

HSP90 α 和 HSP90 β 在肝癌中共同上调表达

杨 婧,曹凯悦,孙立新,遇 珑,孙力超,冉宇靓

(国家癌症中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院,分子肿瘤学国家重点实验室,北京 100021)

摘 要: [目的] 探讨热休克蛋白 90 α (HSP90 α) 和 HSP90 β 在肝癌中的表达及意义。 [方法] 采用免疫组化法检测 103 例肝癌组织和 79 例非肝癌相关组织 (正常肝组织, 肝炎, 肝硬化) 中 HSP90 α 和 HSP90 β 的表达, 并分析其与肝癌临床病理特征的关系。 [结果] 肝癌组织中, HSP90 α 和 HSP90 β 的阳性表达率分别为 82.52% 和 85.44%, 均显著高于非癌组织 ($P < 0.05$)。 HSP90 α 高表达与肝癌分化程度相关 ($P < 0.05$), 而与患者性别、病理类型、病理分期无关 ($P > 0.05$)。 HSP90 β 高表达与肝癌分化程度和 TNM 分期相关 ($P < 0.05$), 而与患者性别、病理类型无关 ($P > 0.05$)。 Spearman 相关性分析显示, HSP90 α 和 HSP90 β 在肝癌组织中协同表达 ($r = 0.535$, $P < 0.001$)。 [结论] HSP90 α 和 HSP90 β 在肝癌组织中共同表达上调, 可能可作为肝癌潜在的诊断和治疗靶点。

关键词: HSP90 α ; HSP90 β ; 肝癌

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2016)05-0391-04

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2016.05.A014

Up-regulated Expression of HSP90 α and HSP90 β in Liver Cancer

YANG Jing, CAO Kai-yue, SUN Li-xin, et al.

(State Key Laboratory of Molecular Oncology, National Cancer Center/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of HSP90 α and HSP90 β in liver cancer and its clinical significance. [Methods] The expression of the HSP90 α and HSP90 β proteins in 103 liver cancer specimens and 79 non-cancer tissues were detected by immunohistochemistry. The relationships between HSP90 α , HSP90 β and the clinicopathologic features of liver cancer were analyzed. [Results] Among 103 cases, the positive expressions of the HSP90 α and HSP90 β were detected in 82.52% and 85.44% respectively. The expressions of HSP90 α and HSP90 β in the cancer tissue were significantly higher than those in the non-cancer tissues ($P < 0.05$). The positive expression of HSP90 α was correlated with differentiation ($P < 0.05$), but not correlated with the gender, pathological types and TNM stage ($P > 0.05$). The positive expression of HSP90 β was correlated with differentiation and TNM stage ($P < 0.05$), but not correlated with the gender and pathological types ($P > 0.05$). Spearman rank correlation showed that HSP90 α and HSP90 β were significantly correlated with each other ($r = 0.535$, $P < 0.001$). [Conclusion] The expressions of HSP90 α and HSP90 β are high in liver cancer, indicating that HSP90 α and HSP90 β might be used as the potential diagnostic and therapeutic target for liver cancer.

Key words: HSP90 α ; HSP90 β ; liver cancer;

热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 是一类结构高度保守的蛋白质, 主要参与蛋白的转运、折叠、维持蛋白质自身稳定及免疫应答^[1], 在应激状态下与靶蛋白形成复合体, 以调节靶蛋白的活性和功能,

提高细胞对应激的耐受性, 是细胞在压力条件下生存的关键。HSP90 作为热休克蛋白家族成员之一, 参与了多种肿瘤的生长过程, 它可通过与客户蛋白结合发挥着重要的功能, 包括促进细胞生长、增殖和存活^[2]。人体细胞中分布最多的 HSP90 家族成员是 HSP90 α 和 HSP90 β , 这两种异构体, 分别由两个不同的基因编码表达, 同源性高达 84%, 但两者在正常细胞中的功能却不相同。虽然多种肿瘤中 HSP90

