

P-cadherin 和 HSP27 蛋白在胃癌组织的表达及临床意义

胡凤兰¹,何秋瑜¹,李祥佩²,刘清华¹,刘莹¹,朱祖安^{2*}

(¹徐州医学院病理教研室,江苏 徐州 221000;²徐州医学院附属医院消化内科,江苏 徐州 221000)

[摘要] 目的:探讨 P 钙黏蛋白(P-cadherin)与热休克蛋白 27(HSP27)在胃癌组织中的表达及其与临床病理因素之间的关系,进而探讨其作为预后指标的意义。方法:建立组织芯片,通过免疫组化 SP 法检测 75 例术前无化疗史的胃癌手术标本和 75 例正常胃组织中 P-cadherin、HSP27 的表达情况,并对随访患者进行生存分析。结果:在胃癌组织及正常胃组织中,P-cadherin、HSP27 的表达率分别为 40.0%、82.7%($P < 0.001$)和 64.0%、30.7%($P < 0.001$)。P-cadherin 低表达和 HSP27 高表达与临床分期、分化程度和淋巴结转移相关($P < 0.05$),HSP27 高表达还与肿瘤大小相关($P < 0.05$)。Pearson 相关分析显示,P-cadherin 与 HSP27 在胃癌中的表达呈负相关($P < 0.05$)。单因素 Kaplan-Meier 回归分析显示 P-cadherin 和 HSP27 与预后相关($P < 0.05$)。Cox 单因素回归分析显示 P-cadherin、HSP27、临床分期、肿瘤大小、有无淋巴结转移与患者预后相关($P < 0.05$);Cox 多因素回归模型分析显示 HSP27、临床分期与患者预后相关($P < 0.05$)。结论:在胃癌中,P-cadherin 低表达、HSP27 高表达与胃癌临床病理特征和生物学行为密切相关。P-cadherin 与 HSP27 的表达在胃癌组织中呈负相关。P-cadherin 和 HSP27 可作为判断患者预后的候选指标。

[关键词] 组织芯片;P 钙黏素;热休克蛋白 27

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)01-026-05

doi:10.7655/NYDXBNS20150106

Expression and clinical significance of P-cadherin and HSP27 proteins in gastric carcinoma

Hu Fenglan¹, He Qiuyu¹, Li Xiangpei², Liu Qinghua¹, Liu Ying¹, Zhu Zu'an^{2*}

(¹Department of Pathology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000; ²Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, China)

[Abstract] **Objective:** This study investigated the expression and significance of both P-cadherin and HSP27 proteins in gastric carcinoma tissues as well as the relationships among the clinical pathologic factors, and discussed the meaning of being prognostic indicators. **Methods:** High throughput technology of tissue microarray and immunohistochemical SP method was employed to investigate the expression of P-cadherin and HSP27 proteins in 75 gastric carcinoma specimens from patients without chemo-radiation therapy and 75 non-tumor gastric tissues. Survival analysis was carried out on the follow-up of patients. **Results:** In gastric cancer tissue and normal gastric tissue, the expression rates of P-cadherin, HSP27 were detected to be 40.0% and 82.7%, 64.0% and 30.7%, respectively (both $P < 0.001$). High expression of P-cadherin and low expression of HSP27 were related to clinical stage, differentiation degree and lymph node metastasis ($P < 0.05$), the high expression of HSP27 was also correlated with tumor size ($P < 0.05$). According to the results of Pearson correlation analysis, the expression rates of P-cadherin and HSP27 in gastric cancer were negatively correlated to each other ($P < 0.05$). Kaplan-Meier analyses showed that P-cadherin and HSP27 were significantly associated with the prognosis ($P < 0.05$). The results of univariate analysis of Cox showed that P-cadherin, HSP27, clinical stage, tumor size and lymph node metastasis were significantly correlated with the prognosis ($P < 0.05$); The multivariate analysis of Cox model indicated that HSP27 and clinical stage were significantly correlated with the prognosis ($P < 0.05$). **Conclusion:** The low expression of P-cadherin in gastric carcinoma and high expression of HSP27, which was closely related with the clinical pathological features and biological behaviors of gastric cancer. Expression of P-cadherin and HSP27 were negatively correlated in gastric carcinoma. P-cadherin and HSP27 could be used as the candidate index to judge the prognosis of patients with gastric carcinoma.

