

HSPA2 在胰腺癌中的表达及其临床意义

吴 杨, 黄 强

摘要 目的 检测并对比热休克蛋白 A2(HSPA2) 在胰腺癌及癌旁胰腺组织中的表达水平, 分析 HSPA2 蛋白在胰腺癌标本中的表达水平与其临床病理参数之间的相关性。方法

采用实时定量 PCR、Western blot 法检测并对比胰腺癌及癌旁胰腺组织中 HSPA2 蛋白和 mRNA 的表达水平, 采用免疫组织化学染色方法测定胰腺癌患者组织中 HSPA2 蛋白的表达, 并探讨其表达与临床病理特征之间的关系。结果 与癌旁胰腺组织相比, 胰腺癌组织中 HSPA2 mRNA 和蛋白表达水平均明显升高。HSPA2 蛋白在胰腺癌组织中的阳性表达率为 68.8% (55/80)。HSPA2 蛋白表达量与胰腺癌的分化程度、血管侵犯、TNM 分期差异有统计学意义 ($P=0.011$ 、 0.005 、 0.012), 而与患者性别、年龄、肿块大小及位置、血清 CA199 水平差异无统计学意义。结论 HSPA2 在胰腺癌组织中的表达明显高于与之相应的癌旁胰腺组织, 且 HSPA2 的高表达与胰腺癌的恶性进展、侵袭和转移等事件密切相关。

关键词 胰腺癌; 热休克蛋白 A2; 侵袭转移

中图分类号 R 735.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)08-1179-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.017

胰腺癌是常见的消化系统恶性肿瘤, 隐匿性浸润和早期快速播散的特点使得胰腺癌成为世界范围内癌症相关死亡率最高的肿瘤之一^[1]。热休克蛋白 A2(heat shock protein A2, HSPA2) 是热休克蛋白 70 家族中的一员, 这种在精子发育和精卵结合过程中发挥重要作用的蛋白, 最近被发现多种人类侵袭性肿瘤中异常高表达, 并调控肿瘤的增殖、侵袭等重要事件^[2]。因此, 研究 HSPA2 在胰腺癌中的表达情况并分析其表达与胰腺癌增殖、侵袭和转移的关系, 对探索胰腺癌的发生进展机制和诊治方法具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 标本 实时定量 PCR 及 Western blot 标本随机选取 15 例在 2015 年 11 月~2016 年 3 月于安徽省立医院胆胰外科行胰十二指肠切除手术的病例, 切取手术标本肿瘤边缘的非坏死胰腺癌组织及相邻的癌旁胰腺组织, 尽快 -80 °C 条件保存备用。全部标本术后均经本院病理科诊断为胰腺导管细胞腺癌。免疫组织化学染色标本随机选取 80 例在 2014 年 12 月~2016 年 1 月于安徽省立医院胆胰外科行胰十二指肠切除手术且术后本院病理科诊断为胰腺导管细胞腺癌的石蜡包埋标本切片。全部患者术前未接受放疗及介入等肿瘤相关治疗。胰腺癌组织病理遵从消化系统肿瘤世界卫生组织(WHO) 分类第四版标准。胰腺癌 TNM 分期遵从国际抗癌联盟/美国癌症联合委员会(UICC-AJCC) 分期系统第七版标准。

1.2 主要试剂 实时定量 PCR 所使用 TRIzol 溶液购自美国 Invitrogen 公司; 第一链 cDNA 合成试剂盒购自美国 ThermoFisher 公司; 荧光定量试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; Western blot 所使用全蛋白提取试剂盒购自南京凯基公司; PVDF 膜购自美国 Millipore 公司; 抗 HSPA2 抗体购自美国 Abcam 公司; 免疫组织化学染色所使用 SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物公司。

1.3 方法

1.3.1 实时定量 PCR 经 TRIzol 抽提、分相、沉淀、洗脱、再溶解获得纯化总 RNA; 按说明书配置逆转录体系, 42 °C、60 min、70 °C、10 min 合成 cDNA 模板; 按说明书配置扩增体系, 使用 HSPA2 引物(F: 5'-GCCGCTATAAGAACCGGGAA-3', R: 5'-ATCCT-GACTGAAAGCGGAGC-3')、GADPH 引物(F: 5'-CG-GAGTCAACGGATTTGGTCTGAT-3', R: 5'-AGCCT-TCTCCATGGTGGTGAAGAC-3') 设定 95 °C 预变性 30 s, 95 °C、5 s, 60 °C、30 s 重复 40 个循环; 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 的相对表达倍数。

