



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.011
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.011
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(4):517-521.

· 基础研究 ·

内质网应激相关蛋白 CHOP/GADD153 在结肠癌组织中的表达及意义

朱兴国¹, 张俊强², 王成宏¹, 何慧菊¹, 赵欢², 陈晓宇²

(1. 安徽医科大学第三附属医院 / 合肥市第一人民医院 普通外科, 安徽 合肥 230088; 2. 安徽医科大学 组织学与胚胎学教研室, 安徽 合肥 230032)

摘要

目的: 探讨结肠癌组织内质网应激相关蛋白 CHOP/GADD153 的表达, 并分析其与临床病理特征的关系。
方法: 选择 82 例结肠癌患者的结肠癌组织与相应的癌旁正常结肠组织 (距癌组织 >5 cm) 制作蜡块后构建组织芯片, 分别用免疫组化及 Western blot 法检测 CHOP/GADD153 蛋白的表达, 并分析其表达与患者临床病理特征分关系。

结果: 免疫组化与 Western blot 结果均显示, 结肠癌组织 CHOP/GADD153 蛋白的表达水平明显癌旁正常结肠组织 ($P < 0.05$); 与临床病理特征的关系分析显示, 结肠癌组织中 CHOP/GADD153 蛋白的表达水平随结肠癌组织分化程度的降低而增强 ($P < 0.05$), 而与患者的年龄、性别、肿瘤的大小、肿瘤的浸润深度和淋巴结转移等因素无关 (均 $P > 0.05$)。

结论: 结肠癌组织中 CHOP/GADD153 蛋白的表达增高, 并与结肠癌组织的分化程度密切相关, 提示内质网应激可能参与了肿瘤分化的调控。

关键词

结肠肿瘤; CHOP/GADD153; 应激, 内质网; 组织阵列分析
中图分类号: R735.3

Expression of endoplasmic reticulum stress-related protein CHOP/GADD153 in colon cancer tissue and its significance

ZHU Xingguo¹, ZHANG Junqiang², WANG Chenghong¹, HE Huiju¹, ZHAO Huan², CHEN Xiaoyu²

(1. Department of General Surgery, the Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University/Hefei First People's Hospital, Hefei 230088, China; 2. Department of Histology and Embryology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract

Objective: To investigate the expression of the endoplasmic reticulum stress (ERS)-related protein CHOP/GADD153 in colon cancer and its relations with clinicopathologic characteristics.

Methods: The specimens of colon cancer tissue and normal adjacent colonic tissue (>5 cm distance from cancer tissue) were taken from 82 colon cancer patients and casted into paraffin blocks for tissue microarray construction. The CHOP/GADD153 protein expression was detected by immunohistochemical staining and Western blot analysis respectively, and the relations of its expression with clinicopathologic characteristics of the patients were analyzed.

Results: Both results of immunohistochemical and Western blot analysis showed that the expression level of

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373421)。

收稿日期: 2014-03-30; 修订日期: 2015-03-07。

作者简介: 朱兴国, 安徽医科大学第三附属医院 / 合肥市第一人民医院副主任医师, 主要从事胃外科方面的研究。

通信作者: 陈晓宇, Email: chenxy@163.com

CHOP/GADD153 protein in the colon cancer tissue was significantly higher than that in normal adjacent colonic tissue ($P<0.05$). The analysis of relationship between CHOP/GADD153 protein expression and clinicopathologic profiles indicated that the expression level of CHOP/GADD153 protein in colon cancer tissue was increased with the decrease of the degree of tumor differentiation ($P<0.05$), but was irrelevant to age, sex, tumor size, tumor infiltration depth and lymph node metastasis (all $P>0.05$).

Conclusion: CHOP/GADD153 protein expression is increased in colon cancer tissue, and is closely related to degree of differentiation of colon cancer, which suggests that ERS may probably participate in the regulation of tumor differentiation.

