

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.06.015

· 临床研究 ·

人脑胶质瘤组织中 Oct4、Wnt2 的表达及其临床意义

赵光锐¹, 吴明灿^{1*}, 陈世洁², 李军川³, 陈廷焯³, 姚 远²(1. 长江大学 临床医学院 外科学教研室, 湖北 荆州 434000; 2. 长江大学 附属第一医院 神经外科, 湖北 荆州 434000; 3. 长江大学 附属第一医院 病理科, 湖北 荆州 434000)

[摘要] 目的: 探讨 Oct4 和 Wnt2 在人脑胶质瘤组织中的表达及其与临床病理特征的关系。方法: 选取临床及病理资料完整的长江大学附属第一医院 2006 - 2009 年手术切除并经病理证实为胶质瘤的石蜡标本 56 例, 采用免疫组织化学方法检测 56 例胶质瘤组织(其中 15 例为术后复发) 和 10 例脑外伤行内减压术切除的脑组织标本 Oct4、Wnt2 的表达。结果: 正常脑组织中 Oct4 表达均为阴性, Wnt2 表达仅 1 例呈弱阳性; 56 例胶质瘤组织中 Oct4 阳性 34 例(60.7%), Wnt2 阳性 40 例(71.4%)。Oct4、Wnt2 在低度恶性胶质瘤组中和高度恶性胶质瘤中的阳性率分别为 46.2% 和 73.3% ($P < 0.05$) 及 57.7% 和 83.3% ($P < 0.05$), Oct4 在复发肿瘤和初诊肿瘤中的阳性率分别为 86.7% 和 51.2% ($P < 0.05$)。人脑胶质瘤组织中 Oct4 和 Wnt2 表达呈正相关($r = 0.537, P < 0.01$)。结论: Oct4、Wnt2 的表达与人脑胶质瘤的恶性程度相关, Oct4 的表达与胶质瘤的复发相关; Oct4 可能是通过 Wnt 通路而参与了胶质瘤的发生、发展。

[关键词] 胶质瘤; Oct4; Wnt2; 脑肿瘤干细胞; Wnt 通路

[中图分类号] R392.11; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)06-0629-04

Expression of Oct4 and Wnt2 in human glioma tissues and its clinical significance

ZHAO Guang-rui¹, WU Ming-can^{1*}, CHEN Shi-jie², LI Jun-chuan³, CHEN Ting-xuan³, YAO Yuan²(1. Department of Surgery, Clinical Medical School of Yangtze University, Jingzhou 434000, Hubei, China; 2. Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Yangtze University, Jingzhou 434000, Hubei, China; 3. Department of Pathology, First Affiliated Hospital of Yangtze University, Jingzhou 434000, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of Oct4 and Wnt2 in human glioma tissues and its relationship with the clinicopathological features of glioma. **Methods:** Fifty-six paraffin blocks were obtained from glioma patients receiving surgery. The diagnosis of these patients were confirmed by pathology in our hospital from 2006-2009. Immunohistochemical staining was used to examine Oct4 and Wnt2 expression in the brain tissues of 10 patients with acute brain injury and 56 glioma tissues (including 15 recurrent cases). **Results:** The normal brain tissues were negative of Oct4, with only one case showing weak Wnt2 expression. Thirty-four of the 56 glioma tissues showed positive expression of Oct4 (60.7%), and 40 showed positive expression of Wnt2 (71.4%). Positive expression rates of Oct4 and Wnt2 in low-grade and high-grade glioma tissues were 46.2% , 73.3% and 57.7% , 83.3% , respectively ($P < 0.05$). Oct4 positive rates in the recrudescence and newly diagnosed glioma tissues were 86.7% and 51.2% , respectively ($P < 0.05$). Oct4 expression in the glioma tissues was positively correlated with that of Wnt2 ($r = 0.537, P < 0.01$). **Conclusion:** Expression of Oct4 and Wnt2 is associated with the malignant degrees of glioma, and Oct4 expression is related to the recurrence of glioma. Oct4 might participate in the development and progression of brain glioma through Wnt signaling pathway.

