论著·临床研究

儿童肝母细胞瘤肝组织中 GRP78 和 GRP94 表达及其临床病理意义

陈干农 马勇 杨竹林

(中南大学湘雅二医院普外科,湖南 长沙 410011)

[摘要] 目的 研究肝母细胞瘤(HB)患儿肝组织中葡萄糖调节蛋白78和94(GRP78和GRP94)表达水平及其临床病理意义。方法 15例儿童HB和10例正常肝组织标本常规制作石蜡包埋切片,用EnVision免疫组织化学法,检测GRP78和GRP94表达。结果 HB患儿肝组织中GRP78和GRP94表达阳性率明显高于正常肝组织(53% vs 10%, 60% vs 10%; 均 $P < 0.05$)。无淋巴结转移及临床分期I~II期病例GRP78表达阳性率明显低于淋巴结转移及临床分期III~IV期病例($P < 0.05$)。无淋巴结转移及临床分期I~II期病例GRP94表达阳性率低于淋巴结转移及临床分期III~IV期病例,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 GRP78和GRP94表达在儿童HB发生、进展方面可能有重要作用。
[中国当代儿科杂志,2010,12(8):634-636]

[关键词] 肝母细胞瘤;葡萄糖调节蛋白78;葡萄糖调节蛋白94;儿童

[中图分类号] R73 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)08-0634-03

Expression of GRP78 and GRP94 in the liver tissues and their clinicopathological significance in children with hepatoblastoma

CHEN Gan-Nong, MA Yong, YANG Zhu-Lin. Department of General Surgery, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China (Yang Z-L, Email: yangzhulin8@sina.com)

Abstract: Objective To study the expression of glucose-regulated protein 78 (GRP78) and glucose-regulated protein 94 (GRP94) in the liver tissues from children with hepatoblastoma (HB) and to investigate the possible clinicopathological values of GRP78 and GRP94 in HB. **Methods** Liver tissue specimens from 15 children with HB and 10 specimens of normal liver tissues were obtained. EnVison immunohistochemistry was used to detect the expression of GRP78 and GRP94 in the conventional paraffin-embedded liver sections. **Results** The positive rates of GRP78 expression (53% vs 10%; $P < 0.05$) and GRP94 expression (60% vs 10%; $P < 0.05$) in HB liver tissues were significantly higher than those in the normal liver tissues. The positive rates of GRP78 expression in the cases without lymphnode metastasis or in clinical stage I-II were significantly lower than those in the cases with lymphnode metastasis or in clinical stage III-IV ($P < 0.05$). GRP94 showed a decreased tendency of positive expression in the cases without lymphnode metastasis or in clinical stage I-II when compared with the cases with lymphnode metastasis or in clinical stage III-IV, although there were no statistical differences between them. **Conclusions** GRP78 and GRP94 expression might play important roles in the pathogenesis and progression of pediatric HB.
[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(8):634-636]

Key words: Hepatoblastoma; Glucose-regulated protein 78; Glucose-regulated protein 94; Child

肝母细胞瘤(hepatoblastoma, HB)是小儿最常见的肝脏原发性恶性肿瘤,瘤体生长迅速,患儿就诊时多为进展期,首诊时能手术切除者 $< 50\%$,预后极差。HB详细发病机制尚未完全明了,但近年研究认为可能与染色体及基因表达异常、低出生体重、母体妊娠期不良外界因素等有关^[1-5]。葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78, GRP78)和94(glucose-regulated protein 94, GRP94)为内质网分子

伴侣蛋白,是细胞为了适应内质网应激状态所产生的应激蛋白。近年研究证实一些恶性肿瘤 GRP78和GRP94呈高表达,且与其进展、转移发生及预后密切相关^[6-14];GRP78和GRP94的产生对肿瘤细胞有保护作用,这极可能是某些晚期肿瘤患者对放疗和化疗不敏感的原因之一^[6-14]。本研究应用EnVison免疫组化法研究HB儿童肝组织中GRP78和GRP94表达水平及其临床病理意义。

[收稿日期]2010-03-21; [修回日期]2010-04-04

[作者简介]陈干农,男,硕士,副教授。

[通信作者]杨竹林,教授。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集1998年1月至2008年12月HB手术切除标本的存档蜡块15例,男11例,女4例,年龄范围6个月至7岁,中位年龄3.2岁,其中≤3岁11例;病理类型包括上皮型12例和混合型3例,上皮型中包括胎儿型6例、胚胎型4例和间变型(未分化型)2例;12例为单发病例,3例为多发病例;9例局限在肝右叶,2例局限在肝左叶,4例同时累及肝左、右叶;肿块最小者为7 cm×6 cm×5 cm,肿块最大者为20 cm×16 cm×15 cm;7例发生区域淋巴结转移,2例发生肺部远处转移。按照美国儿童肿瘤研究组(Children Cancer Study Group,CCSG)分期标准分期为I期3例、II期5例、III期5例和IV期2例。12例进行了术后跟踪随访,3例失访。随访病例中术后3个月内死亡3例(均为III~IV期病例),3~6个月死亡2例,6~12个月死亡3例,死于术后18个月和26个月各1例,2例术后追踪5年仍存活(均为胎儿型和临床分期I期病例)。另取6例HB瘤旁正常肝组织和4例小儿肝破裂标本(病检均为正常肝组织)作为正常对照。以上标本经4%甲醛固定后常规制作石蜡包埋切片,切片厚4 μm。

