

内质网应激蛋白 GRP78 在宫颈癌组织中的表达及意义^{*}

刘 卿^{1,2}, 汪俊涛², 秦 娟², 郭 兵^{1**}

(1. 贵州医科大学 病理生理学教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳市妇幼保健院, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] 目的: 观察内质网应激蛋白 GRP78 在宫颈癌组织中的表达情况, 探讨宫颈癌组织中 HPV 感染状态与 GRP78 表达的关系。方法: 收集手术切除的宫颈癌组织标本 89 例, 分析高危型 HPV 感染和低危型 HPV 感染与患者年龄、病理分化、临床分期及淋巴结转移的关系, 用免疫组化法检测 GRP78 在不同 HPV 亚型感染的宫颈癌组织中的表达情况。结果: 在宫颈癌组织中, HPV(+) 感染率在低分化鳞癌中高于高分化鳞癌($P < 0.05$), 宫颈癌 II 期中高于宫颈癌 I 期($P < 0.05$), 有淋巴结转移的患者中高于无淋巴结转移的患者($P < 0.05$); GRP78 蛋白在高危型 HPV 感染的宫颈癌组织中阳性表达率显著高于低危型 HPV 感染及 HPV 阴性的宫颈癌组织($P < 0.01$), 而 GRP78 在低危型 HPV 感染及 HPV 阴性的宫颈癌组织中表达无明显差异($P > 0.05$)。结论: HPV(+) 感染率随宫颈癌恶性程度增高而增加, 高危型 HPV 感染的宫颈癌组织中 GRP78 蛋白呈高表达。

[关键词] 宫颈肿瘤; 人乳头瘤病毒; 内质网应激; 葡萄糖调节蛋白 78

[中图分类号] R363.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)07-0763-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.07.005

Expression and Significance of Endoplasmic Reticulum Stress Protein GRP78 in Cervical Cancer Tissues

LIU Qing^{1,2}, WANG Juntao², QIN Juan², GUO BING¹

(1. Department of Pathology and Physiology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Guiyang Maternal and Child Health-Care Hospital, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To observe expression of endoplasmic reticulum stress protein GRP78 in cervical cancers and discuss the possible relationship between HPV infection status and GRP78 in cervical cancers. **Methods:** 89 cervical cancer tissue specimens were obtained from surgical resection in department of Obstetrics and Gynecology, and the statistical method was also adopted to analyze the correlations between HPV infection status in cervical cancer tissues and patients' indexes involving age, pathological differentiation, clinical stage and lymph node metastasis, respectively. Then, the expression of GRP78 in cervical cancer tissues infected with different HPV subtypes was detected by immunohistochemical method. **Results:** In clinical cervical cancer tissues, the infection rate of HPV(+) in cervical cancer tissues were higher in poorly differentiated squamous carcinoma than those in high differentiated squamous carcinoma ($P < 0.05$). The infection rate of HPV(+) in stage II cervical cancer tissues were higher than in stage I cervical cancer tissues ($P < 0.05$). The infection rate of HPV(+) in cervical cancer tissues with lymph node metastasis were higher than those without lymph node metastasis in cervical cancer specimens ($P < 0.05$). Immunohistochemistry showed that the positive expression rate of GRP78 in high-risk HPV-infected cervical cancer tissues was significantly higher than that in low-risk HPV-infected and HPV-negative cervical cancer tissues ($P < 0.01$), and the ex-

^{*} [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(NS2015-36); 贵州省科学技术基金[黔科合 LH(2014)7297 号]; 贵阳市卫生局科学技术计划资助项目[(2013)筑卫科技合同字第创 21 号]

^{**} 通信作者 E-mail: 395112185@qq.com

网络出版时间: 2017-07-13 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170713.2305.010.html>

pressions of GRP78 in low-risk HPV-infected and HPV-negative cervical cancer tissues had no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusions:** HPV (+) infection was positively correlated with the degree of malignancy of cervical cancer. GRP78 protein was related to the high-risk HPV infection.

