

# 大肠癌组织中 HSP70 和 p53 蛋白的表达及其意义

胡文秀<sup>1</sup>, 杨成旺<sup>1</sup>, 欧阳晓晖<sup>1</sup>, 苏秀兰<sup>2</sup>

Expression and Significance of HSP70 and p53 Protein in Human Colorectal Carcinoma

HU Wen-xiu<sup>1</sup>, YANG Cheng-wang<sup>1</sup>, OU YANG Xiao-hui<sup>1</sup>, SU Xiu-lan<sup>2</sup>

1. Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010050, China; 2. Central Research Laboratory

Corresponding Author: SU Xiu-lan, E-mail: xlsu@sina.com

**Abstract:** **Objective** To explore the expression feature and significance of heat shock protein 70 and p53 protein in human colorectal carcinoma, para-tumor tissue and normal tissue. **Methods** SP immunohistochemical technique and image analysis were used. **Results** In a total of 31 cases, the average value of light density of HSP70 were  $0.5917 \pm 0.0678$ ,  $0.3363 \pm 0.0485$ ,  $0.1742 \pm 0.0193$  and p53 proteins were  $0.7547 \pm 0.2732$ ,  $0.5388 \pm 0.1542$ ,  $0.3770 \pm 0.0682$  respectively; A high expression of HSP70 and p53 protein were discovered and showed a significant difference ( $P < 0.01$ ) in tumor tissue compared with para-tumor tissue and normal tissue; The expression of HSP70 and p53 protein were a linear correlation and the correlation coefficient ( $r$ ) of them was 0.795. There was a positive correlation between the expression of HSP70 and p53 protein in human colorectal carcinoma. **Conclusion** The results suggested that HSP70 and p53 protein might play an important role in the development of human colorectal carcinoma, and the result was able to a malignant index in cytology. HSP70 and p53 protein might has a coordinated effect in the course of generation and development in human colorectal carcinoma, and might be associated with HSP70 and p53 protein compound form existence in human colorectal tumor tissue probably.

**Key words:** Human colorectal carcinoma; HSP70; p53 protein; Immunohistochemistry

**摘要:**目的 探讨大肠癌组织中 HSP70 和 p53 蛋白的表达特点及其相互间关系。方法 运用 SP 法结合图像分析,探讨 HSP70 和 p53 蛋白在大肠癌组织、癌旁组织及正常组织中的表达。结果 在 31 例大肠癌、癌旁、正常组织标本中, HSP70 表达的平均光密度值分别为:  $0.5917 \pm 0.0678$ 、 $0.3363 \pm 0.0485$ 、 $0.1742 \pm 0.0193$ ; 癌组织中 HSP70 的表达水平显著升高,与癌旁、正常组织中的表达比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。p53 蛋白表达的平均光密度值分别为:  $0.7547 \pm 0.2732$ 、 $0.5388 \pm 0.1542$ 、 $0.3770 \pm 0.0682$ ; 癌组织中 p53 蛋白的表达水平显著升高,与癌旁、正常组织中的表达比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。HSP70 和 p53 在大肠癌组织中的表达存在依从关系 ( $P < 0.01$ ),二者呈直线相关,相关系数  $r$  为 0.795。结论 HSP70 和 p53 蛋白在大肠癌组织中高表达,提示二者在大肠癌的发生发展中起一定的作用,是细胞恶变的指标之一;他们在大肠癌的发生发展中具有协同作用,或者在大肠癌组织中可能存在着 HSP70-p53 蛋白的复合物形式。

**关键词:** 大肠癌; 热休克蛋白 70; p53 蛋白; 免疫组织化学

**中图分类号:** Q51; R34; R735.3<sup>+</sup>4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2007)05-0363-03

## 0 引言

热休克蛋白 (Heat shock proteins, HSP) 是细胞受到各种刺激时产生的一类具有重要生理功能和

高度保守的多肽类蛋白质分子家族,在应激状态下可被诱导表达<sup>[1]</sup>。一些研究表明, HSP70 与抑癌基因 p53 的关系密切<sup>[2]</sup>,但目前尚未见有关 HSP70 和 p53 蛋白在大肠癌中表达的相关报道。

