

FOXO4 和 nNOS 在星型胶质细胞瘤中的表达及意义

齐 敏¹ 刘溪林² 赵 健³ 吴 锋³ 孙乐安² 郑兰荣⁴

(皖南医学院 1. 人体解剖学实验实训中心; 2. 研究生学院; 3. 人体解剖学教研室; 4. 病理解剖学教研室, 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 观察转录因子叉头框蛋白 O4(FOXO4) 和神经型一氧化氮合酶(nNOS) 在星型胶质细胞瘤中的表达, 探讨星型胶质细胞瘤恶性程度发生发展的机制, 进而寻找可能的药物治疗靶点。方法: 从弋矶山医院病理科调取星形胶质细胞瘤 27 例蜡块标本。运用双盲法进行免疫组织化学和免疫荧光染色, 检测各例星型胶质细胞瘤组织中 FOXO4、nNOS 的表达。结果: FOXO4 在 I ~ IV 级星形胶质细胞瘤组织中的阳性表达, 随着肿瘤级别的升高而逐渐降低($P < 0.05$)。而随着星形胶质细胞瘤级别升高, nNOS 的阳性表达也越来越高($P < 0.05$)。结论: FOXO4 阳性表达的减少, nNOS 阳性表达的增强, 可能与星形胶质细胞瘤恶性程度发生发展有关; 调控 FOXO4、nNOS 的异常表达可能是新的治疗药物靶点之一。

【关键词】星型胶质细胞瘤; 转录因子叉头框蛋白 O4; 神经型一氧化氮合酶; 胶质瘤

【中图分类号】R 739. 4; R 361. 3 **【文献标志码】**A

【DOI】10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2019. 04. 002

Expression and significance of FOXO4 and nNOS in astroglioma

QI Min, LIU Xilin, ZHAO Jian, WU Feng, SUN Lean, ZHENG Lanrong

Anatomy Experimental Center, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To observe the expression of forkhead transcription factor 4(FOXO4) and neuronal nitric oxide synthase(nNOS) in astroglioma and investigate the mechanism of malignant degree of astrocytoma for potential target in following drug therapy. **Methods:** Twenty-seven wax specimens of astroglioma were obtained from the pathology department of the First Affiliated Hospital of Wannan Medical College. Immunohistochemistry and immunofluorescence were performed using double-blind method to detect the expression of FOXO4 and nNOS in astroglioma tissues. **Results:** FOXO4 was positively expressed in astroglioma of grade I - IV and gradually down-regulated with increase of tumor grade($P < 0.05$). Contrarily, positive expression of nNOS tended to be higher with increased grade of astrocytoma($P < 0.05$). **Conclusion:** Decreased positive FOXO4 expression, yet increased positive nNOS expression may be related to malignant degree of astrocytoma. Regulating abnormal expression of FOXO4 and nNOS might be one of the new therapeutic targets.

【Key words】 astroglioma; FOXO4; nNOS; glioma

星型胶质细胞瘤在胶质瘤(Glioma) 中占绝大多数, 具有高侵袭性、高致死率特点^[1]。传统治疗方法(手术、化疗和放疗) 并没有完全解决胶质瘤侵袭

性生长所致的高复发率的难题^[2]。越来越多的研究者从基因水平研究肿瘤侵袭性、血管生成及肿瘤发生率。转录因子叉头框蛋白 O4(Forkhead box

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金重点项目(KJ2014A263); 皖南医学院大学生科研资助基金项目(WK2018S57)

收稿日期: 2019-01-09

作者简介: 齐 敏(1993-), 女, 2017 级硕士研究生, 助理实验师, (电话) 18355350102, (电子信箱) 870559964@qq.com;

郑兰荣, 女, 教授, 博士, (电子信箱) zhenglanrong@qq.com, 通信作者。

[7] COMIM CM, VILELA MC, CONSTANTINO LS, et al. Traffic of leukocytes and cytokine up-regulation in the central nervous system in sepsis[J]. Intensive Care Med, 2011, 37(4): 711 - 718.

