

肿瘤发病机制与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000133

血红素加氧酶 1.2 在髓母细胞瘤中的表达及意义

唐 俐¹, 何密斯¹, 郑维萍², 陈 黎², 李 昱³

(重庆医科大学基础医学院 1. 病理生理学教研室; 2. 实验教学管理中心; 3. 病理学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)-1 和 HO-2 在髓母细胞瘤(medulloblastoma, MB)中的表达及意义。**方法:**采用 SP 免疫组织化学法检测 41 例 MB 组织和 23 例对照脑组织标本中 HO-1 和 HO-2 的表达, 分析 HO-1 和 HO-2 的表达相关性及其与 MB 的临床特征(性别、年龄、病理类型和肿瘤部位)之间的关系。**结果:**在 41 例 MB 中, HO-1 和 HO-2 的阳性表达率分别为 78.0%(32/41)和 73.2%(30/41), 高于对照脑组织($P=0.002, 0.001$), 且二者在 MB 中的表达呈正相关($r_s=0.477, P=0.009$); HO-1 和 HO-2 在 MB 中的表达与患者的性别、年龄和肿瘤部位等临床特征均无相关性, 差异无统计学意义(HO-1: $\chi^2=0.118, 0.000, 2.903, P=0.732, 1.000, 0.424$; HO-2: $\chi^2=2.737, 1.191, 1.169, P=0.098, 0.662, 0.945$), 但 HO-1 和 HO-2 在不同组织病理学类型的 MB 中的表达具有统计学差异(HO-1: $\chi^2=12.570, P=0.002$; HO-2: $\chi^2=6.677, P=0.044$)。**结论:**HO-1 和 HO-2 的高表达在 MB 的生长中发挥重要作用。HO-1 和 HO-2 的表达与 MB 的组织病理学分型密切相关, 提示 HO-1 和 HO-2 可作为评估患者病情和预后的新指标及治疗新靶点。

【关键词】血红素加氧酶; 髓母细胞瘤; 免疫组化**【中图分类号】**R365**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-09-11

Expression and significance of HO-1 and HO-2 in medulloblastoma

Tang Li¹, He Misi¹, Zheng Weiping², Chen Li², Li Yu³

(1. Teaching and Research Section of Pathophysiology; 2. Experimental and Teaching Center; 3. Teaching and Research Section of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the expression and clinical values of heme oxygenase (HO)-1 and HO-2 in medulloblastoma. **Methods:** Expression of HO-1 and HO-2 in 41 cases of medulloblastoma and 23 cases of control brain tissues was determined by immunohistochemical assay with SP staining. Relationship between HO-1 and HO-2 expression as well as relationship between HO-1 and HO-2 expression and clinical features (sex, age, histopathology and tumor location) were analyzed with corresponding statistical methods. **Results:** Expression rates of HO-1 and HO-2 in 41 cases of medulloblastoma were 78.0% (32/41) and 73.2% (30/41) respectively, significantly higher than those in control brain tissue ($P=0.002, 0.001$). Expression of HO-1 was positively related with expression of HO-2 ($r_s=0.477, P=0.009$). There was no difference in gender, age and tumor location between negative and positive of HO-1 and HO-2 groups (HO-1: $\chi^2=0.118, 0.000, 2.903; P=0.732, 1.000, 0.424$; HO-2: $\chi^2=2.737, 1.191, 1.169, P=0.098, 0.662, 0.945$). However, expression of HO-1 and HO-2 showed significant difference in medulloblastoma with different histopathology types (HO-1: $\chi^2=12.570, P=0.002$; HO-2: $\chi^2=6.677, P=0.044$). **Conclusions:** High expression of HO-1 and HO-2 play an important role in medulloblastoma growth. Furthermore, expression of HO-1 and HO-2 is significantly associated with histopathology of medulloblastoma, indicating that HO-1 and HO-2 may be used as new marker for patient's state, prognosis and therapeutic target.

