

CYP17A1 和 AR 在脑胶质瘤中的表达及意义

牛万祥^{1,2}, 周晨旭^{1,2}, 牛朝诗^{1,2,3}

1. 安徽医科大学附属省立医院神经外科, 安徽 合肥 230001
2. 脑功能与脑疾病安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230001
3. 安徽省脑立体定向神经外科研究所, 安徽 合肥 230001

摘要:目的 探讨细胞色素 P450c17a 酶 (CYP17A1)、雄激素受体 (androgen receptor, AR) 的表达与胶质瘤临床病理之间的相关性。方法 应用免疫组化二步法检测 55 例胶质瘤组织和 10 例正常脑组织标本的 CYP17A1 蛋白和 AR 蛋白的表达情况。结果 ①CYP17A1 蛋白的表达在高级别胶质瘤和低级别胶质瘤之间具有差异性 ($\chi^2 = 12.034, P < 0.05$), 而正常脑组织中未见表达。CYP17A1 蛋白的表达与病理级别呈正相关 ($r = 0.705, P < 0.05$)。②AR 蛋白的表达在高级别胶质瘤和低级别胶质瘤之间具有差异性 ($\chi^2 = 19.509, P < 0.05$), 而正常脑组织中未见表达。AR 蛋白的表达与病理级别呈正相关 ($r = 0.73, P < 0.05$)。结论 CYP17A1 蛋白及 AR 蛋白在脑胶质瘤组织中表达明显高于正常组织, 且 CYP17A1 蛋白及 AR 蛋白在胶质瘤组织中的表达情况与病理级别密切相关, 提示雄激素轴在胶质瘤的发生发展中起到了重要的作用。

关键词: 胶质瘤; P450c17a 酶; 雄激素受体; 免疫组化染色法

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2017.01.001

Expression of CYP17A1 and androgen receptor in glioma and its clinical significance

NIU Wan-Xiang, ZHOU Chen-Xu, NIU Chao-Shi. Department of Neurosurgery, the Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Anhui Province Key Laboratory of Brain Function and Brain Disease, Hefei 230001, China

Abstract: Objective To investigate the correlation between the expression of cytochrome P450c17 α enzyme CYP17A1 and androgen receptor (AR) and the clinical pathology of glioma. **Methods** The two-step immunohistochemical method was used to measure the expression of CYP17A1 and AR proteins in 55 glioma tissue samples and 10 normal brain tissue samples. **Results** There was a significant difference in the expression of CYP17A1 protein between high-grade gliomas and low-grade ones ($\chi^2 = 12.034, P < 0.05$), while there was no expression of CYP17A1 protein in normal brain tissue samples. The expression of CYP17A1 protein was positively correlated with pathological grade ($r = 0.705, P < 0.05$). There was a significant difference in the expression of AR protein between high-grade gliomas and low-grade ones ($\chi^2 = 19.509, P < 0.05$), while there was no expression of AR protein in normal brain tissue samples. The expression of AR protein was positively correlated with pathological grade ($r = 0.73, P < 0.05$). **Conclusions** Glioma tissues have significantly higher expression of CYP17A1 and AR proteins than normal brain tissues, and the expression of CYP17A1 and AR proteins in glioma tissues are correlated with pathological grade, which suggests that the androgen axis plays an important role in the development and progression of glioma.