[8] HIGASHIDA T, KREIPKE CW, RAFOLS JA, et al. The role of hypoxia-inducible factor-1 α , aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 in blood-brain barrier disruption and brain edema after traumatic brain injury[J]. Journal of Neurosurgery, 2011, 114(1): 92 - 101.

[9] ERBAS O, TASKIRAN D. Sepsis-induced changes in behavioral stereotypy in rats; involvement of tumor necrosis factor-alpha, oxidative stress, and dopamine turnover[J]. J Surg Res, 2014, 186(1): 262 - 268.

[10] TSUGE M, YASUI K, ICHIYAWA T, et al. Increase of tumor necrosis factor- α in the blood induces early activation of matrix metalloproteinase-9 in the brain[J]. Microbiology & Immunology, 2010, 54(7): 417 - 424.

O4 ,FOXO4) 具有广泛的生物学功能 ,包括调节细胞的能量代谢、增殖、凋亡和分化^[3]。神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase ,nNOS) 具有神经毒性作用^[4]。本研究应用免疫组化和免疫荧光检测 FOXO4 和 nNOS 在星型胶质细胞瘤中的表达情况 ,并分析其与临床病理特征之间的关系 ,旨在阐明 FOXO4 和 nNOS 在星型胶质细胞瘤发生发展中的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 一般资料 从弋矶山医院病理科调取 2013 年 1 月 ~2018 年 1 月行外科手术切除的星型胶质细胞瘤石蜡标本 27 例 ,其中男性 14 例 ,女性 13 例; 年龄 30 ~75 岁。所有星型胶质细胞瘤患者术前均未接受任何抗肿瘤治疗。术后病理按 WHO 分级标准 ,其中 I 级 5 例、II 级 8 例、III 级 10 例、IV 级 4 例。另取材时采用瘤周组织作为对照组。

1.2 主要试剂 兔抗 FOXO4 和 nNOS、抗荧光淬灭剂和 SABC 试剂盒均购于北京博奥森生物技术有限公司。荧光二抗购于英国 Abcam 公司 ,DAPI 购于南京凯基生物有限公司。

1.3 免疫组化检测 取各例星型胶质细胞瘤的石蜡标本进行切片 ,片厚 5 μm。按照免疫组化试剂盒说明书依次进行各步骤 ,封片 ,镜下观察。高倍镜下每个肿瘤切片随机选取 2 个视野 ,图像分析软件测量 400 倍视野下 FOXO4 与 nNOS 在不同级别星形胶质细胞瘤中阳性产物的平均灰度值(灰度值越大说明表达越弱 ,反之则越强)。对照组用 PBS 替代一抗做为阴性对照。

1.4 免疫荧光检测 取各例星型胶质细胞瘤的石蜡标本进行切片 ,片厚 5 μm。按照免疫荧光的方法依次孵育一抗、荧光二抗、DAPI 染核等。最后用抗荧光淬灭剂封片 ,透明指甲油封边 ,在荧光显微镜下观察。高倍镜下每个肿瘤切片随机选取 1 个视野 ,观察荧光强弱 ,比较 FOXO4 与 nNOS 在高级别(III、IV 级) 与低级别(I 级、II 级) 星型胶质细胞瘤中的表达情况。对照组用 PBS 替代一抗做阴性对照。

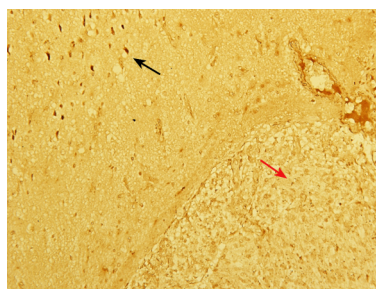
1.5 统计分析 用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。数值变量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,多组间比较采用单因素方差分析 ,多组间两两比较采用 *q* 检验。 *P* < 0. 05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FOXO4 的免疫组化和免疫荧光表达 免疫组织化学染色检测结果显示 ,低级别和高级别星型胶

