

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.05.013

· 临床研究 ·

热激蛋白 47 在人脑胶质瘤组织中的表达及其临床意义

苏静缘, 李晓明 (沈阳军区总医院 神经外科, 辽宁 沈阳 110016)

[摘要] **目的:** 研究热激蛋白 47(heat shock protein 47, HSP47) 在人脑胶质瘤组织中的表达情况及其临床意义。**方法:** 收集 2008 年 1 月至 2009 年 12 月沈阳军区总医院神经外科收治并手术的 92 例胶质瘤患者的肿瘤组织和同期手术切除病理诊断为胶质细胞增生的非胶质瘤组织 10 例, 另有 15 例冻存的胶质瘤组织(收集于 2014 年 5 月至 2014 年 6 月), 应用免疫组织化学方法、Western blotting 检测其中 HSP47 蛋白的表达部位及表达水平, 并结合随访资料分析 HSP47 蛋白表达与临床病理指标、患者生存期之间的关系。**结果:** HSP47 阳性主要定位于Ⅲ、Ⅳ级胶质瘤细胞胞质和血管内皮细胞, HSP47 在胶质瘤组织中表达率为 52.17%、在非胶质瘤组织中无表达, χ^2 检验非肿瘤组和胶质瘤组之间 HSP47 表达的差异有统计学意义($\chi^2 = 9.855, P = 0.002$)。不同年龄、性别胶质瘤患者间 HSP47 蛋白的表达差异无统计学意义($P = 0.423, P = 0.820$); HSP47 蛋白随着 WHO 病理级别增高阳性表达逐渐增多($P < 0.05$)。HSP47 蛋白低表达组患者中位生存时间明显长于高表达组患者[43 (95% CI, 22.4 ~ 63.6) vs 17 (95% CI, 14.5 ~ 19.5)个月, $P < 0.01$]。**结论:** HSP47 在胶质瘤中过表达, 并与病理级别呈正相关, 高表达患者预后不良; HSP47 可以作为胶质瘤诊断和治疗的新靶点。

[关键词] HSP47; 胶质瘤; 免疫组织化学; Western blotting

[中图分类号] R739.41; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)05-0625-05

Expression and clinical significance of heat shock protein 47 in gliomas

Su Jingyuan, Li Xiaoming (Department of Neurology, General Hospital of Shenyang Military Command, Shenyang 110016, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression profile of heat shock protein-47 (HSP47) in glioma and evaluate the diagnostic and prognostic significance of HSP47 in clinical settings. **Methods:** Biopsy specimens were collected from 92 patients diagnosed with glioma and 10 patients diagnosed with gliosis between January, 2008 and December, 2009 at General Hospital of Shenyang Military Command. Additional 15 frozen glioma specimens collected between May, 2014 and June, 2014 were obtained. Immunoreactive HSP47 protein signals in these specimens were assessed by immunohistochemical staining and Western blotting. The prognostic significance of HSP47 was assessed by Kaplan-Meier survival analysis. **Results:** HSP47 was positive in 52.17% of glioma specimens but was undetectable in non-glioma specimens ($\chi^2 = 9.855, P = 0.002$). In HSP47-positive Ⅲ、Ⅳ-grade glioma specimens, the immunoreactive HSP47 protein signal was mainly located the cytoplasm of vascular endothelial cells. HSP47 expression was significantly associated with the pathological grade of the lesion ($P < 0.05$) but not with gender ($P = 0.423$) and age ($P = 0.820$). The medium survival time was significantly longer in patients with low levels of HSP47 (43 months, 95% CI, 22.4 ~ 63.6) than in patients with high levels of HSP47 (17 months, 95% CI, 14.5 ~ 19.5) ($P < 0.001$). **Conclusion:** HSP47 is overexpressed in glioma and its expression level is positively correlated with the pathological grade of the lesion. Our observations suggest that HSP47 may serve as a prognostic factor and a therapeutic target.

