

Gli-1 在人脑胶质瘤中的表达及与 Ki-67 相关性研究

刘海英 张秋实 苏旭明 张学新

河北医科大学第四医院神经外科 河北石家庄 050012

〔摘要〕目的 探讨核转录因子 Gli-1 在人脑胶质瘤中表达情况, 研究其表达与 Ki-67 的相关性。方法 收集河北医科大学第四医院神经外科 2014 年 5 月至 2017 年 5 月胶质瘤组织标本 50 例, 根据病理级别分为 2 组, 低级别组(Ⅰ-Ⅱ级)21 例, 高级别组(Ⅲ-Ⅳ级)29 例, 及非肿瘤脑组织标本 10 例作为对照组, 应用免疫组化方法检测 Gli-1、Ki-67 蛋白的表达情况, 应用 RT-PCR 检测 Gli-1、Ki-67 的 mRNA 的表达情况, 并分析 Gli-1 与 Ki-67 表达的相关性。结果 Gli-1 与 Ki-67 在人脑胶质瘤标本中的阳性表达率分别为 62.8% 和 47.6%, 均显著高于非肿瘤脑组织组中的 5.9% 和 2.7%。Gli-1 与 Ki-67 的表达与病理学分级 ($\chi^2=12.192$, $P<0.01$; $\chi^2=14.508$, $P<0.01$) 呈正相关。Gli-1 与 Ki-67 在人脑胶质瘤中的表达呈正相关 ($P<0.01$)。结论 Gli-1 在人脑胶质瘤中呈高表达, 与病理级别具有相关性, 其与 Ki-67 的表达具有正相关性。

〔关键词〕人脑胶质瘤; Gli-1; Ki-67; 免疫组化; RT-PCR

〔中图分类号〕R739.41 〔文献标识码〕A 〔文章编号〕2095-7165 (2019) 04-001-03

〔基金项目〕该项目受河北省科技厅课题 (162777103D) 资助

Expression of Gli-1 in Human brain glioma and the Correlation with Ki-67

Liu haiying¹, Zhang qiushi¹, Su xuming¹, Zhang xuexin¹

Department of neurosurgery; The Forth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, 12 Health Road, Shijiazhuang, 050012, P.R. China.

〔Abstract〕Objective To investigate the expression of Gli-1 in human brain glioma and the correlation with Ki-67. Methods We investigated Gli-1 and Ki-67 expression in human brain glioma samples by immunohistochemical method from 50 patients, who were treated in our hospital from 2014.5-2017.5. According to the pathological grade, they were divided into two groups: 21 cases in low-grade group (grade I-II), 29 cases in high-grade group (grade III-IV), and 10 cases in non-tumorous brain tissue as control group. Real time PCR was used to detect the mRNA expression of Gli-1 and Ki-67. The correlation of Gli-1 and Ki-67 were analyzed. Results The expression of Gli-1 and Ki-67 in human brain glioma were 62.8% and 47.6%, significantly higher than those in non-tumorous brain tissues (5.9% and 2.7%). The expression by RT-PCR of Gli-1 and Ki-67 in human brain glioma tissues showed significant higher than those in non-tumorous brain tissues ($P<0.05$). The expression of Gli-1 and Ki-67 was significantly associated with pathological grade ($\chi^2=12.192$, $P<0.01$; $\chi^2=14.508$, $P<0.01$). Gli-1 was positively correlated with Ki-67 expression in human glioma ($P<0.01$). Conclusion Gli-1 is highly expressed in human glioma, which is correlated with pathological grade, and positively related with Ki-67 expression.

