



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.03.015
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3818.shtml

· 基础研究 ·

Grb2 在胰腺癌中的表达及其意义

何政, 郑军

(湖北省宜昌中心人民医院 普通外科一病区, 湖北 宜昌 443002)

摘要

目的: 探讨生长因子受体结合蛋白 2 (Grb2) 在胰腺癌中的表达及其意义。

方法: 分别采用 real-time PCR 和 Western blot 方法检测 6 种胰腺癌细胞株中 Grb2 基因和蛋白表达水平; 采用组织芯片检测 80 例胰腺癌组织及癌旁胰腺组织中 Grb2 的表达情况, 并分析 Grb2 表达状态与胰腺癌患者临床病理特征的关系。

结果: Grb2 的 mRNA 与蛋白在高侵袭力、低分化细胞株 PANC-1、MIA-PaCa-2、AsPC-1 中呈相对高表达, 而在低侵袭力、高分化细胞株 BxPC-3、SW1990、capan-2 中呈相对低表达; Grb2 在胰腺癌组织中均有表达, 而在癌旁胰腺组织中不表达或低表达, 统计分析显示, Grb2 的高表达与肿瘤低分化以及淋巴结或者远处转移有关 (均 $P < 0.05$)。

结论: Grb2 的表达与胰腺癌的分化程度和侵袭转移力密切相关, 高表达者肿瘤恶性程度高, 预后差。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(3):338-342]

关键词

胰腺肿瘤; GRB2 衔接蛋白质; 肿瘤浸润; 肿瘤转移

中图分类号: R735.9

Grb2 expression in pancreatic carcinoma and its significance

HE Zheng, ZHENG Jun

(Department of General Surgery, The People's Central Hospital of Yichang, Yichang, Hubei 443002, China)

Corresponding author: ZHENG Jun, Email: zhengjun1995@163.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the Grb2 expression in pancreatic carcinoma and its clinical significance.

Methods: The Grb2 gene and protein expressions in 6 types of pancreatic cancer cell lines were detected by real-time PCR and Western blot, respectively. The Grb2 protein expressions in pancreatic cancer tissues and their adjacent normal tissues from 80 cases were determined by tissue microarray technique, and the relations of Grb2 expression status with clinicopathologic profiles of the pancreatic cancer patients were analyzed.

Results: Both the Grb2 mRNA and protein showed relatively high expression level in the highly invasive and poorly differentiated pancreatic cell lines PANC-1, MIA-PaCa-2 and AsPC-1, but presented relatively low expression level in the less invasive and well differentiated pancreatic cell lines BxPC-3, SW1990 and capan-2. The Grb2 expression was detected in all tested pancreatic cancer tissues, but no or weak Grb2 expression was found in their adjacent normal pancreatic tissues. Statistical analysis showed that high Grb2 expression was associated with poor differentiation of the tumor and lymph node or distant metastasis (both

收稿日期: 2013-05-22; 修订日期: 2014-02-27。

作者简介: 何政, 湖北省宜昌中心人民医院主治医师, 主要从事胆道胰腺方面的研究。

通信作者: 郑军, Email: zhengjun1995@163.com

$P < 0.05$).

Conclusion: Grb2 expression is closely related to the degree of differentiation and ability of invasion and metastasis of pancreatic cancer, and high Grb2 expression may predict highly malignant tumor grades and poor outcome. [Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(3):338-342]

KEYWORDS Pancreatic Neoplasms; GRB2 Adaptor Protein; Neoplasm Invasiveness; Neoplasm Metastasis