[Key words] heat shock protein 47; glioma; immunohistochemical staining; Western blotting

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(5): 625-629]

[基金项目] 辽宁省自然科学基金资助项目(No. 201202240)。Project supported by the Nature Science Foundation of Liaoning Province (No. 201202240)

[作者简介] 苏静缘(1987 -), 女, 辽宁省沈阳市人, 硕士, 医师, 主要从事神经病理学基础与临床研究, E-mail: nijing5231@163.com

[通信作者] 李晓明(Li Xiaoming, corresponding author), E-mail: lxm5668sw@yahoo.com

胶质瘤(glioma)是最常见的颅内肿瘤, 其中 IV 级胶质瘤又被称为成胶质母细胞瘤(glioblastomas, GBMs), 是恶性程度最高的胶质瘤^[1]。胶质瘤细胞具有与正常胶质细胞相似的形态特点, 并按照胶质细胞分类(星型胶质细胞和少突胶质细胞) 将胶质瘤分为星型胶质细胞瘤(astrocytomas)、少突胶质细胞瘤(oligodendrogliomas) 和星形细胞加少突细胞的混合胶质瘤(oligoastrocytomas)。根据 2007 年 WHO 分类标准^[2], 将胶质瘤分为低级别胶质瘤(low-grade, WHO grade I and II) 和高级别胶质瘤(high-grade, WHO grade III + IV)。目前认为, 手术切除、放疗是治疗胶质瘤最有效的方法, 但不能有效地延长胶质瘤患者的生存期。因此研究与胶质瘤发生、发展相关的重要分子, 将对胶质瘤的诊断和治疗提供有意义的新靶点。热激蛋白 47(heat shock protein, HSP47) 是一种胶原特异性分子伴侣, 与胶原合成密切相关, 在不同类型的胶原的形成和成熟过程中有重要作用^[3]。目前, 已有研究^[4]证实, HSP47 在胶质瘤血管中表达, 并且与胶质瘤血管发生有关^[5-6]。HSP47 在基因水平上在胶质瘤各级别间存在差异, 但 HSP47 的蛋白表达, 与胶质瘤分级、临床特征之间的关系, 以及是否能作为胶质瘤诊断生物学指标还未见报道。本研究针对我院胶质瘤患者的肿瘤组织, 应用 Western blotting 和免疫组织化学方法检测 HSP47 蛋白在不同级别胶质瘤组织中的表达情况, 并且结合随访资料分析 HSP47 表达对预后的影响, 以期对胶质瘤的诊断与治疗寻找新的分子靶点。

1 材料与方法

1.1 标本采集及其临床资料

92 例胶质瘤蜡块标本收集于 2008 年 1 月至 2009 年 12 月沈阳军区总医院神经外科收治的患者, 经手术切除后病理诊断为胶质瘤, 其中男性 50 例、女性 42 例, 年龄(15 ~ 69) 岁, 平均年龄(45.4 ± 13.2) 岁。按照 2007 年 WHO 胶质瘤分类标准: II 级 22 例, III 级 34 例, IV 级 36 例。正常脑组织标本 10 例, 取同期手术切除病理诊断为胶质细胞增生的非胶质瘤病例, 作为对照组。92 例患者进行随访调查, 随访截止至 2014 年 12 月。

15 例冻存于液氮中的手术切除胶质瘤组织收集于 2014 年 5 月至 2014 年 6 月沈阳军区总医院神经外科收治的患者, 其中 II 级 3 例、III 级 4 例、IV 级 5 例和作为对照的胶质细胞增生的非胶质瘤病例 3 例, 组织提取蛋白备用。

1.2 主要试剂

兔抗人 HSP47 单克隆抗体购自 Abcam 公司, 小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体购自博士德生物工程有限公司, 免疫组化应用二抗抗体、DAB 试剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗抗体购自博士德生物工程有限公司, Pro-light HRP 化学发光检测试剂购自天根生物科技有限公司, BCA 蛋白浓度测定试剂购自碧云天生物技术有限公司。