[Key words] glioma; Oct4; Wnt2; brain tumor stem cell; Wnt signaling pathway

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(6): 629-632]

[基金项目] 湖北省卫生厅科研基金指导性项目(No. JX3C10); 荆州市医疗卫生科技发展计划项目(荆科技发 2009-13)。Supported by the Scientific Research Project from Health Department of Hubei Province (No. JX3C10); the Medical Health and Technological Development Project of Jingzhou (Technological Development Project of Jingzhou 2009-13)

[作者简介] 赵光锐(1984-), 男, 安徽省六安市人, 硕士, 主要从事胶质瘤的基础与临床研究。E-mail: zhaoguangrui-10@163.com

* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: wumingcan@yangtzeu.edu.cn

研究^[1-2]表明肿瘤中存在肿瘤干细胞, 肿瘤干细胞是肿瘤生长、侵袭、转移和复发的根源。多数学者认为脑肿瘤干细胞起源于自我更新及调节失控的神经干细胞, 而 Wnt 通路是调节神经干细胞自我更新及分化的重要通路之一^[3]。Wnt 通路是由一系列癌基因和抑癌基因编码的蛋白质组成, 其在调节胚胎发育与肿瘤发生、发展等关键的生理、病理过程中起重要作用^[4-5]。人类乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、胶质瘤、卵巢癌等多种肿瘤中 Wnt 通路的异常激活已有报道, 其致癌作用受到较多关注, 而 Wnt2 为 Wnt 通路上游关键因子^[6], 目前相关的研究报道仍较少。

转录因子 Oct4(八聚体结合蛋白4)被认为是干细胞标记物, 在胚胎性癌、精原细胞瘤以及数种恶性肿瘤中有高表达。Oct4 是胚胎发育早期阶段有特异性作用的转录因子或主要调控基因, 具有 POU5F1 基因编码开放阅读框架结构, 位于人染色体 6p21.3, 在干细胞中高水平表达, 而在已分化组织中表达大幅下降或缺如^[7]。本研究通过免疫组织化学法检测 Oct4、Wnt2 在人脑胶质瘤组织中的表达, 并分析两者间相关性, 探讨两者表达的临床意义及与肿瘤复发的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集长江大学附属第一医院 2006 年 8 月至 2009 年 4 月手术切除胶质瘤标本 56 例, 其中男 31 例、女 25 例, 患者年龄 9 ~ 65 岁, 平均年龄 (43.2 ± 11.3) 岁。根据 WHO 神经系统肿瘤的分类标准对胶质瘤进行组织学的分类和分级: I 级 0 例, II 级 26 例, III 级 14 例, IV 级 16 例, 将 I ~ II 级归为低度恶性, III ~ IV 级归为高度恶性; 其中星型细胞瘤 36 例、成胶质细胞瘤 9 例、少突胶质细胞瘤 6 例、室管膜瘤 5 例。56 例标本中 41 例为首次手术患者, 15 例为复发手术患者。另取 10 例同期急性颅脑损伤行内减压切除脑组织标本作为正常脑组织对照。

1.2 主要试剂

浓缩型兔抗人 Wnt2 多克隆抗体购自武汉三鹰生物技术公司(工作液浓度为 1:50), 即用型鼠抗人 Oct4 单克隆抗体及 PV-9000 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术公司。

1.3 免疫组织化学法检测人脑胶质瘤中 Oct4 和 Wnt2 的表达

以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 选择 3 例精原细胞瘤作为 Oct4 阳性对照。将蜡块 $4 \mu\text{m}$ 连续切片, 选取一张行常规 H-E 染色, 确定组织学诊断及

分化程度。采用 PV-9000 两步法分别检测 Oct4、Wnt2 的表达。石蜡切片常规脱蜡至水; 3% H_2O_2 孵育 10 min, PBS 冲洗后滴加一抗 37 °C 孵育 1 h, 滴加二抗试剂 1 孵育 20 min 后, PBS 冲洗, 滴加二抗试剂 2 孵育 30 min 后 PBS 冲洗。DAB 显色, 流水冲洗、复染、脱水、透明、封片。