Key words: Glioma; P450c17 α enzyme; Androgen receptor; Immunohistochemical staining

胶质瘤是神经系统发病率最高的肿瘤, 约占侵袭性生长, 复发率高, 预后差、死亡率高。无论神经系统肿瘤的 40% ~ 50%。由于其恶性增殖和是手术治疗, 还是放疗、化疗, 都难以彻底治愈。

基金项目:安徽省自然科学基金项目 (编号:1408085MKL69), 脑功能与脑疾病安徽省重点实验室绩效考核补助项目 (编号:1506c085017, 1606c08235), 安徽省科技攻关项目 (编号:1604a0802069)

收稿日期:2016-12-19; **修回日期:**2017-02-07

作者简介:牛万祥 (1991-), 男, 在读硕士, 主要研究方向: 脑胶质瘤基础与临床。

通信作者:牛朝诗, 男, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 科主任, 主要从事脑肿瘤和功能神经外科基础与临床; E-mail: niuchaoshi@163.com。

因此,胶质瘤的治疗仍为医学难题之一。流行病学研究表明,脑胶质瘤患者中男女发病率的比例达到1.5~2:1^[1-3],有明显的性别差异。近年来,在有性别差异的恶性肿瘤研究中,发现雄激素轴发挥了重要的作用。细胞色素 P450c17a 酶(CYP17A1)和雄激素受体(androgen receptor, AR)是雄激素轴的重要组成部分。本课题组前期就胶质瘤患者血清睾酮浓度进行了相关研究,结果表明男女胶质瘤患者术前明显高于对照组,术后相对于对照组血清睾酮浓度降低更为明显,且女性胶质瘤患者血清睾酮浓度变化更为明显^[4]。为进一步探讨雄激素合成关键酶 CYP17A1 及其受体 AR 在胶质瘤中作用,本研究通过免疫组化的方法检测 CYP17A1 蛋白和 AR 蛋白在胶质瘤中表达情况,并分析三者之间的关系,探讨雄激素轴在胶质瘤中的作用。

1 材料与方法

1.1 一般材料

收集 2014 年 6 月~2015 年 12 月间安徽医科大学附属省立医院收治的 55 例脑胶质瘤手术切除标本,术前均未行放、化治疗,经病理确诊,有详细的临床和病理资料。根据 WHO2007 中枢神经系统肿瘤分类标准进行组织学分类及分级:WHO I 级 2 例,WHO II 级 24 例,WHO III 级 11 例,WHO IV 级 18 例,另外 10 例正常脑组织标本取自颅脑损伤行内减压术的患者,术后病理检查证实为正常脑组织无胶质细胞增生及坏死。本研究所用组织标本为经 10% 中性福尔马林标本固定液固定,常规石蜡包埋,4 μm 厚连续切片 5 张,编码。

1.2 主要试剂

山羊抗人 CYP17A1 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司 CYP17A1 抗体 N-17: sc-46084),小鼠抗人 AR 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司 AR 抗体 441: sc-7305),山羊超敏二步法免疫组化检测试剂盒(PV-9003),小鼠超敏二步法免疫组化检测试剂盒(PV-9002),二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 免疫组织化学染色二步法

石蜡切片经脱蜡、水化。抗原修复采用微波修复(高火 5 分钟至沸腾,室温冷却),进行 3% H₂O₂ 去离子水孵育 10 分钟,以阻断内源性过氧化物酶。PBS 冲洗 2 分钟×3 次,滴加 CYP17A1/AR 一抗(1:300 稀释),4℃ 过夜。PBS 冲洗 2 分钟×3

次,滴加聚合物辅助剂,室温孵育 10~20 分钟。PBS 冲洗 2 分钟×3 次,滴加辣根酶标记抗山羊/小鼠 IgG 聚合物,室温孵育 10~20 分钟。PBS 冲洗 2 分钟×3 次,应用 DAB 溶液显色 2~5 min。自来水充分冲洗,苏木素复染 1~2 min,脱水,透明,封片。阴性对照组以 PBS 代替一抗。

1.4 结果判断

400 倍光镜下观察,随机选取切片 5 个视野,计数 1000 个细胞中阳性染色细胞,阳性细胞率=(阳性表达细胞数/1000)×100%。无阳性细胞或阳性细胞数<1%为阴性(-),1%~25%为弱阳性(+),26%~50%为阳性(++),>50%强阳性(+++)^[5]。

