

## DJ-1 和 HSP27 在侵袭性与非侵袭性垂体腺瘤中的差异表达

陈委<sup>1</sup>, 石小峰<sup>1</sup>, 刘运生<sup>2</sup>, 李萃<sup>3</sup>, 肖志强<sup>3</sup>, 刘志雄<sup>2</sup>

(1. 深圳市龙岗中心医院神经外科, 深圳 518116; 2. 中南大学湘雅医院神经外科, 长沙 410008;  
3. 卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室, 长沙 410008)

**[摘要]**目的: 研究垂体腺瘤中癌基因蛋白 DJ-1、热休克蛋白 27(HSP27) 的表达是否与侵袭性相关。方法: 采用 Western 印迹法检测侵袭性与非侵袭性垂体腺瘤各 20 例组织中 DJ-1 和 HSP27 蛋白的表达, 并分析 DJ-1 和 HSP27 蛋白水平与侵袭性的关系。结果: 20 例侵袭性垂体腺瘤中 DJ-1 和 HSP27 蛋白表达的强阳性率分别为 70%(14/20) 和 80%(16/20), 20 例非侵袭性垂体腺瘤中 DJ-1 和 HSP27 蛋白表达的强阳性率均为 10%(2/20), 侵袭性垂体腺瘤明显高于非侵袭性垂体腺瘤 ( $P<0.05$ )。DJ-1 和 HSP27 的表达水平与垂体腺瘤侵袭性之间均呈正相关 (分别  $r=0.350$ ,  $P<0.05$ ;  $r=0.400$ ,  $P<0.05$ )。结论: DJ-1 和 HSP27 在侵袭性垂体腺瘤中的异常表达可能在侵袭性垂体腺瘤的形成和发展中发挥重要作用, 与垂体腺瘤的侵袭性密切相关。

**[关键词]** 癌基因 DJ-1 蛋白; 热休克蛋白 27; 垂体腺瘤; 侵袭性; Western 印迹

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.05.009

## Differential expression of DJ-1 and HSP27 in invasive and non-invasive pituitary adenomas

CHEN Wei<sup>1</sup>, SHI Xiaofeng<sup>1</sup>, LIU Yunsheng<sup>2</sup>, LI Cui<sup>3</sup>, XIAO Zhiqiang<sup>3</sup>, LIU Zhixiong<sup>2</sup>

(1. Department of Neurosurgery, Longgang Central Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518116; 2. Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008; 3. Key Laboratory of Cancer Proteomics of Ministry of Health, Changsha 410008, China)

### ABSTRACT

**Objective:** To explore whether oncogenes DJ-1 and HSP27 are associated with invasiveness of human pituitary adenoma.

**Methods:** Total proteins were extracted from samples of 20 invasive and 20 non-invasive pituitary adenomas and the expression of DJ-1 and HSP27 was analyzed by Western blot. The correlation of DJ-1 and HSP27 with the invasiveness of pituitary adenoma was analyzed.

**Results:** The strong positive rates of DJ-1 and HSP27 in the 20 invasive pituitary adenoma were 70% (14/20) and 80% (16/20), respectively. The invasive group had significantly higher expression of DJ-1 and HSP27 proteins than the noninvasive group [10% (2/20), 10% (2/20), respectively]. There was a positive correlation between the expression of DJ-1, HSP27 proteins and the invasiveness of pituitary adenoma as judged by the Spearman rank correlation test ( $P<0.05$ ).

**Conclusion:** The proliferative activity and abnormal expression of oncogenes DJ-1 and HSP27

收稿日期 (Date of reception): 2011-10-18

作者简介 (Biography): 陈委, 硕士, 主治医师, 主要从事垂体瘤、颅脑外伤、脑血管病介入治疗等相关研究。

通信作者 (Corresponding author): 刘志雄, Email: zhixiongliu@csu.edu.cn

基金项目 (Foundation item): 湖南省科技厅项目 (06FJ3168)。 This work was supported by the Department of Science and Technology of Hunan Province, P. R. China (06FJ3168).

may play a significant role in tumorigenesis and progression of pituitary adenoma. There was a significant correlation between the expression of DJ-1 and HSP27 and the invasiveness of pituitary adenoma.