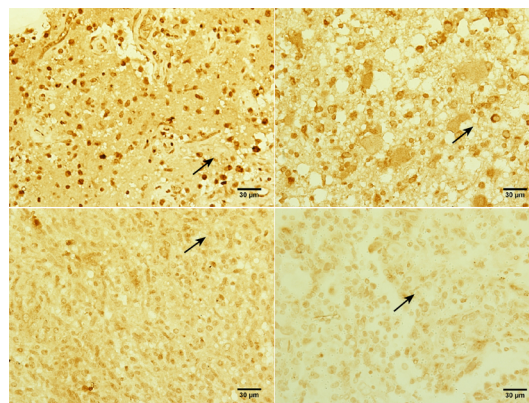
质细胞瘤均可见 FOXO4 阳性细胞 ,呈棕黄色或棕褐色 ,着色主要位于胞核。肿瘤组织 FOXO4 的阳性表达比瘤周正常脑组织低(图 1)。

结果显示 ,IV 级、III 级和 II 级星型胶质细胞瘤组织 FOXO4 阳性细胞的平均灰度值高于 I 级星型胶质细胞瘤组织 FOXO4 阳性细胞(*P* < 0. 05) ,IV 级和 III 级星型胶质细胞瘤组织 FOXO4 阳性细胞的平均灰度值高于 II 级星型胶质细胞瘤组织 FOXO4 阳性细胞(*P* < 0. 05) ,IV 级星型胶质细胞瘤组织 FOXO4 阳性细胞的平均灰度值高于 III 级星型胶质细胞瘤组织 FOXO4 阳性细胞(*P* < 0. 05) ,见图 2、表 1。



左上角为瘤周组织 ,着色较深 ,右下角为肿瘤组织 ,着色较浅。黑色箭头所示为瘤周组织中 FOXO4 阳性细胞 ,红色箭头所示为 III 级星形胶质细胞瘤中 FOXO4 阳性细胞。该视野下随机选取四个肿瘤细胞和四个瘤周细胞 ,测得灰度值平均值分别为 88. 72 ,129. 75(SABC 法 ,×200)。

图 1 星型胶质细胞瘤及瘤周组织中 FOXO4 表达



箭头所示为 I、II、III、IV 级星形胶质细胞瘤组织中 FOXO4 阳性细胞。标尺 = 30 μm(SABC 法 ,×400)。

图 2 各级别星型胶质细胞瘤组织 FOXO4 的表达

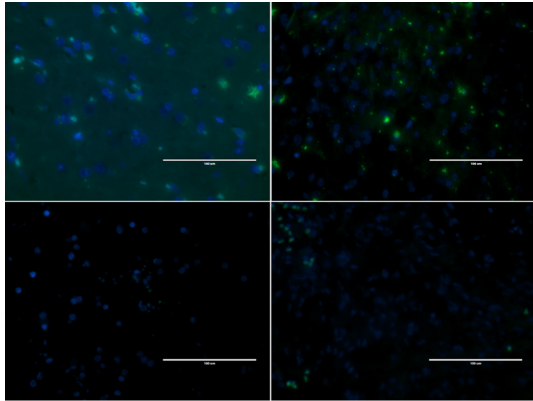
表 1 星型胶质细胞瘤组织 FOXO4 阳性细胞的平均灰度值

组别	<i>n</i>	灰度值	<i>F</i>	<i>P</i>
I 级	5	65. 78 ± 5. 25 ^a		
II 级	8	105. 50 ± 5. 61 ^b	778. 440	0. 000
III 级	10	153. 20 ± 1. 90 ^c		
IV 级	4	172. 40 ± 1. 45 ^d		

注: 多组间两两比较。符号不同表示 *P* < 0. 05。

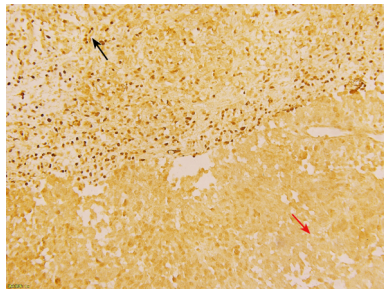
免疫荧光方法检测 ,完成 DAPI 细胞核染色(呈蓝色荧光) ,FOXO4 染色(呈绿色荧光) ,两者叠加 (Merge) 后可以证实 FOXO4 染色基本位于细胞核。同时荧光染色条件下 ,可观察到低级别的星型胶质细胞瘤阳性表达率高于高级别(图 3) 。

