

恶性肿瘤组织中 HSP70、P53 表达与中医热证的关系

王洪琦¹ 张 正¹ 赵燕平² 李建国¹ 陈 凯³

摘要 目的 探讨中医热证和非热证恶性肿瘤患者瘤组织中 HSP70 和 P53 的表达。方法 采用 S-P 免疫组化法进行 HSP70、P53 阳性检测以及采用 ELISA 法和 RT-PCR 法检测恶性肿瘤组织中 HSP70 和 HSP70mRNA 表达含量。结果 (1) 结肠癌热证组、热证合计组 HSP70、P53 阳性率均明显高于各非热证组 ($P < 0.05$); (2) 结肠癌热证组、鼻咽癌热证组、肺癌热证组以及热证合计组中 HSP70 表达含量均高于各非热证组 ($P < 0.01$); (3) 结肠癌热证组、肺癌热证组以及热证合计组中 HSP70mRNA 的表达含量均高于非热证组 ($P < 0.01$)。结论 在恶性肿瘤的热证阶段 HSP70 和 P53 阳性表达率以及 HSP70 表达含量显著高于非热证阶段。

关键词 HSP70; P53; HSP70mRNA; 肿瘤; 热证

Expression of HSP70 and P53 in Malignant Tumor Tissues and Its Relationship to Heat Syndrome of TCM
WANG Hong-qi, ZHANG Zheng, ZHAO Yan-ping, et al *Guangzhou University of TCM, Guangzhou (510405)*

Objective To investigate the expression of HSP70 and P53 in malignant tumor tissues of patients with TCM Heat-Syndrome (HS) or with non-Heat-Syndrome (NHS). **Methods** S-P immunohistochemical method was used to detect the gene expression, and ELISA and RT-PCR were adopted to determine the content of HSP70 and P53 mRNA expression in different malignant tumor tissues. **Results** (1) Positive ratio of HSP70 and P53 in the colorectal cancer of HS was significantly higher than that in colorectal cancer of NHS respectively, and the total positive ratio of the two genes in all tumors of HS was higher than those of NHS ($P < 0.05$); (2) HSP70 expression content in colorectal, nasopharyngeal and lung cancers of HS was higher than in those of NHS respectively, and the total HSP70 expression content in tumors of HS was higher than in those of NHS ($P < 0.01$); (3) HSP70 mRNA expression content in colorectal and lung cancers of HS was higher than in those of NHS respectively, and the total HSP70 mRNA expression content in tumors of HS was higher than in those of NHS ($P < 0.01$). **Conclusion** HSP70 and P53 positive ratio and HSP70 expression content in patients of malignant tumor with HS was higher than in those with NHS.

Key words HSP70; P53; HSP70 mRNA; tumor; Heat-Syndrome

生物体在高温、应激或其他因素刺激下会诱导基因开放而合成一组新的蛋白质—热休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs)。HSPs 作为分子伴侣, 在维持细胞的正常形态及功能中起着重要作用, 参与其他蛋白质的折叠、转运、合成等过程, 与细胞内的其他肽类蛋白质结合, 参与细胞的抗损伤、修复和热耐受过程, 其在多种疾病过程中的重要作用已经被大量证据证实。研究已证实, HSP70、P53 在恶性肿瘤的发生、发展过程中起着重要作用, HSP70 与 P53 蛋白的表达在

数量和分布上有相关性^[1,2]。本课题从中医辨证角度出发, 探讨热证与非热证恶性肿瘤组织中 HSP70 和 P53 的表达, 从而揭示属不同证型的恶性肿瘤组织中 HSP70、P53 表达情况, 报告如下。

资料与方法

1 临床资料 本组恶性肿瘤患者 53 例, 男 33 例, 女 20 例, 按中医辨证分为热证组和非热证组, 属热证 30 例, 非热证 23 例。结肠癌 23 例, 男 13 例, 女 10 例, 属热证 15 例, 非热证 8 例; 鼻咽癌 21 例, 男 14 例, 女 7 例, 热证 11 例, 非热证 10 例; 肺癌 9 例, 男 6 例, 女 3 例, 热证 4 例, 非热证 5 例。临床分期: 结肠癌中高分化 4 例, 中分化 17 例, 低分化 2 例; 鼻咽癌中高分化 8 例, 中分化 10 例, 低分化 3 例; 肺癌中高分化 2