## KEY WORDS

oncogene DJ-1; HSP27; pituitary adenoma; invasiveness; Western blot

垂体腺瘤是颅内高发肿瘤, 约占颅内肿瘤的10%~20%, 列颅内肿瘤第3位。可造成视力减退、失明、垂体功能低下, 严重危及患者身心健康, 影响生存质量, 甚至导致死亡。临床上常发现某些腺瘤表现为具有恶性肿瘤的生物学特征, 呈侵袭性生长, 手术全切率低, 复发率高, 术后需放射治疗, 故在临床上倍受重视。近年来, 在临床、病理、细胞及分子生物学等方面对侵袭性研究有了很大进展, 但是从蛋白质组学方面研究侵袭性垂体腺瘤, 国内外尚未见报道。因此, 本课题组前期<sup>[1-2]</sup>利用固相pH梯度双向凝胶电泳分离侵袭性与非侵袭性垂体腺瘤的总蛋白质, 凝胶经银染显色后, 运用ImageMaster 2D图像分析软件进行比较分析、识别差异表达的蛋白质, 应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)及数据库搜索鉴定部分差异蛋白点。结果得到了分辨率较高、重复性好的侵袭性与非侵袭性垂体腺瘤的双向凝胶电泳图谱。比较分析图谱, 初步对其中30个点进行了肽质指纹分析, 鉴定出一些与细胞周期调控、信号转导等有关的差异蛋白质, 其中包括DJ-1蛋白和HSP27, 其在侵袭性垂体腺瘤中均呈高表达。近年来研究<sup>[3-7]</sup>发现: DJ-1蛋白是第10号染色体同源缺失性磷酸酶张力蛋白基因PTEN抑癌基因的主要负性调控蛋白之一, 它涉及多种肿瘤(乳腺癌、视网膜色素层恶性黑色素瘤、肺癌)病理过程, 其在肿瘤研究中得到进一步重视。在以往的很多脑肿瘤系列研究<sup>[8-13]</sup>中发现: HSP27在胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、转移瘤等多种肿瘤中, 均有异常表达。为了进一步验证上述侵袭性与非侵袭性垂体腺瘤组织差异蛋白质组学的相关结果, 笔者应用蛋白免疫印迹方法对侵袭性与非侵袭性垂体腺瘤组织中DJ-1和HSP27的表达情况进行了检测, 并探讨其临床意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

收集2006年3月至2007年6月中南大学湘雅医院神经外科垂体腺瘤手术标本40例, 其中侵袭

性垂体腺瘤20例、非侵袭性垂体腺瘤20例, 男24例、女16例, 年龄19~60(中位数35.5)岁。结合磁共振图像符合Knosp 3级以上<sup>[14]</sup>或者根据肿瘤与蝶鞍、蝶窦的关系为Hardy-Wilson III级及III级以上或者根据肿瘤向鞍外、鞍旁扩展为C~E期<sup>[15]</sup>之一者, 并经病理诊断确诊为侵袭性垂体腺瘤。

### 1.2 主要试剂

鼠抗人DJ-1和HSP27单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司; 兔抗鼠辣根过氧化物酶标记二抗、彩虹Marker、 $\beta$ -actin、甲基磺酰氟(PMSF)、亮抑蛋白酶肽(leupeptin)、抑酞酶(aprotinin)、丙烯酰胺、二硫苏糖醇(DTT)、过硫酸胺(ammonium persulfate, APS)、十二烷基磺酸钠(SDS)、TEMED、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、甘氨酸(glycine)、溴酚蓝(brophenol blue)、考马斯亮蓝G-250(Coomassia Blue G-250)均购自美国Sigma公司; PVDF膜、化学增强发光试剂盒(Western blot chemiluminescence reagent plus)购自美国Dupont公司; 丙烯酰胺(acrylamide)、甲叉双丙烯酰胺购自美国Promega公司; 牛血清白蛋白购自北京原平生物技术有限公司。

