仍能够继续合成蛋白质^[11]。即使在饥饿的时候也能够保存细胞内有限的营养。GRP78 还能降低对杀伤 T 细胞的敏感性^[12]。目前认为,GRP78 在细胞受刺激时出现的高表达,可能是细胞的一种重要的防御机制,这种机制对细胞起到保护作用,并且延长了细胞在不利因素下的生存期^[13]。这种保护机制对于肿瘤细胞的化疗药物性和抗免疫原性,抗凋亡性有重要作用,是目前肿瘤基因治疗、化疗^[14]、免疫治疗效果不佳的重要原因之一。

有许多研究表明,GRP78 过表达于多种肿瘤中,如卵巢癌、前列腺癌、神经母细胞瘤^[15]、乳腺癌^[16]、胃癌^[17]、肝癌^[12]、宫颈癌^[18]、黑色素瘤^[19]中。本研究我们发现 GRP78 在非小细胞肺癌中的表达率高于癌旁组织,这表明 GRP78 的高表达与恶性肿瘤之间存在着直接的关系。GRP78 在癌旁组织中亦有表达,可能与癌周组织营养物质缺乏、毒物、缺氧等因素有关。

在结直肠癌^[3]、乳腺癌^[20]等恶性肿瘤中 GRP 78 的表达与性别、年龄无关,而与临床分期、分化程度有关。本研究中,在非小细胞肺癌中 GRP78 的表达与上述结果相符。这提示我们,GRP78 的表达程度在非小细胞肺癌中可能与肿瘤细胞的增

殖、分化程度有关。我们进一步对非小细胞肺癌术后患者进行预后分析发现,单因素生存分析显示临床分期和分化程度与 GRP78 的表达对于非小细胞肺癌患者的生存时间有显著的影响。为进一步了解 GRP78 是否为小细胞肺癌预后的独立因素,我们将单因素分析的结果进一步进行 Cox 多因素分析,结果显示,GRP78 的表达与预后有关,进一步证实了 GRP78 的表达可以作为非小细胞肺癌独立的预后因素。

总结此次研究结果,我们发现了 GRP78 的表达与非小细胞肺癌生物学特性及预后的关系。我们推测,GRP78 可能参与了非小细胞肺癌的发生、发展,这就需要进一步做更多的实验来验证 GRP78 在非小细胞肺癌中的功能及应用价值。GRP78 将有可能成为预测非小细胞肺癌复发和预后的一个有价值的肿瘤分子标志物。同时,我们也可以设想把 GRP78 作为一种新的非小细胞肺癌治疗的靶分子应用于基因治疗。通过基因手段抑制 GRP78 的高表达,抑制非小细胞肺癌的生长、侵袭和转移,提高非小细胞肺癌对于化疗药物的敏感性等。

参考文献 (References)

- [1] 支修益. 我国肺癌流行病学现状分析[J]. 中国处方药, 2009, 2:56-57
Zhi Xiu-yi. Lung Cancer Epidemiology Analysis[J]. Prescription Drugs, 2009, 2:56-57
- [2] 原玉芬,杨慧玲. 内质网应激与肿瘤细胞的凋亡[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(2):128-134
Yuan Yu-fen, Yang Hui-ling. Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis Of Tumor Cells[J]. Molecular Diagnosis and Therapy Journal, 2010, 2(2):128-134
- [3] 刘芳,邢晓明,李玉军,等. 结直肠癌癌组织 Grp78 表达及意义[J]. 青岛大学医学院学报, 2009, 45(3):253-254