基金项目: 国家自然科学基金资助 (No. 39770889)

作者单位: 1. 广州中医药大学 (广州 510405); 2. 华南师范大学;

3. 解放军 157 医院

通讯作者: 王洪琦, Tel: 020-36585244, E-mail: jwch@gzhtcm.edu.cn

例,中分化 4 例,低分化 3 例。标本来源于广州中医药大学第二附属医院、解放军 157 医院、广州市肿瘤医院,均经病理学证实。

热证辨证标准:主证:烦热、口咽干燥、大便秘结、涕黄、痰黄、舌红、脉数,兼证:颧红、低热、小便黄、舌红少苔或无苔。凡具备主证一项,兼证两项即可确诊为热证。

2 方法

2.1 S-P 免疫组化法检测恶性肿瘤组织中 HSP70、P53 的阳性表达 (1)主要药品与试剂:Mouse anti-HSP70 Monoclonal Antibody (Sress Gen Biotechnologies Corp), Mouse anti-Monoclonal P53 Maxim Biotech (Inc Cat), Mouse anti-Monoclonal P21 Maxim Biotech (Inc Cat),链霉素抗生物素蛋白-一过氧化酶免疫组化染色超敏试剂盒(福州迈新生物技术开发公司)。(2)主要仪器:OLYMPUS 显微镜(日本);莱卡荧光显微镜及照相系统;TCL-16G 台式高速离心机(上海)。(3)瘤组织 HSP70 和 P53 阳性结果判定标准:细胞浆或胞核出现棕黄色染色,并伴有胞核或胞浆棕黄色颗粒。根据阳性细胞数目分为:阴性(阳性细胞数<5%),弱阳性(阳性细胞数为 5%~30%),阳性(阳性细胞数为 31%~60%),强阳性(阳性细胞数>60%)。

2.2 酶联免疫吸附实验(ELISA 法)检测恶性肿瘤组织中 HSP70 的含量 (1)主要药品与试剂:HSP70 ELISA Kit (Stressgene Biotechnological Corp), 1M PMSF (Progma),异丙醇,EDTA 粉(天象人公司),灭菌双蒸水。(2)主要仪器:电子天平(BD211D, German Sartorius Corp),台式高速冷冻离心机(Universal 30RF, German Hettich Corp),酶标仪(伯乐公司)。

2.3 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定肿瘤组织中 HSP70mRNA 的表达 (1)主要药品与试剂:Promega RNA genes total RNA isolation system, Takara RNA PCR kit Ver2.1, HSP70 PCR primer pair (Canda Stress Gene Corp, STM-507), β -actin PCR primer pair (Sangon), PCR Maker (MBI)。(2)主要仪器:电子分析天平(BD211D, German Sartorius

Corp);超速冷冻离心机(Universal 30RF, German Hettich Corp);低温冰箱(Japan Sanyo);DNA/RNA 纯度检测仪(Gene Quant, American Pharmacia Biotech Corp), PE9600 型 PCR 扩增仪(American PIRKIN Corp), EDAS120 电泳凝胶图像分析系统(American Kodak Corp)。(3)方法:RT-PCR 法 β -actin 引物序列: Sense Primer 5' ACC ACA GTC CAT GCC ATC 3'; Antisense Primer 5' GTA GTA CCT CCA AAC TTC TA3'。HSP70 引物序列: Sense Primer 5' CTC CAG CAT CCG ACA AGA AGC3'; Antisense Primes 5' ACG GTG TTG TGG GGG TTC AGG3'。 β -actin 扩增片段长度为 450bp, HSP70 扩增片段长度为 234bp。RT-PCR 反应体系组成: $MgCl_2$ 6.0 μ l, 10 $\times$ RNA PCR Buffer 8.0 μ l, Takaka LA Taq 1.0 μ l, HSP70 上下游引物各 1 μ l, β -actin 上下游引物各 1 μ l, Rnase Free dH₂O 63.5 μ l,总反应体积为 80 μ l。PCR 扩增反应条件为:前预变性 95 $^{\circ}C$ 2min, 1 个循环;95 $^{\circ}C$ 变性 30s, 59 $^{\circ}C$ 退火 30s, 68 $^{\circ}C$ 延伸 60s, 共 35 个循环;后延伸 68 $^{\circ}C$ 8min。取反应液 10 μ l, 溴化乙啶染色,于 2% 琼脂糖凝胶电泳,将电泳结果置于 EDAS120 电泳凝胶图像分析系统内,采用 Gelbase 电脑软件对 HSP70 DNA 与 β -actin DNA 条带进行光密度扫描,计算 HSP70 DNA 和 β -actin DNA 吸收峰面积之比,即 OD 值,以此估计 HSP70mRNA 的表达。