[Key words] tissue microarray; P-cadherin; HSP27

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(01):026-030]

[基金项目] 江苏省卫生厅指导性科研项目(Z201016)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: liuyingzmc@163.com

胃癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一,世界范围内胃癌发病率仅次于肺癌居第 2 位^[1]。我国胃癌的发病率及病死率均居恶性肿瘤之首,其早期诊断率低,根治术后复发转移率高,所以针对新的治疗靶点来提高疗效的研究是目前的热点。

热休克蛋白(heat shock proteins,HSPs)是一组在结构上高度保守的多肽,其生物学功能十分广泛,参与细胞的损伤与修复^[2],同时在乳腺癌^[3]、结肠癌^[4]等肿瘤细胞高表达,与肿瘤的发生、发展、侵袭转移有关。钙黏蛋白(cadherin,Cad)是一种细胞黏附分子,属于钙离子依赖性跨膜糖蛋白,目前已经发现的钙黏蛋白有几十种,最主要的有上皮型钙黏蛋白、神经型钙黏蛋白以及胎盘型钙黏蛋白 3 种亚型,分别由 CDH1、CDH2 和 CDH3 基因编码而成,表达于不同组织中。钙黏蛋白在维持组织结构的完整性与细胞极性方面发挥着重要的作用,部分钙黏蛋白的功能与结构异常是肿瘤侵袭与转移的主要原因。热休克家族种类繁多,在肿瘤发生发展中的作用不尽相同,近年来研究发现,HSP27 与多种肿瘤的生物学行为和预后存在密切关系,但其在胃癌中的研究甚少,尤其针对胃癌中 P 钙黏蛋白(P-cadherin)与热休克蛋白 27(HSP27)的相关研究不多,因此本实验采用免疫组化和组织芯片技术研究 P-cadherin 和 HSP27 在胃癌中的表达及其与临床病理因素之间的关系,探讨其在胃癌发生、发展中的作用,对胃癌新的治疗靶点以及新的诊断指标提供理论依据。

1 对象和方法

1.1 对象

收集徐州医学院附属医院 2009 年胃癌手术标本和临床资料齐备者 75 例,其中男 53 例,女 22 例;年龄 23~78 岁;肿瘤直径 ≤ 5 cm 者 46 例, > 5 cm 者 29 例;根据国际抗癌联盟(UICC)1987 年公布的胃癌 TNM 分期法将肿瘤分期:I 期 9 例,II 期 35 例,III 期 25 例,IV 期 6 例;组织学分级为:高分化腺癌 3 例,中分化腺癌 31 例,低分化腺癌 41 例;其中有 49 例发生淋巴结转移。75 例患者中有 51 例获得随访资料,随访时间为 1~63 个月,其中死亡 39 例,生存(截尾数据)12 例。另外选取这 75 例患者的癌旁组织作为对照组。所有患者均未给予术前放化疗,且肿瘤组织均制备成组织切片,行 HE 染色后由 2 名病理医师采用双盲法确诊。

二抗生物素化通用型 IgG/Bio 抗体试剂盒(SP-9000)、DAB 显色试剂盒、EDTA 抗原修复液、PBS 粉

剂(北京中杉金桥生物技术有限公司),P-cadherin(bs-1159R)多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司),HSP27(BA0361)多克隆抗体(武汉博士德生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 组织芯片的制作

标本均为 4%中性甲醛溶液固定,常规处理、石蜡包埋。采用机器制作组织芯片,所用组织芯片制作仪 MINICORE 为英国 MITOGEN 公司产品,取样针直径 1.0 mm,组织芯间距 1.0 mm。

1.2.2 免疫组织化学检测

P-cadherin 和 HSP27 分别采用 SP 染色法,染色步骤按产品说明书进行,抗原修复采用高压修复。工作液浓度分别为 P-cadherin(1:150)、HSP27(1:100)。实验用 PBS 代替一抗作为阴性对照,用已知阳性的胃癌组织切片作为阳性对照。免疫组织化学结果判定以镜检显示胞膜或胞质染为淡黄色至棕黄色为阳性细胞标志。P-cadherin 蛋白以细胞膜或胞质呈棕黄色颗粒为阳性;HSP27 蛋白以胞浆呈棕黄色颗粒为阳性。P-cadherin 和 HSP27 蛋白组织化学评分法根据阳性细胞百分比和染色强度划分^[6]。免疫组化阳性细胞百分比以 $\geq 25\%$ 为阳性。反应等级分为: $< 25\%$ 为 0 分; $\geq 25\%$ 且 $< 50\%$ 为 1 分; $\geq 50\%$ 且 $< 75\%$ 为 2 分; $\geq 75\%$ 为 3 分。染色强度分为无、弱、中等、强 4 个等级,没有着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。阳性细胞百分比和着色强度的乘积为最终结果, > 3 为阳性, ≤ 3 为阴性。