2.2 nNOS 的表达 免疫组织化学染色检测结果显示 ,低级别和高级别星型胶质细胞瘤组织均可见 nNOS 阳性细胞 ,呈棕黄色或棕褐色 ,胞质和胞膜着色。肿瘤组织 FOXO4 的阳性表达比瘤周正常脑组织高(图 4) 。



图中用 DAPI 标记的为星型胶质细胞的核定位 ,可发现 FOXO4 的表达随着肿瘤恶性程度的增加而降低(免疫荧光 ,×400) 。

图 3 各级星型胶质细胞瘤组织 FOXO4 阳性表达



左上角为肿瘤组织 ,着色较深 ,右下角为瘤周组织 ,着色较浅。黑色箭头所示为瘤周组织中 nNOS 阳性细胞 ,红色箭头所示为 III 级星形胶质细胞瘤组织中 nNOS 阳性细胞。该视野下随机选取四个肿瘤细胞和四个瘤周细胞 ,测得灰度值平均值分别为 94. 07、158. 76(SABC 法 ,×200) 。

图 4 星型胶质细胞瘤及瘤周组织中 nNOS 表达

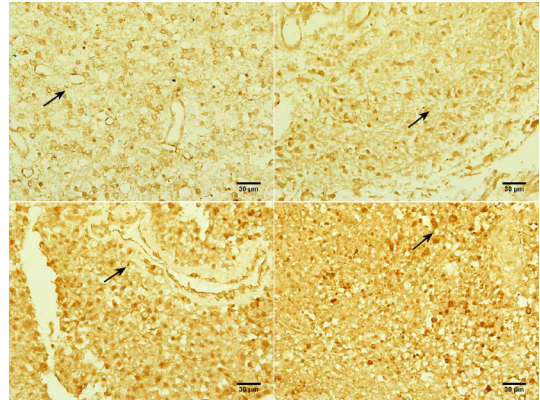
结果显示 ,IV 级、III 级和 II 级星型胶质细胞瘤组织 nNOS 阳性细胞的平均灰度值低于 I 级星型胶质细胞瘤组织 nNOS 阳性细胞($P < 0.05$) ,IV 级和 III 级星型胶质细胞瘤组织 nNOS 阳性细胞的平均灰度值低于 II 级星型胶质细胞瘤组织 nNOS 阳性细胞($P < 0.05$) ,IV 级星型胶质细胞瘤组织 nNOS 阳性细胞的平均灰度值低于 III 级星型胶质细胞瘤组织 nNOS 阳性细胞($P < 0.05$) ,见图 5、表 2。

免疫荧光结果显示 ,nNOS 在高级别星型胶质细胞瘤组织中的阳性表达高于低级别的星型胶质细胞瘤(图 6) 。

表 2 星型胶质细胞瘤组织 FOXO4 阳性细胞的平均灰度值

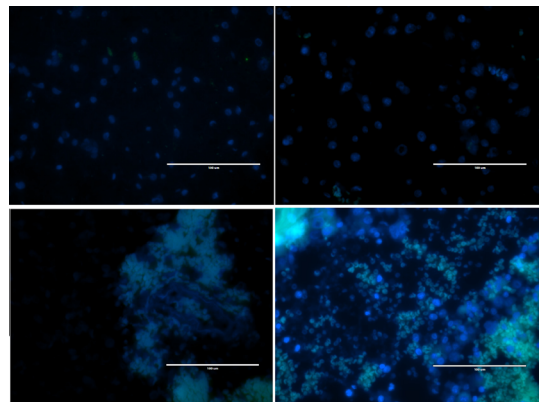
组别	n	灰度值	F	P
I 级	5	163.30 ± 2.79 ^e	464.689	0.000
II 级	8	156.10 ± 1.94 ^f		
III 级	10	114.10 ± 2.45 ^g		
IV 级	4	86.39 ± 8.87 ^h		