[**Key words**] cervical tumor; human papilloma virus; endoplasmic reticulum stress; glucose regulatory protein 78

宫颈癌(cervical cancer)是发生于子宫颈鳞状上皮和腺上皮的一种恶性肿瘤,主要组织学类型是鳞癌,腺癌次之,是最常见的女性生殖道恶性肿瘤,发病率在女性恶性肿瘤中位居第2位^[1]。研究认为,高危型人乳头瘤病毒(human papillo-mavirus, HPV)感染是导致宫颈病变和宫颈癌的主要因素^[2],临床上根据不同亚型 HPV 与肿瘤发生的危险性的高低,将 HPV 分为低危型和高危型两大类。高危型 HPV 目前有 15 种,如 HPV16、18、31、33、35 等,主要引起宫颈癌等恶性肿瘤,世界各国研究的宫颈鳞癌中以 HPV16 型最常见,而宫颈腺癌则以 HPV18 型最常见^[3]。近年来研究表明,内质网应激与肿瘤密切相关,外界的许多不良刺激(如病毒感染、炎症、缺血缺氧等)都会导致细胞内质网稳态失衡,出现内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)^[4-5]。葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein 78, GRP 78)是内质网上的一种应激蛋白,其参与蛋白质的折叠和转运,在 ERS 发生时 GRP 78 表达增高^[6]。本实验通过比较 89 例宫颈癌组织样本中不同 HPV 亚型感染情况与患者年龄、病理分化、临床分期及淋巴转移的关系,采用免疫组化法检测不同 HPV 亚型感染的宫颈癌组织中 GRP78 表达情况,探讨宫颈癌中 HPV 感染状态与 GRP78 之间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2010 年 1 月~2014 年 1 月手术切除的宫颈癌组织标本 89 例,所有标本均已确诊是宫颈癌组织,且手术前均未进行放化疗,同时采集宫颈癌相关的临床病理资料:病患年龄(≤ 50 岁与 > 50 岁)、不同 HPV 亚型(已通过 HPV-DNA 检测确诊 HPV 亚型,分为 HPV 高危组、HPV 低危组和 HPV 阴性组)、病理分化类型(高分化、中分化和低分化)、临床分期(I 期和 II 期)、淋巴转移。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 宫颈癌组织样本 PBS

洗涤 2 次后,用含 4% 多聚甲醛 PBS 固定 24 h,梯度脱水与石蜡包埋,切成 5 μm 薄片;切片经脱蜡与水化,微波抗原修复 10 min,3% H_2O_2 室温孵育 10 min 灭活内源性过氧化物酶,10% 羊血清封闭 60 min,山羊抗人 GRP 78 抗体(1:100, Abcam)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,兔抗羊抗体(1:200, sigma)室温孵育 60 min, DAB 显色,脱水、封片后,显微镜下观察。

1.2.2 阳性标记强度判定标准 随机取 5 个高倍镜($\times 200$)视野下观察,每个视野观察 200 个细胞,统计并进行评分:阳性染色细胞数 $\leq 25\%$ 计 1 分,阳性染色细胞数 25%~49% 计 2 分,阳性细胞数 $\geq 50\%$ 的计 3 分;无染色为 0 分,淡黄色为 1 分,黄色 2 分,棕黄色 3 分;最后得分是阳性细胞评分和染色评分相乘。根据评分将其分为 4 个等级:0~1 分为阴性(-),2~3 分为弱阳性(+),4~6 分及为阳性(++),7~9 分为强阳性(+++)。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 20.0 统计学软件对实验数据进行处理。临床实验数据为等级计数资料,用率(%)表示,组间差异比较采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。多组实验数据间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异有高度统计学意义。

2 结果

2.1 宫颈癌 HPV 感染

在宫颈癌组织中,HPV(+)感染率在宫颈低分化鳞癌中高于高分化鳞癌,差异有统计学意义($P < 0.05$);HPV(+)感染率在宫颈癌 II 期中高于宫颈癌 I 期,差异有统计学意义($P < 0.05$);HPV(+)感染率在宫颈癌有淋巴结转移的患者中高于无淋巴结转移的患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 宫颈癌组织中 GRP78 表达

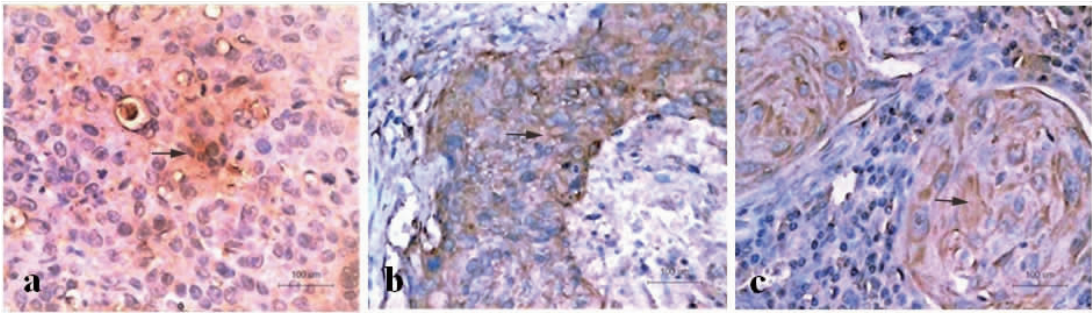
GRP78 在高危型 HPV、低危型 HPV 以及 HPV 阴性感染的宫颈癌组织中都有不同程度的阳性表