本文运用 SP 法染色,图像分析 HSP70 和 p53 蛋白在大肠癌、癌旁及正常组织中的表达,以探讨大肠癌组织中 HSP70 和 p53 蛋白的表达特点及其相互关系。

收稿日期: 2006-05-04; 修回日期: 2006-11-10  
基金项目: 内蒙古自治区人才开发基金资助项目  
作者单位: 1. 010050 呼和浩特, 内蒙古医学院附属医院普外科, 2. 中心研究室  
通信作者: 苏秀兰, E-mail: xlsu@sina.com  
作者简介: 胡文秀 (1969 - ), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事消化系统肿瘤的研究

### 1 资料与方法

#### 1.1 资料

收集 2003 年 10 月~2004 年 9 月内蒙古医学院附属医院大肠癌手术切除的病理标本,选择其中诊断明确资料完整的 31 例。男 17 例,女 14 例;结肠 15 例,直肠 16 例;年龄 30~79 岁;病理类型包括:高分化腺癌 6 例,高中分化腺癌 2 例,中分化腺癌 11 例,中-低分化腺癌 1 例,低分化腺癌 1 例,粘液腺癌 9 例,结肠恶性间质瘤 1 例;发生区域淋巴转移 11 例;Duke's 分期:A 期 12 例,B 期 7 例,C 期 10 例,D 期 2 例;上述标本均于手术切除离体后 30min 内取样,每例均分别采集肿瘤组织、距癌肿边缘 2cm 处的癌旁组织、切除肠管一端切缘的正常组织,用 10%中性福尔马林液固定,石蜡包埋,连续切片厚 4~5 $\mu$ m,常规 HE 染色及免疫组织化学法染色。

#### 1.2 主要试剂

兔抗人 HSP70(突变型)单克隆抗体,鼠抗人 p53 单克隆抗体, UltraSensitive™ SP 超敏试剂盒, DAB 显色试剂盒,均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

#### 1.3 染色方法

石蜡切片常规脱蜡水化,枸橼酸缓冲液进行抗原热修复(微波炉中高中火 98 $^{\circ}$ C 加热,HSP70 组为 10min,p53 蛋白组为 12min,室温冷却)。超敏免疫组织化学法(SP 法)染色,操作按试剂盒说明书进行;HSP70 单抗使用的最佳反应浓度为 1:250,p53 单抗为即用型;用 PBS 代替一抗作阴性对照。用新鲜配制的 DAB 液显色,光镜下观察染色情况,HSP70 组为 5~10min,p53 蛋白组为 10min。蒸馏水冲洗 3min/次  $\times$ 3,苏木素复染:HSP70 组为 20min,p53 蛋白组为 8min;过自来水去掉多余的苏木素,过 1%盐酸酒精分化,流动水冲洗 10min 返蓝。切片经过梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封片。

#### 1.4 图像采集及分析

采用国产 JD801 图像分析系统(捷达形态图像分析系统,江苏捷达科技发展有限公司出品),进行图像采集和光密度扫描,得出 HSP70 和 p53 蛋白表达的平均光密度值。

#### 1.5 统计学处理

使用 SPSS 11.0 统计分析软件进行统计学处理。多个样本均数间的多重比较,行方差分析  $F$  检验;HSP70 和 p53 蛋白表达的相互间关系用直线回归与相关分析。

### 2 结果

#### 2.1 HSP70 的表达特征

光镜下 HSP70 阳性物质为棕黄色颗粒,定位于胞浆和胞核,以胞浆表达为主,见图 1。31 例大肠癌组织中,HSP70 的表达水平显著升高,与癌旁、正常组织中的表达比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 1。

#### 2.2 p53 蛋白在大肠癌组织中的表达特征

光镜下 p53 蛋白的阳性物质为深棕色颗粒,定位于胞核,见图 2。31 例大肠癌组织中,p53 蛋白的表达水平显著升高,与癌旁、正常组织中的表达比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 1。

表 1 HSP70 和 p53 蛋白平均光密度值的表达(31 例)