〔Key words〕human brain glioma, Gli-1, Ki-67, Immunohistochemistry, RT-PCR

胶质瘤是人中枢神经系统常见恶性肿瘤, 约占颅脑肿瘤的 47%。其中多形性胶质母细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM) 是人中枢神经系统原发的高度恶性肿瘤, 约占神经胶质瘤的 60%, 因其增殖迅速、高浸润性及复发率高等特点导致患者预后很差, 中位生存期约 14.6 个月, 5 年生存率不超过 10%^[1]。因此, 深入研究胶质瘤的发生、发展的分子机制, 寻找其发生发展的规律, 探究肿瘤相关分子机制是治疗胶质瘤的一项重要手段。研究显示 SHH (Sonic Hedgehog) 信号通路在胚胎发育尤其是神经系统发育中起到重要作用。不仅如此近年来研究也证明, SHH 信号通路在多种肿瘤如髓母细胞瘤、胃癌、肝癌、基底细胞癌、肺癌、前列腺癌等的发生发展中起重要作用^[2-6]。

Glioma-associated oncogene 1 (Gli-1) 是一类含有锌指结构的核转录因子, 在多种生物学进程中发挥着关键作用^[7-8]。以往的研究中显示, Gli-1 是 SHH 信号通路激活中不可缺少的一类转录因子, 其表达程度可直接反应 Shh 信号通路的激活状况^[6,9]。而在胶质瘤中 SHH 信号通路及 Gli-1 的表达情况目前尚显有报道。不仅如此, Gli-1 与代表肿瘤恶性分化能力的 Ki-67 蛋白的相关性研究更是 GBM 发生发展机制研究中的一项短板。因此本研究旨在利用 RT-PCR 及免疫组化技术, 探究人脑胶质瘤中 SHH 信号通路中核转录因子 Gli-1 的表达情况, 探究胶质瘤的发生发展的相关机制, 为临床实践提供一定的指导。

1 材料和方法

1.1 研究对象

收集我院神经外科自 2014 年 5 月至 2017 年 5 月资料完整的行开颅手术患者肿瘤标本, 经病理证实为胶质瘤标本 50 例。其中男性 28 例, 女性 22 例。年龄 17-72 岁, 中位年龄 47 岁; 病理学分级依据 2016 年 WHO 中枢神经系统肿瘤分类标准, I 级 9 例, II 级 12 例, III 级 13 例, IV 级 16 例, 其中 I 级、II 级作为低级别肿瘤组, III 级、IV 级作为高级别肿瘤组。选取同期因脑外伤手术患者非肿瘤脑组织 10 例作为对照组。

1.2 试剂

兔抗人 Gli-1 多克隆抗体 (ABGENT 公司)、鼠抗人单克隆抗体 Ki-67 (武汉博士德生物工程有限公司)、SP9001 免疫组化检测试剂盒 (北京中杉金桥生物技术开发公司)、反转录试剂盒 (Thermo 公司)。

1.3 RT-PCR

于 NCBI 基因库查找相应的基因 mRNA 序列, 应用 Oligo 5.0 设计引物, 返回 NCBI, 进行 Primer-BLAST, 采用特异性较好引物序列。引物序列由 Invitrogen 公司合成 (表 1)。

1.4 免疫组化法检测多形性胶质母细胞瘤及正常脑组织中 Gli-1 及 Ki-67 的表达

将取得的胶质瘤标本、非肿瘤脑组织经甲醛溶液固定后, 石蜡包埋切片, 梯度复水后 3% 过氧化氢 (H_2O_2) 室温避光孵育 30min, PBS 冲洗 2 次, EDTA 热修复后 PBS 冲洗 2 次, 血清封闭液

37℃温箱封闭 1h, 吸取多余血清后滴加一抗 (Ki67 1:100, Gli-1 1:100), 4℃孵育过夜。次日 PBS 冲洗 2 次, 加入生物素标记的二抗, 37℃温箱孵育 30min, PBS 冲洗 2 次, 加链酶卵白素工作液, 37℃温箱内孵育 30min, PBS 冲洗 2 次, DAB 显色, 复染。光镜下观察结果并拍照。

Gli-1 免疫组化表达均主要为细胞质及细胞核中, Ki67 免疫组化表达均主要为细胞核中。采用 Friedrich 等的免疫反应评分 (immunoreactivity score, IRS), 采用半定量标准: 高倍视野下随机选取 5 个视野, 计数 200 个细胞, 阳性细胞 ≤ 10% 为 0 分; >10%~50% 为 1 分; >50%~75% 为 2 分; >75% 为 3 分。染色强度标准: 无色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。总体评价: 以上述 2 项得分相乘: 0 分判为“-”, 1 分~4 分判为“+”, 5 分~7 分判为“++”, ≥ 8 分判为“+++”。以“++”和“+++”定义为阳性, “-”和“+”定义为阴性。