1.3 免疫组化法检测胶质瘤及非胶质瘤组织中 HSP47 蛋白的表达

病理切片常规脱蜡至水; 蒸馏水洗净后柠檬酸微波修复 15 min, 自然冷却至室温, PBS 洗; 3% 过氧化氢孵育 10 min, 以阻断内源性过氧化物酶, PBS 洗; 10% BSA 封闭 10 min; 滴加一抗(HSP47 1:400), 放于湿盒中, 4 °C 孵育过夜, PBS 冲洗; 滴加生物素标记的二抗, 37 °C 孵育 1 h, PBS 冲洗; DAB 显色, 充分水洗; 苏木精浅染 5 min, 充分水洗; 乙醇脱水, 二甲苯透明, 封片。在显微镜($\times 200$) 下计数细胞, 每张切片上随机选择 10 个不重叠视野, 每个标本计数 5 张切片。HSP47 表达以综合染色强度和阳性细胞数(占总细胞数的百分比) 进行半定量判定: (1) 染色强度评分: 细胞无显色为 0 分, 浅黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分; (2) 阳性细胞数比例评分: 阳性细胞占总细胞数 < 10% 为 1 分, 11% ~ 50% 为 2 分, 51% ~ 80% 为 3 分, > 81% 为 4 分。上述两项评分之和小于 < 4 分为低表达(low expression), ≥ 4 分为高表达(high expression)。

1.4 Western blotting 检测胶质瘤冻存标本组织中 HSP47 蛋白的表达

取冻存于液氮的胶质瘤组织, 称重后用组织裂解液匀浆处理; 离心后取上清, BCA 法测蛋白浓度, 平衡蛋白浓度后变性处理; 12% SDS-PAGE, 并转至 NC 膜; 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h; 一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 漂洗后用相应的过氧化物酶标记二抗室温孵育 1 h; TBST 漂洗后经 Pro-light HRP 化学发光检测试剂发光, 用 X-ray 显影, 计算蛋白相对表达量。实验重复 3 次。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件, 计数资料以百分比表示, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 正常组织与胶质瘤组织间以及不同病理分级间 HSP47 蛋白的表达情况比较均采用 χ^2 检验, 应用 Kaplan - Meier 法进行预后生存分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HSP47 蛋白在胶质瘤组织中呈高表达

免疫组织化学染色结果(图 1)显示,HSP47 阳性细胞(呈棕黄色)主要位于肿瘤细胞胞质(^)和

Ⅲ、Ⅳ级胶质瘤的血管内皮细胞(*),在非肿瘤脑组织中几乎未见 HSP47 阳性细胞。随着 WHO 病理级别增加,HSP47 阳性表达逐渐增多,说明 HSP47 蛋白的表达可能与胶质瘤恶性程度有关。

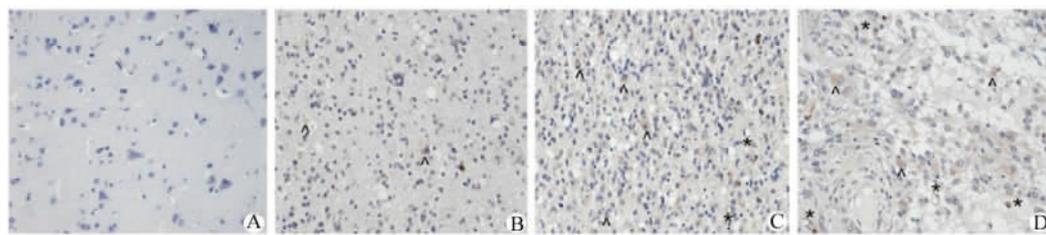


图 1 免疫组化染色检测 HSP47 在人脑胶质瘤组织中的表达(×200)

Fig. 1 Immunohistochemical assessment of HSP47 in glioma tissues (×200)

A:Non-glioma;B:Ⅱ grade glioma;C:Ⅲ grade glioma;D:Ⅳ grade glioma

* :The endothelial cells; ^:The cytoplasm

2.2 HSP47 在各级别胶质瘤组织中的表达水平及其与临床病理指标的关系

10 例非胶质瘤组织中 HSP47 无表达(阳性率为 0);92 例胶质瘤中 HSP47 高表达 48 例(52.17%),经 χ^2 检验非肿瘤组和胶质瘤组之间 HSP47 的表达差异有统计学意义($\chi^2 = 9.855, P = 0.002$)。

临床因素分析结果(表 1)显示,HSP47 蛋白表达在不同年龄、性别的胶质瘤患者组间差异没有统计学意义($P = 0.423, P = 0.820$)。HSP47 蛋白在Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ级胶质瘤组织中高表达,其表达率分别为 18.2%(4/22)、55.9%(19/34)和 69.4%(25/36);胶质瘤 WHO 级别越高,其 HSP47 蛋白的表达也越高,经 χ^2 检验证实,各级别间 HSP47 蛋白的表达差异有统计学意义($P < 0.001$)。