3 统计学方法 采用 t 检验和 χ^2 检验。

结 果

1 S-P 免疫组化法检测结肠癌和鼻咽癌肿瘤组织中 HSP70、P53 结果 见表 1。HSP70 阳性率结肠癌热证组与非热证组比较,差异有显著性($P<0.05$);鼻咽癌热证组与非热证组比较,差异无显著性($P>0.05$);热证合计组与非热证合计组比较,差异有显著性($P<0.01$)。P53 阳性率结肠癌热证组与非热证组比较,差异有显著性($P<0.05$);鼻咽癌热证组与非热证组比较,差异无显著性($P>0.05$);热证合计组与非热证合计组比较,差异有显著性($P<0.05$)。

表 1 结肠癌、鼻咽癌肿瘤组织中 HSP70、P53 阳性表达 (例)

组别	例数	HSP70					P53 表达				
		阴性	弱阳性	阳性	强阳性	阳性率(%)	阴性	弱阳性	阳性	强阳性	阳性率(%)
结肠癌热证	15	1*	5	7	2	93.33	2*	7	3	3	86.67
结肠癌非热证	8	5	2	1	0	37.50	5	1	1	1	37.50
鼻咽癌热证	11	3	2	4	2	72.73	1	5	3	2	90.91
鼻咽癌非热证	10	5	1	3	1	50.00	3	2	4	1	70.00
热证合计	26	4 $\Delta\Delta$	7	11	4	84.62	3 Δ	12	6	5	88.46
非热证合计	18	10	3	4	1	44.44	8	3	5	2	55.56

注:与本病非热证组比较,* $P<0.05$;与非热证合计组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

2 ELISA 法检测恶性肿瘤(结肠癌、鼻咽癌、肺癌)组织中 HSP70 含量的结果 见表 2。结肠癌热证组、鼻咽癌热证组、肺癌热证组肿瘤组织中 HSP70 的含量各与其非热证组比较差异有显著性($P<0.01$);热证合计组恶性肿瘤组织中 HSP70 的含量明显高于非热证合计组,差异有显著性($P<0.01$)。

表 2 恶性肿瘤组织中 HSP70 的表达含量 ($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HSP70 含量
结肠癌热证	8	220.982 $\pm$ 87.798 *
结肠癌非热证	7	149.166 $\pm$ 42.919
鼻咽癌热证	5	211.047 $\pm$ 123.524 *
鼻咽癌非热证	7	142.340 $\pm$ 105.946
肺癌热证	4	222.758 $\pm$ 71.214 *
肺癌非热证	5	178.516 $\pm$ 81.549
热证合计	17	197.839 $\pm$ 103.352 *
非热证合计	19	175.219 $\pm$ 88.940

注:与本病非热证(合计)组比较, * $P<0.01$

3 RT-PCR 法对恶性肿瘤(结肠癌、鼻咽癌、肺癌)组织中 HSP70mRNA 表达的检测结果 见表 3。结肠癌热证组、肺癌热证组肿瘤组织中 HSP70mRNA 的表达含量各与其非热证组比较,差异有显著性($P<0.01$);鼻咽癌热证组中 HSP70mRNA 表达含量与其非热证组比较,差异无显著性($P>0.05$);热证合计组肿瘤组织中 HSP70mRNA 的含量明显高于非热证合计组($P<0.01$)。