CLC number: R735.9

胰腺癌恶性程度极高,其早期诊断困难,易发生侵袭转移而丧失手术时机^[1-2];其对当前的综合放化疗也极其耐受而预后极差^[3-5]。生长因子受体结合蛋白2(growth factor receptor-bound protein 2, Grb2)被证实多种肿瘤细胞株中表达且在肿瘤的发生发展中起到重要作用^[6-9],但Grb2与胰腺癌的关系尚不明确,本实验将为Grb2在胰腺癌中的作用做一初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI1640培养基购自HyCone公司;新生牛血清购自HyClone公司;TRIzol试剂购自Invitrogen公司;Reverse Transcription System试剂盒、SYBR Green Realtime PCR Master Mix购自TOYOBO公司;Grb2和GAPDH引物Invitrogen公司合成;浓缩型兔抗人Grb2多克隆抗体购自SANTA-CRUZ公司。组织芯片购自上海芯超生物科技有限公司。Western blot相关试剂购自武汉博士德公司。ECL显色试剂盒购自碧云天公司,全细胞蛋白提取试剂盒,BCA法测蛋白浓度试剂盒购自碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胰腺癌细胞株PANC-1、MIA-PaCa-2、AsPC-1、BxPC-3、SW1990、capan-2为本实验室长期冷冻保存。其中PANC-1、MIA-PaCa-2、AsPC-1为高侵袭力、低分化细胞株,BxPC-3、SW1990、capan-2为低侵袭力、高分化细胞株^[10-11]。采用含10%新生牛血清的RPMI1640培养基,置37℃、50 mL/L CO₂培养箱内培养。

1.2.2 real-time PCR检测胰腺癌细胞株中Grb2 mRNA的表达 参照说明书,用TRIzol试剂常规提取细胞总RNA。按照逆转

录试剂盒操作程序进行逆转录反应。反应总体积为20 μL,其中样品总RNA 2 μg、primer mix 1 μL、5×buffer 4 μL、enzyme 1 μL,加DEPC水至20 μL,37℃反应15 min,98℃灭活5 min。管家基因GAPDH为内对照。通过相对荧光定量PCR方法,对Grb2和β-actin进行检测,计算出不同样本的Grb2相对表达量。运用Primer 5.0设计引物,Grb2的上游引物为5'-GCC GAA TTC ATG CTG CTG CAG GGG AGC CA-3',下游引物为5'-CGC GTC GAC TCA AGT CTG CTG GGC CTG CAG CA-3'。GAPDH上游引物5'-ACA GTC AGC CGC ATC TTC TT-3',下游引物5'-GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG-3'。应用Bio-Rad CFX定量PCR仪进行real-time PCR实验,反应条件为95℃ 5 s,60℃ 10 s,72℃ 5 s,40个循环。以 $Folds=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示实验组与对照组目的基因表达的倍数比关系,其中 $\Delta\Delta Ct=[Ct(Grb2)-Ct(GAPDH)]_{实验组}-[Ct(Grb2)-Ct(GAPDH)]_{对照组}$ (考虑到统计结果的直观性,选择PANC-1为对照组)。重复3次实验,计算平均值。

1.2.3 Western blot检测胰腺癌细胞株中Grb2蛋白水平的表达 以细胞裂解法提取全细胞蛋白,BCA法测蛋白浓度。样本加入10%SDS-PAGE凝胶进行电泳,转膜至硝酸纤维素膜。Grb2一抗浓度为1:200,β-actin一抗浓度为1:1 000,4℃孵育摇床过夜,二抗(1:2 000)37℃孵育1 h。ECL化学发光试剂盒显色、曝光、显影、定影。用Quality one软件对胶片条带进行定量吸光度分析。

1.2.4 组织芯片检测Grb2在胰腺癌和癌旁正常胰腺组织中的表达 免疫组织化学染色采用SABC法,余按试剂说明书操作。Grb2抗体工作浓度为1:500,DAB显色,苏木素复染,中性树脂固定。以PBS取代一抗为阴性对照,以棕黄色为阳性信