	癌组织	癌旁组织	正常组织
HSP70 平均光密度值	0.5917 $\pm$ 0.0678 **	0.3363 $\pm$ 0.0485 *	0.1742 $\pm$ 0.0193
p53 蛋白平均光密度值	0.7547 $\pm$ 0.2732 **	0.5388 $\pm$ 0.1542 *	0.3770 $\pm$ 0.0682

\*\*癌组织与癌旁、正常组织比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ );\*癌旁组织与正常组织比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )

#### 2.3 HSP70 与 p53 蛋白在大肠癌组织中的表达及其相互关系

经统计学处理,结果显示,HSP70 和 p53 蛋白在人大肠癌组织中的表达有依从关系( $P < 0.01$ ),二者呈直线相关(linear correlation),相关系数  $r$  为 0.795,见图 3。

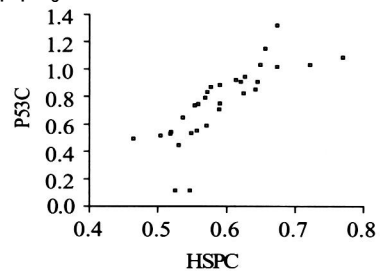


图 3 HSP70 和 p53 蛋白在大肠癌组织中表达的平均光密度值散点图

### 3 讨论

#### 3.1 关于 HSP70

自 1970 年 HSP 被正式发现和命名之后,对其的研究不断深入,并逐渐形成如下共识:HSP 是细胞应激反应的生物标志;HSP 是细胞的内源性保护蛋白;HSP 具有分子伴侣作用;HSP 可以作为肿瘤的标志物<sup>[5-7]</sup>;HSP 是肿瘤免疫的分子佐剂等。

目前发现的 HSP 家族的成员有 10 余种,其中研究得较多最为关注的是 HSP70,由于它在生物中的含量最多,并且在正常细胞中水平较低,而在应激后表达显著增高,是 HSP 中重要的成员,且具有高度保守性的一族。研究表明,肿瘤细胞具有较高水

平的 HSP70 表达,肿瘤来源的 HSP70 具有强大的免疫原性和肿瘤特异性<sup>[8]</sup>,因而在细胞的凋亡和诱导肿瘤免疫中起着重要的作用<sup>[9,10]</sup>。

本文检测了 31 例大肠癌组织中 HSP70 的表达,结果发现,HSP70 在大肠癌、癌旁、正常组织中的表达呈递减的趋势,HSP70 在大肠癌组织中高表达,与癌旁、正常组织中的表达比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),并且癌旁与正常组织中的表达比较差异也有统计学意义( $P < 0.01$ ),证实了正常-癌旁-癌组织的“依行粘膜”的肿瘤发生、发展规律的存在,说明了随着肿瘤恶性程度的增加,细胞内 HSP70 的积聚也逐渐增多,提示 HSP70 可能是反映大肠癌生物学行为和预后的重要标记物,可以作为大肠癌的标志物。

### 3.2 关于 p53 蛋白

p53 抑癌基因的突变和功能丧失是人类恶性肿瘤中最常见的基因变化<sup>[11]</sup>。

p53 蛋白由 393 个氨基酸组成,可分为野生型 p53 蛋白(wt-p53 蛋白)和突变型 p53 蛋白(mt-p53 蛋白)。正常组织细胞中,p53 的半衰期极短,表达水平极低,用 SP 法不能检测到;突变后的 mt-p53 半衰期延长,大量堆积于肿瘤细胞中,出现过量表达,可以用 SP 法在肿瘤组织中检测到<sup>[12]</sup>,所以一般认为 SP 法检测出的 p53 蛋白即为 mt-p53 蛋白。人类肿瘤一半以上有 p53 的突变和缺失,是目前所知人体肿瘤中最常见的基因改变<sup>[13]</sup>。

本组 31 例大肠癌中 p53 过度表达。p53 蛋白在大肠癌组织中高表达,与癌旁、正常组织中的表达比较有统计学差异( $P < 0.01$ ),并且随着肿瘤恶性程度的增加,p53 蛋白在肿瘤细胞中的积聚也逐渐增多,提示突变型 p53 在肿瘤细胞中积累也逐渐增多。提示 mt-p53 是细胞恶变的指标,p53 在大肠癌的发生发展中起一定的作用。