【Key words】 heme oxygenase; medulloblastoma; immunohistochemistry

髓母细胞瘤(medulloblastoma, MB)是儿童期常见的脑肿瘤之一, 占儿童中枢神经系统肿瘤的20%,

作者介绍: 唐 俐, Email: tanglicq@126.com,

研究方向: 肿瘤发病机理及治疗。

通信作者: 李 昱, Email: liyu100@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: NSFC81272571); 重庆市渝中区科委科技资助项目(编号: 20120208)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000133.html>

占儿童后颅窝肿瘤的40%, 其恶性程度高, 预后不佳。随着学者们对 MB 的组织学来源、病理学类型和生物学行为等方面研究的不断深入, 目前发现该肿瘤的发生发展与参与小脑正常发育的多种生物分子及多条信号通路有关^[1-2], 但 MB 的具体发病机制仍未完全阐明, 在临床治疗上仍缺乏可靠的预后判断指标及有效的治疗手段。

血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)是血红素分解代谢的细胞内限速酶,催化血红素降解并释放出胆绿素、CO 和 Fe^{2+} ,与氧化应激、炎症反应、细胞增殖、细胞凋亡和维持细胞稳态密切相关^[3]。近年来研究表明 HO 在肿瘤发生、血管生成、肿瘤侵袭转移等多种生物学行为中发挥重要作用。在多种肿瘤组织(胰腺癌^[4]、肝癌^[5]和黑色素瘤^[6]等)中 HO 的高表达,参与抑制细胞凋亡、促进细胞增殖和转移等过程,但在乳腺癌^[7]中,HO 的表达上调则可抑制其细胞增殖。因此,HO 在各种肿瘤发生、发展中的作用不尽相同,而目前 HO 在人 MB 中的表达研究甚少。

本课题采用 SP 免疫组织化学法检测 HO-1 和 HO-2 在 41 例 MB 组织切片标本中的表达,初步探讨 HO-1 和 HO-2 之间的表达相关性及其与 MB 各临床特征的相互关系和临床意义,以期发现更多参与 MB 发生发展的蛋白分子,进一步阐明其发病机制,为 MB 的临床治疗提供理论基础和新思路。

1 材料和方法

1.1 临床资料

收集重庆医科大学临床病理诊断中心 2005 年至 2010 年病理诊断为 MB 的手术切除标本 41 例,其中男性 23 例,占 56.1%,女性 18 例,占 43.9%;儿童(≤ 16 岁)30 例,占 73.2%,成人(> 16 岁)11 例,占 26.8%;根据 2007 年 WHO 的中枢神经系统肿瘤组织病理学分类标准:经典型 28 例,占 68.3%,多纤维/结节型 9 例,占 21.9%,广泛结节型 2 例,占 4.9%,大细胞间变型 2 例,占 4.9%;肿瘤位于小脑蚓部 17 例,占 41.5%,小脑半球 14 例,占 34.1%,第四脑室 8 例,占 19.5%,脑干 2 例,占 4.9%。对照脑组织 23 例为重庆医科大学临床病理诊断中心保存。

1.2 主要试剂

兔抗人 HO-1 多克隆抗体和兔抗人 HO-2 多克隆抗体均购自北京博奥森生物技术有限公司;即用型兔鼠通用 SP

免疫组化试剂盒和浓缩型 DAB 酶底物显色试剂盒均购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.3 SP 免疫组织化学法检测 HO-1 和 HO-2 在 MB 中的表达

采用 SP 免疫组织化学法,具体操作按说明书进行。肿瘤手术切除标本经 10% 中性甲醛溶液固定,石蜡包埋切片,常规脱蜡水化;枸橼酸钠缓冲液(pH 6.0)微波修复抗原;0.3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶活性 10 min;正常山羊血清室温封闭 20 min;分别加入抗 HO-1(1:200)和抗 HO-2(1:200),4℃过夜;37℃复温 45 min;生物素标记的二抗 37℃作用 30 min;HRP 标记的三抗 37℃作用 30 min;DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封片。实验过程中,以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定

以瘤细胞中出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性细胞,根据双评分半定量方法判断结果,染色强度:无色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色或棕褐色为 2 分;阳性细胞百分比:阴性为 0 分, $< 20\%$ 为 1 分,20%~50% 为 2 分, $> 50\%$ 为 3 分。当染色强度评分加阳性细胞百分比评分所得结果 ≥ 2 时,为免疫反应(+),否则为(-)。