1.3.2 Western blot 提取组织总蛋白后标准曲线法检测蛋白浓度; 混合上样缓冲液沸水中水浴 5

2017-05-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81272397); 安徽省自然科学基金面上项目(编号: 1408085MKL70)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院普通外科, 合肥 230001

作者简介: 吴 杨, 男, 硕士研究生;

黄 强, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: po_bid@163.com

min,等量上样,SDS-PAGE 胶电泳;半干转膜法转移蛋白至 PVDF 膜;PVDF 膜浸入封闭液 1 h,漂洗后浸入一抗液 4 ℃ 过夜,漂洗后浸入二抗液 2 h,漂洗后 ECL 化学发光显影定影;ImageJ 软件检测条带灰度值,以目的条带与 β-actin 条带灰度比值计算表达量。

1.3.3 免疫组织化学染色 石蜡包埋切片标本使用二甲苯脱蜡、梯度酒精水化、抗原修复、封闭内源性过氧化物酶活性后,加一抗液 4 ℃ 过夜,加即用型二抗室温 1 h;DAB 显色、苏木精复染;梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片镜检。随机选取切片中 5 个高倍视野,细胞明显的棕褐色颗粒计 3 分,棕黄色计 2 分,淡黄色计 1 分,无染色计 0 分。染色细胞百分比 ≤10% 计 1 分, >50% 计 3 分,两者之间为 2 分。染色深度计分与染色细胞百分比的乘积算得总分。总分 ≥2 分为阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,采用独立样本的 *t* 检验。率的比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺癌和癌旁胰腺组织中 HSPA2 的表达量

实时定量 PCR 和 Western blot 结果显示 HSPA2 mRNA 和蛋白在胰腺癌及癌旁胰腺组织中有表达。HSPA2 mRNA 和蛋白在胰腺癌标本组中的的表达量均显著高于癌旁组。HSPA2 mRNA 在 86.7% (13/15) 的胰腺癌组织中的表达显著高于与之相对应的癌旁胰腺组织,胰腺癌组中 HSPA2 mRNA 的表达量显著高于癌旁组 (*P* = 0.024)。HSPA2 蛋白在 66.7% (10/15) 的胰腺癌组织中的表达显著高于与之相对应的癌旁胰腺组织,胰腺癌组中 HSPA2 蛋白的表达量显著高于癌旁组 (*P* = 0.034)。见图 1。

2.2 胰腺癌组织切片中的 HSPA2 蛋白的表达及与临床病理参数的相关性

HSPA2 蛋白在胰腺癌中的免疫组织化学染色如图 2 所示。判定染色情况并统计相关临床病理参数制表分析显示,HSPA2 蛋白在胰腺癌组织中的阳性表达率为 68.8% (55/80)。HSPA2 蛋白表达量与胰腺癌的分化程度、血管侵犯、TNM 分期有显著相关性 (*P* = 0.011、0.005、0.012),而与患者性别、年龄、肿块大小及位置、血清 CA199 水平无明显相关性。见表 1。