1.5 RT-PCR 检测多形性胶质母细胞瘤及正常脑组织中 Gli-1mRNA 及 Ki-67 的表达

将手术取下的各肿瘤组织及非肿瘤脑组织半小时内放入无菌、无酶冻存管, 存至 -80℃ 冰箱。组织标本在研钵中碾碎, 用 TriQuick 总 RNA 提取试剂提取组织总 RNA, 反转录试剂盒获得 cDNA, 20 μl 反应体系进行 RT-PCR 反应 [Mix 10 μl, 上游引物 (5 μM) 0.4 μM, 下游引物 (5 μM) 0.4 μM, cDNA 0.4 μg, 去离子水至 20 μl]。反应条件: 95℃ 5min, 95℃ 30s, 56℃ (Ki-67) /58℃ (Gli-1) /57℃ (GAPDH) 30s, 72℃ 45s, 72℃ 7.5min (35 个循环)。产物经琼脂糖凝胶电泳后分别测定样本基因及对应内参灰度值, 以灰度值进行统计学比较。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学处理, 计数资料采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法; 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用非参数秩和检验, 相关性分析采取等级相关分析。用 Spearman 等级相关分析法分析人脑胶质瘤组织中 Gli-1、Ki-67 蛋白表达的相关性, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化结果

Gli-1、Ki-67 均高表达于 GBM 细胞中。Gli-1 定位于细胞胞质、胞核 (见图 1), Ki-67 定位于细胞胞核 (见图 2)。

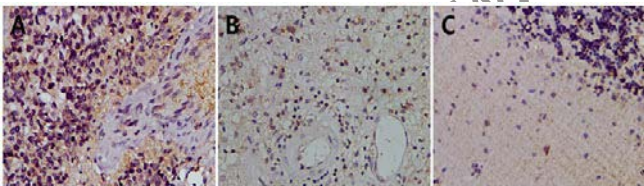


图 1: 高级别胶质瘤 (A)、低级别胶质瘤 (B)、非肿瘤脑组织 (C) Gli-1 免疫组织化染色 (×400)

图 1: Examples of immunohistochemical staining of Gli-1

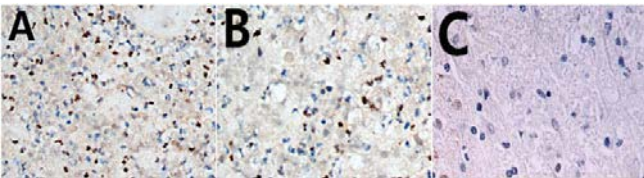


图 2: 高级别胶质瘤 (A)、低级别胶质瘤 (B)、非肿瘤脑组织 (C) Ki-67 免疫组织化学法染色 (×400)

图 2: Examples of immunohistochemical staining of Ki-67

Gli-1 的表达在高级别 GBM 中为 65.52% (29/29), 低级别 GBM 中为 23.81% (5/21), 正常脑组织中为 10% (1/10), 差异有统计学意义 ($\chi^2=12.192, P<0.01$)。(表 1)。高级别 GBM 与正常脑组织阳性率对比、低级别 GBM 与正常脑组织阳性率对比均有统计学意义 ($P<0.01$)。Ki-67 的表达在高级别胶质瘤中为 72.41% (21/29), 低级别胶质瘤中为 14.28% (3/21),