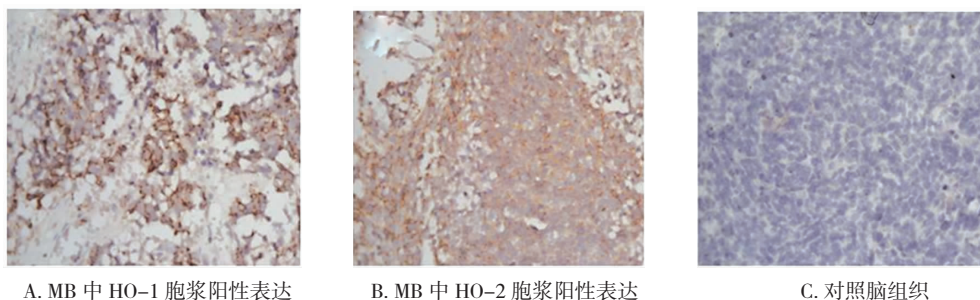
1.5 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件对实验所得数据进行统计学分析,各指标组间比较采用 χ^2 检验(其中组织病理类型的组间比较采用 Fisher 确切概率法),两指标间的相关性分析采用 Spearman 秩相关检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 HO-1 和 HO-2 在 MB 中的表达及其表达相关性

免疫组织化学检测结果显示,HO-1 和 HO-2 均主要表达于细胞浆内,呈棕黄色或棕褐色颗粒状染色。41 例 MB 组织切片中,HO-1 的阳性表达例数为 32 例,阳性表达率为 78.0%(32/41)明显高于对照组脑组织 HO-1 阳性表达率 39.1%(9/23);HO-2 的阳性表达例数为 30 例,阳性表达率为 73.2%(30/41)明显高于对照组脑组织 HO-2 阳性表达率 30.4%(7/23),且差异均具有统计学意义(P 值分别为 0.002、0.001)见图 1。Spearman 秩相关分析结果显示,HO-1 和 HO-2 在 MB 中的表达呈正相关($r_s=0.477, P=0.009$),见表 1。



A. MB 中 HO-1 胞浆阳性表达

B. MB 中 HO-2 胞浆阳性表达

C. 对照脑组织

图 1 免疫组织化学法检测 HO-1 和 HO-2 在 MB 和对照脑组织中的表达 (SP, 400×)

Fig.1 Immunohistochemical staining for HO-1 and HO-2 in MB and control brain tissue (SP, 400×)

表 1 HO-1 和 HO-2 的表达相关性

Tab.1 Relationship between expression of HO-1 and HO-2

HO-1	HO-2		合计
	-	+	
-	6	3	9
+	5	27	32
合计	11	30	41

2.2 HO-1 和 HO-2 的表达与 MB 各临床特征的相关性

统计学分析结果显示,HO-1 和 HO-2 在 MB 中的表达与患者的性别、年龄和肿瘤部位等临床特征差异无统计学意义($P>0.05$),但 HO-1 和 HO-2 在不同组织病理学类型的 MB 中的表达具有统计学差异($P=0.002$ 、 $P=0.044$),见表 2。

表 2 HO-1 和 HO-2 的表达与 MB 各临床特征的相关性

Tab.2 Relationship between expression of HO-1 and HO-2 and clinical features of MB

临床特征	例数 (n)	HO-1		χ^2 值	P 值	HO-2		χ^2 值	P 值
		-	+			-	+		
性别									
男	23	6	17	0.118	0.732	9	14	2.737	0.098
女	18	3	15			2	16		
年龄(岁)									
≤16	30	7	23	0.000	1.000	7	23	1.191	0.662
>16	11	2	9			4	7		
组织病理类型									
经典型	28	3	25	12.570	0.002	5	23	6.677	0.044
多纤维/结节型	9	2	7			3	6		
广泛结节型	2	2	0			1	1		
大细胞/间变型	2	2	0			2	0		
肿瘤部位									
小脑蚓部	17	2	15	2.903	0.424	4	13	1.169	0.945
小脑半球	14	5	9			5	9		
第四脑室	8	2	6			2	6		
脑干	2	0	2			0	2		