Key words Colonic Neoplasms; Stress, endoplasmic reticulum; Tissue Array Analysis

CLC number: R735.3

结肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一，发病率高，其病因目前尚无定论。C/EBP的家族成员C-EBP同源蛋白/生长阻滞及DNA损伤诱导基因153 (C/EBP-homologous protein/growth arrest and DNA damage-inducible gene 153, CHOP/GADD153) 是内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 特异性的转录因子^[1-3]。作为内质网应激蛋白分子伴侣参与蛋白质的折叠与转运，生理状态下其表达量很低，但当各种损伤引起错误折叠蛋白增多、胞内Ca²⁺稳态失衡等内质网应激反应时则呈高表达^[4]。近年来国内外对CHOP/GADD153在人类也有研究，但结肠癌组织中的研究甚少^[5-9]。本研究选取结肠癌组织标本及癌旁正常结肠上皮组织82例，应用组织芯片免疫组化法及Western blot法检测CHOP/GADD153蛋白表达，探讨其表达与结肠癌组织临床病理特征及结肠癌发生、发展的联系。

1 材料与方法

1.1 病例资料

收集2011年1月—2013年12月在安徽省合肥市第一人民医院普外科手术切除的新鲜结肠癌组织标本，以及癌旁（手术切缘距癌组织 >5 cm，经HE染色证实无癌细胞）正常结肠组织标本82例。患者术前均未接受放疗、化疗，术后病理均经我院病理科2位以上专家证实。留取部分癌组织和正常标本迅速置 -80 °C冰箱中备用检测。82例结肠癌组织患者中，男59例，女23例；年龄37~81岁，平均 (62.6 ± 9.1) 岁；26例患者癌组织未侵及浆膜，另56例患者癌组织侵及浆膜；31例患者无淋巴结转移，另51例患者有淋巴结转移；根据WHO分

型：38例患者为低分化型，30例中分化型，14例高分化型；38例患者肿瘤直径 ≥ 5 cm，44例肿瘤直径 < 5 cm。

1.2 主要试剂与仪器

鼠抗人CHOP/GADD153多克隆抗体 (sc-7351)、鼠抗人 β -actin (sc-8432) 多克隆抗体购自美国Santa Cruz Biotechnology公司；链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶 (SP) 试剂盒、3, 3'-二氨基联苯胺 (DAB) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司；预染蛋白质分子质量标准 (Marker) 购自加拿大Fermentas公司，ECL超敏显色试剂盒购自美国Pierce公司，RIPA裂解液、BCA试剂盒、PVDF膜、一抗稀释液购自碧云天生物技术研究。切片机构自德国Leica公司；日本Olympus显微镜观察摄片。

1.3 方法

1.3.1 制备组织芯片 新鲜结肠癌组织手术标本，置于4%多聚甲醛溶液固定，常规石蜡包埋、切片、HE染色，作病理组织学诊断。利用组织芯片制作仪，从蜡块上穿取直径1.5 mm的组织蜡块柱，插入具有7列 \times 8行点阵的受体蜡块中，融蜡、冷却，制备组织芯片，厚4 μ m连续切片备用。

1.3.2 免疫组化检测 CHOP/GADD153 蛋白的表达 切片常规脱蜡、水化、抗原修复等，滴加抗CHOP/GADD153抗体（工作浓度1:200）4 °C孵育过夜，加酶标二抗（工作浓度1:400）室温30 min，滴加DAB显色，苏木素复染细胞核，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树脂封片，镜检并摄片。每批切片使用PBS液替代CHOP/GADD153抗体作为阴性对照，用已知CHOP/GADD153阳性乳腺癌组织作阳性对照。阳性结果呈棕黄色细颗粒，分布于细胞核及细胞质。采用南京捷达801

分析软件测定阳性细胞的平均吸光度值 (average optical density, AOD), 每张切片随机测定 5 个区域, 反映 CHOP/GADD153 的表达水平。

1.3.3 Western blot 检测 CHOP/GADD153 蛋白的表达 按蛋白裂解液说明书抽提获取蛋白样本, 取 20 μg 蛋白样本, SDS-PAGE 凝胶电泳后, 转移至 PVDF 膜上, 脱脂奶粉封闭液室温孵育 2 h, PBST 漂洗膜 3 遍, 加入鼠抗人 CHOP/GADD153 抗体 (工作浓度 1:1 000)、β-actin (工作浓度 1:2 000), 4℃ 孵育过夜。弃一抗, PBST 洗 3 遍。加入羊抗鼠二抗 (工作浓度 1:1 000), 室温振荡孵育 2~3 h, 弃二抗, PBST 洗 3 遍, 增强化学荧光发光法 (ECL) 显影, 曝光。结果以灰度扫描, 并进行定量分析。