注:多组间两两比较。符号不同表示 $P < 0.05$ 。



箭头所示为 I、II、III、IV 级星型胶质细胞瘤组织中 nNOS 阳性细胞。标尺 = 30 μm(SABC 法 ,×400) 。

图 5 各级星型胶质细胞瘤组织中 nNOS 的阳性表达



图中用 DAPI 标记的为星型胶质瘤细胞的核定位 ,可发现 nNOS 的表达随着肿瘤恶性程度的增加而增强(免疫荧光 ,×400) 。

图 6 各级星型胶质细胞瘤 nNOS 阳性表达

3 讨论

人脑星型胶质细胞瘤是中枢神经系统中常见的恶性肿瘤 ,与神经系统以外的其他肿瘤不同 ,该肿瘤不发生转移但具有很强的侵袭性^[5]。胶质瘤细胞的高度侵袭性和高度血管生成能力是影响预后的重要原因。FOXO4 转录因子为 FOXO 家族成员 ,FOXO 家族参与各种信号通路 ,调节细胞周期进程 ,DNA 损伤修复和分化 ,并促进细胞死亡^[6]。FOXO 家族受多种信号通路调控 ,其中最明显的受 PI3K-Akt/PKB 介导磷酸化级联通路的负调控^[7-8]。在鼻咽癌组织中 ,FOXO4 受 mir-421 的直接靶向作用 ,引起 FOXO4 表达的下调 ,表现为肿瘤细胞的增殖增强^[9]。大量研究显示 ,FOXO4 在肺癌、结肠癌、膀胱癌等多种人类肿瘤中的表达都有所下调或缺失 ,

FOXO4 在肿瘤中的表达较正常组织的表达减少^[6-12]。本研究结果显示,随着星形胶质细胞瘤级别的增加,FOXO4 的表达逐渐减少,呈负相关,这与 FOXO4 在其他肿瘤中的表达基本一致。据此,结合既往研究与本研究结果进一步提示,FOXO4 可能具有抑制肿瘤细胞增殖、血管生成的作用,其下调或缺失可致肿瘤的生长加速。由此可见,FOXO4 可能是一个潜在的非特异性(广谱)的癌症治疗靶点。

NO 是脑组织中重要的信使分子,参与了肿瘤的病理生理过程^[13]。大脑额叶一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)阳性神经元的生长发育对其他多种神经元和神经胶质细胞的分化、增殖、迁移以及大脑血管的生长发育具有重要作用。NOS 及其催化 L-精氨酸形成的 NO,在机体内具有广泛的生物学作用,可参与神经元发育、轴突生长、突触形成和修复过程,在肿瘤形成等过程中发挥重要作用^[14-15]。有研究发现 NOS 及其催化而形成的 NO,在口腔鳞癌、胃癌、大肠癌等多种肿瘤中有重要作用^[16-18]。NO 使得胶质瘤细胞运动增加, NOS 抑制剂可能在神经肿瘤学中有治疗作用^[18-19]。nNOS 为 NOS 同功酶的三种亚型之一, nNOS 被认为有神经毒性作用^[4-5]。正常的脑组织 nNOS 表达较少,脑组织的高脂浓度和高能量要求,使其特别容易受到自由基和氧化剂介导的损伤:脑深部神经元 NADPH-d/nNOS 标记的神经元减少^[19]。本次实验结果显示, nNOS 在高级别(Ⅲ、Ⅳ级)星形胶质细胞瘤中表达高于低级别(Ⅰ、Ⅱ级)星形胶质细胞瘤,提示肿瘤相关因子 nNOS 的异常高表达可能与人脑星形胶质细胞瘤的恶性程度以及侵袭性生长有关。具体机制有待进一步研究,以期为进一步研究星形胶质细胞瘤靶向药物的研究提供参考资料。

鉴于转录因子 FOXO4 和肿瘤相关因子 nNOS 参与了肿瘤的生长、转移过程^[3-4],本研究结果表明 FOXO4、nNOS 的异常表达可能与星形胶质细胞瘤的浸润性生长有关,下一步将深入研究验证 FOXO4、nNOS 与星形胶质细胞瘤病理级别的关系,并寻找 FOXO4、nNOS 两种因子对于肿瘤的具体作用机制和通路,从基因水平进一步探讨星形胶质细胞瘤的发生发展机制。

【参考文献】

[1] 王艳华, 楚建杰, 李子敏, 等. 人 U87-MG 脑胶质瘤细胞裸鼠原位移植模型的建立[J]. 中国药理学通报, 2018(5): 735-739.

