维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)04-0561-05

HO-1 在良、恶性乳腺组织中的表达及意义

刘胜春,吴凯南

(重庆医科大学附属第一医院普外科,重庆市普外科重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨血红素氧合酶-1(HO-1)在乳腺良恶性组织中的表达及意义。方法:分别用 RT-PCR4 免疫组化、Western blot 蛋白印迹杂交检测正常乳腺组织 10 例;乳腺增生症 18 例;乳腺纤维腺瘤 20 例;乳腺癌 25 例组织中的 HO-1mRNA 及 HO-1 蛋白,并检测 HO-1 酶活性,探讨 HO-1 在乳腺肿瘤组织中表达及意义。结果:乳腺癌组织中的 HO-1mRNA 表达(0.3755±0.0628)明显高于正常乳腺(0.1199±0.0810)、乳腺增生(0.15021±0.0479)及乳腺纤维腺瘤组(0.1834±0.054)(t=2.2992, P<0.01),乳腺良、恶性肿瘤组织中的 HO-1 表达(23.4617±7.0136,34.2712±4.3423)均高于正常乳腺(4.2742±0.821)及乳腺增生组(6.2525±1.0032)(P<0.05)。乳腺良、恶性肿瘤组织中的 HO-1 酶活性(1.1458±0.0458,1.4646±0.04892)均高于正常乳腺(0.8935±0.0271)及乳腺增生组(0.9375±0.0302)(P<0.01),乳腺癌组织中的 HO-1 酶活性高于纤维腺瘤(t=3.7546, P<0.01)。结论:HO-1mRNA、蛋白表达以及 HO-1 酶活性的变化与乳腺良性病变及癌变存在相关性,提示 HO-1 对肿瘤细胞存在保护作用。

【关键词】乳腺增生;乳腺肿瘤;血红素氧合酶-1

【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-01-11

Expression and significance of heme oxyenase-1 in benign and malignant breast tissue

LIU Shengchun, et al.

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression and significance of heme oxyenase-1(HO-1) in benign and malignant breast tissue. *Methods:* HO-1 mRNA, HO-1 protein and enzyme activity of HO-1 in 10 cases of normal breast tissue, 18 of hyperplasia, 20 of adenoma and 25 of carcinoma were evaluated by RT-PCR, immunohistochemistry and Western blot respectively, and the significance of HO-1 in breast tissue was discussed. *Results:* The expression of HO-1 mRNA in breast carcinoma tissue(0.3755±0.0628) was higher than those in normal breast tissue(0.1199±0.0810), breast hyperplasia(0.1502±0.0479) and breast adenoma(0.1834±0.0541)(t=2.2992, P<0.01), HO-1 protein expression in benign and malignant breast tumor tissue(23.4617±7.0136,34.2712±4.3423) were higher than those in normal(4.2742±0.8216) and hyperplasia breast tissue (6.2525±1.0032)(P<0.05), and at the same time, HO-1 enzyme activity in benign and malignant breast tumor tissue (1.1458±0.0458,1.4646±0.0489)were higher than those in normal (0.8935±0.0271) and hyperplasia (0.9375±0.0302)(P<0.01) too and that of carcinoma tissue was higher than that in breast adenoma(t=3.7546,P<0.01)。*Conclusions*:HO-1mRNA、protein expression and HO-1 enzyme activity were associated with benign and malignant breast tissue, which indicates that HO-1 can protect carcinoma cell in breast.