1.4 免疫组织化学染色结果判断

Oct4 主要表达于细胞核, Wnt2 主要表达于细胞质, 以阳性细胞表达率和染色强度之和进行判断。(1) 每张切片选取具有代表性的区域高倍镜($\times 400$)下随机选择 5 个视野, 计算阳性细胞百分率。无阳性细胞为 0 分, 阳性细胞 $< 10\%$ 为 1 分; $10\% \sim 50\%$ 为 2 分; $51\% \sim 75\%$ 为 3 分; $> 75\%$ 为 4 分。(2) 测算细胞染色深浅程度。染色强度呈弱染色(淡黄色)记 1 分, 中等染色(棕黄色)记 2 分, 强染色(黄褐色)记 3 分。上述 2 项积分相加后共 0 ~ 7 分, 其中总分 0 ~ 1 分为(-), 2 ~ 3 分为弱阳性(+), 4 ~ 5 分为中等强度阳性(++), 6 ~ 7 分为强阳性(+++).

1.5 统计学处理

采用 SPSS12.0 统计软件, 阳性率间的比较采用 χ^2 检验; 相关性采用 Spearman 秩相关分析。

2 结果

2.1 胶质瘤组织中 Oct4 的表达

10 例正常脑组织中均为阴性, 胶质瘤组织中 Oct4 表达阳性率为 60.7% (34/56), 正常脑组织和肿瘤组织间 Oct4 表达差异性有统计学意义 ($P < 0.01$)。低度恶性(I ~ II)和高度恶性(III ~ IV)胶质瘤中 Oct4 阳性率分别为 46.2% (12/26)、73.3% (22/30), 随着病理级别的增高 Oct4 表达阳性率增高, 胶质瘤不同恶性程度组间阳性率差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1、表 1)。

2.2 胶质瘤组织中 Wnt2 的表达

10 例正常脑组织中仅 1 例 Wnt2 表达为弱阳性, 胶质瘤组织中 Wnt2 表达阳性率为 71.4% (40/56), 与正常脑组织对比 Wnt2 表达阳性率差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。低度恶性和高度恶性胶质瘤组中 Wnt2 的阳性率分别为 57.7% (15/26)、83.3% (25/30), 肿瘤级别增高 Wnt2 表达明显增强, 高度恶性组中 Wnt2 表达阳性率明显高于低度恶性组, 两者间差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1、图 1)。

2.3 首次就诊患者与肿瘤复发患者中 Oct4、Wnt2 表达的比较

复发肿瘤组中 Oct4 阳性率为 86.7% (13/15),

Wnt2 的阳性率为 73.3% (11/15)。首次就诊患者组中 Oct4 阳性率为 51.2% (21/41)、Wnt2 阳性率 70.7% (29/41)。经 χ^2 检验 Oct4 在复发肿瘤与首

次就诊肿瘤组中的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Wnt2 在复发肿瘤与首次就诊组肿瘤中的表达差异无统计学意义(表 1)。

表 1 胶质瘤及正常脑组织中 Oct4 与 Wnt2 的表达

Tab. 1 Expression of Oct4 and Wnt2 in glioma tissues and normal brain tissues

Tumor	Oct4 expression			Wnt2 expression		
	n/N (%)	χ^2	P	n/N (%)	χ^2	P
Normal brain tissue	0/10 (0)	12.52	$P < 0.01$	1/10 (10.0)	11.12	$P < 0.01$
Glioma tissue	34/54 (63.0)			40/56 (71.4)		
Low-grade (I-II)	12/26 (46.2)	4.31	$P < 0.05$	40/56 (71.4)	4.49	$P < 0.05$
High grade (III-IV)	22/30 (73.3)	22		25/30 (83.3)		
Recrudescence tumor	13/15 (86.7)	4.39	$P < 0.05$	11/15 (73.3)	0.036	$P > 0.1$
Newly diagnosed tumor	21/41 (51.2)			29/41 (70.7)		