### 1.3 方法

取0.1g冷冻垂体腺瘤组织加入500  $\mu$ L组织裂解液, 冰上充分裂解1h后, 在4  $^{\circ}$ C, 12000 r/min条件下离心30~60 min。取上清液分装置-75  $^{\circ}$ C保存备用。采用Western印迹法检测DJ-1和HSP27蛋白的表达。取含50  $\mu$ g蛋白的上清液, 加入适量蛋白加样缓冲液以及 $\beta$ -巯基丙醇至总体积35  $\mu$ L混匀, 在Ep管中以100  $^{\circ}$ C加热变性7 min, 冰上退火。在恒压80 V条件下, 行12.5%SDS-PAGE凝胶电泳, 至酚溴蓝染色接近胶底边后停止电泳。电泳后将SDS-PAGE凝胶中的蛋白质通过湿法电转移方法转移至PVDF膜上(4  $^{\circ}$ C)。转移完毕后, 加入含5%脱脂牛奶的TBST, 摇床上室温封闭PVDF膜1~2 h。按适当的稀释度用封闭液稀释第一抗体(鼠抗人DJ-1和HSP27单克隆抗体), 将膜与一抗置于封闭的塑料袋中在4  $^{\circ}$ C室温中摇转过夜(对一抗体稀

释比 1:50, 1:100, 1:200 分别实验对比, 从而减少误差)。孵育完成后用 TBST 漂洗滤膜 3 次, 每次 10 min。按适当的稀释度用封闭液稀释第二抗体 (兔抗鼠辣根过氧化物酶标记二抗, 美国 Sigma 公司), 于室温下孵育 1 h。孵育完成后用 PBS 或 TBST 漂洗滤膜 3 次, 每次 10 min。

ECL 增强发光试剂显色后, 置暗盒曝光于 X 线片上, 曝光时间为 15~30 min, 常规显影、定影、图像扫描仪扫描, Bandscan5.0 图像分析软件对目的条带进行灰度分析, 以  $\beta$ -actin 作内参, 计算目的蛋白的相对表达量 (目的蛋白相对表达量=目的蛋白条带灰度值/ $\beta$ -actin 条带灰度值): <10%(+), 10%~20%(++), 20%~50%(+++), >50%(++++), 其中 +~++ 为弱阳性, +++~++++ 为强阳性。

### 1.3 统计学处理

应用 SPSS 13.0 软件包进行统计学分析。率的比较采用卡方检验或四格表确切概率法。等级资料相关性分析采用 Spearman 等级相关分析。P<0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 癌基因 DJ-1 蛋白与垂体腺瘤侵袭性的关系

侵袭性组中 DJ-1 弱阳性 (+~++) 表达 6 例, 强阳性 (+++~++++) 表达 14 例, 强阳性率为 70%, 而在非侵袭性组弱阳性表达 18 例, 强阳性表达 2 例, 强阳性率为 10%。侵袭组与非侵袭组之间 DJ-1 强阳性率差异具有统计学意义 (P<0.05)。经 Spearman 等级相关检验, DJ-1 的表达与垂体腺瘤侵袭性之间存在正相关关系 ( $r_s=0.350$ , P<0.05; 表 1, 图 1)。

表 1 DJ-1 和 HSP27 在垂体腺瘤中的表达

Table 1 Differential expression of DJ-1 and HSP27 in invasive and non-invasive pituitary adenomas

组别	DJ-1				HSP27				例数
	+	++	+++	++++	+	++	+++	++++	
侵袭组	0	6	6	8	2	2	4	12	20
非侵袭组	14	4	2	0	12	6	2	0	20
合计	14	10	8	8	14	8	6	12	40

### 2.2 HSP27 与垂体腺瘤侵袭性的关系

侵袭性组中 HSP27 弱阳性 (+~++) 表达 4 例, 强阳性 (+++~++++) 表达 16 例, 强阳性率为 80%, 而在非侵袭性组弱阳性表达 18 例, 强阳性表达 2 例, 强阳性率为 10%。侵袭组与非侵袭组之间 HSP27 强阳性率差异具有统计学意义 (P<0.05)。经 Spearman 等级

相关检验, HSP 的表达与垂体腺瘤侵袭性之间存在正相关关系 ( $r_s=0.400$ , P<0.05; 表 1, 图 1)。

### 2.3 垂体腺瘤组织蛋白免疫印迹显影结果

在不同标本中, 随着一抗稀释比从 1:50~1:200 的范围内变化, DJ-1 或 HSP27 在侵袭组表达强阳性, 而在非侵袭组中相对表达量弱阳性。 $\beta$ -actin 条带在各组中表达量一致 (图 1), 这就排除了因上样量不同而导致的假阳性的实验结果。