表 3 恶性肿瘤组织中 HSP70mRNA 的表达含量 ($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HSP70mRNA 含量
结肠癌热证	8	2.17 $\pm$ 0.19 *
结肠癌非热证	7	0.98 $\pm$ 0.14
鼻咽癌热证	5	1.22 $\pm$ 0.23
鼻咽癌非热证	7	0.66 $\pm$ 0.11
肺癌热证	4	1.27 $\pm$ 0.22 *
肺癌非热证	5	0.59 $\pm$ 0.12
热证合计	17	1.28 $\pm$ 0.10 *
非热证合计	19	0.71 $\pm$ 0.14

注:与本病非热证(合计)组比较, * $P<0.01$

讨 论

HSPs 是在热诱导下生成的一组具有高度保守性的蛋白质,其表达与肿瘤的发生、增殖及分化有关。正常细胞中,HSP70 的表达受细胞周期调控,而肿瘤细胞中突变或异常蛋白质的存在刺激 HSP70 的合成,使其呈现持续的高表达。有的学者认为^[3],HSP70 的高表达一方面介导癌基因及抑癌基因产物的构象成熟、跨膜转运,另一方面介导错配蛋白的降解,协调肿瘤细胞的蛋白质快速代谢平衡,使肿瘤细胞得以无限增殖。P53 抑癌基因为人类肿瘤发病学中最受重视的抑癌基

因,P53 蛋白为一种生长抑制性蛋白,在肿瘤细胞中的表达失调、蛋白表达增加,主要是由其编码基因发生突变,从而导致氨基酸改变,最终产生没有活性的 P53 蛋白^[4]。Agoff 的研究表明^[5],野生型 P53 可以通过与 CCAAT 结合因子(CBF)来抑制 HSP70 的基因转录,而突变型 P53 可改变野生型 P53-CBF 结合体,从而使 HSP70 基因的转录不受抑制。

近年来,相继报道了不同恶性肿瘤包括肝癌、胃癌、结肠癌、肺癌等组织 HSP70 的表达,多数支持恶性肿瘤伴有 HSP70 的超常表达,认为 HSP70 可以作为癌症的诊断指征,尤其是乳腺肿瘤^[6,7]。有人观察了胃癌、胰腺癌和结肠癌 HSP70 的表达,也发现有超常的表达,并认为这种表达有利于提高化疗的敏感性,但其阳性率也不高于 50%^[8]。HSP70 与肿瘤之间缺乏高度特异性制约了人们企图将 HSP70 用于临床诊断的努力。因此,目前存在的最大问题是肿瘤过程中 HSP70 表达的特异性和阳性率的问题。一旦这个问题得到解决,HSP70 的临床应用即可成为现实。为何在不同或同一种肿瘤存在表达的差异,可能研究者们过多地注意从纵深方面研究单一肿瘤的表达,而忽略了研究差异所产生的原因。尽管 HSP70 在肿瘤组织中的表达可能是持续性的,但瞬间或阶段表达还是其主要形式,在肿瘤发展的不同阶段,HSP70 的表达规律是不一致。中医辨证的关键在于从不同的疾病或同一疾病的不同病理阶段找出共同的病理环节,即从证的角度来认识疾病的差异。由于热休克反应过程与热证过程一致性,以及应激对热休克蛋白表达的影响,我们设想 HSP70 在肿瘤组织中的表达可能没有病种特异性,但可能存在证候特异性,即在恶性肿瘤发展过程中热证阶段的表达与非热证阶段有所不同。本课题从证的角度来研究 HSP70、P53 在不同肿瘤组织中的表达是否存在证候特异性,并探讨不同的肿瘤组织以及同一病种的肿瘤组织中 HSP70、P53 的表达及其与证的关系。