正常脑组织中为 10% (1/10), 差异有统计学意义 ($\chi^2=14.508, P<0.01$) (表 2)。

2.2 RT-PCR 结果

Gli-1 mRNA 在高级别胶质瘤、低级别胶质瘤和正常脑组织中的相对表达量分别为 0.145 ± 0.020 、 0.083 ± 0.070 、 0.060 ± 0.039 , $P=0.004$, 差异有统计学意义。其中, 高级别胶质瘤与对照组、低级别 GBM 与对照组间相对表达量有统计学意义 ($P<0.0125$)。Ki-67 mRNA 在高级别胶质瘤、低级别胶质瘤和对照组中的相对表达量分别为 0.147 ± 0.032 、 0.113 ± 0.070 、 0.049 ± 0.035 , 秩和检验结果: $\chi^2=11.30, P<0.05$, 有统计学意义。(表 3)。

2.3 相关性分析

采用 Spearman 等级相关分析法, 在各级别脑胶质瘤中 Gli-1 的表达与 Ki-67 呈正相关 ($r=0.68, P<0.05$)。

表 1: 不同级别胶质瘤和正常脑组织对照组 Gli-1 IHC 染色结果比较

组别	例数	Gli-1		阳性率	χ^2	P 值
		阴性	阳性			
高级别胶质瘤	29	10	19	65.52%	12.192	<0.001
低级别胶质瘤	21	15	6	23.81%		
非肿瘤脑组织	10	9	1	10.00%		

表 2: 不同级别胶质瘤和正常脑组织对照组 Ki-67 IHC 染色结果比较

组别	例数	Ki-67		阳性率	χ^2	P 值
		阴性	阳性			
高级别胶质瘤	29	8	21	68.97%	14.508	<0.001
低级别胶质瘤	21	14	7	33.33%		
非肿瘤脑组织	10	9	1	10%		

表 3: ki-67、Gli-1 mRNA 在不同级别胶质瘤及正常脑组织中的相对表达量

分组	Ki-67/GAPDH mRNA	Gli-1/GAPDH
高级别胶质瘤	0.125 ± 0.020	0.147 ± 0.032
低级别胶质瘤	0.133 ± 0.070	0.123 ± 0.070
正常脑组织	0.060 ± 0.039	0.049 ± 0.035
P 值	$P<0.05$	$P<0.0125$

3 讨论

SHH 信号通路在普遍存在于正常的人体组织中, 对于胚胎发育、细胞成熟、细胞分化、内分泌激素的产生有着不可替代的重要作用。近年来, 随着研究的不断深入, 学者们陆续发现 SHH 信号通路在肿瘤组织中也有明显的异常激活现象。

Yuan Z 等研究发现, SHH 信号通路在原发性非小细胞肺癌 (NSCLC) 中存在广泛激活的现象, DNA 芯片检测发现 87% 腺癌和 93% 的鳞癌存在 Gli-1 的高表达。而在小细胞肺癌 (SCLC) 中, Gli-1 的表达显著降低^[10-12]。证实 Shh 信号通路在 NSCLC 中普遍存在, 且以鳞癌的临床意义最为突出。在胰腺癌中, 阿布拉等通过 RT-PCR 实验证明 Shh、Ptch-1、Smo、Gli-1 在胰腺癌组织中表达量明显高于胰腺癌旁组织及正常胰腺组织, 在表型为 CD44+CD24+ESA+ 的胰腺癌干细胞中, Shh 的表达量比正常的胰腺导管上皮细胞高出 46 倍^[13-15]。在胃癌中, 相关研究表明 Shh 的缺失与幽门螺杆菌感染及肠上皮化生有关^[5, 16-17]。Saze 等对胃癌组织的实验研究发现, Shh、Ptch-1 的高表达水平与胃癌的预后不良有显著关系, 且 Shh 通路中的 Ptch-1 高表达可能与胃癌的进展有关^[18]。

Shh 广泛存在于神经系统、皮肤、胃肠、四肢。在神经系统形成过程中, 早期成熟分化的神经细胞分泌 Shh, 作用于远处的 Gli (+) 神经前体细胞, 促进其增殖分化为终末细胞。当终末细胞达到一定数量后, 负反馈于成熟的神经细胞, Shh 分泌减少, 前体细胞的增生减退, 通过这种自我反馈的机制来调节个体发育中脑组织的大小和形状^[19, 20]。研究显示在神经信号系统成熟后,