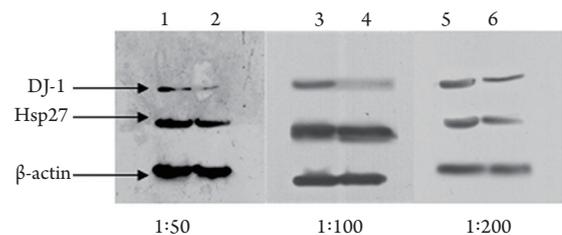


图 1 免疫印迹检测 DJ-1 和 HSP27 的表达。1, 3, 5: 侵袭组; 2, 4, 6: 非侵袭组。

Figure 1 Expression of DJ-1 and HSP27 by Western blot. 1, 3, 5: Invasive group; 2, 4, 6: Non-invasive group.

## 3 讨论

Nagakubo 等<sup>[16]</sup>在 1997 年检测人类蛋白与原癌基因 c-myc 蛋白的相互作用时首次克隆出一条新的人类 cDNA, 并命名为癌基因 DJ-1。人的 DJ-1 基因位于 1p36.2-36.3, 该区域有一种与几种肿瘤有关的染色体异常位点。人类的 DJ-1 蛋白又称为 RS, RS 是一分子量为 20 kD, 含有 189 个氨基酸的蛋白质, 在进化上相当保守, 它在脑内 (包括在黑质基底节) 及身体的其他部位不同类型细胞的胞核、胞质中广泛表达。DJ-1 可增强亮氨酸转录因子 Nrf2 的遍在蛋白化作用 (与人乳头瘤病毒 HPV16, 18E6, E7 癌蛋白诱导细胞内降解抑癌蛋白 P53 和 pRb 的作用), 加速 P53 和 pRb 的降解。而抑癌蛋白 P53 和 pRb 在抑制垂体腺瘤侵袭性生长起重要作用。PTEN 抑癌基因与许多细胞表面受体相互作用, 对一些受体介导的信号转导途径进行负调节, 从而抑制细胞的增殖、迁移和侵袭。PTEN 通过与 p53 蛋白结合, 调节基因转录, 进而间接对细胞生长或细胞凋亡进行调控。最近研究<sup>[17]</sup>证实 DJ-1 蛋白是 PTEN 抑癌基因的主要负性调控蛋白之一, 可抑制 PTEN 抑癌基因而促使肿瘤生长。本实验结果表明: DJ-1 蛋白在侵袭性垂体腺瘤组表达明显高于非侵袭组。可以推测, 随着 DJ-1 蛋白表达的增强, 它抑制抑癌基因 PTEN 和抑癌蛋白 P53, pRb 作用加剧, 从而使垂体

腺瘤的侵袭性明显增加,促使垂体腺瘤的侵袭生长。

HSP27 是 sHSP 亚家族中的重要成员,是甾体激素受体结合蛋白。HSP27 可调节细胞的增殖,介导癌基因及抑癌基因产物的跨膜转运,同时协调肿瘤细胞的蛋白质快速代谢平衡,使肿瘤细胞得以无限增殖,其表达量与肿瘤(乳腺癌、肝癌、头颈肿瘤)恶性程度相关<sup>[8-13]</sup>。本实验发现 HSP27 在侵袭性垂体腺瘤中高表达,这可能是由于在垂体腺瘤的侵袭生长过程中,肿瘤细胞不断增殖,需要大量 HSP27 来调节和稳定这异常增殖过程,提示它们对于垂体腺瘤的侵袭性发展过程中起重要作用。

本研究应用免疫印迹蛋白技术检验了 DJ-1 与 HSP27 在侵袭性垂体腺瘤中的表达,结合笔者先前的侵袭性与非侵袭性垂体腺瘤蛋白质组学研究均证实:DJ-1 与 HSP27 在侵袭组表达明显高于非侵袭组( $P < 0.01$ ),认为 DJ-1 与 HSP27 与侵袭性垂体腺瘤的关系密切,对侵袭性垂体腺瘤的临床诊断和治疗有重要意义。