研究结果发现不同恶性肿瘤组织中 HSP70 和 P53 表达有别,结肠癌、鼻咽癌局部肿瘤细胞的胞浆和胞核中 HSP70、P53 有较高的表达。结肠癌热证组 HSP70、P53 的阳性表达率明显高于非热证组;热证合计组 HSP70、P53 阳性表达率明显高于非热证合计组。初步揭示了 HSP70、P53 的表达可能与恶性肿瘤中属热证与非热证的不同证型有相关性。通过进一步对恶性肿瘤组织中 HSP70、HSP70mRNA 表达含量的检测,结果发现属热证的结肠癌、肺癌、热证合计组中 HSP70 和 HSP70mRNA 的表达含量比非热证组的高。

进一步证实了 HSP70 的表达差异与肿瘤发展处于一定阶段有关,即属于中医热证这一病理阶段的恶性肿瘤组织中 HSP70 的表达明显增强。此外,研究表明 HSP70 与 P53 在结肠癌、鼻咽癌中的表达的正相关性,其原因也可能与所属不同证型有关。

参 考 文 献

1 Lazaris AC, Theodoropoulos GE, Aroni K, et al. Immunohistochemical expression of c-myc oncogene, heat shock protein 70 and HLA-DR molecules in malignant cutaneous melanoma. *Virchowsarch* 1995;426(5):461—467.

2 Kaur J, Ralhan R. Differential expression of 70kDa heat shock-protein in human oral tumorigenesis. *Int J Cancer* 1995; 63 (6):774—779.

3 施一江,赵 玫,徐先发,等.主要人热休克蛋白在癌组织及癌旁正常组织中表达水平的比较研究. *中华肿瘤杂志* 1998; 20(4):277—279.

Shi YJ, Zhao M, Xu XF, et al. Comparative study of expression levels of the major human heat shock proteins in cancer and

normal tissues. *Chin J Oncol* 1998;20(4):277—279.

4 El-Deiry WS, Kokino T, Velculescu VE, et al. WAF1, a potential mediator of P53 tumor suppression. *Cell* 1993;75(4): 817—825.

5 董 亮,沈 丹,冯一中.热休克蛋白 70 和 P53 在人类乳腺癌中的表达及意义. *苏州医学院学报* 2000;20(9):808.

Dong L, Shen D, Feng YZ. Expression of heat shock protein 70 and P53 in human primary breast cancer and its significance. *J Suzhou Med Coll* 2000;20(9):808.

6 Kaur J, Srivastava A, Ralhan R, et al. P53-hsp70 complexes in oral dysplasia and cancer: potential prognostic implications. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996;32B(1):45—49.

7 Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, et al. Heat shock protein HSP70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer; prognostic implications. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(7): 570—574.

8 Ehrenfried JA, Herron BE, Townsend CM, et al. Heat shock proteins are differentially expressed in human gastrointestinal cancers. *Sur Oncol* 1995;4(4):197—203.

(收稿:2003-10-29 修回:2004-07-27)

《中国中西医结合杂志》第六届编委会名单

名誉总编 季钟朴

总 编 辑 陈可冀

副总编辑 沈自尹 肖培根 陈维养(常务)

顾 问 吴咸中 辛育龄 关幼波 邓铁涛 尚天裕 王永炎 侯 灿

编辑委员 马必生 王一涛 王书臣 王今达 王宁生 王 阶 王学美 王 佩 王宝恩
王硕仁 王雪苔 尹光耀 史大卓 史载祥 刘干中 刘建勋 刘耕陶 刘猷枋
危北海 匡调元 朱 兵 吕爱平 吕维柏 齐清会 孙 燕 李 恩 李乃卿
李大金 李玉光 李连达 李廷谦 李国贤 李国栋 李鸣真 李顺成 李恩宽
杨任民 杨秀伟 时毓民 陈士奎 陈小野 陈冬燕 陈香美 吴伟康 陆付耳
张大钊 张之南 张永祥 张伯礼 张国玺 张亭栋 张荣华 张家庆 张梓荆
林求诚 林志彬 林瑞超 郁仁存 周文泉 周 俊 周霭祥 金益强 赵伟康
唐由之 顾振纶 郭赛珊 徐治鸿 梁晓春 黄晓愚 曹小定 葛秦生 谢宗万
谢竹藩 董福慧 曾晓春 雷 燕 蔡定芳 裴正学 黎磊石 廖家桢 廖福龙
戴瑞鸿