收稿日期: 2015-12-16; 修回日期: 2016-01-28

基金项目: 广西区域性高发肿瘤早期防治研究重点实验室开放课题——基于肿瘤干细胞亚群的肝癌新型分子分型的研究 (GK2013-KF01); 国家 863 计划青年科学家专题项目 (2014AA020537)

通讯作者: 冉宇靓, E-mail: ran_yuliang@126.com

的表达均呈现显著上调,但是 HSP90 α 和 HSP90 β 在各类肿瘤中的表达并不一致,例如,有报道显示在胰腺癌和喉癌组织中,HSP90 α 基因较特异地高表达,而 HSP90 β 基因表达量无明显变化。

已有研究表明 HSP90 及 HSP90 α 在肝癌中高表达,HSP90 β 是否在肝癌生长中发挥重要作用,以及它是否能作为肝癌治疗的靶点仍未明确。本研究采用免疫组化法检测肝癌组织中 HSP90 α 和 HSP90 β 表达水平,分析其意义。

1 材料与方法

1.1 标本来源

组织芯片购自西安艾丽娜生物科技有限公司,其中组织芯片 LV805 包含正常组织 29 例、肝炎 10 例以及肝硬化 40 例。组织芯片 BC03119 取自 103 例癌组织,其中男性 79 例,女性 24 例;患者平均年龄 51 ± 11 岁(中位年龄 51 岁,32~98 岁);肿瘤分化:高分化 9 例,中分化 64 例,低分化 20 例,未注明分化程度 10 例;根据国际抗癌联盟(UICC)1987 年公布的肝癌 TNM 分期法,其中 I 期 5 例,II 期 45 例,III 期 52 例,IV 期 1 例。

1.2 试剂

一抗鼠抗人 HSP90 α (ab79849)、HSP90 β (ab53497)单克隆抗体购自美国 abcam;SP 超敏免疫组化试剂盒、DAB 试剂盒购自福州迈新生物技术公司;苏木素购自北京益力精细化学品有限公司。

1.3 方法

免疫组织化学染色步骤:(1)芯片脱蜡和水化。(2)使用柠檬酸缓冲液对组织抗原热修复 30min。(3)自然冷却至室温。PBS 洗涤 3 次,每次 3min。(4)甩掉 PBS,加入内源性过氧化物酶阻断剂(迈新超敏组化试剂盒中 A 液)覆盖组织,室温孵育 20min。PBS 冲洗 3 遍,每次 3min。(5)甩去 PBS,加入动物非免疫血清(迈新超敏组化试剂盒中 B 液),室温封闭 20min。(6)甩去封闭液,加入 HSP90 α 、HSP90 β 抗体,于保湿盒中 4℃ 过夜孵育。(7)PBS 洗涤 3 次,每次 3min。(8)甩去 PBS,加入二抗——生物素标记的羊抗鼠/兔标记的 IgG (迈新超敏组化试剂盒中 C 液),PBS 洗涤 5 次,每次 3min。(9)甩去 PBS,加入链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(迈新超敏组化试

剂盒中 D 液),室温孵育 10min。PBS 洗涤 3 次,每次 3min。(10)甩去 PBS,加入新鲜配制的 DAB 显色液,显微镜下观察显色。自来水冲洗终止。(11)加入苏木素复染 5min,1%盐酸-75%酒精分色,自来水冲洗。(12)经过梯度酒精脱水干燥,中性树胶封片。

阳性结果判定:免疫组化阳性表达均为各自染色结构完整、定位明确、染色对比清晰,以细胞质出现棕黄色的细胞为标准。根据阳性细胞占切片内全部肿瘤细胞或非肿瘤细胞的比例将其分为阴性:未发现阳性细胞;弱阳性:阳性细胞 $<33.0\%$;中阳性:阳性细胞在 $34.0\%\sim 66.0\%$ 之间;强阳性:阳性细胞 $>67.0\%$ ^[3]。在本次实验的结果统计中,认定强阳性和中阳性为阳性,弱阳性和阴性为阴性。针对同一肝癌组织,若 HSP90 α 和 HSP90 β 均阳性则为共阳性表达。