- [2] JIANG XC, YAN YK, HU MH, *et al.* Increased level of H19 long noncoding RNA promotes invasion, angiogenesis, and stemness of glioblastoma cells[J]. JNS, 2016, 124(1): 129-136.
- [3] MEI Y, WANG ZX, ZHANG L, *et al.* Regulation of neuroblastoma differentiation by forkhead transcription factors FOXO1/3/4 through the receptor tyrosine kinase PDGFRA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(13): 4898-4903.
- [4] BARNA M, KOMATSU T, REISS CS. Activation of type III nitric oxide synthase in astrocytes following a neurotropic viral infection[J]. Virology, 1996, 223(2): 331-343.
- [5] PULLEN NA, FILLMORE HL. Induction of matrix metalloproteinase-1 and glioma cell motility by nitric oxide[J]. J Neurooncol, 2010, 96(2): 201-209.
- [6] LI H, OUYANG RY, WANG Z, *et al.* Mir-150 promotes cellular metastasis in non-small cell lung cancer by targeting FOXO4[J]. Sci Rep, 2016, 6: 39001.
- [7] 张翔, 杜旭东, 周昱, 等. 结肠直肠癌中 FOXO4 的表达与临床病理关系[J]. 交通医学, 2014(6): 596-598.
- [8] BRACHENE ACD, DEMOULIN JB. FOXO transcription factors in cancer development and therapy[J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 73(6): 1159-1172.
- [9] CHEN L, TANG YP, WANG J, *et al.* Mir-421 induces cell proliferation and apoptosis resistance in human nasopharyngeal carcinoma via downregulation of FOXO4[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 435: 745-750.
- [10] YANG W, KANG XL, ZENG FC, *et al.* Correlations of Foxo3 and Foxo4 expressions with clinicopathological features and prognosis of bladder cancer[J]. Pathol Res Pract, 2017, 213(7): 766-772.
- [11] WANG W, ZHOU PH, HU W. Overexpression of FOXO4 induces apoptosis of clear-cell renal carcinoma cells through downregulation of bim[J]. Mol Med Report, 2016, 13(3): 2229-2234.
- [12] YANG YH, BLEE AM, WANG DJ, *et al.* Loss of FOXO1 cooperates with TMPRSS2-ERG overexpression to promote prostate tumorigenesis and cell invasion[J]. Cancer Res, 2017, 77(23): 6524-6537.
- [13] PALUMBO P, MICONI G, Cinque B, *et al.* NOS2 expression in glioma cell lines and glioma primary cell cultures: correlation with neurosphere generation and SOX-2 expression[J]. Oncotarget, 2017, 8(15): 25582-25598.
- [14] 郑兰荣, 黄小梅, 顾倩, 等. 人胚胎发育后期小脑皮质组织中一氧化氮合酶阳性神经元的形态学[J]. 中国医学科学院学报, 2009, 31(4): 473-475.
- [15] 郑兰荣, 顾倩, 邵金贵. 人胎舌内 NOS 阳性神经元发育的免疫组化观察[J]. 皖南医学院学报, 2006, 25(3): 164-166.
- [16] 黄小梅, 郑兰荣, 顾倩, 等. 口腔鳞癌诱导型一氧化氮合酶 mRNA 的表达及其临床意义[J]. 肿瘤, 2008, 28(4): 330-333.
- [17] 涂毅, 姚峰, 魏文, 等. 胃癌中微血管密度及一氧化氮合酶表达与肿瘤浸润、转移的相关性分析[J]. 临床外科杂志, 2007, 15(8): 530-532.
- [18] 牛蕾, 雷丽. 胃癌组织中一氧化氮合酶与整合素连接激酶的表达及意义[J]. 中国医药导报, 2015(23): 83-86.
- [19] GARBOSSA D, FONTANELLA M, PAGNI CA, *et al.* Nitric oxide synthase and cytochrome c oxidase changes in the tumoural and peritumoural cerebral cortex[J]. Acta Neurochir(Wien), 2001, 143(9): 897-908.