### 3.3 关于 HSP70 和 p53 蛋白相互间的关系

HSP70 和 p53 都被认为在肿瘤的发生和发展中起一定的作用。近年来研究发现,HSP70 与原癌基因 c-myc、抑癌基因 p53 关系密切<sup>[1]</sup>。肿瘤中常有 p53 和 HSP 的共同表达,HSP70 水平的高低与 p53 基因的突变率正相关,所以 p53 与 HSP70 复合体的存在可能是某些肿瘤发生、发展的机制之一<sup>[14,15]</sup>。本文结果显示,HSP70 和 p53 在人体大肠癌组织中的表达存在依从关系( $P < 0.01$ ),两者呈直线相关。提示两者在肿瘤的发生、发展中具有协同作用,或者在人体大肠癌组织中可能存在着

HSP70-p53 蛋白的复合物形式。所以对 p53 基因及 HSP70 的研究,有助于设计基于 p53 的“基因治疗”及研制特异性大肠癌疫苗,因而具有广阔的应用前景。

(本文图 1、2 见封 3)

### 参考文献:

- [1] Lindquist S, Craig EA. The heat shock protein[J]. Annu Rev Genet, 1988, 22(1):631-677.
- [2] Tolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death [J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(19): 1564- 1572.
- [3] Blagosklonny MV, Toretsky J, Bohem S, et al. Mutant cofor- mation of p53 translated in vitro or in vivo requires functional HSP90[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(16): 8379- 8383.
- [4] Hartl FU, Hayer Hard M. Molecular chaperones in the cyto- sol: from nascent chain to folded protein [J]. Science, 2002, 295(5561): 1852-1858.
- [5] Beer DG, Kardia SL, Huang CC, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma[J]. Nat Med, 2002, 8(8): 816-824.
- [6] Kanazawa Y, Isomoto H, Oka M, et al. Expression of heat shock protein (HSP) 70 and HSP 40 in colorectal cancer[J]. Med Oncology, 2003, 20(2): 157-164.
- [7] Li Zhong, Xuejun Peng, Giovanna E. et al. Antibodies to HSP70 and HSP90 in serum in non-small cell lung cancer patients[J]. Cancer Detection and Prevention, 2003, 27(4): 285-290.
- [8] Udono H, Srivastava PK. Comparision of tumor-specific im- munogenicities of Stress-induced proteins gp96, HSP90 and HSP70 [J]. J Immunol, 1994, 152(11): 5398-5403.
- [9] 傅庆国, 孟凡东, 郭克建, 等. 热休克蛋白 70 在诱导肿瘤免疫中的效应 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003, 23(1): 31- 33.
- [10] 黄晓兵, 候梅. 热休克蛋白与肿瘤细胞凋亡[J]. 四川肿瘤防 治, 2003, 16(1): 53-55.
- [11] 刘勇, 李启明, 路名芝, 等. nm23- H1、p53、PCNA 表达与大肠 癌浸润转移的关系[J]. 临床与实验病理学杂志, 1997, 13(1): 21-24.
- [12] Romano JW, Ehrhart JC, Duthu A, et al. Identification and characterization of p53 gene mutation in human osteosarcoma cell line[J]. Oncogene, 1989, 4(12): 1483-1488.
- [13] Hainaut P, Milner J. Interaction of heat shock protein 70 with p53 translated in vitro: evidence for interaction with dimeric P53 and for a role in the regulation of p53 conformation[J]. EMBO, 1992, 11(10): 3513-3520.
- [14] Huol J, Roy G, Lamber H, et al. Increased survival after treatments with anticancer agenes of Chinese hamster cells ex- pression the human Mr 27000 heat shock protein[J]. Cancer Res, 1991, 51(1): 245-254.
- [15] Fourie AM, Hupp TR, Lane DP, et al. HSP70 binding sites in the tumor suppressor protein p53[J]. J Biol Chem, 1997, 272(40): 19471-19479.

