

论著·临床研究

HSP70 和 S100A9 蛋白在脑胶质瘤组织中的表达及其意义*

廖秋林¹, 彭大云¹, 赖续文²

(1. 广东祈福医院, 广东 广州 511495; 2. 中国人民解放军南部战区总医院, 广东 广州 510010)

[摘要] 目的 探讨热休克蛋白 70(HSP70)和 S100 钙离子结合蛋白 A9(S100A9)在胶质瘤组织中的表达水平及在低级别脑胶质瘤与胚胎发育不良性神经上皮肿瘤(DNT)中的鉴别诊断价值。**方法** 所有病理标本取自 2015 年 1 月至 2020 年 12 月广东祈福医院和南部战区总医院确诊的 160 例胶质瘤初诊患者,其中世界卫生组织(WHO) I、II、III、IV 级胶质瘤患者均为 40 例。采用免疫组织化学法检测 160 例胶质瘤和肿瘤旁正常脑组织,以及 20 例 DNT 组织中 HSP70 和 S100A9 的表达水平。**结果** HSP70 和 S100A9 在 160 例胶质瘤组织中的阳性率分别为 85.0%(136/160)和 7.5%(12/160)。HSP70 在不同 WHO 分级胶质瘤组织中的表达水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),且表达水平随着胶质瘤 WHO 级别的增加而升高,也能用于低级别胶质瘤与 DNT 的鉴别诊断。S100A9 在不同 WHO 分级胶质瘤的表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),也不能用于 DNT 与低级别胶质瘤的鉴别诊断。HSP70 与 S100A9 在脑胶质瘤组织中的表达无相关性。**结论** HSP70 可用于脑胶质瘤的诊断,表达水平随着胶质瘤 WHO 级别的增加而升高,且可用于 DNT 与低级别胶质瘤的鉴别诊断。S100A9 无上述价值。

[关键词] 胶质瘤; 胚胎发育不良性神经上皮肿瘤; 热休克蛋白 70; S100A9 蛋白; 免疫组织化学

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2023.23.010

中图分类号:R362;R361+.2

文章编号:1009-5519(2023)23-4006-04

文献标识码:A

Expression and significance of HSP70 and S100A9 protein in brain glioma tissues*LIAO Qiulin¹, PENG Dayun¹, LAI Xuwen²

(1. Guangdong Clifford Hospital, Guangzhou, Guangdong 511495, China; 2. Chinese People's Liberation Army Southern Theater Command General Hospital, Guangzhou, Guangdong 510010, China)

[Abstract] **Objective** To research the expression level of heat shock protein 70(HSP70) and S100 calcium-binding protein A9(S100A9) in glioma tissue and their differential diagnostic value in low-level brain glioma and dysembryoplastic neuroepithelial tumor(DNT). **Methods** All pathological specimens were taken from 160 newly diagnosed patients with gliomas in Guangdong Clifford Hospital and Chinese People's Liberation Army Southern Theater Command General Hospital from January 2015 to December 2020, including 40 patients with World Health Organization(WHO) grade I, II, III and IV gliomas. Immunohistochemical method was used to detect the expression levels of HSP70 and S100A9 in 160 cases of glioma and normal brain tissue adjacent to tumor, and 20 cases of DNT. **Results** The detectable rates of HSP70 and S100A9 were 85.0%(136/160) and 7.5%(12/160), respectively. The expression of HSP70 in gliomas with differences WHO grades was statistically significant($P < 0.05$), and the expression level increased with the improvement of who grade of gliomas, which could also be used for the differential diagnosis of low-grade gliomas and DNT. S100A9 had no statistical difference in different WHO grades($P > 0.05$), and it could not be used for the differential diagnosis of DNT and low-grade glioma. There was no correlation between HSP70 and S100A9 expression in glioma tissues. **Conclusion** HSP70 can be used in the diagnosis of brain glioma. The expression level increases with the improvement of WHO grade of glioma, and can be used in the differential diagnosis of low-level glioma and DNT. S100A9 has no such value.