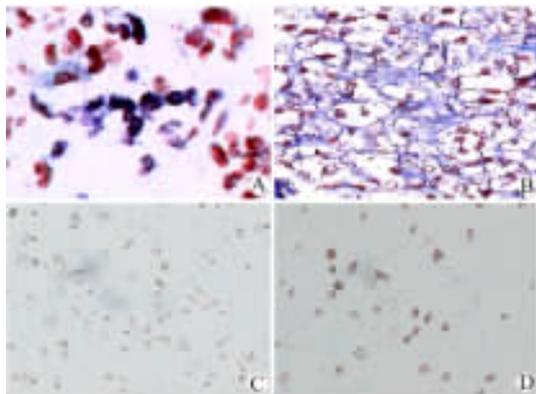


图 1 免疫组织化学染色检测人脑胶质瘤组织中 Oct4 和 Wnt2 的表达

Fig. 1 Expression of Oct4 and Wnt2 in human glioma tissues as detected by immunohistochemical staining

A: Oct4 in human glioma tissues (×400); B: Wnt2 in human glioma tissues (×400); C: Oct4 in normal brain tissues (×200); D: Wnt2 in normal brain tissues (×200)

2.4 人脑胶质瘤组织中 Oct4 与 Wnt2 表达的相关性 Spearman 秩相关分析显示: Oct4、Wnt2 在胶质瘤中的表达呈正相关($r = 0.537, P < 0.01$, 表 2)。

3 讨论

Oct4 是胚胎发育早期阶段具有特异性作用的转录因子,其主要作用是激活或抑制调节基因表达,

维持细胞全能性。Oct4 作为干细胞特异性转录因子在已分化组织中表达下调,有研究者^[7]提出肿瘤干细胞转变成癌细胞可能就是 Oct4 下调或缺失所致,表达 Oct4 的成体干细胞可能就是肿瘤的起始细胞。Du 等^[8]报道 Oct4 在人类胶质瘤中高表达,肿瘤组织中的未分化细胞可能与 Oct4 的高表达有关,Oct4 阳性细胞可能就是正常干细胞向肿瘤细胞分化过程中的肿瘤干细胞或“中间型细胞”。

表 2 人脑胶质瘤组织中 Oct4 与 Wnt2 表达的相关性

Tab. 2 Expression of Oct4 and Wnt2 in glioma tissues and normal brain tissues

Oct4	Wnt2				Total
	-	+	++	+++	
-	14	2	4	2	22
+	1	3	2	2	8
++	0	2	3	5	10
+++	1	2	6	7	16
Total	16	9	15	16	56

本研究发现胶质瘤中 Oct4 阳性率与正常脑组织相比差异有统计学意义;高度恶性胶质瘤组与低度恶性胶质瘤组间 Oct4 阳性率差异有统计学意义;复发胶质瘤组与首次手术患者组间 Oct4 阳性率差

异有统计学意义。这些结果不但提示 Oct4 在胶质瘤中的表达与肿瘤的恶性程度、复发存在关系,其作为干细胞特异性转录因子在胶质瘤中的表达也说明胶质瘤中存在肿瘤干细胞。

Wnt 通路是调控细胞生长、发育和分化的关键途径,Wnt2 是 Wnt 蛋白中与细胞增殖分化关系较为密切的因子之一,位于染色体 7p31,在人类中它的功能尚未完全清楚。本研究发现正常脑组织与胶质瘤中 Wnt2 的阳性率差异有统计学意义;低度恶性胶质瘤组与高度恶性胶质瘤组间 Wnt2 阳性率差异有统计学意义;首次就诊患者组与复发肿瘤组间 Wnt2 阳性率无统计学意义。这些结果表明 Wnt2 的表达与胶质瘤的恶性程度相关,此外作为 Wnt 通路上游关键因子,在胶质瘤中的过表达表明 Wnt 通路可能参与了胶质瘤的发生发展。