【Key words】Breast hyperplasia;Breast carcinoma;Heme oxygenase-1

血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)又称 HSP32,是降解血红素为胆绿素、CO 和 Fe^{2+} 的起始酶和限速酶。HO-1 的表达对重金属、内毒素、热休克、炎性细胞因子、前列腺素以及氧化应激等刺激均很敏感[1]。对维持应激反应时的细胞平衡起重要作用。本研究拟探讨其在乳腺良恶性组织中的作用及意义。

1 方法与材料

1.1 临床资料

一般资料:收集我院乳腺外科手术标本 73 例,其中正常乳腺组织 10 例,取自乳腺整形外科手术标本,经病理检查

作者介绍:刘胜春(1968-),男,博士,副教授,
主要研究方向:外科基础及肿瘤外科。

维普资讯 http://www.cqvip.com

证实为正常乳腺组织;乳腺增生症 18 例;乳腺纤维腺瘤 20 例;乳腺癌 25 例,均为女性,患者年龄 22 – 65 岁,平均 35.5 岁。

诊断标准:乳腺癌诊断标准参照《新编常见恶性肿瘤诊治规范 – 乳腺癌分册》[3]。

1.2 免疫组化 ABC 染色

5μm 连续切片分别用于 HE 及免疫组化染色。免疫组化染色步骤:二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,1%甲醇双氧水阻断,0.4%胃蛋白酶消化;血清封闭,分别加兔抗人 HO–1 多克隆抗体(武汉博士德生物制剂公司),4℃过夜;生物素化 II 抗,37℃20min;ABC 复合物 37℃20min,DAB 镜下控制显色,苏木精复染树胶封片。实验中以正常人脾脏组织作为阳性对照,下同。

1.3 RT–PCR 检测 HO–1mRNA 的表达

经典总 RNA 提取试剂合(上海生工,SK1351)提取总 RNA,按试剂合操作说明合成第一条链。紫外分光光度计测定 RNA 浓度,琼脂糖电泳证实 RNA 的完整性。

HO–1 的引物序列为:正义引物 5′ –CGAAACAAGCA–GAACCCA–3′ ,反义引物 3′ –GTAGGACTCGACGAC–CAC–5′ ,产物 cDNA 192bp;β–actin 正义引物 5–GTAAA–GACCTCTATGCCAACA–3′ 反义引物 3′ –CACCAATGTC–CTTCAGCGAG–5′ ,产物长度 624bp。PCR 反应条件:预变性 94℃2min,95℃变性 1min,55℃退火 40s,72℃延伸 1min,共 35 个循环,最后 72℃延伸 5min。产物在质量浓度为 1%的琼脂糖上电泳,利用 Syngene 系统进行图象分析,作 ODHO–1/ODβ–actin 光密度比值测定。

1.4 HO–1 蛋白印迹杂交

4℃下在匀浆器中用 0.5ml 蛋白提取液提取 0.1g 肿瘤组织总蛋白,紫外分光光度计测定并调整总蛋白浓度为 0.5mg/ml,10%SDS–PAGE 电泳(电泳电压 9V/cm,进入分离胶后增加为 15V/cm),电泳 4h 后电转到硝酸纤维膜上(电流 0.65mA/cm,时间 15h)。5%脱脂奶粉 PBST 封闭 1h,加兔抗鼠 HO–1 多克隆抗体(1∶200)过夜,羊抗兔二抗 HRP(1∶1000,Santa Cruz,北京中山生物试剂公司分装)1h,利用 ECL 试剂盒(SC–2048,Santa Cruz)化学发光法显色,胶片暴光 3′ –5′ ,扫描入计算机分析积分光密度。

1.5 HO–1 的酶活性测定

取 100mg 肿瘤组织按 1∶4 加入 0.1molKH$_2$PO$_4$,冰上匀浆,4℃下 12000×g 离心 20min 后在将上清液在 4℃下 12000×g 离心 60min。20μl 上清,50mmHemin,2mmG–6–P,G–6–P 脱氢酶,0.25μl 0.8mmol/l NADPH,1.8ml 0.1mol KH$_2$PO$_4$,标准肝组织匀浆上清液 20μl,37℃避光反应 60min 后冰上终止反应。以不含 NADPH 的样品作空白对照,464nm,530nm 测定胆红素生成(胆红素的摩尔消光系数为 40mmol/L.cm)。

1.6 统计学处理

实验结果中计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用 SPSS 软件进行分析,组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