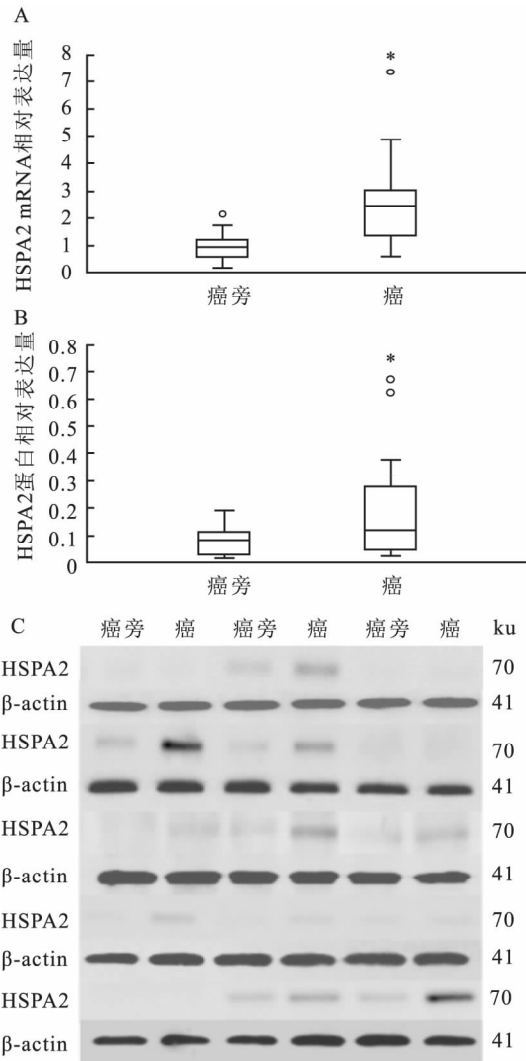


图 1 胰腺癌和相应癌旁胰腺组织中 HSPA2 的表达量

A: HSPA2 mRNA 相对表达量; B、C: HSPA2 蛋白的表达量; 与癌旁组比较: * *P* < 0.05

3 讨论

HSP 作为一种具有重要生理功能的伴侣蛋白质分子,广泛参与机体的损伤修复和保护过程^[3]。HSPA2 是人类睾丸中的生精特异性蛋白,在精子发生、成熟以及精卵识别中发挥重要作用^[4]。多项研究^[5]证明 HSPA2 在肺癌、食管癌、膀胱癌、宫颈癌的组织标本和细胞株中高表达。这提示 HSPA2 可能在人类肿瘤的发生和发展中扮演重要角色。

为了解 HSPA2 在胰腺癌中的表达情况,本实验通过检测并对比 15 对胰腺癌和癌旁胰腺组织中 HSPA2 mRNA 和蛋白的表达水平,证实 HSPA2 在胰

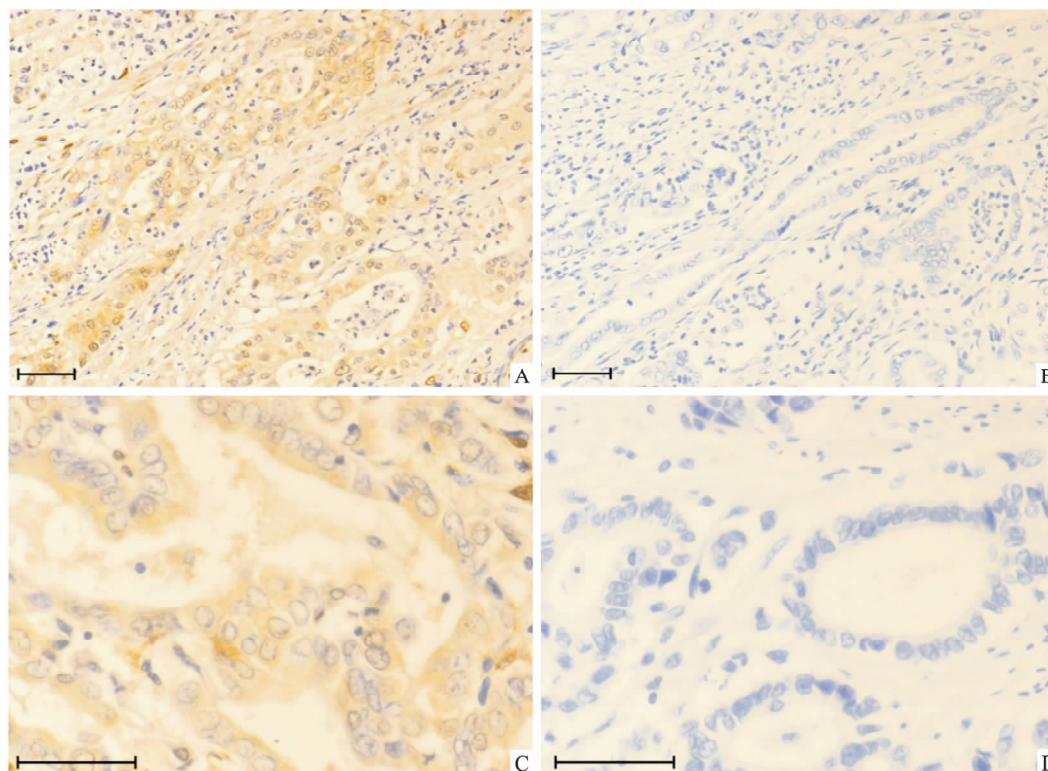


图2 免疫组织化学染色所示 HSPA2 蛋白在胰腺癌切片标本中的表达

A: 阳性表达 ×200; B: 阳性表达 ×400; C: 阴性表达 ×200; D: 阴性表达 ×400

表1 HSPA2 在 80 例胰腺癌组织中的表达及其与临床相关病理参数间的关系 (n = 80)