3 讨 论

HO 系统是一个微粒体酶系统,是血红素降解的起始酶和限速酶,其广泛存在于哺乳动物体内,参与多种生理和病理过程,现已发现了 3 种 HO 同工酶,包括 HO-1、HO-2 和 HO-3。其中 HO-1 为诱导型,HO-2 和 HO-3 为组成型,但 HO-3 的酶活性远远低于 HO-1 和 HO-2^[8]。近年来,越来越多的研究表明,HO-1 因其抗氧化性和抗凋亡性,在多种肿瘤的形成和快速生长中发挥了重要的作用。对胰腺癌、肝癌和黑色素瘤等研究发现,HO-1 在上述肿瘤

组织中较正常组织呈明显的高表达状态,提示 HO-1 的高表达与肿瘤的生长密切相关。新近文献报道,在肝癌细胞株(HepG2)和宫颈癌细胞株(HeLa)中,HO-2 可参与调节 HO-1 的表达,进而参与肿瘤的发生发展^[9]。现有的研究表明 HO-1 可通过多种机制(如:降解血红素而减少超氧自由基的生成、增加胆红素和 CO 的生成)发挥其抗凋亡、抗氧化的作用,从而有利于肿瘤的形成和生长^[10]。

MB 是中枢神经系统肿瘤中恶性程度较高的神经上皮性肿瘤之一,其生长极为迅速,具有极强的浸润性和转移性,病死率高,预后不佳。目前标准的治疗方案为手术切除并辅以放化疗,该方案大大提高了患者的 5 年生存率,但同时也带来了一系列的放化疗后遗症。随着对 MB 研究的不断深入,有研究者提出 MB 是一种高度异质性的肿瘤,其具有不同的表型和预后^[2,11]。因此,近年来针对 MB 患者的危险程度分层就成为了其个体化治疗方案选择的标准之一。个体化治疗方案的运用不仅保证了 MB 的生存率,同时大大降低了放化疗副反应,使存活患儿的生活质量得到了提高。目前用于 MB 患者危险程度分层的指标主要包括:年龄、术后残存肿瘤大小、组织病理学类型和转移等,但也有学者提出生物学分子指标(如 survivin、Gli-1、Gli-2 和 β -catenin 等)将取代目前分层评估方案^[12-13]。

Al-Owais 等^[14]发现在 MB 细胞株 DAOY 中,HO-1 通过诱导 CO 的生成,抑制 K^+ 通道的活性从而发挥其抗凋亡作用,抑制 HO-1 的表达可促进 DAOY 细胞凋亡,抑制 MB 细胞株的生长。HO-1 是 MB 细胞株的一个重要分子。但 HO 在人 MB 的实体肿瘤组织中的表达研究目前国内外少有报道。邓煜等^[15]对 MB 中核因子相关因子-2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2,Nrf-2)/HO-1 信号通路研究发现,Nrf-2 及其所调控的下游细胞因子 HO-1 均被激活而表达上调,对肿瘤细胞发挥保护性的抗氧化作用而促进肿瘤的生长,在信号通路方面提示 HO-1 与 MB 的形成和生长密切相关。本课题检测 HO-1 和 HO-2 在人 MB 实体肿瘤组织和对照脑组织的表达,结果显示,HO-1 和 HO-2 的阳性表达率分别为 78.0%(32/41)和 73.2%(30/41),显著高于对照组脑组织中 HO-1 和 HO-2 阳性表达率,且 HO-1 与 HO-2 的表达呈正相关,提示 HO-1 和 HO-2 的高表达可能与 MB 的形成和生长密切相关,且

二者可能存在协同作用。本研究进一步对 HO-1 和 HO-2 与 MB 的各临床特征的相关性进行分析,结果表明,HO-1 和 HO-2 在 MB 中的表达与患者的性别、年龄和肿瘤部位等临床特征均无相关性,但 HO-1 和 HO-2 在经典型和多纤维/结节型 MB 中的表达高于广泛结节型和大细胞/间变型 MB。而针对 MB 患者的回顾性分析则显示经典型和多纤维/结节型 MB 患者预后明显优于广泛结节型和大细胞/间变型^[16-17]。因此,HO-1 和 HO-2 可能提示 MB 患者预后,成为参与 MB 患者预后评估的又一生物学分子指标。