研究显示,Oct4、Nanog 等调节胚胎干细胞自我更新的基因,在肿瘤的发生中有重要作用,脑肿瘤干细胞自我更新的关键可能在于其具有类同于早期胚胎干细胞的自分泌激活机制^[9]。Takao 等^[10]报道,激活 Wnt 通路下游关键因子 β -Catenin 的表达导致胚胎干细胞长期增殖;此外,发现 β -Catenins 是以 Oct4 依赖的形式上调 Nanog 的表达的,得出结论认为 Wnt 通路通过 Oct4 介导上调 Nanog 以维持胚胎干细胞的自我更新。本研究发现胶质瘤中 Oct4 与 Wnt2 的表达呈正相关,也证明了 Oct4 在胶质瘤中的表达、维持肿瘤细胞的未分化状态可能与 Wnt 通路有关,Oct4 在胶质瘤中的表达导致 Wnt 通路调节异常,使神经干细胞的自我更新及分化失调,从而脑肿瘤干细胞产生,导致了胶质瘤的发生及肿瘤的恶性增殖。

综上所述,Oct4 和 Wnt2 在胶质瘤的发生、发展过程中可能具有重要作用,可为临床判断胶质瘤恶性程度及复发提供有效参考。联合检测其在胶质瘤中的表达,有助于深入研究胶质瘤的发生、发展机制以

及以脑肿瘤干细胞为靶细胞的新型肿瘤治疗方法。

[参 考 文 献]

[1] Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas [J]. N Engl J Med, 2005, 353(8): 811-822.

[2] Wendy A, Woodward, Erik P. Cancer stem cells: markers or biomarkers [J]? Cancer Metastasis Rev, 2008, 27(5): 459-470.

[3] Clark PA, Treisman DM, Ebben J, et al. Developmental signaling pathways in brain tumor-derived stem-like cells [J]. Dev Dyn, 2007, 236(12): 3297-3308.

[4] Tan LP, Ng BK, Balraj P, et al. No difference in the occurrence of mismatch repair defects and APC and CTNNB1 genes mutation in a multi-racial colorectal carcinoma patient cohort [J]. Pathology, 2007, 39(2): 228-234.

[5] Bryja V, Cajánek L, Grahň A, et al. Inhibition of endocytosis blocks Wnt signalling to beta-catenin by promoting dishevelled degradation [J]. Acta Physiol (Oxf), 2007, 190(1): 55-61.

[6] Gangadhara RS, Sundaram C, Manas P, et al. Wnt/ β -catenin/Tcf signaling pathway activation in malignant progression of rat gliomas induced by transplacental N-Ethyl-N-nitrosourea Exposure [J]. Neurochem Res, [2009-01-16]. [Epub ahead of print].

[7] Tai MH, Chang CC, Kiupel M, et al. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis [J]. Carcinogenesis, 2005, 26(2): 495-502.

[8] Du Z, Jia D, Liu S, et al. Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells [J]. Glia, 2009, 57(7): 724-733.

[9] Ezech UI, Turek PJ, Reijo RA, et al. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma [J]. Cancer, 2005, 104(10): 2255-2265.

[10] Takao Y, Yokota T, Koide H. Beta-catenin up-regulates Nanog expression through interaction with Oct-3/4 in embryonic stem cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 353(3): 699-705.

[收稿日期] 2009 - 10 - 04 [修回日期] 2009 - 11 - 30
[本文编辑] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB 3358 - 93《统计学术语》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1)样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} ,不用大写 X,也不用 Mean 或 M;(2)标准差用英文小写 s,不用 SD;(3)标准误用英文小写 s_x ,不用 SE;(4) t 检验用英文小写 t;(5) F 检验用英文大写 F;(6)卡方检验用希文小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r;(8)自由度用希文小写 ν ;(9)样本数用英文小写 n;(10)概率用英文大写 P;(11)以上符号 \bar{x} 、s、 s_x 、t、 χ^2 、r、 ν 、n、P 均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)