| 临床病理参数 | n | HSPA2 的表达情况 (n) | | χ ² 值 | P 值 |
|-----------------|----|-----------------|------|------------------|-------|
| | | 阴性表达 | 阳性表达 | | |
| 年龄 (岁) | | | | | |
| ≤60 | 50 | 14 | 36 | 0.656 | 0.418 |
| >60 | 30 | 11 | 19 | | |
| 性别 | | | | | |
| 女 | 35 | 10 | 25 | 0.208 | 0.649 |
| 男 | 45 | 15 | 30 | | |
| 血清 CA199 (U/ml) | | | | | |
| ≤37 | 20 | 7 | 13 | 0.175 | 0.676 |
| >37 | 60 | 18 | 42 | | |
| 肿瘤大小 (cm) | | | | | |
| ≤2 | 39 | 13 | 26 | 0.154 | 0.695 |
| >2 | 41 | 12 | 29 | | |
| 肿瘤部位 | | | | | |
| 胰头 | 62 | 20 | 42 | 0.130 | 0.718 |
| 胰体、胰尾 | 18 | 5 | 13 | | |
| 分化程度 | | | | | |
| 高 | 44 | 19 | 25 | 6.479 | 0.011 |
| 中低 | 36 | 6 | 30 | | |
| 血管侵犯 | | | | | |
| 无 | 49 | 21 | 28 | 7.930 | 0.005 |
| 有 | 31 | 4 | 27 | | |
| TNM 分期 | | | | | |
| I | 41 | 18 | 23 | 6.267 | 0.012 |
| II + III + IV | 39 | 7 | 32 | | |

腺癌组织中的翻译和转录水平均明显高于与之相对应的癌旁胰腺组织。推测 HSPA2 的表达激活可能在胰腺癌的发生和进展过程中发挥重要作用。为了进一步探索 HSPA2 在胰腺癌中的高表达的意义。本实验通过免疫组织化学染色法对 80 例胰腺癌切片标本中的 HSPA2 蛋白表达情况进行检测分析显示 HSPA2 蛋白在胰腺癌切片标本中不同程度表达,且 HSPA2 的阳性率与血管侵犯、肿瘤分化程度及 TNM 分期有显著相关性,说明 HSPA2 的高表达与胰腺癌的恶性进展、侵袭和转移等行为密切相关。多项研究^[2]表明 HSPA2 在多种侵袭性肿瘤中较高水平表达, HSPA2 基因沉默可以导致肿瘤细胞增殖、侵袭和移植瘤生长能力的大幅降低。这说明 HSPA2 可能对胰腺癌的增殖、侵袭转移具有重要意义。一项针对非小细胞肺癌的研究^[6]运用免疫组织化学染色方法显示 HSPA2 在鳞癌中的阳性率 (73%) 显著高于腺癌 (41%), 且核内染色阳性率与肺癌的分级及分期密切相关, HSPA2 在核内表达的意义仍不明确, 可能涉及对遗传物质稳定性的保护。虽然 HSPA2 在膀胱尿路上皮癌、宫颈癌等肿瘤中的表达明显高于相应癌旁组织^[7-8], 但在肺鳞癌中的表达水平与相应癌旁正常肺组织中的表达水平差异