2.3 Western blotting 检测在各级胶质瘤组织中 HSP47 蛋白的表达

各级别胶质瘤中 HSP47 蛋白相对含量(Ⅱ级为 0.76 ± 0.05 、Ⅲ级为 0.89 ± 0.032 、Ⅳ级 1.18 ± 0.23)显著高于非胶质瘤中 HSP47 蛋白相对含量(0.23 ± 0.04)($P < 0.01$);不同级别的胶质瘤各组间两两比较,差异均有统计学意义(Ⅱ级 vs Ⅲ级, $P = 0.032$;Ⅱ级 vs Ⅳ级, $P = 0.019$;Ⅲ级 vs Ⅳ级, $P = 0.027$,图 2)。Western blotting 结果也表明 HSP47 蛋白含量与胶质瘤恶性程度有关。

2.4 HSP47 蛋白表达与患者预后关系分析

评估 92 例胶质瘤患者总生存期与 HSP47 蛋白表达之间的关系,结果(图 3、表 2)显示,92 例胶质

瘤患者的中位生存时间为 23 个月,其中 HSP47 低表达患者的中位生存时间为 43 个月、HSP47 高表达患者的中位生存时间为 17 个月;应用 Kaplan-Meier 法 Log-rank 检验结果表明,HSP47 蛋白低表达组患者中位生存时间明显高于高表达组患者($P < 0.001$)。

表 1 HSP47 在胶质瘤中的表达及其与临床病理特征的关系(n)

Tab. 1 Correlation of HSP47 with clinicopathologic variables in glioma patients(n)

Characteristic	N	HSP47 expression		χ^2	P
		Low	High		
Gender					
Male	50	22	28	0.643	0.423
Femal	42	22	20		
Age(t/a)					
<45	24	11	13	0.052	0.820
≥45	68	33	35		
WHO					
Ⅱ	22	18	4	14.678	<0.01
Ⅲ	34	15	19		
Ⅳ	36	11	25		

3 讨论

HSP47 是一种丝氨酸家族蛋白,细胞应激条件下,HSP47 在细胞表面表达并伴随着内体囊泡(endosomal compartments)的碱性变化,其在肿瘤的发展、侵袭和转移过程中有重要作用。已有研究显示,HSP47 在多种肿瘤中如肺癌^[7-8]、胰腺癌^[9]、胃癌^[10]、溃疡性结肠癌^[11]以及头颈部鳞状细胞癌^[12]中高表达。Zhao 等^[6]在胶质瘤细胞中敲除 HSP47 基因,发现肿瘤细胞的生长、侵袭和转移受到抑制,说明 HSP47 调节胶质瘤的发展;该研究也发现在胶质瘤细胞中 miR-29a 能有效调节 HSP47 的表达;HSP47 可能是 miR-29a 调节潜在的下游靶点。

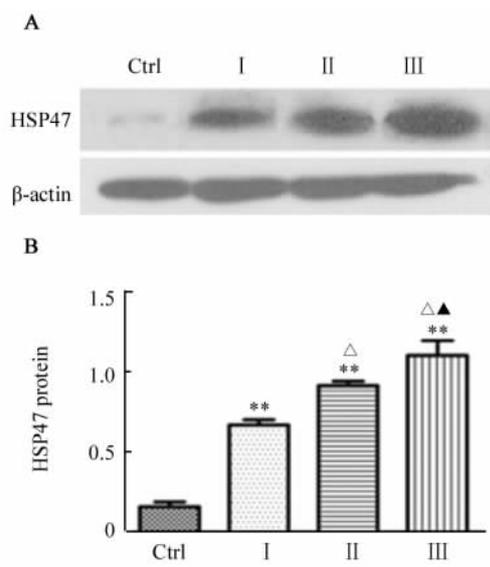


图2 HSP47 蛋白在人脑不同级别胶质瘤组织中的表达情况

Fig. 2 Western blotting analysis of HSP47

A: A representative Western blot; B: Quantitative analysis of the protein levels

** $P < 0.01$ vs Ctrl; $\Delta P < 0.05$ vs II grade glioma group; $\blacktriangle P < 0.05$ vs III grade glioma group

本研究应用免疫组织化学和 Western blotting 技术在蛋白水平研究 HSP47 在胶质瘤中的表达情况,发现 HSP47 主要分布胶质瘤细胞的胞质以及高级别胶质瘤组织的血管内皮细胞中,而在与非胶质瘤脑组织中未发现 HSP47 的表达;对不同级别的胶质瘤各级别间比较发现,HSP47 与胶质瘤恶性程度呈正相关,高级别胶质瘤明显比低级别胶质瘤 HSP47 表达量多。本研究患者预后分析结果显示,HSP47 蛋白低表达组患者的中位生存时间明显高于高表达