1.3 统计学方法

使用 SPSS16.0 统计软件,P-cadherin 和 HSP27 蛋白在正常胃组织及胃腺癌各临床病理参数之间表达差异的比较采用四格表资料的 χ^2 检验,用 Spearman 相关分析检测 P-cadherin 和 HSP27 蛋白的相关性。对有随访资料的 P-cadherin 和 HSP27 作出 Kaplan-Meier 生存曲线,各组生存率用 log-rank 检验进行组间生存率的比较,P-cadherin 和 HSP27 的表达与预后的关系采用单因素和多因素 Cox 回归模型进行分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 P-cadherin 表达及其与临床病理参数的关系

胃癌组织中 P-cadherin 蛋白主要定位于癌细胞膜或细胞浆中(图 1A)。本实验中患者 P-cadherin 蛋白在胃癌中阳性表达率为 40.0%(43/75),在癌旁组织中表达率为 82.7%(62/75),两组差异有统计学意

义($P < 0.001$)。P-cadherin 蛋白表达与肿瘤 TNM 分期、分化程度和淋巴结转移相关($P < 0.05$),而与患者性别、年龄、肿瘤大小无关($P > 0.05$,表 1)。

2.2 HSP27 蛋白表达及其与临床病理参数的关系

胃癌组织中 HSP27 蛋白主要定位于癌细胞浆,以胞浆着色为主(图 1B)。本组患者 HSP27 蛋白在胃癌中阳性表达率为 64.0%(48/75),在癌旁

组织中阳性表达率为 30.7%(23/75),两组差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。HSP27 表达与肿瘤 TNM 分期、分化程度、肿瘤的大小和淋巴结转移相关($P < 0.05$),而与患者性别、年龄无关($P > 0.05$,表 1)。

2.3 P-cadherin 和 HSP27 在胃癌表达的相关性

Spearman 相关分析显示,在胃癌中,P-cadherin 与 HSP27 表达呈显著负相关($r = -0.408, P < 0.001$,表 2)。

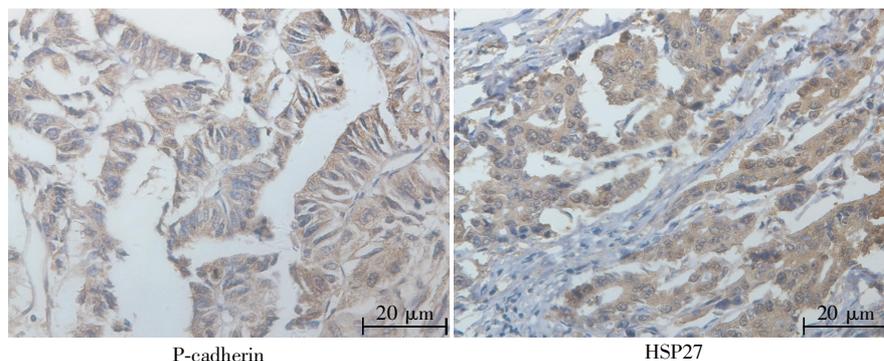


图 1 P-cadherin 和 HSP27 在胃癌组织中的阳性表达(SP,×400)

Figure 1 Positive expression of P-cadherin and HSP27 in gastric carcinoma(SP,×400)

表 1 P-cadherin 和 HSP27 的表达与胃癌患者临床病理参数之间的关系

Table 1 The relationship between P-cadherin and HSP27 expression and clinical pathological factors of gastric carcinoma patients (n)