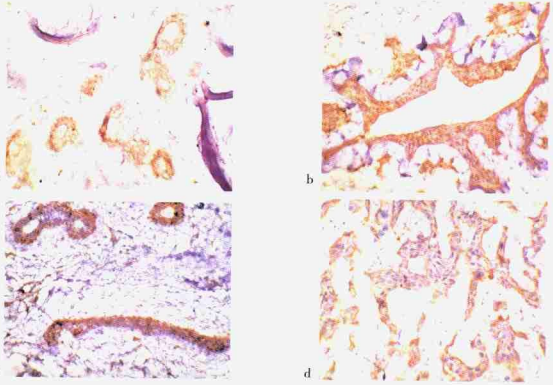


图 1 正常乳腺(a),乳腺增生(b),乳腺纤维腺瘤(c)和乳腺癌组织(d)中的 HO–1 免疫组化染色结果。SABC 法×400

维普资讯 http://www.cqvip.com

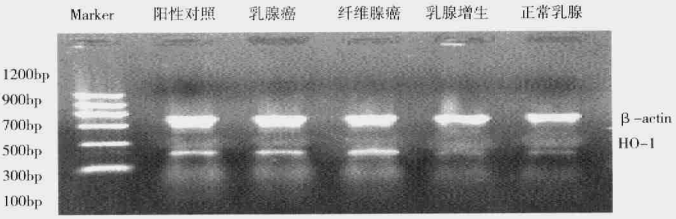


图 2 各组乳腺组织 HO-1mRNA 表达

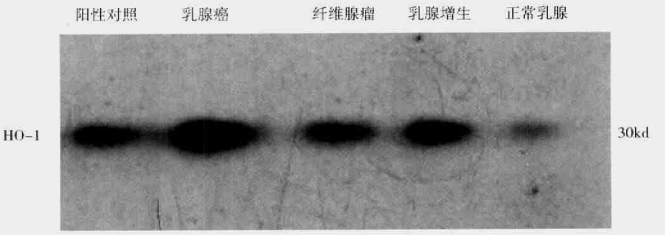


图 3 各组乳腺组织 HO-1 蛋白印迹杂交(Western blot)结果

2.1 免疫组化染色

良、恶性组织中均有 HO-1 表达，HO-1 染色阳性位于肿瘤细胞及乳腺上皮细胞胞浆。见图 1。

2.2 HO-1mRNA 表达

表 1 乳腺良恶性组织的 HO-1mRNA 表达

组织	n	$\bar{x} \pm s$	t	P
正常乳腺	10	0.1199 ± 0.0810		
乳腺增生	17	0.1502 ± 0.0479	0.3595	>0.05
纤维腺瘤	20	0.1834 ± 0.0541	0.4642	>0.05
乳腺癌*	25	0.3755 ± 0.0628	2.2992	<0.05

*癌变组织与任何组比较均有显著性差异(P<0.05)

各组乳腺及肿瘤组织均有 HO-1mRNA 表达，见图 2。HO-1mRNA 与 β-actin 的 OD 比值发现，乳腺癌组织中的 HO-1mRNA 表达（0.3755 ± 0.0628）明显高于正常乳腺（0.1199 ± 0.0810）、乳腺增生（0.1502 ± 0.0479）及乳腺纤维腺瘤组（0.1834 ± 0.0541）（t=2.2992，P<0.01），乳腺增生组织中的 HO-1mRNA 表达高于纤维腺瘤及正常乳腺，但其差异没有显著性意义，可能与病例数有限有关。见表 2。

2.3 HO-1 蛋白印迹杂交(Western blot)

各组乳腺组织 HO-1 蛋白印迹杂交（Western blot）结果见图 3，经积分光密度分析发现，乳腺良、恶性肿瘤组织中的 HO-1 表达（23.4617 ± 7.0136，34.2712 ± 4.3423）均高于正常乳腺（4.2742 ± 0.8216）及乳腺增生组（6.2525 ± 1.0032）（P< 0.05），乳腺癌组织中的 HO-1 蛋白表达高于纤维腺瘤，但其差异没有显著性意义(t=1.3967，P>0.05)，可能与病例数有限有关。