达,在高危型 HPV 感染的宫颈癌组织中阳性表达率显著高于低危型 HPV 感染及 HPV 阴性的宫颈癌组织,差异有统计学意义($P<0.01$),而 GRP78 在低危型 HPV 感染及 HPV 阴性的宫颈癌组织中表达差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 1 和表 2。

表 1 高危型 HPV 和低危型 HPV 表达与宫颈癌临床病理($n, \%$)

Tab. 1 The expression between high-risk HPV and low-risk HPV in clinicopathological features of cervical cancer

指标	n	HPV(+)		HPV(-)	Z/χ^2	P
		高危	低危			
年龄(岁)						
≤50	45	39(86.7)	2(4.4)	4(8.9)	-0.294	0.768
>50	44	39(88.6)	2(4.5)	3(6.8)		
病理分化						
高分化	17	12(70.6)	2(11.8)	3(17.6)	9.045	0.011
中分化	20	16(80.0)	1(5.0)	3(15.0)		
低分化	52	50(96.2)	1(1.9)	1(1.9)		
临床分期						
I 期	24	18(75.0)	2(8.3)	4(16.7)	-2.201	0.028
II 期	65	60(92.3)	2(3.1)	3(4.6)		
淋巴转移						
有	60	56(93.3)	2(3.3)	2(3.3)	-2.375	0.018
无	29	22(75.9)	2(6.9)	5(17.2)		



注:a 为高危型 HPV 感染的宫颈鳞癌(低分化),b 为低危型 HPV 感染的宫颈鳞癌(中分化),
c 为阴性 HPV 感染的宫颈鳞癌(高分化)

图 1 GRP78 在宫颈癌组织中的表达($\times 200$)

Fig. 1 Expression of GRP78 in cervical cancer tissues

表 2 GRP78 在不同 HPV 亚型感染的宫颈癌组织中的表达($n, \%$)

Tab. 2 Comparison of GRP78 expression in cervical cancer tissues infected different HPV subtypes

分组	GRP78				χ^2	P
	-	+	++	+++		
高危($n=78$)	0(0.0)	10(12.8)	34(43.6)	34(43.6)	14.240	0.001
低危($n=4$)	2(50.0)	1(25.0)	1(25.0)	0(0.0)		
阴性($n=7$)	3(42.9)	1(14.3)	2(28.6)	1(14.3)		

3 讨论

宫颈癌是最常见的女性生殖系统恶性肿瘤,2012 年 WHO 组织最新报道,世界每年宫颈癌新发病例 52.8 万,2015 年癌症中心统计我国宫颈癌每

年新发病例约有 9.89 万,死亡病例约有 3.05 万,其发病率及致死率较高,严重威胁着女性的生命健康^[7]。宫颈癌传统治疗方法以手术、化疗以及放疗为主,但生存率仍不理想。因此,对宫颈癌病因、发病机制的研究,以及寻求更敏感、更有效的宫颈癌治疗方法非常必要。近年来研究表明,高危型

HPV 感染是导致宫颈病变和宫颈癌的主要因素, HPV 病毒癌基因与宿主细胞的 DNA 整合, 导致宫颈上皮细胞发生恶性转化^[8]。HPV 病毒是一种小的无包膜小 DNA 病毒, 由 8 个基因组成, 包括 6 个早期表达基因 (E_1 、 E_2 、 E_4 、 E_5 、 E_6 、 E_7) 和 2 个晚期基因 (L_1 、 L_2)^[9]。高危型 HPV 的 E_6 、 E_7 系病毒癌基因, 它们分别与抑癌基因 P_{53} 和 Rb 结合, 导致细胞周期失控 (细胞过度增殖、分化不良、永生化)、基因突变等改变, 最终引起子宫颈上皮内瘤变直至演变成宫颈癌^[10]。近年来研究表明内质网应激与肿瘤关系密切, 肿瘤的发生、发展与内质网应激密切相关, 故研究宫颈癌中的 HPV 感染状态与内质网应激的关系有一定意义^[11]。GRP78 亦称免疫球蛋白重链结合蛋白, 在内质网中, GRP78 参与蛋白质的修饰、折叠和转运, 并促进蛋白质的正确折叠, 维持内质网正常功能。GRP78 同时也是内质网上的一种应激蛋白, 在内质网应激下 GRP78 表达明显增高, 以维持内质网稳态从而利于细胞存活^[12]。有研究表明, 高表达的 GRP 78 可抑制前凋亡成分 Caspase-3 的激活, 启动 UPR 促进未折叠或错误折叠的蛋白正确折叠, 维持内质网钙稳态和内环境稳定, 促进肿瘤细胞的存活^[13]。此外, 有研究指出 GRP78 可作为肿瘤生长和治疗效果的生物学标记^[14]。