[Key words] Glioma; Dysembryoplastic neuroepithelial tumor; Heat shock protein 70; S100 calci-

* 基金项目:广东省医学科研基金项目(A2019320)。

作者简介:廖秋林(1975—),硕士研究生,主任医师,主要从事脑胶质瘤的病理诊断及分子诊断方面的研究。

um-binding protein A9; Immunohistochemistry

作者前期进行了肿瘤实体组织比较蛋白质组学研究,鉴定出了较多低级别胶质瘤与胚胎发育不良性神经上皮肿瘤(DNT)的差异表达蛋白质^[1]。其中,差异蛋白质热休克蛋白 70(HSP70)属于 HSP 家族中最重要的成员,也是研究最为热门的一个,其具有“分子伴侣”功能,与蛋白质的合成、折叠、寡聚化和运输密切相关,在蛋白质的生物合成和细胞间运输起着纽带作用^[2]。S100 钙离子结合蛋白 A9(S100A9)是 S100 家族的重要成员,与肿瘤的发生发展密切相关,具有促进肿瘤细胞增殖、侵袭转移和诱发肿瘤免疫抑制的作用^[3]。HSP70 与 S100A9 之间作用机制并无直接关联,选做验证研究是因为在前期新鲜组织用同位素标记相对和绝对定量技术(iTRAQ)对比研究中发现这 2 种蛋白质在低级别胶质瘤组织与 DNT 组织中的表达有显著差异,为作进一步的验证,本研究显著增加样本量,采用石蜡标本进行回顾性研究。

本研究采用免疫组织化学法检测胶质瘤组织中 HSP70 和 S100A9 的表达情况,分析这 2 种蛋白质在胶质瘤临床分期和预后中的意义,为胶质瘤的诊断和鉴别诊断、临床分期和预后判断寻找新的生物学标志物。

1 资料与方法

1.1 一般资料 所有病理标本取自 2015 年 1 月至 2020 年 12 月广东祈福医院和南部战区总医院确诊的 160 例胶质瘤初诊患者,根据 2016 年世界卫生组织(WHO)胶质瘤诊断标准进行分级,WHO I 级胶质瘤 40 例,包含毛细胞型星形细胞瘤 34 例、毛黏液样型星形细胞瘤 4 例、室管膜下巨细胞星形细胞瘤 2 例;WHO II 级胶质瘤 40 例,包含弥漫性星形细胞瘤 23 例、少突胶质细胞瘤 12 例、混合型少突-星形细胞瘤 5 例;WHO III 级胶质瘤 40 例,包含间变性星形细胞瘤 32 例、间变性少突胶质细胞瘤 8 例;WHO IV 级胶质瘤 40 例,包含星形细胞瘤来源的胶质母细胞瘤 25 例、少突胶质细胞来源的胶质母细胞瘤 15 例。其中,不包含 WHO I 级的星形细胞来源的肿瘤共 80 例,少突胶质细胞瘤 35 例,混合型少突-星形细胞瘤 5 例。也可根据 2016 年 WHO 胶质瘤诊断标准简单分为低级别胶质瘤(WHO I 级和 WHO II 级)和高级别胶质瘤(WHO III 级和 WHO IV 级),各 80 例。所有病例中男 111 例,女 69 例;年龄 21~78 岁,中位年龄 58 岁。所有病例均为初诊患者,均无严重并发症,无基础性代谢性疾病,均为初诊患者,术前未行放疗及靶向治疗,常规病理取材,10%中性缓冲福尔马林固定液固定 6~8 h,常规脱水处理及石蜡切片,所

选取的蜡块均包含肿瘤旁正常脑组织。本实验通过广东祈福医院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学法 免疫组织化学法试剂 HSP70 和 S100A9 均购自 Abcam 公司,均为兔抗人多克隆抗体,工作浓度均为 1:50,所选蜡块以 4 μm 厚度常规切片,涂胶片捞片,脱蜡,采用微波修复抗原,检测方法严格按照试剂盒所附操作说明书的步骤进行。采用缩短一抗/二抗孵育时间,并多次以不同抗体浓度、多次预实验等以选择最合适的工作浓度及实验方法,进而大规模染片、判读、打分及统计分析。