号。综合细胞染色强度和阳性细胞计数进行半定量分析，每张切片至少观察 5 个视野。根据判断标准，背景清晰无色为阴性，浅黄色细胞 ≤ 10% 为可疑阳性 (±)，浅黄色细胞 >10% 为弱阳性 (+)，棕黄色细胞 >30% 为阳性 (++)，棕黄色细胞 >70% 为强阳性 (+++)。将结果分为两组：(±)、(+) 为低表达，(++)、(+++) 为高表达。根据术后病理诊断结果进一步分析 Grb2 表达量与临床病理参数之间的关系。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件包进行处理，计量资料采用 *t* 检验、计数资料采用 χ^2 检验，*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各细胞株 Grb2 mRNA 的表达

real-time PCR 示细胞株 PANC-1 中 Grb2 mRNA 表达量最高，以 PANC-1 作为对照，AsPC-1、SW1990、capan-2、BxPC-3、MIA-PaCa-2 细胞株中 Grb2 的 mRNA 表达水平分别是 PANC-1 的 0.938 8、0.513 2、0.554 9、0.443 2、0.963 7 倍 (图 1)。

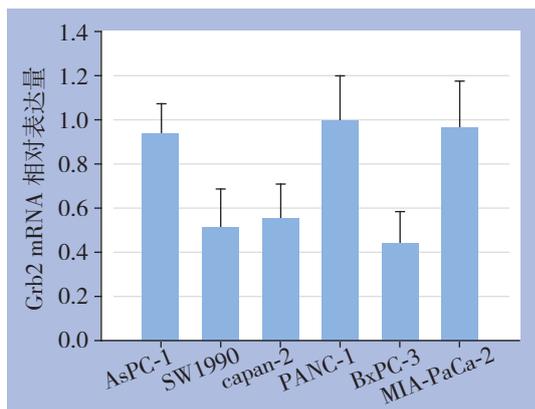


图 1 Grb2 mRNA 在各胰腺癌细胞株的相对表达水平
Figure 1 Relative expression levels of Grb2 mRNA in each pancreatic cancer cell line

2.2 各细胞株 Grb2 蛋白的表达

Western blot 示 Grb2 蛋白在 PANC-1、MIA-PaCa-2、AsPC-1 中相对高表达，在 BxPC-3、SW1990、capan-2 相对低表达，与基因水平一致。

运用 Quality one 软件对胶片条带进行定量分析，以细胞株 PANC-1 作为对照，AsPC-1、SW1990、capan-2、BxPC-3、MIA-PaCa-2 细胞株中 Grb2 的蛋白表达水平分别是 PANC-1 的 0.988 3、0.106 7、0.254 9、0.534 0、0.939 1 倍 (图 2)。

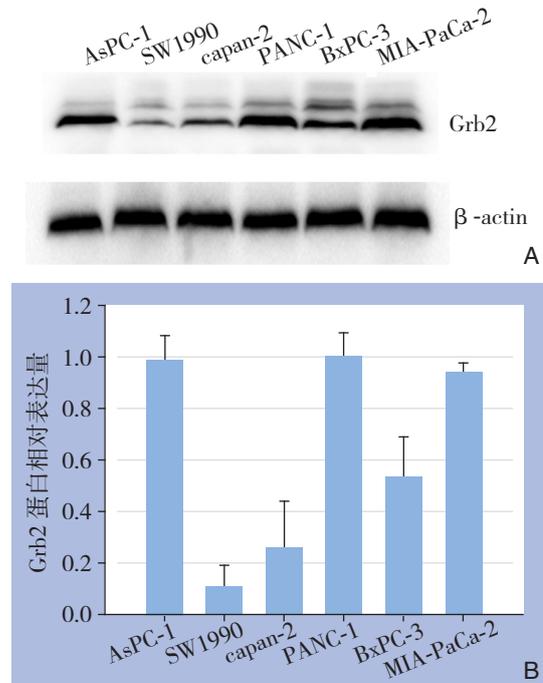


图 2 Western blot 检测胰腺癌细胞株中 Grb2 蛋白的表达
A: 电泳图; B: 相对表达量

Figure 2 Western blot analyses for Grb2 protein expression in each pancreatic cancer cell line A: Electrophoretogram; B: Relative expression level