组患者的中位生存时间,这说明 HSP47 高表达患者可能预后不良。Wu 等^[1]通过定量胶质瘤患者外周血单核细胞中 HSP47 的细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)反应来检测 HSP47 与胶质瘤的关系,发现 HSP47 在胶质瘤中过表达,并且与肿瘤级别相关;另外,HSP47 CTL 反应阳性的胶质瘤患者生存期较 CTL 反应阴性的长。另外,本实验同时发现在正常脑微血管壁上未见 HSP47 阳性表达,而在 III、IV 高级别胶质瘤血管内皮细胞中存在 HSP47 阳性表达,提示 HSP47 可能与恶性胶质瘤血管生成有关,可能是血管发生的早期分子标志物。Mustafa 等^[4]应用免疫组化双染技术也发现 HSP47 与内皮细胞标记 CD31、CD34 和 CD105 共表达,HSP47 存在于成胶质细胞瘤血管壁内皮细胞,并与胶质瘤内皮细胞活化和血管发生有关。Wu 等人^[13]敲除 HSP47 明显抑制人脐静脉内皮细胞的形成、侵袭和增殖,相似的敲除 HSP47 明显减少胶质瘤 VEGF 的表达,减少胶质瘤血管生成;而 HSP47 促进胶质瘤血管生成依赖于 HIF-1 α -VEGFR2 信号通路。

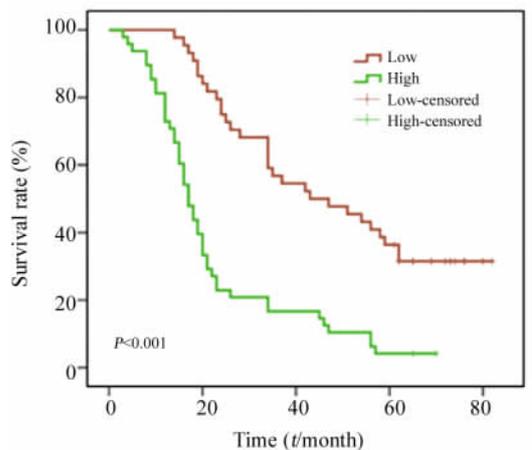


图3 不同 HSP47 表达水平的胶质瘤患者的 Kaplan-Meier 存活曲线

Fig. 3 Kaplan-Meier survival curves for patients with different levels of HSP47

综上,HSP47 主要在胶质瘤细胞质和高级别胶质瘤血管内皮细胞表达;HSP47 在胶质瘤中的表达显著高于非肿瘤组织,并且随着肿瘤级别的增高 HSP47 表达也增高,HSP47 的高表达明显与胶质瘤患者预后相关,说明 HSP47 可能在胶质瘤发生、发展过程中起着重要的作用。因此,HSP47 可能成为胶质瘤临床诊断的标记物,作为靶向分子有可能成为胶质瘤治疗的潜在靶点,但相关机制还有待进一步研究。

表 2 HSP47 表达与胶质瘤患者生存期的关系

Tab. 2 Correlation between HSP47 expression and overall survival time in glioma patients

HSP47	<i>n</i>	OS(<i>t</i> /month)	95% CI	χ^2	<i>P</i>
Low expression	44	43	22.4 – 63.6	29.40	<0.001
High expression	48	17	14.5 – 19.5		
Overall survival time	92	23	18.3 – 27.7		

[参考文献]