- Liu Fang, Xing Xiao-ming, Li Yu-jun, et al. Colorectal Adenocarcinoma Grp78 Expression and Its Significance [J]. Qingdao University Medical College, 2009, 45(3):253-254
- [4] Zheng HC, Nakamura T, Zheng Y, et al. SV40 T antigen disrupted the cell metabolism and the balance between proliferation and apoptosis in lens tumors of transgenic mice[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135(11):1521-1532
- [5] Lee AS. GRP78 induction in cancer:therapeutic and prognostic implications[J].Cancer Res, 2007, 67(8): 3496-3499
- [6] 吴倩,张红,张和平. 组织芯片技术研究 cd147 和 mmp-2 在胃癌中的表达[J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45(1):43-46
- Wu Qian, Zhang Hong, Zhang He-ping. Tissue Microarray Technology Cd147 and Mmp-2 Expression in Gastric Cancer [J]. Anhui Medical University, 2010, 45(1):43-46
- [7] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2):71-96
- [8] Silvestri GA, Alberg AJ, Ravenel J. The changing epidemiology of lung cancer with a focus on screening[J]. BMJ, 2009, 339:451-454
- [9] Li J and Lee AS. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer [J]. Curr Mol Med, 2006, 6(1):45-54
- [10] Ortiz C, Cardemil L. Heat shock responses in two leguminous plants : a comparative study[J]. Exp Bot, 2001, 52(361):1712-1719
- [11] Yang Y, Turner RS, Gaut JR. The chaperone BiP/GRP78 binds to amyloid precursor protein and decreases Abeta 40 and Abeta 42 secretion [J]. Biol Chem, 1998, 273(40):25552-25555
- [12] 姜莉,张黎川,王琪. GRP78 表达下调可降低肺腺癌细胞对 VP-16 的耐药[J]. 中国肺癌杂志, 2009, 12(11):1159-1163
- Jiang Li, Zhang Li-chuan, Wang Qi. GRP78 Expression Down Can Reduce Lung Adenocarcinoma Cells Resistant To VP-16 [J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2009, 12(11):1159-1163
- [13] Fernandez PM, Tabbara SO, Jacobs LK, et al. Over expression of the glucose regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions[J]. Breast Cancer Res Treat, 2000, 59(1):125-126
- [14] Fu Y, Lee AS. Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy [J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(7):741-744
- [15] Jianze Li, Amy S. Lee, et al. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer Current Molecular Medicine, 2006, 6:45-54
- [16] Fernandez PM, Tabbara SO, Jacobs LK, et al. Over expression of the glucose regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions[J]. Breast Cancer Res Treat, 2000, 59(1):15-26
- [17] Zheng H, kahashi. Overexpression of GRP 78 and GRP94 are marker smarkers for aggressive behavior and Poor Prognosis in gastric carcinomas[J]. Hum Pathol, 2008, 39(7):1042-1049
- [18] 张莹,孙黎光.GRP78 的研究进展[J]. 国外医学·生理·病理科学与临床分册, 2005, 25(3):251-253
- Zhang Ying, Sun Li-guang. Advances In Research On GRP78[J]. Foreign Medical Physiology, Pathology, Scientific and Clinical Journal, 2005, 25(3):251-253
- [19] Zhuang L, Scolyer R A, LEE C S, et al. Expression of glucose-regulated stress protein GRP78 is related to progression of melanoma [J]. Histopathology, 2009, 54(4):462-470
- [20] 王琪,安利佳,陈誉华,等.内质网分子伴侣 GRP78 在人肺癌组织中的高表达及其临床意义[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(2):148-150
- Wang Qi, An Li-jia, Chen Yu-hua, et al. Endoplasmic Reticulum Molecular Chaperone GRP78 in Human Lung Cancer Tissue and Its Clinical Significance [J]. Chinese Medicine Journal, 2003, 83(2):148-150

(上接第 4247 页)

- [15] O'Driscoll L, Walsh N, Larkin A, et al. MDR1/P-glycoprotein and MR-P-1 drug efflux pumps in pancreatic carcinoma [J]. Anticancer Res, 2007, 27:2115-2120
- [16] Kageyama T, Ohishi M, Miyamoto S. Diphtheria toxin mutant CRM-197 possesses weak EF2-ADP-ribosyl activity that potentiates its anti-tumorigenic activity[J]. Biochem, 2007, 142(1):95-104
- [17] Fridman JS, Caulder E, Hansbury M, et al. Selective inhibition of ADAM metalloproteases as a novel approach for modulating ErbB pathways in cancer[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(6):1892-1902
- [18] Yagi H, Yotsumoto F, Sonoda K, et al. Synergistic anti-tumor effect of paclitaxel with CRM197, an inhibitor of HB-EGF, in ovarian cancer[J]. Int J Cancer, 2009, 124(6):1429-1439
- [19] Yagi H, Yotsumoto F, Miyamoto S. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor promotes transcoelomic metastasis in ovarian cancer through epithelial-mesenchymal transition [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(10):3441-3451
- [20] Buzzi S, Rubboli D, Buzzi G, et al. CRM197 (nontoxic diphtheria toxin): effects on advanced cancer patients[J]. Cancer Immunol Immunother, 2004, 53(11):1041-1048