1.4 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件对数据进行处理,各样本资料差异的统计学分析采用 χ^2 检验,相关性分析采用 Spearman 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HSP90 α 、HSP90 β 蛋白在肝癌中的表达

肝癌组织中 HSP90 α 蛋白主要定位于癌细胞胞质,少量定位于细胞核,阳性染色呈棕褐色(Figure 1);HSP90 β 蛋白主要定位于癌细胞胞质,阳性染色呈棕褐色(Figure 2)。HSP90 α 、HSP90 β 在肝癌组织中的阳性表达明显高于非癌组织,差异有统计学意义(P 均 <0.001)(Table 1)。HSP90 α 、HSP90 β 在 103 例肝癌组织中共阳性 80 例(77.67%),其中一项阳性 93 例(90.29%)。

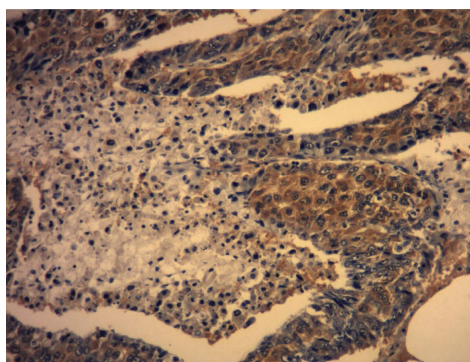


Figure 1 Positive expression of HSP90 α in liver cancer tissue($\times 200$)

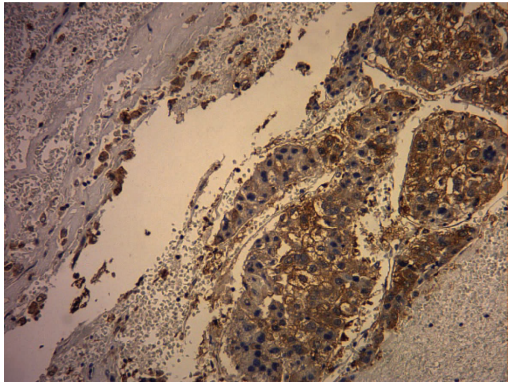


Figure 2 Positive expression of HSP90β in liver cancer tissue (×200)

Table 1 The expression of HSP90α and HSP90β in liver cancer tissue and non-cancer tissue

Group	n	HSP90α		HSP90β	
		-(%)	+(%)	-(%)	+(%)
Cancer	103	18(17.48)	85(82.52)	15(14.56)	88(85.44)
Cirrhosis	40	32(80.0)	8(20.0)	14(35.0)	26(65.0)
Inflammation	10	8(80.0)	2(20.0)	7(70.0)	3(30.0)
Normal	29	25(86.21)	4(13.79)	20(68.97)	9(31.03)

2.2 HSP90α、HSP90β 表达与肝癌临床特征的关系

HSP90α 表达与肝癌组织分化程度相关 ($\chi^2=6.092, P<0.05$), HSP90α 表达阳性率随组织分化程度的降低而升高;而与患者性别、病理类型、TNM 分期无关 ($P>0.05$)。HSP90β 表达与肝癌组织分化程度相关 ($\chi^2=10.939, P<0.01$), HSP90β 表达阳性率随组织分化程度的降低而升高;与病理分期也相关, I +

II 期组与 III + IV 期组的阳性率分别为 78.0% 和 92.5% ($\chi^2=4.319, P<0.05$);而与患者性别、病理类型无关 ($P>0.05$)。HSP90α 和 HSP90β 共表达与患者病理类型相关 ($\chi^2=5.048, P<0.05$), 而 HSP90α 或 HSP90β 高表达与组织分化程度相关 ($\chi^2=17.039, P<0.01$)。见 Table 2。