- [1] Wu ZB, Cai L, Qiu C, et al. CTL responses to HSP47 associated with the prolonged survival of patients with glioblastomas [J]. Neurology, 2014, 82(14): 1261-1265.
- [2] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system [J]. Acta Neuro-pathol, 2007, 114(2):97-109.
- [3] Coletta RD, Almeida OP, Ferreira LR, et al. Increase in expression of hsp47 and collagen in hereditary gingival fibromatosis is modulated by stress and terminal procollagen n-propeptides [J]. Connect Tissue Res, 1999, 40(4):237-249.
- [4] Zhao D, Jiang X, Yao C, et al. Heat shock protein 47 regulated by mir-29a to enhance glioma tumor growth and invasion [J]. J Neurooncol, 2014, 118(1): 39-47.
- [5] Mustafa DA, Sieuwerts AM, Zheng PP, et al. Overexpression of colligin 2 in glioma vasculature is associated with overexpression of heat shock factor 2 [J]. Gene Regul Syst Bio, 2010, 4:103-107.
- [6] Mustafa D, Weiden M, Zheng P, et al. Expression sites of colligin 2 in glioma blood vessels [J]. Brain Pathol, 2010, 20(1): 50-65.
- [7] Kakuqawa T, Yokota S, Ishimatsu Y, et al. Serum heat shock protein 47 levels in patients with drug-induced lung disease [J]. Respir Res, 2013, 14: 133.
- [8] Haqiwwara S, Iwasaka H, Matsumoto S, et al. Association between heat stress protein 70 induction and decreased pulmonary fibrosis in an animal model of acute lung injury [J]. Lung, 2007, 185(5): 287-293.
- [9] Cao D, Maitra A, Saavedra Ja, et al. Expression of novel markers of pancreatic ductal adenocarcinoma in pancreatic nonductal neoplasms: additional evidence of different genetic pathways [J]. Mod Pathol, 2005, 18(6): 752-761.
- [10] Tsukimi Y, Nakai H, Itoh S, et al. Involvement of heat shock proteins in the healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats [J]. J Physiol Pharmacol, 2001, 52(3):391-406.
- [11] Araki K, Mikami T, Yoshida T, et al. High expression of hsp47 in ulcerative colitis-associated carcinomas: Proteomic approach [J]. Br J Cancer, 2009, 101(3):492-497.
- [12] Lee SS, Tseng LH, Li YC, et al. Heat shock protein 47 expression in oral squamous cell carcinomas and upregulated by arecoline in human oral epithelial cells [J]. J Oral Pathol Med, 2011, 40(5): 390-396.
- [13] Wu ZB, Cai L, Lin SJ, et al. Heat shock protein 47 promotes glioma angiogenesis [J]. Brain Pathol, 2015, doi: 10. 1111/bpa. 12256. [Epub ahead of print].

[收稿日期] 2015 - 04 - 22

[修回日期] 2015 - 08 - 10

[本文编辑] 阮芳铭

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中计量单位使用的要求

本刊严格执行国务院颁发的《中华人民共和国法定计量单位》，全面贯彻国家标准 GB3100-3102-1993《量和单位》的规定，正确使用量和单位的名称和符号。(1)量符号以斜体拉丁和希腊字母表示(pH 用正体除外)，例如 *m*(质量)、*t*(时间)、*c*(浓度)、*V*(体积)、*p*(压力)、*F*(力)等。(2)单位符号一律以正体拉丁或希腊字母表示，例如 kg(千克)、m(米)、h(小时)、mol/L(摩尔每升)等。(3)表示人体检验指标的浓度或质量浓度时，一般使用 L(升)作为检验组成含量单位的分母。(4)表示用药剂量单位时，不能写成 mg/kg/d 的形式，应写成 mg/(kg · d)或 mg · kg⁻¹ · d⁻¹的形式。(5)单位符号常见书写错误：长度单位符号 A°(埃)已不用，应写作 0.1 nm；时间单位“小时”符号为 h(不是 hr)、“秒”符号为 s(不是 sec)；转速单位符号为 r/min(不是 rpm)；量浓度单位符号为 mol/L(不是 M、N，也不是 mol/mm³)；力的单位“牛顿”符号为 N(不是 dyn(达因))、kgf(千克力)，换算 1 dyn = 10⁻⁵N；热量单位“焦耳”符号为 J(不是 cal(卡))、kcal(千卡)，换算 1 cal = 4. 187 J；放射性活度单位符号为 Bq(不是 Ci(居里))，换算 1 Ci = 3. 7 × 10¹⁰Bq]。

(本刊编辑部)