[编辑:安 凤]

## 乳腺癌组织中核转录因 NF- $\kappa$ B 和抑癌基因 p53 的表达及其意义

(正文见 342 页)

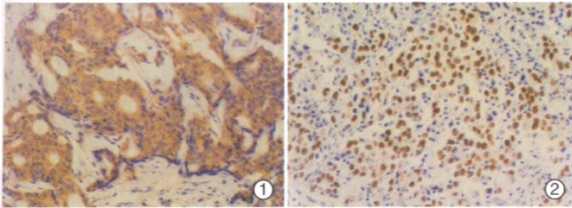


图1 乳腺癌细胞质中 NF- $\kappa$ B65 呈阳性表达(SP  $\times$  200)  
图2 乳腺癌细胞核中 p53 呈阳性表达(SP  $\times$  200)

## 大肠癌组织中 HSP70 和 p53 蛋白的表达及其意义

(正文见 363 页)

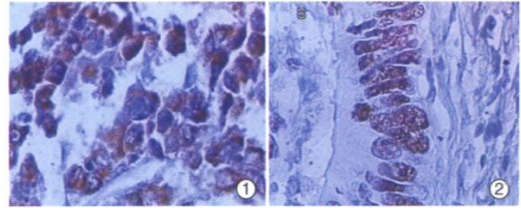


图1 HSP70 在大肠癌组织中的表达 ( $\times$  400)  
图2 p53 蛋白在大肠癌组织中的表达 ( $\times$  400)

## 肿瘤相关抗原在人大肠癌中的表达

(正文见 354 页)

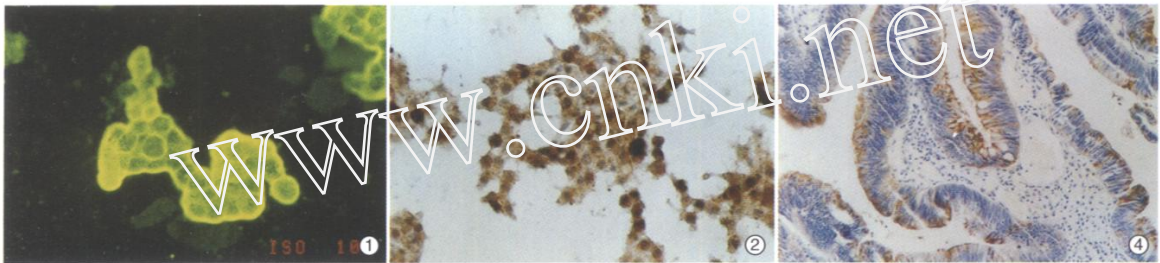
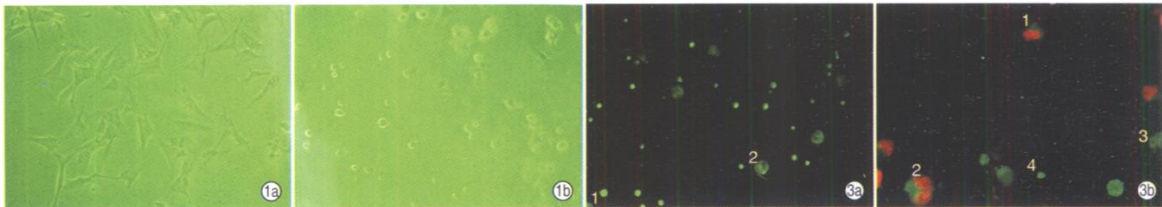


图1 ND-1 对 CCL-187 细胞间接免疫荧光照片 ( $\times$  400);  
图2 LEA 对 CCL-187 细胞的免疫细胞化学染色 (SP  $\times$  400);  
图4 LEA 在大肠癌组织中的免疫组化检测 (SP  $\times$  400)

## 环氧化酶-2 抑制剂 Nimesulide 对膀胱癌 T24 细胞体外生长的抑制作用

(正文见 369 页)



1a. 未加药组 T24 细胞 ( $\times$  400)  
1b. 高浓度组 T24 细胞 ( $\times$  400)  
图1 Nimesulide 作用后 T24 细胞形态学改变

3a. 1:VA 2:VN ( $\times$  200)  
3b. 1:NVA 2:NVN 3:VN 4:VA ( $\times$  400)  
图3 NIM 诱导 T24 细胞凋亡的荧光染色观察