1.5 统计方法

使用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理。采用卡方检验进行数据分析,等级资料的相关性采用 Spearman 秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CYP17A1 蛋白在胶质瘤组织中表达情况

免疫组化检测 CYP17A1 蛋白表达,显示在胶质瘤各病理级别标本均呈阳性表达,正常脑组织不表达。且 CYP17A1 蛋白的表达在高级别胶质瘤标本(WHO III 级和 WHO IV 级)和低级别胶质瘤标本(WHO I 级和 WHO II 级)间有统计学差异($\chi^2 = 12.034, P < 0.05$)。经 Spearman 相关分析,CYP17A1 蛋白的表达与病理级别呈正相关($r = 0.705, P < 0.05$),具体内容见图 1,表 1、2。

表 1 CYP17A1 蛋白在不同病理级别胶质瘤中的表达

病理级别	n	CYP17A1 蛋白的表达				
		阴性	弱阳性	阳性	强阳性	阳性细胞率(%)
正常	10	10	0	0	0	-
I 级	2	0	1	1	0	27±5.7
II 级	24	0	8	11	5	38.2±19.3
III 级	11	0	0	7	4	58.2±14.1
IV 级	18	0	1	5	12	50.2±18.6

表 2 CYP17A1 蛋白在低级别胶质瘤和高级别胶质瘤中的表达

病理级别	n	CYP17A1 蛋白的表达				
		阴性	弱阳性	阳性	强阳性	阳性细胞率(%)
低级别	26	0	9	12	5	36.5±17.8
高级别	29	0	1	12	16	51.5±17.7

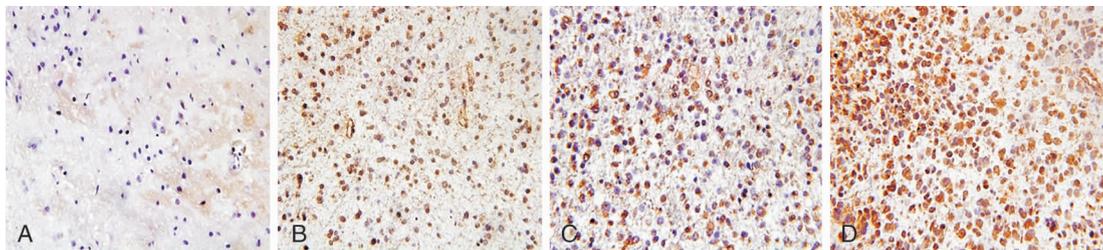


图 1-A.正常组织 图 1-B.WHO II 级组织 图 1-C.WHO III 级组织 图 1-D.WHO IV 级组织

图 1 CYP17A1 蛋白在正常及脑胶质瘤组织中的表达(免疫组化, ×400)。

2.2 AR 蛋白在胶质瘤组织中的表达情况(见图 2)

免疫组化检测 AR 蛋白在胶质瘤各病理级别标本均呈阳性表达,正常脑组织不表达。且 AR 蛋白的表达在高级别(WHO III 级和 WHO IV 级)胶质瘤标本和低级别(WHO I 级和 WHO II 级)胶质瘤标本间有统计学差异($\chi^2 = 19.509, P < 0.05$)。经 Spearman 相关分析,AR 蛋白的表达与病理级别呈正相关($r = 0.73, P < 0.05$),具体内容见图 2,表 3、4。

表 3 AR 蛋白在不同病理级别胶质瘤中的表达

病理级别	n	CYP17A1 蛋白的表达				
		阴性	弱阳性	阳性	强阳性	阳性细胞率(%)
正常	10	10	0	0	0	-
I 级	2	1	1	0	0	6.3 ± 3.4
II 级	24	5	8	11	0	15.4 ± 11.3
III 级	11	0	1	7	3	46.5 ± 16.1
IV 级	18	1	2	5	10	57.4 ± 21.6