1.2.2 免疫组织化学法结果判读 由 2 位副主任医师各自独立观察判断,2 个免疫标记均以细胞核和(或)细胞质出现棕黄色颗粒着色为阳性细胞,从正常着色细胞、着色位置、内对照及外对照等综合判断染片质量,排除非特异染色干扰。选取 5~10 高倍镜视野(400 倍),计数 500~1 000 个细胞。采用二级计分法判定结果,阳性细胞数低于 5%为 0 分;5%~25%为 1 分;>25%~50%为 2 分;>50%~75%为 3 分;>75%为 4 分。染色强度分类:淡黄色为 1 分;黄色或深黄色为 2 分;褐色或棕黄色为 3 分。两者相加低于 2 分为阴性(-);2~3 分为阳性(+);4~5 分为中等阳性(++);6~7 分为强阳性(+++)。

1.3 统计学处理 应用 SPSS25.0 软件进行数据处理,计数资料以率或构成比表示,采用 κ 系数检验及 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

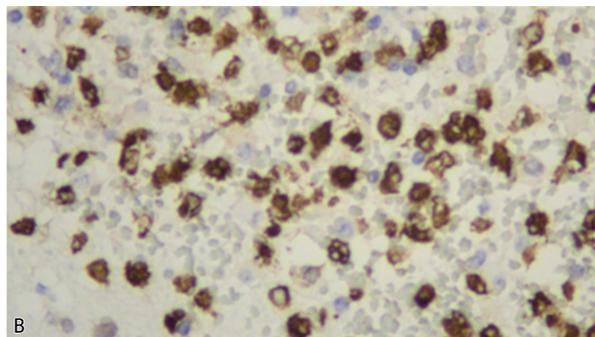
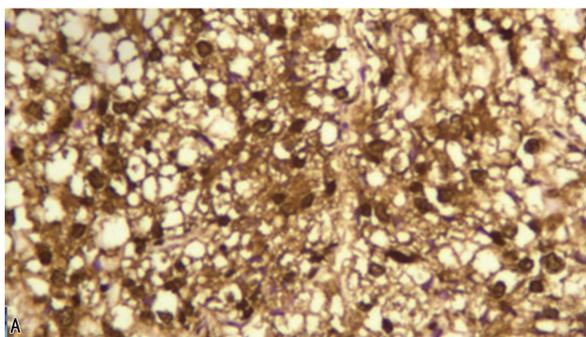
2.1 HSP70 和 S100A9 在胶质瘤组织中的表达 HSP70 主要表达于肿瘤细胞的胞质,偶尔表达于细胞膜和细胞核;正常人体组织较少表达 HSP70。免疫组织化学染色结果显示,HSP70 在胶质瘤组表达阳性率为 85.0%(136/160),在正常脑组织表达阳性率为 23.1%(37/160),二者比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。S100A9 在大部分肿瘤细胞阴性表达,主要表达于反应性或出血灶中的中性粒细胞、巨噬细胞的细胞核,部分细胞质也有表达。S100A9 在胶质瘤组表达阳性率为 7.5%(12/160),在正常脑组织组表达阳性率为 4.4%(7/160),二者比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1、表 1。

2.2 HSP70 和 S100A9 在不同级别胶质瘤组织中的表达阳性率比较 HSP70 在 WHO 分级 I~IV 级胶质瘤组织中的表达阳性率比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。S100A9 在 WHO 分级 I~IV 级胶质瘤组织中的表达阳性率比较,差异均无统计学意义($P >$

0.05)。见表 2。

2.3 HSP70 和 S100A9 在低级别胶质瘤与 DNT 组织中的表达阳性率比较 HSP70 在低级别胶质瘤组表达阳性率显著高于 DNT 组,差异有统计学意义

($P < 0.05$); S100A9 在 DNT 组与低级别胶质瘤组表达阳性率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),无鉴别诊断意义。见表 3。



注:A. 胶质瘤肿瘤细胞中 HSP70 的典型阳性表达,以细胞质及细胞核表达为主;B. S100A9 的典型阳性形态,以细胞核表达为主。

图 1 胶质瘤组织中 HSP70 和 S100A9 的典型阳性表现(免疫组织化学染色法,200×)

表 1 HSP70 和 S100A9 在胶质瘤组织中的表达

蛋白质	阳性强度(n)				总数 (n)	阳性 [n(%)]
	-	+	++	+++		
HSP70	24	38	76	22	160	136(85.0)
S100A9	148	5	3	4	160	12(7.5)

表 2 HSP70 和 S100A9 在不同 WHO 分级胶质瘤组织中的表达差异[n(%)]