Shh-Gli 信号通路处于失活状态。而异常激活的 Shh-Gli 将引起颅内相关肿瘤的发生发展。Jeng 等^[21]研究发现阻断 Shh 信号通路可限制胶质瘤细胞的迁移和扩散。Ptch-1 的突变与人髓母细胞瘤的关系也被广泛证实^[22]。何青兰等^[23]用 RT-PCR 检测体外培养的 U251 恶性胶质瘤细胞系及人脑胶质瘤组织中 Shh 信号通路因子 mRNA 的表达,结果显示在 U251 细胞和胶质瘤组织中的 Shh mRNA 的表达分别高于其在瘤周组织的表达,提示 Shh 的信号通路异常参与了脑胶质瘤的发生发展过程。Shahi 等^[24]研究发现 Gli-1、Gli-3 mRNA 在大部分星形胶质细胞瘤和髓母细胞瘤组织中呈明显的高表达。

本实验以 Shh 信号通路中重要的转录因子 Gli-1 作为研究对象,应用免疫组化的实验方法发现 10 例正常脑组织中 Shh、Gli-1 不表达或仅有弱表达,而在 50 例胶质瘤组织中 29 例检测到 Shh、Gli-1 阳性表达,余下 21 例 Shh、Gli-1 阴性表达。其中,Shh 在低级别胶质瘤、高级别胶质瘤间对比无统计学意义;Gli-1 在高级别胶质瘤中表达量明显高于低级别。RT-PCR 结果表明:Shh、Gli-1 mRNA 的相对表达量明显高于正常脑组织。但是 Shh mRNA、Gli-1 mRNA 在高级别胶质瘤、低级别胶质瘤间对比,无统计学意义。上述结果表明:与正常脑组织对比,在胶质瘤组织中 Shh 和 Gli-1 在蛋白水平及基因水平均上调,提示 Shh 信号通路在 GBM 细胞中是普遍激活的。而在不同级别 GBM 细胞中 Gli-1 在蛋白水平表达量有统计学意义。

Ki67 是一种增殖细胞相关的核抗原,其功能与有丝分裂密切相关,与细胞增殖活性以及肿瘤的发生、发展和转移有关,是我国中枢神经系统胶质瘤诊断与治疗指南(2015)强烈推荐生物学标记物(I 级证据)^[25]。本研究证实,在 GBM 细胞中 Gli-1 高表达并与 Ki-67 呈正相关,这预示着肿瘤细胞的增殖分化能力与 Gli-1 有明显的正相关性,Gli-1 表达高的 GBM 可能预示着更加不良的预后。因此从另一个层面来说适时适当干预 Gli-1 的表达,调节 Shh 信号通路的激活/失活状态将有可能作为治疗 GBM 的一个重要手段。

目前有关 Gli-1 及 Shh 信号通路在 GBM 方面的研究尚少积极探究 GBM 发生发展的机制仍然有锁欠缺,本研究样本量较少,机制研究深入程度仍需完善,但也为临床治疗 GBM 提供了一定指导意义,为后续研究打下部分基础。

[参考文献]

- [1] Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR et al: A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 2001, 95(2): 190-198.
- [2] Tchernev G, Pidakev I, Lozev I, et al. Undermining plastic surgery as a possible option for treating basal cell carcinoma of the forehead[J]. *Wien Med Wochenschr*, 2017, 167(5-6): 131-133.
- [3] Du J, Chen W, Yang L, et al. Disruption of SHH signaling cascade by SBE attenuates lung cancer progression and sensitizes DDP treatment[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1899.
- [4] Wang B, Yu T, Hu Y, et al. Prognostic role of Gli1 expression in breast cancer: a meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(46): 81088-81097.
- [5] Merchant JL, Ding L. Hedgehog Signaling Links Chronic Inflammation to Gastric Cancer Precursor Lesions[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2017, 3(2): 201-210.
- [6] Gao H, Song Q, Yang J, et al. Carnosol inhibits Hedgehog signaling pathway in both LNCaP and DU145 prostate cancer cell lines[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2017, 63(8): 104-108.
- [7] Cho YC, Nguyen TT, Park SY, et al. Bromopropane Compounds Increase the Stemness of Colorectal Cancer Cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9).