表 4 AR 蛋白在低级别胶质瘤和高级别胶质瘤中的表达

病理级别	n	CYP17A1 蛋白的表达				
		阴性	弱阳性	阳性	强阳性	阳性细胞率(%)
低级别	26	6	9	11	0	13.5 ± 10.8
高级别	29	1	3	12	13	53.3 ± 19.5

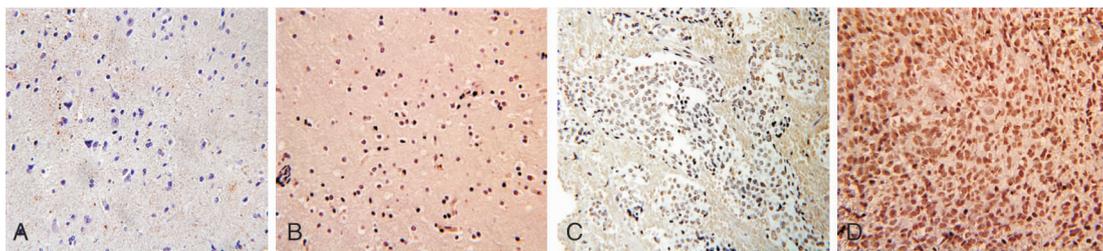


图 2-A.正常组织 图 2-B.WHO II 级组织 图 2-C.WHO III 级组织 图 2-D.WHO IV 级组织

图 2 AR 蛋白在正常及脑胶质瘤组织中的表达(免疫组化, ×400)。

3 讨论

CYP17A1 全称为 cytochrome P450, family 17, subfamily A, Polypeptide 1 (细胞色素 P450c17), 基因位于第 10 号染色体(10q24.3), 也被称为 17 α -羟化酶, 17、20-裂解酶。主要定位于细胞内质网及微粒体, 是胆固醇合成睾酮过程中的两个关键酶。研究表明 CYP17A1 的多态性与一些性别相关恶性肿瘤的发生发展密切相关^[6]。

AR 是雄激素轴中重要的受体, 主要表达于细胞核内。AR 基因定位于 X 染色体(Xq11.2-12), 并通过与靶基因结构上特殊的序列结合, 即与雄激素反应元件(androgen response element, ARE) 结合, 进一步调控靶基因的表达^[7]。在一些恶性肿瘤的

研究中, AR 的表达是这些恶性肿瘤的发生发展及性别差异的重要原因^[8,9]。Ceccarelli 等^[10] 研究发现加入雄激素的培养基能促进胶质瘤细胞的增殖。Hopewell 等^[11] 应用 3, 4-苯芪并诱导脑胶质瘤大鼠模型的研究中发现, 雄性大鼠胶质瘤诱导成功率为 77.8%, 而对照组去势雄性大鼠胶质瘤诱导率明显低下, 仅为 50%, 且对照组的中位生存期也明显延长。裸鼠皮下胶质瘤模型研究^[12] 也得出相似的结果, 雄性裸鼠肿块生长速度明显快于雌性裸鼠。本课题组前期研究发现胶质瘤患者血清睾酮浓度明显高于对照组^[4], 雄激素受体在胶质瘤组织中呈过表达状态, 且睾酮受体的表达与胶质瘤的级别呈正相关^[13]。