指标	P-cadherin			HSP27		
	+	-	P 值	+	-	P 值
性别						
男	21	32	0.918	35	18	0.568
女	9	13		13	9	
年龄						
<60 岁	11	23	0.218	20	14	0.395
≥60 岁	19	22		28	13	
分期						
I~II 期	22	22	0.035	23	21	0.012
III~IV 期	8	23		25	6	
分化程度						
高中分化	22	12	0.000	16	18	0.005
低分化	8	33		32	9	
肿块大小						
≤5 cm	22	25	0.119	23	23	0.001
>5 cm	8	20		25	4	
淋巴转移						
有	13	36	0.001	32	9	0.005
无	17	9		16	18	

2.4 P-cadherin 和 HSP27 的表达与胃癌患者预后的关系

对 51 例获得随访结果的胃癌患者进行 Kaplan-Meier 生存分析,结果显示 P-cadherin 高表达组患者

表 2 胃癌中 P-cadherin 和 HSP27 的相关性分析

Table 2 Correlation analysis of P-cadherin and HSP27 in gastric carcinoma (n)

		P-cadherin		r 值	P 值
		+	-		
HSP27	+	12	36	-0.408	<0.001
	-	18	9		

的总生存率明显高于低表达组,而 HSP27 低表达组患者的总生存率明显高于高表达组,用 log-rank 检验进行组间生存率检验结果显示,P-cadherin($\chi^2 = 8.215, P = 0.004$)、HSP27($\chi^2 = 13.109, P < 0.01$)组间生存率差异有统计学意义,即 P-cadherin 低表达和 HSP27 高表达与胃癌预后不良有关(图 2、3)。

经 Cox 比例风险回归模型分析,单因素分析显示,肿瘤的分期、大小、有无淋巴结转移、P-cadherin 以及 HSP27 的表达与患者预后相关 ($P < 0.05$,表 3)。Cox 逐步回归多因素分析,临床分期、HSP27 蛋白的表达与患者预后相关($P < 0.05$,表 4)。

3 讨论

组织芯片(tissue chip)又称组织微列方阵(tissue microarray, TMA),是将许多不同个体组织以规则阵列方式排布在同一载玻片上,进行同一指标的原位组织学研究,极大提高了检测效率与实验条件的规范标准,目前已广泛运用于肿瘤学研究的各个领域。

肿瘤的发生涉及多种细胞事件及生理过程,其

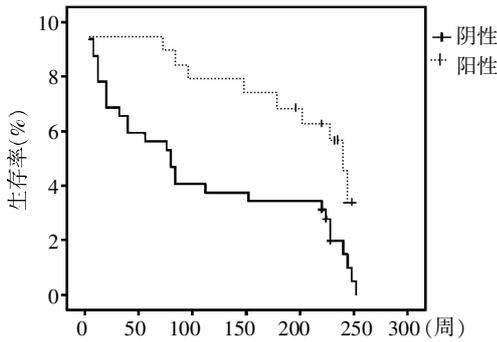


图 2 P-cadherin 表达与生存期的关系

Figure 2 Relationship of P-cadherin expression and life span

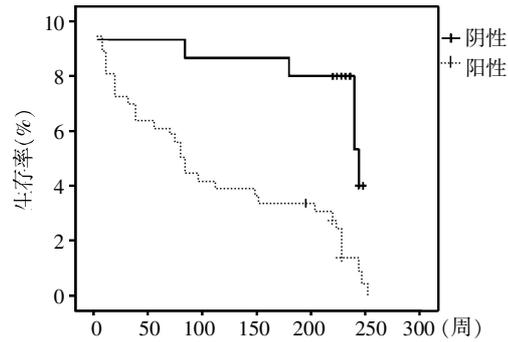


图 3 HSP27 表达与生存期的关系

Figure 3 Relationship of HSP27 expression and life span

表 3 胃癌单因素生存分析(Cox 比例风险模型分析)结果

Table 3 Univariate survival result of gastric carcinoma (Cox rate risk model analysis)

因素	回归系数	标准误	Wald 值	P 值	相对危险度 (95%CI)
P-cadherin	-1.000	0.371	7.255	0.007	0.368(0.178~0.762)
HSP27	1.477	0.452	10.677	0.001	4.379(1.806~10.621)
年龄	-0.002	0.015	0.012	0.914	0.998(0.970~1.028)
性别	-0.150	0.355	0.178	0.673	0.861(0.430~1.726)
分期	0.672	0.219	9.396	0.002	1.957(1.274~3.007)
分化	-0.280	0.317	0.779	0.377	0.756(0.406~1.407)
大小	0.215	0.073	8.721	0.003	1.240(1.075~1.431)
淋巴转移	0.894	0.386	5.367	0.021	2.445(1.148~5.208)