1.2 主要试剂

兔抗人GRP78和GRP94多克隆抗体购自Santa Cruz公司,EnVision™染色试剂盒购自瑞士DAKO公司。

1.3 方法

GRP78和GRP94染色方法均为EnVision免疫组化法,严格按试剂说明书操作,主要步骤如下:切片脱蜡至水洗,3% H₂O₂ 甲醇液10 min,胰蛋白酶消化15 min,滴一抗37℃孵育60 min,PBS液(pH7.4)洗3次×5 min,滴A液37℃孵育30 min,PBS液(pH7.4)洗3次×5 min,加入羊抗兔二抗显色液显色15 min,蒸馏水洗2 min,苏木精浅染1 min,脱水,透明和中性树脂封固。细胞浆和(或)细胞核含棕黄色颗粒者为GRP78和GRP94表达阳性细胞,随机观察切片中10个高倍视野阳性细胞率,其阳性细胞率均值≥25%为阳性病例。以武汉博士德公司提供的阳性切片作为阳性对照,以0.01 mol/L PBS液(pH7.4)替代一抗作为阴性对照。

1.4 统计学分析

将所得数据输入SPSS 13.0统计软件包行Fisher's精确概率法检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HB及正常肝组织中GRP78和GRP94的表达

GRP78和GRP94免疫组化阳性产物主要定位于胞浆,偶见胞核着色。15例HB中GRP78和GRP94表达阳性病例分别为8例(53%)和9例(60%),10例正常肝组织GRP78和GRP94表达阳性均为1例(10%),且GRP78和GRP94阳性者为同一瘤旁肝组织,HB中GRP78和GRP94表达阳性率明显高于正常肝组织(分别 $P = 0.034, P = 0.016$)。

2.2 GRP78和GRP94表达与HB临床病理特征的关系

本研究发现无淋巴结转移及临床分期I~II期病例GRP78表达阳性率明显低于淋巴结转移及临床分期III~IV期病例($P < 0.05$);无淋巴结转移及临床分期I~II期病例GRP94表达阳性率低于淋巴结转移及临床分期III~IV期病例,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。胎儿型和生存期>1年病例GRP78和GRP94表达阳性率低于其他病理类型及生存期≤1年病例,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。GRP78和GRP94表达与HB患者性别、年龄及发生部位均无明显关系。

表1 GRP78和GRP94表达与HB临床病理特征的关系 [例(%)]

临床病理特征	例数	GRP78 阳性	χ^2 值	P 值	GRP94 阳性	χ^2 值	P 值
性别							
男	11	6(55)	0.02	0.513	7(64)	0.23	0.377
女	4	2(50)			2(50)		
年龄							
≤3岁	11	6(55)	0.02	0.513	7(64)	0.23	0.461
>3岁	4	2(50)			2(50)		
病理类型							
胎儿型	6	2(33)			2(33)		
胚胎型	4	2(50)	6.69	0.382	3(75)	4.17	0.321
未分化型	2	2(100)			2(100)		
混合型	3	2(67)			2(67)		
部位							
肝右叶	9	4(44)			5(56)		
肝左叶	2	1(50)	1.05	0.612	1(50)	1.57	0.752
肝左右叶	4	3(75)			1(75)		
淋巴结转移							
无	8	2(25)	5.53	0.032	3(37)	3.62	0.084
有	7	6(86)			6(86)		
临床分期							
I-II	8	2(25)	5.53	0.032	3(37)	3.62	0.084
III-IV	7	6(86)			6(86)		
生存期							
≤1年	8	5(62)	1.26	0.252	6(75)	2.74	0.152
>1年	4	1(25)			1(25)		

3 讨论

临床上 HB 常起病隐匿,多无症状,发病时肿瘤已较大,临床分期多为 III ~ IV 期,患儿多不能耐受手术,术后 5 年生存率或无瘤生存时间极低,故早期发现和治疗尤显重要。本组 15 例 HB 病例其临床病理表现均与国内外有关 HB 的文献报道相似^[1-5]。