WHO 分级	总数 (n)	HSP70		S100A9	
		阳性	阴性	阳性	阴性
WHO I 级	40	28(70.0)	12(30.0)	3(7.5)	37(92.5)
WHO II 级	40	33(82.5)	7(17.5)	3(7.5)	37(92.5)
WHO III 级	40	36(90.0)	4(10.0)	4(10.0)	36(90.0)
WHO IV 级	40	39(97.5)	1(2.5)	2(5.0)	38(95.0)
合计	160	136(85.0)	24(15.0)	12(7.5)	148(92.5)

表 3 胶质瘤组与 DNT 组 HSP70、S100A9 表达阳性率比较[n(%)]

组别	n	HSP70		S100A9	
		阳性	阴性	阳性	阴性
低级别胶质瘤组	80	61(76.2)	19(23.8)	6(7.5)	74(92.5)
DNT 组	20	3(15.0)	17(85.0)	2(10.0)	18(90.0)
χ^2	-	26.053		0.136	
P	-	<0.001		0.712	

注: - 表示无此项。

2.4 胶质瘤组织中 HSP70 和 S100A9 表达的相关性分析 通过配对计数资料的 κ 系数检验,因为 $\kappa < 0.4$,可见 HSP70 和 S100A9 在脑胶质瘤组织中的表达无相关性。

3 讨论

HSP70 是 HSP 家族的重要成员,主要作用是调控人体应急状态下的蛋白质代谢水平,其表达水平与细胞的应激能力及功能状态密切相关,也可在一定程度上反映细胞的老化程度^[4]。在肿瘤患者中,不同分化程度和不同分期的肿瘤细胞中 HSP70 表达水平均有不同,部分研究发现继发性耐药的肿瘤患者 HSP70 表达水平升高^[5]。也有研究认为 HSP70 可能诱导和增强人体自主的抗肿瘤免疫反应,抑制肿瘤细胞生长。如, HSP70 参与了肿瘤细胞表型改变及与肿瘤特异性多肽抗原结合形成免疫复合物,诱导机体免疫系统识别肿瘤细胞,引发人体的抗肿瘤特异免疫反应; HSP70 也可以间接或直接激活自然杀伤细胞(NK 细胞),直接杀灭肿瘤细胞^[6-7]。近年来,已发现在多种肿瘤中 HSP70 高表达,如胶质瘤^[7]、肝细胞癌^[8]、乳腺癌^[9]、胃癌^[10]、肺腺癌^[11]等。

本实验研究结果表明, HSP70 的表达在胶质瘤与正常脑组织之间有显著差异,且随着胶质瘤 WHO 级别的增加其表达水平升高,说明 HSP70 与胶质瘤的分化程度有密切关系,可用于胶质瘤的辅助诊断标志。HSP70 还可作为胶质瘤的潜在治疗靶点,如抑制 HSP70 的合成或阻断其抗凋亡作用均可延长胶质瘤患者的生存期。DNT 分为复杂型和单纯型,典型的星形细胞瘤与单纯型 DNT 有比较好分辨的形态学特征,而复杂型 DNT 由于具有特殊的少突胶质细胞样细胞,与少突胶质细胞瘤鉴别十分困难。本实验结果表明, HSP70 在 DNT 与低级别胶质瘤组织中的表达有统计学差异,少突胶质细胞瘤表达明显升高,可用于两者的辅助鉴别诊断,从而避免将复杂型 DNT 诊断为 WHO II 级的少突胶质细胞瘤,继而导致不必要

的过度治疗,加重患者负担且浪费医疗资源。本实验设计没有验证 HSP70 与 Ki-67 等现有胶质瘤免疫标记的相关性,也无证据表明与已有的胶质瘤免疫组织化学指标有相关性。

S100A9 蛋白属于钙结合蛋白,其编码基因位于染色体 1q21 区,易发生重排、易位、缺失等改变,主要参与细胞的分化和增殖,以及部分蛋白磷酸化,也参与一些具有突变的肿瘤细胞的侵袭和转移^[12]。已有研究发现,S100A9 蛋白在肺癌^[13]、鼻咽癌^[14]、宫颈癌^[15]、乳腺癌^[16]、胃癌^[17]等诸多肿瘤中表达升高,且 S100A9 表达阳性率与肿瘤的分化程度呈负相关,可能与肿瘤的发展、增殖、侵袭及转移相关。