本课题组前期研究表明, 宫颈癌组织中 GRP78 阳性率 94.38%, 高于慢性宫颈炎 (60%) 和正常宫颈组织 (53.7%), 且 GRP78 在宫颈癌组与慢性宫颈炎组间的表达差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 宫颈癌组与正常组宫颈间 GRP78 的表达差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 慢性宫颈炎组与正常宫颈组间 GRP78 的表达差异无统计学意义 ($P = 0.206$), 且 GRP78 表达与宫颈癌恶性程度呈正相关, 与 Dong D 等^[13]学者的研究结果一致, 以上结果说明 GRP 78 与宫颈癌有一定相关性。而本研究从临床病例统计中发现在 89 例宫颈癌组织标本中, HPV (+) 感染在年龄组中比较无明显差异 ($P > 0.05$); HPV (+) 感染在病理分化组中比较, 低分化鳞癌组 HPV 感染率最高, 低分化鳞癌组与高分化鳞癌组间比较具有明显差异 ($P < 0.05$), 低分化鳞癌组与中分化鳞癌组间比较无明显差异 ($P > 0.05$), 中分化鳞癌组与高分化鳞癌组间比较也无明显差异 ($P > 0.05$); HPV (+) 感染在宫颈癌临床分期组中比较, 临床 I 期与临床 II 期两者间比较具有明显差异 ($P < 0.05$); HPV (+) 感染在淋巴转移组中比较, 有淋巴转移组与无淋巴转移组两者间比

较具有明显差异 ($P < 0.05$)。此外, 本研究从组织学角度证实 GRP78 在高危型 HPV 感染的宫颈癌组织中表达显著高于低危型 HPV 感染和 HPV 阴性的宫颈癌组织, 该结果表明高危型 HPV 感染的宫颈癌组织中 GRP78 呈现高表达。

本次实验结果表明在宫颈癌中, 随宫颈癌的分级越低、临床分期越晚、淋巴转移阳性的情况下, HPV (+) 感染率越高, 也即肿瘤恶性程度高; 说明 HPV (+) 感染率与宫颈癌的恶性程度呈正相关。GRP78 在宫颈癌组织中表达显著高于正常宫颈组织, 且在高危型 HPV 感染的宫颈癌组织中呈现高表达, 提示高危型 HPV 感染宫颈上皮后可能显著诱导了 GRP78 的高表达, 也进一步证实了 GRP78 蛋白与宫颈癌的密切相关性, 因有研究表明 GRP78 可作为肿瘤生长和治疗效果的生物学标记, 且本课题组前期结果提示 GRP78 表达与宫颈癌恶性程度呈正相关, 故 GRP78 可考虑作为宫颈癌治疗效果及预后判断的生物学标记。

4 参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. [J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2012 (1): 58 - 63.
- [2] Arbyn W, Ronco G, Anttila A, et al. Evidence Regarding Human Papillomavirus Testing in Secondary Prevention of Cervical Cancer [J]. Vaccine, 2012 (Suppl. 5): F88 - F99.
- [3] 崔英, 胥爱辉, 蔡永娥, 等. 人乳头瘤病毒 (HPV) 致宫颈癌的分子机制研究 [J]. 现代肿瘤医学, 2008 (1): 143 - 145.
- [4] Xu Y, Chiu JF, He QY, et al. Tubeimoside-I exerts cytotoxicity in HeLa cells through mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress pathways. [J]. Journal of Proteome Research, 2009 (3): 1585 - 1589.
- [5] Hung JY, Hsu YL, Ni WC, et al. Oxidative and endoplasmic reticulum stress signaling are involved in dehydrocostuslactone-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. [J]. Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands), 2010 (3): 355 - 358.
- [6] Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, et al. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. [J]. Journal of Clinical Investigation, 2009 (5): 1201 - 1206.
- [7] 殷爱军. DNA 甲基化检测在宫颈癌筛查中的应用 [D]. 济南: 山东大学, 2016.

(下转第 771 页)

添加于各类食品或作为药用,从而提高淫羊藿药渣的再开发利用价值。

4 参考文献

[1] 周达彪,唐懋华. 中药渣农业循环利用模式产业化探讨[J]. 上海蔬菜, 2007(6):112-115.