2.3 胰腺癌组织 Grb2 蛋白的表达及其与临床病理因素的关系

组织芯片示 Grb2 在 80 例临床切除的胰腺癌标本中均有表达，在癌旁正常胰腺组织中不表达或者表达量很低，定位于胞浆和包膜 (图 3)。Grb2 蛋白在胰腺癌中的表达与胰腺癌的病理分化程度有关，在低分化的胰腺癌中，Grb2 高表达；在高分化的胰腺癌组织中，Grb2 相对低表达 (*P* < 0.0001)。Grb2 蛋白在胰腺癌中的表达与胰腺癌是否发生侵袭转移密切相关，在伴有淋巴结或者远处转移的胰腺癌中，Grb2 明显高表达；在不伴有淋巴结和远处转移的胰腺癌中，Grb2 相对低表达 (*P* < 0.0001) (表 1)。

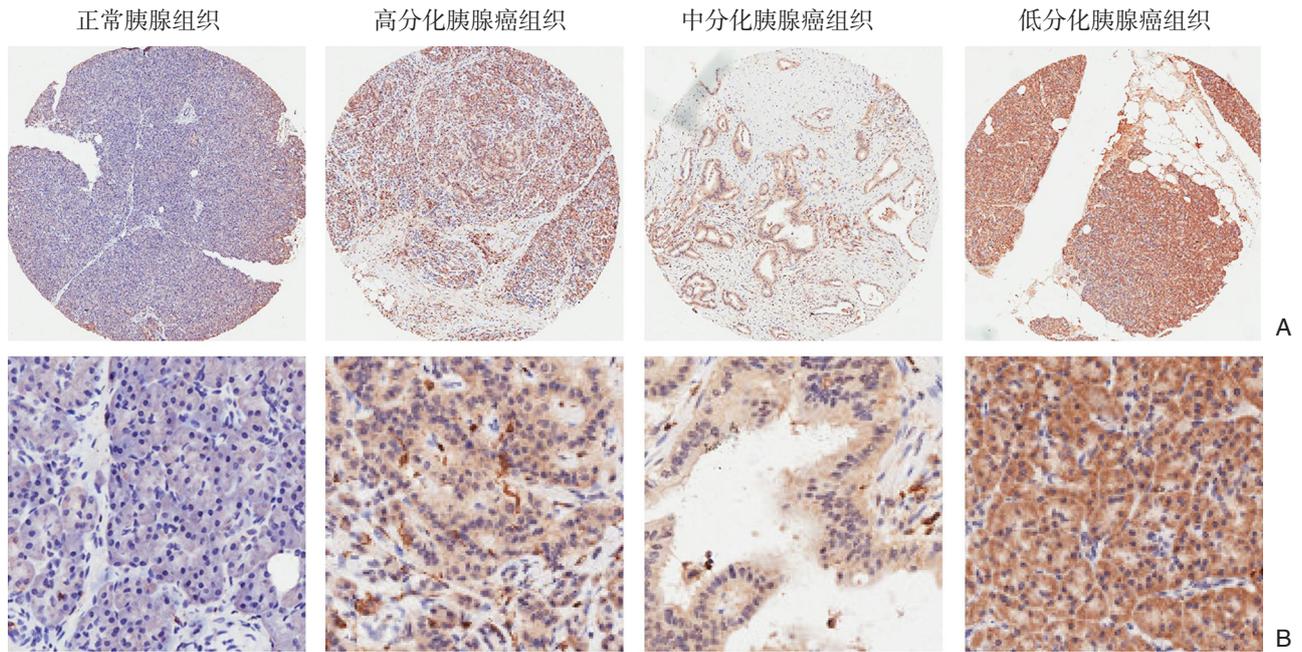


图 3 组织芯片免疫组化检测 Grb2 在胰腺癌组织与癌旁组织中的表达 A: ×40; B: ×200

Figure 3 Immunohistochemical analysis of tissue microarrays for Grb2 expressions in pancreatic cancer tissues and adjacent non-tumorous tissues A: ×40; B: ×200