2.3 HSP90α 和 HSP90β 在肝癌中表达相关性

103 例肝癌患者中, HSP90α 和 HSP90β 共阳性 80 例, 共阴性 23 例, Spearman 相关性分析显示, 肝癌中 HSP90α 与 HSP90β 的表达呈显著正相关 ($r=0.535, P<0.001$)。

3 讨论

大量研究发现, HSP90 在恶性肿瘤生长过程中, 通过与其客户蛋白结合而参与了应激信号转导通路、生长信号通路和死亡受体信号转导等通路的调控, 参与了肿瘤细胞的生长和增殖, 在癌基因的通路中作为组成部分起重要作用^[4]。近来的肿瘤治疗研究中, HSP90 得到了越来越多的关注^[5,6], 在多种恶性肿瘤中都发现了 HSP90 的高表达^[7,8]。HSP90α 和 HSP90β 是 HSP90 家族中分布最多的异构体, 以往报道多认为是 HSP90α 在肿瘤中高表达, 而 HSP90β 为组成型表达, 其表达并未发生显著变化。但近来亦有研究显示 HSP90β 在肿瘤中也呈高表达^[9,10]。肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 以往已经有部分研究报道 HSP90α 在肝癌组织中高表达, 提

Table 2 The expression of HSP90α and HSP90β and clinical correlations

Index	n	HSP90α			HSP90β			HSP90α and HSP90β			HSP90α or HSP90β		
		Positive (%)	χ^2	P	Positive (%)	χ^2	P	Positive (%)	χ^2	P	Positive (%)	χ^2	P
Gender			0.537	0.464		0.107	0.744		1.743	0.187		0.278	0.598
Male	79	64(81.0)			67(84.8)			59(74.7)			72(91.1)		
Female	24	21(87.5)			21(87.5)			21(87.5)			21(87.5)		
Pathological types			3.718	0.054		2.993	0.084		5.048	0.025		1.888	0.169
Cholangiocarcinoma	15	15(100)			15(100)			15(100)			15(100)		
Hepatocellular	88	70(79.6)			73(82.9)			65(73.9)			78(88.7)		
Differentiation			6.092	0.048		10.939	0.004		4.532	0.104		17.039	<0.001
High	9	5(55.6)			5(55.6)			5(55.6)			5(55.6)		
Middle	64	55(85.9)			56(87.5)			51(79.7)			60(93.8)		
Low	20	18(90.0)			20(100)			18(90.0)			20(100)		
TNM stage			0.429	0.512		4.319	0.038		1.801	0.180		2.041	0.153
I + II	50	40(80.0)			39(78.0)			36(72.0)			43(86.0)		
III + IV	53	45(84.9)			49(92.5)			44(83.0)			50(94.3)		

示了 HSP90 α 可能在肝癌发生发展中发挥重要作用,但 HSP90 β 异构体在肝癌中的表达少见报道。

我们检测的结果显示,103 例肝癌中 88 例 HSP90 β 表达阳性,HSP90 β 在肝癌组织中的表达显著高于正常肝组织、肝炎和肝硬化 ($P<0.01$),HSP90 β 的高表达与分化程度密切相关 ($P<0.05$),分化程度越低,HSP90 β 表达水平越高;此外,HSP90 β 表达与肝癌的临床分期密切相关,临床分期越晚,HSP90 β 表达越高 ($P<0.05$);提示 HSP90 β 的表达与肝癌的疾病进展具有一定的相关性,这与其他研究者在小细胞肺癌及淋巴瘤中获得的相关研究结果相符合^[9]。考虑到 HSP90 β 在正常组织中主要是作为分子伴侣参与细胞分化的调节,这些结果提示了 HSP90 β 是否可能参与了肝癌细胞的恶性增殖和分化的调节,从而促进肝癌的发生发展值得进一步研究。