表 4 胃癌多因素生存分析(Cox 比例风险模型分析)结果

Table 4 Multivariable survival result of gastric carcinoma (Cox rate risk model analysis)

因素	回归系数	标准误	Wald 值	自由度	P 值	相对危险度 (95%CI)
HSP27	1.104	0.520	4.511	1	0.034	3.017(1.089~8.357)
I 期	-	-	7.148	3	0.067	-
II 期	-1.181	0.855	1.911	1	0.167	0.307(0.057~1.638)
III 期	-1.516	0.570	7.083	1	0.008	0.220(0.072~0.671)
IV 期	-1.159	0.587	3.897	1	0.048	0.314(0.099~0.992)
大小	0.113	0.092	1.505	1	0.220	1.119(0.935~1.340)

基于偏最大似然估计的前进法, 选入变量 $P \leq 0.05$, 剔除变量 $P > 0.1$ 。临床分期 III 期、IV 期与 I 期相比, $^*P < 0.05$ 。

中胞内蛋白表达异常是癌变原因之一。HSPs 不仅在应激条件下维持细胞必需的蛋白质空间构象, 保护细胞生命活动以确保细胞生存, 而且对未折叠新生多肽链、多蛋白复合物的组装和跨膜运输、转位, 细胞内蛋白质合成后的加工, 细胞骨架和核骨架的稳定等都起着重要作用^[5]。HSP27 是 HSP 家族的主要成员之一, 在正常生理状态下, HSP27 表达较低以利于细胞活动的正常进行, 在不同刺激条件下, 如加热、X 线、细胞氧化及抗癌药物处理后 HSP27 表达增高^[6]。HSP27 高表达与恶性肿瘤关系密切, 在许多恶性肿瘤中均发现有高表达^[7]。钙黏蛋白是一类 Ca^{2+} 依赖的细胞膜表面跨膜糖蛋白, 其特征为细胞类型特异性的表达模式, 即介导同型细胞间的黏附, 形成二聚体发挥作用^[8]; 它的活动异常可导致组织细胞结构改变和功能障碍, 有些钙黏蛋白的结构和功能异常与肿瘤的侵袭转移密切相关^[9-11]。P-cadherin 是

钙黏蛋白家族中的一员, 它主要见于胎盘和上皮组织, 如乳腺、前列腺等。它对组织、细胞的形态发生、生长和分化具有重要作用, 对防止肿瘤细胞的浸润转移有重要意义。研究表明, P-cadherin 基因与 E-cadherin 基因连锁于同一染色体片段 (16q22.1)。目前, 国外一些研究认为, 在人类乳腺不同的病变中, P-cadherin 表达不同, 40% 的浸润癌细胞中 P-cadherin 有表达上调, 而也有研究认为 P-cadherin 的表达与乳腺病变无相关性。Kovacs 等^[13] 采用免疫组化法对 100 例浸润性乳腺癌研究发现, P-cadherin 的阳性表达率为 40.0% (40/100); 并且发现在分化差的乳腺癌中, P-cadherin 表达率显著降低。Van 等^[14] 研究表明 P-cadherin 在恶性黑色素瘤中作为一种肿瘤抑制基因, 能抑制肿瘤的侵袭和转移。P-cadherin 表达下调的作用机制还尚不清楚, 可能与肿瘤的变异和异质性有关。同时 P-cadherin 在胃癌里的表达情况还

不甚明确。

为了探讨 HSP27 以及 P-cadherin 在胃癌发生、发展中的作用,本研究以组织芯片为研究对象,运用免疫组化技术从蛋白水平检测 P-cadherin 和 HSP27 在胃癌组织中的表达情况。结果显示 P-cadherin 在胃癌中的阳性表达率明显低于正常胃组织;HSP27 在胃癌的阳性表达率明显高于正常胃组织。P-cadherin 在分化程度高、无淋巴结转移和早期分期的患者中高表达;HSP27 在分化程度低、有淋巴结转移、晚期分期和瘤体大的患者中高表达,差异有统计学意义。这提示高表达 HSP27 的肿瘤组织有较高的恶性度和侵袭性而 P-cadherin 的高表达则可能起到保护作用。二者异常表达在胃癌的发生、发展过程中可能起重要作用,因此其对肿瘤的诊断和风险预报具有重要的提示信息。本组结果还显示 P-cadherin 和 HSP27 在胃癌中的表达呈负相关性,提示 P-cadherin 在肿瘤的发生、发展中可能受 HSP27 的负向调控^[15]。