1.4 统计学处理

所有计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,

采用 SPSS 15.0 统计软件进行分析, 各测定值组间比较采用成组 *t* 检验。

2 结果

2.1 免疫组化显示组织中 CHOP/GADD153 蛋白的表达

82 例结肠癌组织和对照组均显示 CHOP/GADD153 蛋白染色阳性, CHOP/GADD153 蛋白主要表达于细胞质, 有的胞核也有阳性染色, 呈淡黄色、黄色或棕黄色, 细颗粒状。采用南京捷达 801 分析软件, 检测阳性细胞的平均 A 值, 研究表明结肠癌组织中的 CHOP/GADD153 蛋白表达水平 (0.362 ± 0.049) 明显高于正常结肠组织黏膜上皮和腺体中的表达 (0.252 ± 0.032), 差异有统计学意义 ($t=5.824, P=0.001$) (图 1)。

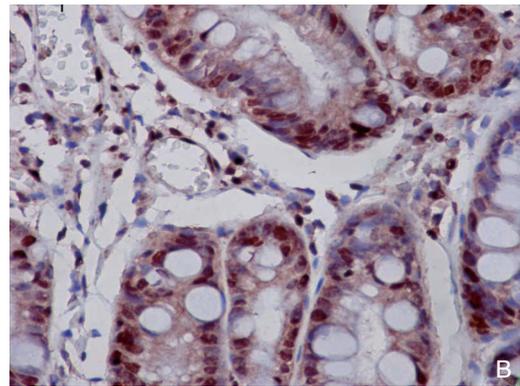
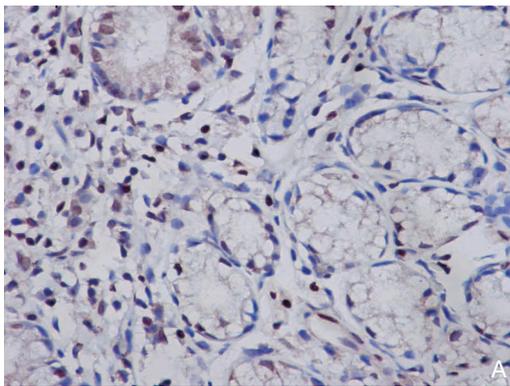


图 1 免疫组化检测 CHOP/GADD153 的表达 (×400) A: 正常结肠组织的弱阳性表达; B: 结肠癌组织的强阳性表达
Figure 1 Immunohistochemical staining for CHOP/GADD153 expression (×400) A: Weak positive expression in normal colonic tissue; B: Strong positive expression in colon cancer tissue

2.2 CHOP/GADD153 在结肠癌组织中的表达与临床病理特征关系

对免疫组化结果进行 AOD 分析, 结果表明, 在结肠癌组织中, CHOP/GADD153 的表达的与结

肠癌组织分化程度有关 ($P < 0.05$), 而与患者的年龄、性别、结肠癌肿瘤大小、浸润程度、淋巴结转移情况无关 (均 $P > 0.05$) (表 1)。

表 1 结肠癌组织中 CHOP/GADD153 的表达与临床病理特征的关系 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Relations of CHOP/GADD153 expression in colon cancer tissue with clinicopathologic features ($\bar{x} \pm s$)

项目	n	AOD	t	P	项目	n	AOD	t	P
性别					有无淋巴结转移				
男	59	0.572 ± 0.265	0.937	0.365	无	31	0.508 ± 0.242	-0.604	0.438
女	23	0.514 ± 0.303			有	51	0.589 ± 0.285		
年龄 (岁)					浸润深度				
< 60	35	0.535 ± 0.317	-0.572	0.562	未浸润浆膜者	26	0.519 ± 0.296	-0.738	0.426
≥ 60	47	0.589 ± 0.275			浸润浆膜或浆膜外	56	0.597 ± 0.308		
肿瘤直径 (cm)					分化情况				
< 5	44	0.532 ± 0.269	-1.382	0.137	高分化	14	0.310 ± 0.023	6.287	0.002
≥ 5	38	0.612 ± 0.286			中分化	30	0.381 ± 0.029		
					低分化	38	0.485 ± 0.032	8.623	0.001

2.3 Western blot 结果

Western blot结果显示,不同分化级别结肠癌组织与正常结肠黏膜上皮中均可检测到CHOP/GADD153的表达。由图像分析可知,与正常组比较,结肠癌组织中CHOP/GADD153蛋白的表达明显增强,且随着分化程度的降低而升高,其中,中、低分化的结肠癌组织中CHOP/GADD153蛋白的表达量明显高于正常组中CHOP/GADD153蛋白的表达量(均 $P < 0.05$)(图2)。