表 1 Grb2 蛋白的表达与胰腺癌患者临床病理特征间的关系
Table 1 Relations of Grb2 protein expression with the clinicopathologic characteristics of pancreatic cancer patients

临床病理因素	n	Grb2		P	χ ²
		高表达	低表达		
年龄 (岁)					
< 55	42	28	14	0.867	0.028
≥ 55	38	26	12		
性别				0.628	0.241
男	37	26	11		
女	43	28	15		
肿瘤最大径 (cm)				0.340	0.912
< 2	40	25	15		
≥ 2	40	29	11		
组织分化				<0.0001	18.77
高	23	6	17		
中	23	17	6		
低	34	31	3		
转移				<0.0001	20.89
是	55	46	9		
否	25	8	17		

3 讨论

Grb2 是生长因子受体结合蛋白 2, 又叫 Ash 蛋白, 在人类中由 Grb2 基因编码。该蛋白参与细胞内各种受体激活后的下游调节。它能够直接与激活的表皮生长因子受体磷酸化的酪氨酸结合, 参与 EGF 受体介导的信号转导, 也能通过与 Shc 磷

酸化的酪氨酸结合间接参与由胰岛素受体介导的信号转导^[12]。Grb2 能够同时与 Shc、Sos 结合形成 Shc-Grb2-Sos 复合物, 并将 Sos 激活, 激活的 Sos 与质膜上的 Ras 蛋白结合, 并将其激活, 引起信号级联反应。Grb2 蛋白含有一个 SH2 结构域和两个 SH3 结构域, 属 SH 蛋白^[13-14]。

本研究发现在胰腺癌细胞株中, Grb2 蛋白和 mRNA 在侵袭能力较弱、分化程度较高的 BxPC-3、SW1990、capan-2 细胞株中相对低表达; 在侵袭能力较强、分化程度较低的 MIA-PaCa-2、ASPC-1、PANC-1 细胞株中相对高表达。在胰腺癌组织中, Grb2 明显高表达; 而在癌旁胰腺组织中, Grb2 表达量很低或者不表达。本研究通过对 80 例胰腺癌组织进行免疫组织化学法分析, 发现 Grb2 表达量与分化程度和是否伴有转移高度相关。目前研究^[15-16]证实 Grb2 在结肠癌、乳腺癌、胃癌的发生发展中起到重要作用, 与肝癌、前列腺癌的预后有明显关系^[17-18], 在 Grb2 高表达的病例中, 患者的预后明显较差。这都说明 Grb2 在各种肿瘤的发生发展的各个时期都起到重要的作用。

胰腺癌恶性程度高、早期发生侵袭转移、预后非常差。胰腺癌的发生是一个极其复杂的过程, 是多基因协同作用、多因素共同参与、综合发展的结果^[19-20]。Grb2 的表达与胰腺癌细胞的分化程度和是否伴有转移高度相关, 很有可能在胰腺癌的发