2.4 HO-1 酶活性测定

HO-1 的酶活性测定结果发现，正常乳腺、乳腺增生、良性肿瘤到恶性肿瘤中均存在具有活性的 HO-1 酶，乳腺良、恶性肿瘤组织中的 HO-1 酶活性（1.1458 ± 0.0458，1.4646 ± 0.0489）均高于正常乳

表 2 乳腺良恶性组织的 HO-1 蛋白质 western

组织	n	$\bar{x} \pm s$	Range	t	P
正常乳腺	10	4.2742 ± 0.82157	3.81 ~ 8.16		
乳腺增生	17	6.2525 ± 1.0032	3.24 ~ 9.27	1.4045	>0.05
纤维腺瘤	20	23.4617 ± 7.0136	13.84 ~ 38.26	2.2649	<0.05
乳腺癌	25	34.2712 ± 4.3423	19.47 ~ 40.36	1.39667	>0.05

纤维腺瘤和癌变组织与正常乳腺及乳腺增生组比较均有显著性差异(P<0.05)

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 4 各组乳腺组织中 HO-1mRNA、HO-1 蛋白印迹杂交及 HO-1 酶活性检测结果：HO-1mRNA、蛋白表达以及 HO-1 酶活性在正常乳腺、乳腺增生、纤维腺瘤到乳腺癌组织呈现逐渐增加的趋势。

腺（0.8935 ± 0.0271）及乳腺增生组（0.9375 ± 0.0302）（$P<0.01$），乳腺癌组织中的 HO-1 酶活性高于纤维腺瘤（$t=3.7546$，$P<0.01$）。

表 3 乳腺良恶性组织的 HO-1 酶活性检测结果

组别	n	x ± s（nmol 胆红素 /mg 蛋白质 /1h）	t	P
正常乳腺	10	0.8935 ± 0.0271		
乳腺增生	17	0.9375 ± 0.0302	1.0204	>0.05
乳腺腺瘤	20	1.1458 ± 0.0458	3.7546	<0.01
乳腺癌	25	1.4646 ± 0.0489	4.7686	<0.01

3 讨 论

HO-1 的活性在多种因素（如重金属、热休克、谷胱甘肽耗竭、紫外线、内毒素、缺血 - 再灌注、缺氧、高氧、NO 供体、过氧亚硝基以及 HO 的底物——血红素和血红蛋白等）的诱导下，可明显提高甚至 100 倍以上，是目前已知最易受诱导的酶，提示 HO-1 可能是细胞对抗应激反应的重要组成部分。这一推想已得许多实验研究的支持，如 NO 诱导 HO-1 活性增强可降低培养的内皮细胞对过氧化氢造成的氧化性损伤的敏感性，血红素诱导的 HO-1 活性增加可减少过氧亚硝基引起的主动脉内皮细胞的凋亡，离体的灌注心脏以及体内骨骼肌的缺血 - 再灌注损伤[11]，HO-1 表达增强还有助于提高内皮细胞对抗氧化性损伤的能力，用基因转移技术将 HO-1 基因转移到鼠肺上皮细胞或肺血管内皮细胞中，使 HO-1 表达增强，可完全防止高张氧或氧化剂引起的肺损伤[11]。