GRPs 是细胞为了适应内质网应激状态所产生的一类应激蛋白,与热休克蛋白有较高的同源性。GRP78 又称免疫球蛋白重链结合蛋白(Bip),其功能很多,除作为分子伴侣参与蛋白质的折叠和转运外,它还是内质网上的一种应激蛋白,在低糖、低氧等应激状态下大量表达以维持内质网的稳定和保护细胞^[6-10]。GRP94 是内质网内数量最多的糖蛋白,只存在于脊椎动物,其功能相似于 GRP78^[9-14]。近年研究证实一些恶性肿瘤(如乳腺癌、宫颈鳞癌、口腔鳞癌、肺癌、食管腺癌、胃腺癌)中 GRP78、GRP94 呈高表达,其高水平表达的恶性肿瘤多分化差、进展快、易发生淋巴和血液转移,预后差,认为是评估这些恶性肿瘤生物学行为和预后的重要生物学标记物,且同时发现这些恶性肿瘤来源的正常组织或良性病变呈低表达或不表达^[6-14];此外,在一些实体恶性肿瘤研究中发现 GRP78、GRP94 的表达有助于诱导肿瘤细胞发展和耐药性的产生,甚至诱导肿瘤细胞的免疫耐受,从而对肿瘤细胞有保护作用,这可能是恶性肿瘤细胞对化疗药物耐受和放疗抵抗的重要机制之一,检测 GRP78、GRP94 表达水平对指导临床治疗可能有重要临床应用价值^[6-15]。

HB 肝组织中 GRP78、GRP94 表达水平研究国内外尚未见文献报道。本研究发现,HB 肝组织中表达 GRP78、GRP94 阳性率明显高于正常肝组织;无淋巴结转移及临床分期 I ~ II 期病例 GRP78 表达阳性率明显低于淋巴结转移及临床分期 III ~ IV 期病例($P < 0.05$);无淋巴结转移及临床分期 I ~ II 期病例 GRP94 表达阳性率与淋巴结转移及临床分期 III ~ IV 期病例比较,有降低趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$);胎儿型和生存期 > 1 年病例 GRP78 和 GRP94 表达阳性率较其他病理类型及生存期 ≤ 1 年病例亦有降低趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$),这可能与本研究样本数不大有关。本研究结果提示 GRP78 和 GRP94 表达水平与 HB 发生、

进展、恶性程度、转移及侵袭潜力密切相关,高表达的 HB 进展快、恶性程度高、易发生转移或复发,预后差。

致谢:衷心感谢中南大学湘雅医院病理科、湘雅二医院病理科和湖南省儿童医院病理科提供病理标本及临床病理资料。

[参 考 文 献]

- [1] 李友,李笃妙. 肝母细胞瘤治疗新进展[J]. 医学综述,2008,14(6):848-850.
- [2] 李长春,金先庆. 儿童肝母细胞瘤诊治进展[J]. 重庆医学,2007,36(15):1481-1482.
- [3] Towu E, Kiely E, Pierro A, Spitz L. Outcome and complications after resection of hepatoblastoma [J]. J Pediatr Surg, 2004, 39(2):199-202.
- [4] Isaacs H Jr. Fetal and neonatal hepatic tumors [J]. J Pediatr Surg, 2007, 42(11):1797-1803.
- [5] Horton JD, Lee S, Brown SR, Bader J, Meier DE. Survival trends in children with hepatoblastoma [J]. Pediatr Surg Int, 2009, 25(5):407-441.
- [6] Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications [J]. Trends Biochem Sci, 2001, 26(8):504-510.
- [7] Uramoto H, Sugio K, Oyama T, Nakata S, Ono K, Yoshimastu T, et al. Expression of endoplasmic reticulum molecular chaperone Grp78 in human lung cancer and its clinical significance [J]. Lung Cancer, 2005, 49(1):55-62.
- [8] Fernandez PM, Tabbara SO, Jacobs LK, Manning FC, Tsangaris TN, Schwartz AM, et al. Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but benign human breast lesions [J]. Breast Cancer Res Treat, 2000, 59(1):15-26.
- [9] Langer R, Feith M, Siewert JR, Wester HJ, Hoefler H. Expression and clinical significance of glucose-regulated proteins GRP78 (BiP) and GRP94 (GP96) in human adenocarcinomas of the esophagus [J]. BMC Cancer, 2008, 8:70-75.
- [10] Zheng HC, Takahashi H, Li XH, Hara T, Masuda S, Guan YF, et al. Overexpression of GRP78 and GRP94 are markers for aggressiver behavior and poor prognosis in gastric carcinoma [J]. Hum Pathol, 2008, 39(7):1042-1049.
- [11] Hodorova I, Rybarova S, Solar P, Vecanova J, Prokopcakova L, Bohus P, et al. GP96 and its different expression in breast carcinomas [J]. Neoplasma, 2008, 55(1):31-35.
- [12] Fu Y, Lee AS. Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy [J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(7):741-744.
- [13] Kubata H, Suzuki T, Lu J, Takahashi S, Sugita K, Sekiya K, et al. Increased expression of GRP94 protein is associated with decreased sensitivity to in cervical cancer cell [J]. Int J Radiat Biol, 2005, 81(9):701-709.
- [14] Nomura H, Uzawa K, Yamano Y, Fushimi K, Ishigami T, Kata Y, et al. Network-based analysis of calcium-binding protein genes identifies Grp94 as a target in human oral carcinogenesis [J]. Br J Cancer, 2007, 97(6):792-801.
- [15] Zhang LY, Zhang XC, Wang LD, Zhang ZF, Li PL. Increased expression of GRP94 protein is associated with decreased sensitivity to adriamycin in ovarian carcinoma cell lines [J]. Clin Exp Obstet Gynecol, 2008, 35(4):257-263.

(本文编辑:王庆红)