- [8] Di MC, Rosa R, D' Amato V, et al. Hedgehog signalling pathway orchestrates angiogenesis in triple-negative breast cancers[J]. *Br J Cancer*, 2017, 116(11): 1425-1435.
- [9] Kuroda H, Kurio N, Shimo T, et al. Oral Squamous Cell Carcinoma-derived Sonic Hedgehog Promotes Angiogenesis[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(12): 6731-6737.
- [10] Yuan Z, Goetz JA, Singh S, Ogden SK, Petty WJ, Black CC, Memoli VA, Dmitrovsky E, Robbins DJ. Frequent requirement of hedgehog signaling in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene*. 2007; 26:1046-55. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209860>.
- [11] Castellone MD, Laukkanen MO, Teramoto H, et al. Cross talk between the bombesin neuropeptide receptor and Sonic hedgehog pathways in small cell lung carcinoma[J]. *Oncogene*, 2015, 34(13): 1679-1687.
- [12] Wu J, Di D, Zhao C, et al. Clinical Significance of Gli-1 And Caveolin-1 Expression in the Human Small Cell Lung Cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(2): 401-406.
- [13] 依马木买买提江·阿布拉, 李东伟, 易超, 等. Hedgehog 信号通路基因 Shh、Ptch1、Smo 及 Gli1 在胰腺癌中的表达及意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2015, (18):2894-2900.
- [14] Kaitsuka T, Tomizawa K. Cell-Penetrating Peptide as a Means of Directing the Differentiation of Induced-Pluripotent Stem Cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(11): 26667-26676.
- [15] Kelleher FC, McDermott R. Aberrations and therapeutics involving the developmental pathway Hedgehog in pancreatic cancer[J]. *Vitam Horm*, 2012, 88: 355-378.
- [16] Ding L, Hayes MM, Photenhauer A, et al. Schlafen 4-expressing myeloid-derived suppressor cells are induced during murine gastric metaplasia[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(8): 2867-2880.
- [17] Jung DH, Kim JH, Lee YC, et al. Helicobacter pylori Eradication Reduces the Metachronous Recurrence of Gastric Neoplasms by Attenuating the Precancerous Process[J]. *J Gastric Cancer*, 2015, 15(4): 246-255.
- [18] Saze Z, Terashima M, Kogure M, et al. Activation of the sonic hedgehog pathway and its prognostic impact in patients with gastric cancer[J]. *Dig Surg*, 2012, 29(2): 115-123.
- [19] Treese C, Sanchez P, Grabowski P, et al. Poorly Differentiated Medullary Phenotype Predicts Poor Survival in Early Lymph Node-Negative Gastro-Esophageal Adenocarcinomas[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0168237.
- [20] Liu C, Hu Q, Jing J, et al. Regulator of G protein signaling 5 (RGS5) inhibits sonic hedgehog function in mouse cortical neurons[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2017, 83: 65-73.
- [21] Jeng KS, Jeng CJ, Sheen IS, et al. Glioma-Associated Oncogene Homolog Inhibitors Have the Potential of Suppressing Cancer Stem Cells of Breast Cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5).
- [22] Capurro M, Izumikawa T, Suarez P, et al. Glypican-6 promotes the growth of developing long bones by stimulating Hedgehog signaling[J]. *J Cell Biol*, 2017, 216(9): 2911-2926.
- [23] 何青兰, 陈炼, 秦龙, 等. Hedgehog 信号通路相关基因在人脑胶质瘤干细胞和胶质瘤组织中的表达及其意义[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2010, (7):423-425.
- [24] Shahi MH, Rey JA, Castresana JS. The sonic hedgehog-Gli1 signaling pathway in brain tumor development[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(12): 1227-1238.
- [25] Hu X, Wei M, Zou Y, et al. Expression of p53, epidermal growth factor receptor, Ki-67 and 06-methylguanine-DNA methyltransferase in human gliomas[J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(1): 130-134.