无统计学意义。HSPA2 在人体不同组织和不同组织来源肿瘤中的不同表达模式值得进一步深入研究。

另外, HSPA2 在肿瘤中的表达调控和作用机制方面的相关研究成果甚少。大量研究^[9] 结果表明热刺激并不能促进人类 HSPA2 基因的表达。但有研究^[10] 观察到非小细胞肺癌来源的细胞株中 HSPA2 蛋白在温度升高刺激下会从细胞质快速向细胞核、核仁以及中心体区域聚集, HSPA2 可能对应激状态下的肿瘤细胞核和中心体的完整性提供保护作用。低氧是实体肿瘤发展过程中面临的关键问题, 有研究^[11] 证实低氧诱导因子 HIF-1 能作为转录因子与 HSPA2 转录起始位点上游的低氧应答元件 HRE 相互作用, 从而激活 HSPA2 基因在肿瘤细胞中的表达。继续深入对 HSPA2 在肿瘤中的表达调控和作用机制的研究, 对探索其在胰腺癌发生发展中的作用具有重要意义。

综上所述, HSPA2 在胰腺癌组织中的表达明显高于与之相应的癌旁胰腺组织, 且 HSPA2 在胰腺癌中高表达与肿瘤的恶性进展、侵袭和转移等行为密切相关。HSPA2 的表达激活可能在胰腺癌的发生发展过程中发挥重要作用。

参考文献

- [1] Rahib L, Smith B D, Aizenberg R, et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(11): 2913–21.
- [2] Scieglinska D, Krawczyk Z. Expression, function, and regulation

- of the testis-enriched heatshock HSPA2 gene in rodents and humans [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2015, 20(2): 221–35.
- [3] Feder M E, Hofmann G E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology [J]. *Annu Rev Physiol*, 2003, 61: 243–82.
- [4] Dix D J, Allen J W, Collins B W, et al. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(8): 3264–8.
- [5] Scieglinska D, Krawczyk Z. Expression, function, and regulation of the testis-enriched heat shock HSPA2, gene in rodents and humans [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2015, 20(2): 221–35.
- [6] Scieglinska D, Goglerpigłowska A, Butkiewicz D, et al. HSPA2 is expressed in human tumors and correlates with clinical features in non-small cell lung carcinoma patients [J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(6): 2833–40.
- [7] Garg M, Kanojia D, Seth A, et al. Heat-shock protein 70-2 (HSP70-2) expression in bladder urothelial carcinoma is associated with tumour progression and promotes migration and invasion [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(1): 207–15.
- [8] Garg M, Kanojia D, Saini S, et al. Germ cell-specific heat shock protein 70-2 is expressed in cervical carcinoma and is involved in the growth, migration, and invasion of cervical cells [J]. *Cancer*, 2010, 116(16): 3785–96.
- [9] Zakeri Z F, Welch W J, Wolgemuth D J. Characterization and inducibility of hsp 70 proteins in the male mouse germ line [J]. *J Cell Biol*, 1990, 111(5 Pt 1): 1785–92.
- [10] Scieglinska D, Pigłowski W, Mazurek A, et al. The HspA2 protein localizes in nucleoli and centrosomes of heat shocked cancer cells [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 104(6): 2193–206.
- [11] Habryka A, Goglerpigłowska A, Sojka D, et al. Cell type-dependent modulation of the gene encoding heat shock protein HSPA2 by hypoxia-inducible factor HIF-1: Down-regulation in keratinocytes and up-regulation in HeLa cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1849(9): 1155–69.

Expression and clinical significance of HSPA2 in pancreatic cancer

Wu Yang, Huang Qiang

(Dept of General Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To detect the expression of HSPA2 mRNA and protein in pancreatic cancer and corresponding adjacent nontumorous tissues, and investigate the expression of HSPA2 protein in pancreatic cancer and its association with clinicopathological characteristics. **Methods** Western blot and qPCR (real-time quantitative PCR) was used to evaluate HSPA2 expression in pancreatic cancer and corresponding adjacent nontumorous tissues. Immunohistochemistry was used to investigate the HSPA2 expression in pancreatic cancer and its association with clinicopathological characteristics. **Results** Both the mRNA and protein levels of HSPA2 were significant higher in pancreatic cancer tissues than those in their paired adjacent nontumorous tissues. High HSPA2 expression was detected in 68.8% (55/80) of pancreatic cancer tissues. HSPA2 protein expression was significantly associated with tumor differentiation, vascular invasion, and status of metastasis ($P = 0.011, 0.005, 0.012$). **Conclusion** HSPA2 expression is elevated in pancreatic cancer, and positively correlated the process of invasion, metastasis and progression of pancreatic cancer.

Key words pancreatic cancer; HSPA2; invasion metastasis