生发展和侵袭转移过程中发挥重要的作用。因此进一步研究 Grb2 在胰腺癌中的作用, 有可能进一步阐明胰腺癌早期发生侵袭转移的原因, 开发新的治疗药物。

参考文献

- [1] Kim CB, Ahmed S, Hsueh EC. 胰腺癌的手术治疗现状 [J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22 (9):1105-1113.
- [2] 向旭, 王道石, 邱仁央, 等. 扩大根治性切除治疗胰头癌 [J]. 中国普通外科杂志, 2010, 19 (5):539-542.
- [3] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009[J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4):225-249.
- [4] 张国华, 刘士霞. 胰腺癌 41 例误诊因素探讨 [J]. 实用医学杂志, 2006, 22(23):2804-2805.
- [5] 张亮, 王建方, 杨国山, 等. 胰腺癌多种治疗模式的临床疗效对比 [J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(9):1138-1141.
- [6] Jang IK, Zhang J, Gu H. Grb2, a simple adapter with complex roles in lymphocyte development, function, and signaling[J]. Immunol Rev, 2009, 232(1):150-159.
- [7] Giubellino A, Burke TR Jr, Bottaro DP. Grb2 signaling in cell motility and cancer[J]. Expert Opin Ther Targets, 2008, 12(8):1021-1033.
- [8] Feller SM, Lewitzky M. Potential disease targets for drugs that disrupt protein-protein interactions of Grb2 and Crk family adaptors[J]. Curr Pharm Des, 2006, 12(5):529-548.
- [9] Dharmawardana PG, Peruzzi B, Giubellino A, et al. Molecular targeting of growth factor receptor-bound 2 (Grb2) as an anti-cancer strategy[J]. Anticancer Drugs, 2006, 17(1):13-20.
- [10] Zhang Y, Wei J, Wang H, et al. Epithelial mesenchymal transition correlates with CD24+CD44+ and CD133+ cells in pancreatic cancer[J]. Oncol Rep, 2012, 27(5):1599-1605.
- [11] Ding Q, Yoshimitsu M, Kuwahata T, et al. Establishment of a highly migratory subclone reveals that CD133 contributes to migration and invasion through epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer[J]. Hum Cell, 2012, 25(1):1-8.
- [12] Downward J. The GRB2/Sem-5 adaptor protein[J]. FEBS Lett, 1994, 338(2):113-117.
- [13] Miki H. Ash/Grb2--toward the elucidation of its mechanism to produce a variety of signals[J]. Seikagaku, 1995, 67(2):144-148.
- [14] Takenawa T, Miki H, Matuoka K. Signaling through Grb2/Ash-control of the Ras pathway and cytoskeleton[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1998, 228:325-342.
- [15] Yin J, Cai Z, Zhang L, et al. A recombinant fusion protein PTD-Grb2-SH2 inhibits the proliferation of breast cancer cells in vitro[J]. Int J Oncol, 2013, 42(3):1061-1069.
- [16] Hoeben A, Martin D, Clement PM, et al. Role of GRB2-associated binder 1 in epidermal growth factor receptor-induced signaling in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Int J Cancer, 2013, 132(5):1042-1050.
- [17] Xu XL, Wang X, Chen ZL, et al. Overexpression of Grb2-associated binder 2 in human lung cancer[J]. Int J Biol Sci, 2011, 7(5):496-504.
- [18] Hino N, Oyama M, Sato A, et al. Genetic incorporation of a photo-crosslinkable amino acid reveals novel protein complexes with GRB2 in mammalian cells[J]. J Mol Biol, 2011, 406(2):343-353.
- [19] 江建新, 刘勇, 高珊, 等. 14-3-3 σ 对胰腺癌 PANC-1 细胞侵袭能力的影响 [J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(3):294-299.
- [20] 肖卫东, 李勇, 邹叶青, 等. 沉默 DNMT1 和 DNMT3b 基因对胰腺癌 BxPC-3 细胞 p16/RASSF1A 基因启动子甲基化的影响 [J]. 中国普通外科杂志, 2012, 21(3):322-326.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 何政, 郑军. Grb2 在胰腺癌中的表达及其意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(3):338-342. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.03.015

Cite this article as: HE Z, ZHENG J. Grb2 expression in pancreatic carcinoma and its significance [J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(3):338-342. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.03.015

本刊为《中国学术期刊网络出版总库》期刊

为了实现学术期刊媒体的数字化、网络化转型, 更好地推进学术文献资源的广泛传播和深度开发利用, 本刊已加入《中国学术期刊网络出版总库》。在我刊刊登的文章, 该数据库可免费提供作者文章引用统计分析资料。如作者不同意将文章编入该数据库, 请在来稿时声明或另投它刊。作者著作权使用费将在本刊稿酬中一次性给付。

《中国学术期刊网络出版总库》通过“中国知网”(www.cnki.net)和“中国期刊网”(www.chinajournal.net.cn)进行网络出版与信息服务。其集成整合和优化利用我国知识信息资源, 向国内外读者提供动态信息服务, 欢迎广大作者、读者浏览。

中国普通外科杂志编辑部