HO-1 与肿瘤的相关性目前还不甚清楚，近年来正逐渐被人们所重视，Yanagawa 等[12]报道单因素分析发现 HO-1 低表达与头颈部肿瘤的未分化程度和淋巴结转移明显相关（$P=0.04$，$P=0.01$）。Caballero 等[13]用免疫组化检测 DAB 诱导的肝脏癌前病变及肿瘤组织，发现 HO-1 在癌前病变，良性腺瘤以及早期肿瘤表达较少，在肝细胞性肝癌中 HO-1 的表达与肿瘤的分化程度成反相关，认为 HO-1 降低与肿瘤癌变过程有关，提出 HO-1 是肿瘤治疗的潜在措施。Fang 等[14]用聚乙烯 - 乙二酯 - 糖结合 ZnPP [poly (ethylene glycol)-conjugated ZnPP, PEG-ZnPP]在体内实验有阻止 HO-1 活性及抗肿瘤作用，并经药代动力学检测发现血液中 ZnPP 的维持时间比单用 ZnPP 长 40 倍；体外实验结果发现 PEG-ZnPP 诱发了氧化应激并导致 SW480 人结肠癌细胞凋亡。同时该作者报道 ZnPP 可提高肿瘤细胞对喜树碱、阿霉素等化疗药物的反应[15]。本组实验结果显示乳腺癌组织内的 HO-1mRNA 表达，明显高于乳腺良性肿瘤、乳腺增生及正常乳腺组织（$t=2.2992$，$P<0.01$）。蛋白表达以及 HO-1 的酶活性检测也得到类似的结果，其中乳腺癌组织中的 HO-1 蛋白表达高于纤维腺瘤，但其差异没有显著性意义（$t=1.3967$，$P>0.05$），可能与病例数有限有关。并且 HO-1mRNA、蛋白表达以及 HO-1 酶活性在正常乳腺、乳腺增生，纤维腺瘤到乳腺癌组织呈现逐渐增加的趋势。说明 HO-1mRNA、蛋白表达以及 HO-1 酶活性的变化与乳腺良性病变及癌变存在相关性，结合文献，提示 HO-1 对肿瘤细胞存在保护作用。

HO-1 对肿瘤细胞保护作用的机制尚不清楚，目前多认为与肿瘤细胞的凋亡发生有关。Masamichi 等研究发现，HO-1 酶活性的抑制剂 ZnPP 可阻止 Bcl-2 的表达并延迟抗凋亡蛋白 Bag-1 的表达。Zhang 等[16]在体外及体内实验中证实，应用 siRNA 降低 HO-1 的表达而导致的细胞凋亡增加可能是通过增加 cas-3 的活性和 Fas 的表达来完成的。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Bcl-XL属抗凋亡基因，该基因激活、蛋白表达可抑制细胞凋亡，延长细胞生存。Redaelli 等[9] 利用 Western Blot 评价热休克诱导 HO-1 和 CoPP 处理的肝脏组织中的抗凋亡蛋白 Bcl-XL，结果发现 CoPP 处理组的 Bcl-XL 与空白对照组无差异，热休克组 Bcl-XL 表达明显增高，而 HO-1 的阻止剂 SnPP 能降低这种增高。Brouad 等认为 HO-1 影响抗凋亡蛋白产生的机制可能通过 HO-1 的代谢产物 CO 或 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号传导途径。Liao 等[10]报道用激活 STAT-3 的 CT-1 处理在体外培养的细胞可提高 I/R 损伤后细胞的存活率并减少凋亡发生率。Ikezoe 等[11]发现用 HIV-1 蛋白酶抑制剂可通过降低 STAT-3 细胞外信号调节激酶 1/2 的活性来抑制人骨髓瘤细胞的生长并诱导凋亡的发生。Nagel-Wolfrum 等[12]用一段特殊的短肽链与 STAT-3 二聚区结合以阻止 DNA 的连接活性并抑制 STA-3 在肿瘤细胞中的作用，结果发现肿瘤细胞生长受抑制，Bcl-XL 表达降低，并诱导了凋亡的发生。

总之，本实验结果为通过抑制或降低 HO-1 在乳腺肿瘤中的表达及活性以治疗乳腺癌提供了一个新的思路。

参 考 文 献

[1] Motterlini R, Foresti R, Intaglietta M, et al. No-mediated activaton of heme oxygenase; endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothlium[J]. American Journal of Physiology, 1996; 270: H107-114.

[2] 中国抗癌协会.新编常见恶性肿瘤诊治规范，乳腺癌分册[M]. 第1版，北京：北京医科大学协和医科大学联合出版社，1999.27-35.

[3] Liming yang, Shuo Quan, Nader G, et al. Retrovirus-mediated HO gene transfer into endothelial cells protects against oxidant-induced injury [J]. Am J physiol, 1999;277:L127-133.