## 参考文献

1. 陈委,刘志雄,刘运生,等.侵袭性与非侵袭性垂体腺瘤的蛋白质差异表达[J].中华神经外科杂志,2009,25(6):504-507.  
CHEN Wei,LIU Zhixiong,LIU Yunsheng,et al. Establishment and analysis of differential expression profiles from invasive and non-invasive pituitary adenomas.[J] Chinese Journal of Neurosurgery,2009,25(6):504-507.
2. 刘志雄,刘运生,陈委,等.侵袭性与非侵袭性垂体腺瘤的蛋白质差异表达谱的建立[J].中南大学学报:医学版,2009,34(7):569-575.  
LIU Zhixiong,LIU Yunsheng,CHEN Wei,et al. Establishment of differential expression profiles from invasive and non-invasive pituitary adenomas[J]. Central South University.Medical Science,2009,34(7):569-575.
3. Bonifati V ,Rizzu P,yvan Baren MJ,et al.Mutations in the DJ-1 gene associated with auto somal recessive early onset park insonism[J]. Science,2003,299(5604):256-259.
4. Le Naour F, Misek DE, Krause MC, et al.Proteomics-based identification of RS/DJ-1 as a novel circulating tumor antigen in breast cancer[J]. Clin Cancer Res,2001,7(11):3328-3335.
5. Pardo M,Garcia A,Thomas B,et al. The characterization of the invasion phenotype of uveal melanoma tumour cells shows the presence of MUC18 and HMG-1 metastasis markers and leads to the identification of DJ-1 as a potential serum biomarker[J]. Cancer,2006,119(5):1014-1022.
6. MacKeigan JP, Clements CM, Lich JD, et al.Proteomic profiling drug-induced apoptosis in non-small cell lung carcinoma:identification of RS/DJ-1 and RhoGDIalpha[J]. Cancer Res,2003,63(20):6928-6934.
7. Masahiko O,Kenichi M,Takesh IN,et al. DJ-1 a target protein for an endocrine disrupter,participates in the fertilization in mice[J]. Biol Pharm Bull,2002,25(7):853-856.
8. Lu KJM, Lam CT, Siu AF,et al.Proteomic profiling of hepatocellular carcinoma in Chinese cohort reveals heat-shock proteins (Hsp27,Hsp70, GRP78) up-regulation and their associated prognostic values[J]. Proteomics,2006,6(3):1049-1057.
9. Romanucci M,Marinelli A,Sarli G,ea al.Heat shock protein expression in canine malignant mammary tumours[J].BMC Cancer,2006,27(6):171.
10. Lo Muzio L,Campisi G,Farine A,et al.Prognostic value of HSP27 in head and neck squamous cell carcinoma:a retrospective analysis of 57 tumours[J]. Anticancer Res,2006,26(2B):1343-1349.
11. Kato S, Hirano A, Kato M, et al. Comparative study on the expression of stress-response protein(srp)72,srp27,alphaB-crystallin and ubiquitin in brain tumours.An immunohistochemical investigation.[J] Neuropathol Appl Neurobiol,1993,19(5):436-442.
12. Kato S, Morita T, Takenaka T, et al. Stress-response (heat-shock) protein 90 Expression in tumors of the central nervous system:an immunohistochemica study[J].Acta Neuropathol (Berl),1995,89(2):184-188.
13. Assimakopoulou M, Sotiropoulou-Bonikou G,Maraziotis T, et al. Prognostic Sigificance of HSP27 in astrocytic brain tumors:an immunohistochemical study[J].Anticancer Res,1997,17(4A):2677-2682.
14. Knosp E, Steiner E, Kitz K, et al. Pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space:a magnetic resonance imaging classification compared with surgical findings[J]. Neurosurgery, 1993,33(4):610-618.
15. Hardy J,Vezina JL.Transsphenoidal neurosurgery of intracranial neoplasm[J]. Adv Neurol,1976,15:261-273.
16. Nagakubo D,Taira T, Kitaura H,et al.DJ-1, A novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras[J]. Biochem Biophys Res Commun,1997,231(2):509-513.
17. Kim RH,Peters M,Jang YJ,et al.DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN[J]. Cancer Cell,2005,3(7):263-273.

(本文编辑 彭敏宁)