本研究发现 CYP17A1 蛋白和 AR 蛋白在脑胶质瘤组织中表达明显高于正常组织,且 CYP17A1 蛋白和 AR 蛋白表达情况随着胶质瘤病理级别的增高而增强。说明胶质瘤能通过过表达 CYP17A1 蛋白等睾酮合成过程中的关键酶,增加的睾酮底物向睾酮的转化,从一个方面解释了胶质瘤患者血清睾酮水平高于正常人平均水平^[4]。而在一些性别相关恶性肿瘤的研究中发现,雄激素能促进 AR 蛋白的表达^[14]。由此推测胶质瘤细胞过量转化的睾酮等雄激素可能进一步促进了 AR 等雄激素受体的表达。而过表达的 AR 等雄激素受体,可能又增强了雄激素对胶质瘤细胞的多种生物学作用。在前列腺癌的研究中发现,雄激素与 AR 结合,进一步激活了 Src/Raf/ERK 信号传导通路,有效的维持了前列腺癌细胞的致瘤性^[15]。本课题研究结果发现胶质瘤组织内雄激素合成的关键酶 CYP17A1 与雄激素受体 AR 二者均呈阳性表达,且表达与病理级别密切相关,提示胶质瘤组织内存在着睾酮-睾酮受体自分泌环路,并与胶质瘤的发生发展及预后有着密切的联系。

综上所述,CYP17A1 蛋白和 AR 蛋白在胶质瘤组织中的表达明显升高,且随病理级别升高而表达增强,表明胶质瘤内部的雄激素轴与胶质瘤的发生有着密切的联系。但是,雄激素轴在脑胶质瘤中的作用通路仍需进一步研究。这将为胶质瘤的内分泌治疗与临床诊断展开了新的道路。

参 考 文 献

- [1] Lönn S, Klæboe L, Hall P, et al. Incidence trends of adult primary intracerebral tumors in four Nordic countries [J]. *Int J Cancer*, 2004, 108(3):450-455.
- [2] Mckinley BP, Michalek AM, Fenstermaker RA, et al. The impact of age and sex on the incidence of glial tumors in New York state from 1976 to 1995 [J]. *J Neurosurgery*, 2000, 93(6):932-939.
- [3] Cowppli-Bony A, Bouvier G, Rué M, et al. Brain tumors and hormonal factors: review of the epidemiological literature [J]. *J Cancer Causes Control*, 2011, 22(5):697-714.
- [4] 周敏, 牛朝诗, 鲍得俊, 等. 脑胶质瘤患者手术前后血清睾酮水平的变化 [J]. *中华实验外科杂志*, 2015(6):1429-1431.
- [5] 秦国强, 王淳良, 梅金红, 等. 性激素受体在良恶性脑膜瘤中的表达及意义 [J]. *南昌大学学报*, 2009, 49(6):65-67.
- [6] Hamada A, Danesi R, Price D K, et al. Association of a CYP17 polymorphism with overall survival in Caucasian patients with androgen-independent prostate cancer [J]. *J Urology*, 2007, 70(2):217-220.
- [7] Kanda T, Xia J, Yokosuka O. Androgen receptor signaling in hepatocellular carcinoma and pancreatic cancers [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(28):9229-9236.
- [8] Yeh SH, Chen PJ. Gender disparity of hepatocellular carcinoma: the roles of sex hormones [J]. *J Oncology*, 2010, 78 Suppl 1(1):172-179.
- [9] Culig Z. Androgen Receptor Coactivators in Regulation of Growth and Differentiation in Prostate Cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231(2):270-274.
- [10] Ceccarelli I, Rossi A, Maddalena M, et al. Effects of morphine on testosterone levels in rat C6 glioma cells: Modulation by anastrozole [J]. *J Cell Physiol*, 2009, 221(1):1-4.
- [11] Hopewell J W. The Effects of Castration on the Induction of Experimental Gliomas in Male Rats [J]. *Br J Cancer*, 1970, 24(1):187-190.
- [12] Kabat GC, Etgen AM, Rohan TE. Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma? [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, 19(19):2421-2427.
- [13] 鲍得俊, 牛朝诗, 程传东, 等. 雄激素受体在脑胶质瘤中的表达及意义 [J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2014(6):277-279.
- [14] Takeda H, Nakamoto T, Kokontis J, et al. Autoregulation of androgen receptor expression in rodent prostate: Immunohistochemical and in situ hybridization analysis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 177(1):488-496.
- [15] Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer [J]. *Endocr Rev*, 2004, 25(2):276-308.