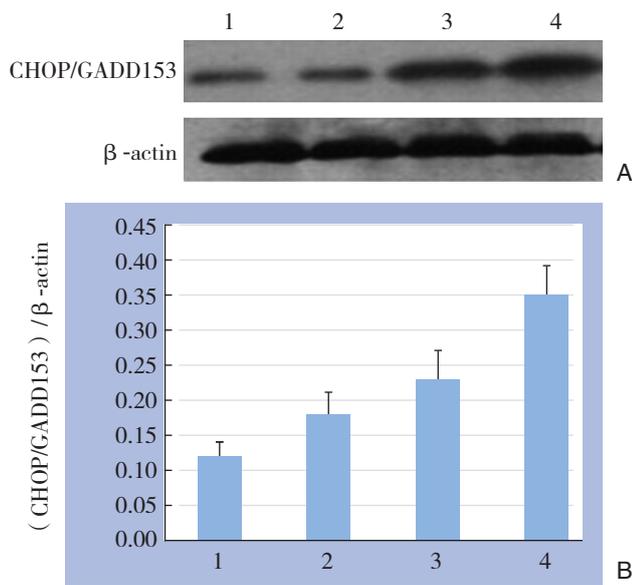


图2 CHOP/GADD153蛋白的表达检测 A: Western blot 检测结果; B: 蛋白表达的半定量分析 1: 正常结肠组织; 2: 高分化结肠癌组织; 3: 中分化结肠癌组织; 4: 低分化结肠癌组织

Figure 2 Determination of CHOP/GADD153 protein expression

A: Western blot image; B: Semi-quantitative analysis of the protein expression 1: Normal colonic tissue; 2: Colon cancer tissue of well differentiation; 3: Colon cancer tissue of moderate differentiation; 4: Colon cancer tissue of poor differentiation

3 讨论

结肠癌是我国常见的消化系统恶性肿瘤,有很高的发病率和病死率,其病因未明,目前普遍认为其涉及多因素、多阶段、多基因变异积累的结果。CHOP是内质网应激特异的转录因子,与机体各种细胞功能活动,如能量代谢、分化、增殖、凋亡有关。正常情况下,CHOP主要位于细胞质中,含量较低;而当细胞处于应激状态时,CHOP可被活化而转位至胞核内^[10-12]; CHOP/

GADD153是内质网应激标志性蛋白,抗肿瘤药可上调CHOP/GADD153基因的表达,从而诱导肿瘤细胞凋亡^[13]。目前普遍认为,3条内质网应激通路介导细胞凋亡:(1)激活和转录CHOP/GADD153基因;(2)激活通路JNK(c-Jun NH₂-terminal protein kinase);(3)激活内质网特有的半胱氨酸蛋白酶caspase-12的通路。CHOP/GADD153是机体促进细胞内蛋白质成熟、维持细胞功能的关键性调节物质^[14-16]。为保证各病例间组织块制片、染色和观察等实验条件的一致性,使试验结果更具可比性,减小系统性误差,本研究应用组织芯片技术,分析CHOP/GADD153在结肠癌组织中的表达。结果显示,结肠癌组织中CHOP/GADD153的表达明显高于正常结肠组织,这可能与结肠实体肿瘤的血供不足,局部肿瘤组织营养缺乏、缺氧和酸中毒,进而激活CHOP/GADD153基因的启动子,引起CHOP/GADD153的过表达^[17]。高表达的CHOP/GADD153抑制前凋亡组分的激活,稳定内质网的钙和内环境稳态,使得肿瘤细胞的存活^[18]。本实验提示在结肠正常黏膜上皮癌变过程发生内质网应激。研究中还发现不同分化程度的结肠癌组织细胞中CHOP/GADD153表达的水平也不同,CHOP/GADD153的表达与结肠癌组织的分化程度相关,随着分化程度的降低而增高,低分化癌多呈强阳性表达,而在高、中分化癌中多呈弱阳性或阳性表达,提示CHOP/GADD153在结肠癌的分化中起着重要的作用,有可能成为衡量结肠癌恶性程度的一种潜在的分子标志物^[19-20]。

综上,本研究表明结肠癌组织中CHOP/GADD153的表达增高,通过抑制内质网应激反应中大量CHOP/GADD153的产生,提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,促进结肠癌肿瘤细胞的凋亡,可能成为防治结肠癌的新策略。

参考文献

- [1] 邹晓静,杨乐,姚尚龙. CHOP/GADD153在血管紧张素II诱导心肌细胞凋亡中的表达及作用[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(11):2132-2136.
- [2] Hosoi T, Yamaguchi R, Noji K, et al. Flurbiprofen ameliorated obesity by attenuating leptin resistance induced by endoplasmic reticulum stress[J]. EMBO Mol Med, 2014, 6(3):335-346.
- [3] 石印青,陈亮,任利,等. 内质网应激分子伴侣GRP78在大鼠缺血再灌注损伤肝脏中的表达[J]. 中国普通外科杂志, 2013,