[4] Yanagawa T, Omura K, Harada H, et al. Heme oxygenase-1 expression predicts cervical lymph node metastasis of tongue squamous cell carcinomas[J]. Oral Oncol, 2004;40(1):21-27.

[5] Caballero F, Meiss R, G imenez A, et al. Immunohistochemical analysis of heme oxygenase-1 in preneoplastic and neoplastic lesions during chemical hepatocarcinogenesis[J]. Int J Exp Pathol,2004;85(4):213-222.

[6] Fang J, Sawa T, Akaike T, et al. In vivo antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor[J]. Cancer Res, 2003; 63(13):3567-3574.

[7] Fang J, Sawa T, Akaike T, et al. Enhancement of chemotherapeutic response of tumor cells by a heme oxygenase inhibitor, pegylated zinc protoporphyrin[J]. Int J Cancer,2004;109(1):1-8.

[8] Zhang XC, Peiying S, Jiang DH, et al. Small interfering RNA targeting heme oxygenase-1 enhances ischemia-reperfusion-induced lung apoptosis [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004;297 (11): 10677-10684.

[9] Redaelli CA, Tian YH, Schaffner T.Extended preservation of rat liver graft by induction of heme oxygenase-1[J]. Hepatology, 2002; 35(5): 1082-1092.

[10] Liao Z, Brar BK, Cai Q, et al. Cardiotrophin-1(CT-1) can protect the adult heart from injury when added both prior to ischaemia and at reperfusion[J]. Cardiovasc Res, 2002; 53:902-910.

[11] Ikezoe T, Saito T, Bandohashi K, et al. HIV-1 protease inhibitor induces growth arrest and apoptosis of human multiple myeloma cells via inactivation of signal transducer and activator of transcription 3 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 [J]. Mol Cancer Ther, 2004; 3(4): 473-479.

[12] Nagel-Wolfrum K, Buerger C, Wittig I, et al. The interaction of specific peptide aptamers with the DNA binding domain and the dimerization domain of the transcription factor Stat3 inhibits transactivation and induces apoptosis in tumor cells[J]. Mol Cancer Res, 2004; 2(3):170-182.

（上接第 555 页）

[6] Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis in human gastric cancer [J].Clin Cancer Res,2000;6(1):135-138.

[7] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference hy double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans[J].Nature, 1998;391(6669):806-811.

[8] Zamore PD, Tuschi H, Sharp PA, et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21-23 nucleotide intervals[J]. Cell, 2000;101(1): 25-33.

[9] Agami R. RNAi and related mechanisms and their potential use for therapy[J]. Curr Opin Chem Biol, 2002; 6(6):829-834.

[10] Phipps KM, Martinez A, Lu J,et al. Small interfering RNA molecules as potential anti-human rhinovirus agents: in vitro potency, specificity, and mechanism[J]. Antiviral Res,2004;61(1):49-55.

[11] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs [J]. Genes Dev, 2001;15 (2): 188-200.

[12] Michael K,Sasaki E,Halter F,et al.HGF triggers activation of the COX-2 gene in rat gastric epithelial cells: action mediated through the ERK2 signaling pathway[J].Faseb,1999;13(15): 2184-2189.

[13] Wa J, Mao Y, He L, et al.A new cell proliferating marker,cytosomic thymidine kinase as compared to proliferating cell nuclear antigen in patients with colorectal carcinoma [J].Anticancer Res,2000;20 (6C): 4815-4820.

[14] Sikuma K, Fujimori T, Hirabayashi K, et al. Cyclooxygenase(COX)-2 immunoreactivity and relationship to p53 and ki-67 expression in colorectal cancer[J].J Gastroenterol,2000;35(6):488-490.

[15] Takagi S,Kumagai S,Kinouchi Y,et al.High ki-67 labeling index in human colorectal cancer with microsatellite instability [J].Anticancer Res, 2002;22(6A):3241-3244.