本实验结果表明,S100A9 在大多数胶质瘤细胞中无表达,仅少许肿瘤细胞弱表达,而在肿瘤组织中出血灶表达增高,且主要表达于出血灶中的中性粒细胞、巨噬细胞,部分淋巴细胞也有表达,这与大多数文献研究不同,作者仔细阅读相关文献,发现很多文献中的配图也是表达于中性粒细胞及淋巴细胞,并不是表达于肿瘤细胞,作者在 180 例免疫组织化学中观察到了这个现象,其原因尚不清楚。因此 S100A9 不能作为胶质瘤的辅助诊断标志物,不能用于判断胶质瘤的预后,与胶质瘤的发生发展关系不明,也不能用于低级别胶质瘤与 DNT 的鉴别诊断。鉴于 S100A9 主要表达于中性粒细胞、巨噬细胞及部分淋巴细胞,提示可用于肿瘤免疫微环境的监测,但其具体临床意义则需要大量的临床实验数据验证才可得出结论。

参考文献

- [1] 陈晓东,廖秋林,张伟,等.应用 iTRAQ 技术筛选 DNT 与低级别胶质瘤差异表达蛋白[J].中华全科医学杂志,2016,14(7):1077-1079.
- [2] MOSSER D D,CARON A W,BOURGET L,et al. Role of the human heat shock protein HSP70 in protection against stress-induced apoptosis[J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(9): 5317-5327.
- [3] BRESNICK A R,WEBER D J,ZIMMER D B. S100 proteins in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2015,15(2):96-109.
- [4] 汪翔,杜爱能,张策,等.热休克蛋白在胶质瘤中的研究进展[J].中华实验外科杂志,2017,34(8):1426-1429.
- [5] 龙明炬,黄秋林.热休克蛋白 70 在胃癌中的研究进展[J].中国肿瘤外科杂志,2019,11(4):296-299.
- [6] 林章雅,康德智,郑树法,等.高免疫原性胶质瘤细胞疫苗体外诱导 Th-1 漂移研究[J].中华神经医学杂志,2009,8(11):1115-1118.
- [7] 王晓东,陈善成,杨俊葆,等.星形胶质细胞瘤中 HSP70 的表达及生物学活性[J].中国老年学杂志,2015,35(6):1477-1479.
- [8] 司薇,徐丹.热休克蛋白 70 在肝细胞癌中的表达意义[J].黑龙江医学,2021,45(1):106-109.
- [9] 汤永喆,王浩,何奇,等. miR-223 及 HSP 70 在人乳腺浸润性导管癌及癌旁组织中的表达研究[J].现代肿瘤医学,2020,28(8):1304-1307.
- [10] 缪孟郡,方志红,程菁祎.胃癌患者血清趋化因子 L20,热休克蛋白 70 的表达及意义[J].医学临床研究,2019,36(12):2346-2348.
- [11] 马铭泽,史凤显,翟若南,等.热休克蛋白 70 对人肺腺癌 A549 细胞上皮间质转化的影响[J].郑州大学学报(医学版),2021,56(3):408-412.
- [12] 凌园果,徐卡娅,仇文进,等.钙卫蛋白 S100A8/A9 在神经系统疾病中作用的研究进展[J].医学综述,2021,27(7):1278-1283.
- [13] 郭涛弦,范红松,罗勤.非小细胞肺癌患者血清 S100A8,S100A9,MMP-9 的表达及意义[J].国际呼吸杂志,2020,40(22):1729-1734.
- [14] 陈舒华,谷婷婷,刘湘,等.鼻咽癌高癌家系癌患者外周血淋巴细胞 S100A9 表达分析[J].中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志,2021,29(2):85-88.
- [15] 蒋艳平,王前,徐倩,等. S100A9 对宫颈癌淋巴结转移的预测价值[J].中南大学学报(医学版),2020,45(6):701-708.
- [16] 王明君,杨芳,张青松. S100A9 在乳腺癌组织中表达及表皮生长因子的反馈调节作用[J].重庆医学,2020,49(21):3596-3600.
- [17] 周荣健,张恒,束平,等. S100A9 蛋白在肠型胃癌组织中的表达及其临床意义[J].中华普通外科杂志,2019,34(1):53-57.

(收稿日期:2023-02-21 修回日期:2023-08-18)