随访资料的 Kaplan-Meier 单因素分析、Cox 单因素回归分析显示 P-cadherin 和 HSP27 与胃癌的预后有关,Cox 多因素回归模型分析显示 HSP27 与患者预后相关。P-cadherin 表达减弱和 HSP27 蛋白表达增强提示患者预后差,因此 P-cadherin 和 HSP27 蛋白可作为胃癌预后的指标之一。

另外,Cox 单因素分析显示临床分期、肿瘤大小、淋巴结转移与预后相关,说明了肿瘤大小、淋巴结转移状态和远处转移状态的 TNM 分期,是影响胃癌预后的重要因素,提示早期诊断、早期干预能够提高患者的生存率。Cox 多因素回归分析提示临床分期Ⅲ期、Ⅳ期的患者与 I 期相比,差异有统计学意义。

综上所述,HSP27 可作为一种重要物质参与调控肿瘤细胞增殖和凋亡,而 P-cadherin 可作为一种保护因子,在胃癌发生、发展中发挥重要作用,因此提示 HSP27 可作为胃癌治疗的有效靶点,而 P-cadherin 可作为判断预后的一种手段,但其作用的具体机制及相关分子通路尚待进一步探讨。

[参考文献]

[1] Filomena A, Saieva C, Lucchetti V, et al. Gastric Cancer surveillance in a high-risk population in Tuscany (Central Italy): preliminary results [J]. *Digestion*, 2011, 84 (1): 70-77

[2] Yanaka A. Role of heat shock protein in gastric mucosal protection [J]. *Nihon Rinsho*, 2007, 65(10): 1890-1895

[3] Lee HH, Lim CA, Cheong YT, et al. Comparison of protein expression profiles of different stage of lymph nodes metastasis in breast cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8 (3): 353-362

[4] Bauer K, Nitsche U, Slotta-Huspenina J, et al. High HSP27 and HSP70 expression levels are independent adverse prognostic factors in primary resected colon cancer [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2012, 35(3): 197-205

[5] Jolly 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

[6] Nagaraja GM, Kaur P, Asea A. Role of human and mouse HspB1 in metastasis [J]. *Curr Mol Med*, 2012, 12 (9): 1142-1150

[7] Lee SS, Tsai CH, Ho YC, et al. Heat shock protein 27 expression in areca quid chewing-associated oral squamous cell carcinomas [J]. *Oral Dis*, 2012, 18(7): 713-719

[8] Li DM, Feng YM. Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 128(1): 7-21

[9] Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, et al. Cadherin switching [J]. *Cell Sci*, 2008, 121(6): 727-735

[10] Paredes J, Albergaria A, Oliveira JT, et al. P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11 (6): 5869-5877

[11] Munoz-Guerra MF, Marazuela EG, Fernandez-Contreras ME, et al. P-cadherin expression reduced in squamous cell carcinoma of the oral cavity: an indication of poor prognosis [J]. *Cancer*, 2005, 103(5): 960-969

[12] Paredes J, Correia AL, Ribeiro AS, et al. P-cadherin expression in breast cancer: a review [J]. *Breast Cancer Res*, 2007, 9(5): 214

[13] Kovacs A, Dhillon J, Walker RA. Expression of P-cadherin, but not E-cadherin or N-cadherin, relates to pathological and functional differentiation of breast carcinomas [J]. *J Clin Pathol*, 2003, 56(6): 318-322

[14] Van Marck V, Stove C, Van Den Bossche K, et al. P-cadherin promotes cell-cell adhesion and counteracts invasion in human melanoma [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(19): 8774-8783

[15] Aldrian S, Kindas-Mügge I, Trautinger F, et al. Overexpression of Hsp27 in a human melanoma cell line: regulation of E-cadherin, MUC18/MCAM, and plasminogen activator (PA) system [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2003, 8 (3): 249-257