与以往的相关报道类似,我们检测的 103 例肝癌中,85 例 HSP90 α 表达阳性,表达水平较正常肝组织、肝炎和肝硬化显著增高 ($P<0.01$)。HSP90 α 的阳性表达与分化程度相关 ($P<0.05$),肝癌组织的分化越低,HSP90 α 的表达水平越高,提示 HSP90 α 的表达随着肿瘤恶性程度的升高而提高,这与其他研究者在白血病中得到研究结果相类似^[11]。提示了 HSP90 α 可能参与了肝癌发生发展的调控。

本研究明确报道了 HSP90 β 在肝癌中高表达,且与肝癌分化、进展相关;上述研究结果提示了 HSP90 α 和 HSP90 β 在肝癌发生发展中均发挥了重要的作用,其分子作用机制值得进一步研究,尤其是 HSP90 β ;同时也表明了不仅是 HSP90 α ,HSP90 β 也同时可以作为肝癌治疗的潜在靶点。

虽然在一些种类的肿瘤中 HSP90 α 和 HSP90 β 在同一病灶中的表达并不一致,有的肿瘤高表达 HSP90 α ,但却仅组成型表达 HSP90 β 。然而我们发现,在肝癌中 HSP90 α 与 HSP90 β 的表达呈显著正相关,可能是在肝癌发生发展的过程中,两者可通过协同表达影响肝癌细胞的增殖和分化,促进肝癌发生发展。但是,两者协同表达对于肝癌发生发展的意义还有待进一步的研究来阐明。

综上所述,HSP90 α 和 HSP90 β 在肝癌组织中表达上调,且与疾病恶性分化程度和进展有关。提示 HSP90 α 和 HSP90 β 均具有作为肝癌潜在的诊断标

志物和治疗靶点的重要潜力。

参考文献:

- [1] Jayaprakash P,Dong H,Zou M,et al. Hsp90alpha and Hsp90beta together operate a hypoxia and nutrient paucity stress-response mechanism during wound healing[J]. J Cell Sci,2015,128(8):1475-1480.
- [2] Shiota T,Ojima H,Hiraoka N,et al. Heat shock protein 90 is a potential therapeutic target in cholangiocarcinoma [J]. Mol Cancer Ther,2015,14(9):1985-1993.
- [3] Cappello F,Rappa F,David S,et al. Immunohistochemical evaluation of PCNA,p53,HSP60,HSP10 and MUC-2 presence and expression in prostate carcinogenesis [J]. Anticancer Res,2003,23(2B):1325-1331.
- [4] Su YH,Tang WC,Cheng YW,et al. Targeting of multiple oncogenic signaling pathways by Hsp90 inhibitor alone or in combination with berberine for treatment of colorectal cancer [J]. Biochim Biophys Acta,2015,1853 (10 Pt A): 2261-2272.
- [5] Jhaveri K,Taldone T,Modi S,et al. Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers [J]. Biochim Biophys Acta,2012,1823 (3):742-755.
- [6] Garcia-Carbonero R,Carnero A,Paz-Ares L. Inhibition of HSP90 molecular chaperones:moving into the clinic [J]. Lancet Oncol,2013,14(9):e358-e369.
- [7] Wang J,Cui S,Zhang X,et al. High expression of heat shock protein 90 is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in patients with advanced gastric cancer[J]. PLoS One,2013,8(4):e62876.
- [8] Cheng Q,Chang JT,Geradts J,et al. Amplification and high-level expression of heat shock protein 90 marks aggressive phenotypes of human epidermal growth factor receptor 2 negative breast cancer [J]. Breast Cancer Res, 2012,14(2):R62.
- [9] Wu Y,Huang B,Liu Q,et al. Heat shock protein 90-beta over-expression is associated with poor survival in stage I lung adenocarcinoma patients [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015,8(7):8252-8259.
- [10] Lee JH,Kang KW,Kim JE,et al. Differential expression of heat shock protein 90 isoforms in small cell lung cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol,2015,8(8):9487-9493.
- [11] Tian WL,He F,Fu X,et al. High expression of heat shock protein 90 alpha and its significance in human acute leukemia cells[J]. Gene,2014,542(2):122-128.