- 22(7):905-910.
- [4] Chen J, Wei H, Xie B, et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to arsenic trioxide-induced apoptosis in drug-sensitive and -resistant leukemia cells[J]. *Leuk Res*, 2012, 36(12):1526-1535.
- [5] 王德桂, 马泽民, 吕国华, 等. 褪黑素对大鼠急性脊髓损伤内质网应激蛋白GADD153/CHOP表达的影响[J]. *中国当代医药*, 2013, 20(16):13-16.
- [6] Irie Y, Saeki M, Tanaka H, et al. Methamphetamine induces endoplasmic reticulum stress related gene CHOP/Gadd153/ddit3 in dopaminergic cells[J]. *Cell Tissue Res*, 2011, 345(2):231-241.
- [7] Montalbano R, Waldegger P, Quint K, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a pivotal role in cell death mediated by the pan-deacetylase inhibitor panobinostat in human hepatocellular cancer cells[J]. *Transl Oncol*, 2013, 6(2):143-157.
- [8] Prasanthi JR, Larson T, Schommer J, et al. Silencing GADD153/CHOP gene expression protects against Alzheimer's disease-like pathology induced by 27-hydroxycholesterol in rabbit hippocampus[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10):e26420. doi: 10.1371/journal.pone.0026420.
- [9] 邓晓, 邱莎莎, 杨庆春. 原发性胰腺淋巴瘤诊治分析: 附2例报告[J]. *中国普通外科杂志*, 2011, 20(3):314-316.
- [10] Jauhainen A, Thomsen C, Strömbom L, et al. Distinct cytoplasmic and nuclear functions of the stress induced protein DDIT3/CHOP/GADD153[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4):e33208. doi: 10.1371/journal.pone.0033208.
- [11] Irie Y, Saeki M, Tanaka H, et al. Methamphetamine induces endoplasmic reticulum stress related gene CHOP/Gadd153/ddit3 in dopaminergic cells[J]. *Cell Tissue Res*, 2011, 345(2):231-241.
- [12] Mihailidou C, Papazian I, Papavassiliou AG, et al. CHOP-dependent regulation of p21/waf1 during ER stress[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2010, 25(6):761-766.
- [13] Hung JY, Hsu YL, Ni WC, et al. Oxidative and endoplasmic reticulum stress signaling are involved in dehydrocostuslactone-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells[J]. *Lung Cancer*, 2010, 68(3):355-365.
- [14] Cao Y, Hao Y, Li H, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in apoptosis of differentiated mouse podocytes induced by high glucose[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(4):809-816.
- [15] 马健, 王浩, 苏雪慧, 等. 抗肿瘤药物作用的新靶点: CHOP/GADD153凋亡通路[J]. *中国临床药学杂志*, 2012, 21(6):392-394.
- [16] Silva RM, Ries V, Oo TF, et al. CHOP/GADD153 is a mediator of apoptotic death in substantia nigra dopamine neurons in an in vivo neurotoxin model of parkinsonism[J]. *J Neurochem*, 2005, 95(4):974-986.
- [17] Liao Y, Fung TS, Huang M, et al. Upregulation of CHOP/GADD153 during coronavirus infectious bronchitis virus infection modulates apoptosis by restricting activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway[J]. *J Virol*, 2013, 87(14):8124-8134.
- [18] 张平, 王志宏, 贺亮, 等. 原发性甲状腺恶性淋巴瘤的诊断与治疗: 附23例报告[J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(11):1369-1372.
- [19] 王家钰, 张丽, 吴萍, 等. Noxa在胃腺癌细胞耐受内质网应激诱导凋亡中的作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(6):590-595.
- [20] Meares GP, Mines MA, Beurel E, et al. Glycogen synthase kinase-3 regulates endoplasmic reticulum (ER) stress-induced CHOP expression in neuronal cells[J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317(11):1621-1628.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 朱兴国, 张俊强, 王成宏, 等. 内质网应激相关蛋白 CHOP/GADD153在结肠癌组织中的表达及意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(4):517-521. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.011
Cite this article as: ZHU XG, ZHANG JQ, WANG CH, et al. Expression of endoplasmic reticulum stress-related protein CHOP/GADD153 in colon cancer tissue and its significance[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(4):517-521. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.04.011