[2] 庄毅,洪净. 药用真菌双向性固体发酵工程与中成药药渣再开发[J]. 中国中药杂志, 2006(22):1918-1919.

[3] 付亮,袁璟亚,丁春邦,等. 淫羊藿药渣中多糖的提取及其体外抗氧化活性评价[J]. 食品工业科技, 2016(1):116-120.

[4] 马婷,王丽娜,李子坚,等. 淫羊藿苷抗肿瘤作用的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2017(9):1505-1508.

[5] 许碧连,吴铁. 淫羊藿总黄酮药理作用的研究现状[J]. 中国临床药理学与治学, 2003(1):115-117

[6] 刘江亭,林永强,张学兰,等. 白术麸炒前后饮片和水煎

液中总糖、多糖含量测定比较[J]. 中医药学报, 2016(5):15-17.

[7] 陈纬,邹焰. 人参、淫羊藿增强小鼠免疫功能的协同作用[J]. 遵义医学院学报, 2001(1):2-6.

[8] 张俊生,陈莉华,汤小虎,等. 淫羊藿总黄酮的超声辅助提取及其抗氧化活性[J]. 生物加工过程, 2012(1):13-18.

[9] Srinivasa RK, Chaudhury PK, Pradhan A. Evaluation of anti-oxidant activities and total phenolic content of *Chromolaena odorata*[J]. Food & Chemical Toxicology An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2010(2):729-731.

[10] 高锦明,植物化学[M]. 北京:科学出版社, 1995:156-191.

[11] 雷永涛,李莉,郝小燕,等. 淫羊藿总黄酮的提取和分离纯化工艺研究[J]. 贵阳医学院学报, 2012(2):137-140.

(2017-04-18 收稿,2017-06-26 修回)

中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 赵 毅

(上接第 762 页)

[12] Martelli C, Dei S, Lambert C, et al. Inhibition of P-glycoprotein-mediated Multidrug Resistance (MDR) by N, N-bis(cyclohexanol)amine aryl esters; Further restriction of molecular flexibility maintains high potency and efficacy[J]. Bioorg Med Chem let, 2011(21):106-109.

[13] Burg D, Riepsaame J, Pont C, et al. Peptide-bond modified glutathione conjugate analogs modulate GSTpi function in GSH-cojugation, drug sensitivity and JNK signaling[J]. Biochem Pharmacol, 2006(3):268-277.

[14] Perez-Sayans M, Somoza-Martin JM, Barros-Angueira F, et al. Multidrug resistance in oral squamous cell carcinoma; The role of vacuolar ATPase[J]. Cancer Lett, 2010

(2):135-143.

[15] Sun LR, Zhong Ji, Cui SX, et al. Modulation of P-glycoprotein activity by the substituted quinoxalinone compound of QA3 in Adriamycin-resistant K562/A02 cells [J]. Pharmacol Rep, 2010(2):333-342.

[16] Ling X, He X, Apontes P, et al. Enhancing effectiveness of the MDR-sensitive compound T138067 using advanced treatment with negative modulators of the drug-resistant protein survivin[J]. AM J Transl Res, 2009(4):393-405.

(2017-02-18 收稿,2017-04-29 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 苏晓庆

(上接第 766 页)

[8] Reid JL, Wright TC, Stoler MH, et al. Human Papilloma-virus oncogenic mRNA testing for cervical cancer screening [J]. American Journal of Clinical Pathology, 2015(3):473-483.

[9] Doorbar JJNM, Quint W, Banks L, et al. The Biology and life-cycle of human papillomaviruses[J]. Vaccine, 2012 (Suppl. 5):F55-F70.

[10] Schiller JTSM, Castellsague X, Garland SM. A Review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines[J]. Vaccine, 2012(Suppl. 5):F123-F138.

[11] 吴芳,安永康,朱艳琴. 内质网应激与肿瘤细胞凋亡研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2014(9):2228-2231.

[12] Zhu G, Lee ASAU. Role of the Unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis [J]. Journal of Cellular Physiology, 2015(7):1413-1420.

[13] Dong D, Dubeau L, Bading J, et al. Spontaneous and controllable activation of suicide gene expression driven by the stress-inducible grp78 promoter resulting in eradication of sizable human tumors[J]. Human Gene Thera-py, 2004(6):553.

[14] 周玮. GRP78 的表达与肿瘤发生发展的关系—Meta 分析[D]. 武汉:华中科技大学, 2011.

(2017-04-07 收稿,2017-06-26 修回)

中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 乐 萍