本课题通过检测 HO-1 和 HO-2 在 MB 中的表达,分析其与 MB 各临床特征的相关性,发现 HO-1 和 HO-2 的高表达在 MB 的生长中起重要作用,且 HO-1 和 HO-2 可能作为评估患者病情及预后,并指导治疗方案选择的又一新指标及治疗新靶点,但 HO-1 和 HO-2 参与 MB 发生发展的具体作用机制尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Guessous F, Li Y, Abounader R. Signaling pathways in medulloblastoma[J]. J Cell Physiol, 2008, 217(3): 577-583.
- [2] Gilbertson RJ, Ellison DW. The origins of medulloblastoma subtypes[J]. Annu Rev Pathol, 2008, 3: 341-365.
- [3] Akagi R, Takahashi T, Sassa S. Cytoprotective effects of heme oxygenase in acute renal failure[J]. Contrib Nephrol, 2005, 148: 70-85.
- [4] Nuhn P, Kunzli BM, Hennig R, et al. Heme oxygenase-1 and its metabolites affect pancreatic tumor growth in vivo[J]. Mol Cancer, 2009, 8: 37.
- [5] Sass G, Leukel P, Schmitz V, et al. Inhibition of heme oxygenase 1 expression by small interfering RNA decreases orthotopic tumor growth in livers of mice[J]. Int J Cancer, 2008, 123(6): 1269-1277.
- [6] Was H, Cichon T, Smolarczyk R, et al. Overexpression of heme oxygenase-1 in murine melanoma; increased proliferation and viability of tumor cells, decreased survival of mice[J]. Am J Pathol, 2006, 169(6): 2181-2198.
- [7] Hill M, Pereira V, Chauveau C, et al. Heme oxygenase-1 inhibits rat and human breast cancer cell proliferation; mutual cross inhibition with indoleamine 2,3-dioxygenase[J]. FASEB J, 2005, 19(14): 1957-1968.
- [8] McCoubrey WK, Jr, Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3[J]. Eur J Biochem, 1997, 247(2): 725-732.
- [9] Ding Y, Zhang YZ, Furuyama K, et al. Down-regulation of heme oxygenase-2 is associated with the increased expression of heme oxygenase-1 in human cell lines[J]. FEBS J, 2006, 273(23): 5333-5346.
- [10] Fang J, Akaike T, Maeda H. Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment[J]. Apoptosis, 2004, 9(1): 27-35.
- [11] Rutkowski S, Gerber NU, von Hoff K, et al. Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy and deferred radiotherapy[J]. Neuro Oncol, 2009, 11(2): 201-210.
- [12] Northcott PA, Shih DJ, Peacock J, et al. Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes[J]. Nature, 2012, 488(7409): 49-56.
- [13] Ramaswamy V, Northcott PA, Taylor MD. FISH and chips: the recipe for improved prognostication and outcomes for children with medulloblastoma[J]. Cancer Genet, 2011, 204(11): 577-588.
- [14] Al-Owais MM, Scragg JL, Dallas ML, et al. Carbon monoxide mediates the anti-apoptotic effects of heme oxygenase-1 in medulloblastoma DAOY cells via K⁺ channel inhibition[J]. J Biol Chem, 2012, 287(29): 24754-24764.
- [15] 邓煜, 高敏娜, 唐俐, 等. HO-1 和 Nrf-2 在髓母细胞瘤中的表达和意义[J]. 中国肿瘤临床, 2012, 39(15): 1029-1032.
- [16] Ellison DW, Kocak M, Dalton J, et al. Definition of disease-risk stratification groups in childhood medulloblastoma using combined clinical, pathologic, and molecular variables[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(11): 1400-1407.
- [17] Northcott PA, Korshunov A, Witt H, et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(11): 1408-1414.

(责任编辑:冉明会)

《重庆医科大学学报》
在线投稿网址: cyxb.alljournals.ac.cn