

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2016.20160198

脑胶质瘤组织 β -连环蛋白、血管内皮生长因子的表达与微血管密度及其相关性研究

张惊宇, 张力娜, 舒永伟, 郑永慧, 初婷婷, 赵 虹*, 杨子超

哈尔滨医科大学附属第四医院神经内科, 哈尔滨 150081

[摘要] **目的:**探讨脑胶质瘤组织 β -连环蛋白、血管内皮生长因子的表达与微血管密度以及三者的相关性。**方法:**50例脑胶质瘤标本和40例健康对照标本,其中脑胶质瘤组包含低级别脑胶质瘤标本29例和高级别脑胶质瘤标本21例。采用免疫组织化学法检测各组标本中 β -连环蛋白的表达;采用 Western 印迹法检测血管内皮生长因子的表达水平;应用抗 CD105 抗体检测新生血管内皮细胞表面标志蛋白 CD105 的表达水平,计算微血管密度。**结果:**脑胶质瘤组 β -连环蛋白表达阳性率、血管内皮生长因子表达水平和微血管密度均较对照组明显升高 ($P < 0.05$)。与低级别脑胶质瘤组相比,高级别脑胶质瘤组的 β -连环蛋白表达阳性率、血管内皮生长因子表达水平和微血管密度均明显升高 ($P < 0.05$)。 β -连环蛋白表达阳性率、血管内皮生长因子表达水平、微血管密度三者间均呈正相关性 ($P < 0.01$)。**结论:**脑胶质瘤患者中 β -连环蛋白表达阳性率、血管内皮生长因子表达水平及微血管密度均明显升高,其中高级别脑胶质瘤中升高更明显。

[关键词] 脑胶质瘤; β -连环蛋白; 血管内皮生长因子; 微血管密度

[中图分类号] R 739.41 **[文献标志码]** A

The β -catenin and vascular endothelial growth factor expressions and microvessel density in glioma and their correlations

ZHANG Jing-yu, ZHANG Li-na, SHU Yong-wei, ZHENG Yong-hui, CHU Ting-ting, ZHAO Hong*, YANG Zi-chao

Department of Neurology, Fourth Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the expressions of β -catenin, vascular endothelial growth factor (VEGF), and microvessel density in glioma and their correlations. **Methods:** 50 glioma specimens and 40 health control specimens were collected. The gliomas were divided into low grade gliomas ($n=29$) and high grade gliomas ($n=21$). The expression of β -catenin in all specimens was detected by immunohistochemistry. The level of VEGF was detected by Western blotting. The expression of CD105 (a surface marker of neovascular endothelial cell) was examined by anti-CD105 antibody, and the microvessel density was calculated. **Results:** The positive expression rate of β -catenin, the level of VEGF and microvessel density in glioma group were significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). Compared with the low grade gliomas, the three indexes were obviously higher in high grade gliomas ($P < 0.05$). There was a positive correlations between the positive expression rate of β -catenin, the level of VEGF, and microvessel density ($P < 0.05$). **Conclusions:** The positive expression rate of β -catenin, the level of VEGF, and microvessel density in glioma patients increase obviously, and those are more significant in the patients with high-grade glioma.

[Key Words] glioma; β -catenin; vascular endothelial growth factor; microvessel density

脑胶质瘤是临床上备受关注的脑肿瘤之一,其发病率占颅内肿瘤的45.0%以上。大多数脑胶质瘤患者确诊时,肿瘤已经高度异质性。脑胶质瘤相对其他肿瘤预后更差,致死率更高^[1-2]。脑胶质瘤的

侵袭和复发受多种基因、蛋白以及细胞因子等信号通路的共同调控^[3],但其发生机制目前仍未阐明。

β -连环蛋白的功能广泛,其中最重要的功能之一是参与肿瘤细胞的增殖和迁移,因此目前成为人

[收稿日期] 2016-03-02 **[接受日期]** 2016-05-15

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金面上项目(H201423),哈尔滨市科技局青年后备人才项目(2013RFQYJ062)。Supported by General Program of National Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (H201423) and Youth Talent Program of Harbin Municipal Science and Technology Bureau (2013RFQYJ062)。

[作者简介] 张惊宇,博士,主任医师。E-mail: zhangjingyu@163.com

*通信作者(Corresponding author)。Tel: 0451-85939431, E-mail: zhaohong661214@163.com

们研究恶性肿瘤发生机制的一个热点^[4]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)多由血管内皮细胞合成和分泌,是一类促进血管生成的关键因子,能刺激肿瘤新生血管的形成,并参与介导肝癌、肺癌、肾癌和颅内肿瘤等多种肿瘤的发生和发展过程^[5]。因此,抑制肿瘤血管生成已成为治疗颅内恶性肿瘤(如脑胶质瘤等)的新策略^[6]。本研究通过检测脑胶质瘤组织中 β -连环蛋白、VEGF的表达水平和微血管密度,探讨其与脑胶质瘤血管生成的相关性。

1 材料与方法

1.1 标本 50例脑胶质瘤标本及40例健康对照标本购自上海锐赛生物技术有限公司。根据WHO脑胶质瘤分类和分级标准^[7],50例脑胶质瘤标本中,I级17例、II级12例、III级13例、IV级8例。I级和II级为低级别脑胶质瘤,共29例;III级和IV级为高级别脑胶质瘤,共21例。

1.2 免疫组织化学法检测 β -连环蛋白表达阳性率 羊抗人 β -连环蛋白单克隆抗体、S-P试剂盒和DAB显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。标本经10%甲醛溶液固定,石蜡包埋,5 μ m切片,然后应用免疫组织化学S-P法检测 β -连环蛋白的表达(具体操作按试剂盒说明书进行)。以试剂公司提供的阳性切片作为阳性对照,以磷酸盐缓冲液(PBS)作为阴性对照。光学显微镜下,细胞膜、细胞质和细胞核出现棕黄色、棕褐色颗粒或均质染色时,判定为 β -连环蛋白阳性表达。400倍显微镜下观察,每张切片观察10个视野,每个视野计数100个肿瘤细胞,计算阳性细胞百分数,取平均值。结果判定:根据阳性细胞所占百分数进行分级, $<5\%$ 为阴性(-), $5\% \sim 25\%$ 为弱阳性(+), $26\% \sim 50\%$ 为中度阳性(++), $>50\%$ 为强阳性(+++)。

1.3 Western印迹法检测VEGF表达水平 裂解新鲜胶质瘤组织和正常脑组织后,提取总蛋白,用BCA法进行蛋白质定量。每例样本各取15 μ g蛋白,行SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,电泳结束后转膜,用5%脱脂牛奶室温封闭2 h,再分别加入VEGF一抗(1:500)和 β -actin一抗(1:200;两种一抗均由美国Santa Cruz公司提供),4℃反应过夜;PBS洗涤后,加入1:5 000稀释的辣根过氧化物酶标记的抗VEGF一抗和抗 β -actin一抗

抗体(购自北京中杉金桥生物技术有限公司);ECL法染色后,应用凝胶成像系统显像。采用Image J软件进行目的蛋白的定量分析。

1.4 检测肿瘤微血管密度 以CD105蛋白作为血管内皮细胞的特异性标志物,用抗CD105抗体检测新生血管内皮细胞表面的CD105表达水平。CD105蛋白染色可呈棕色或棕黄色,以10%细胞质呈棕黄色者判定为表达阳性。参照Eichten等^[8]报道的方法计数微血管,将与相邻微血管、肿瘤细胞或其他结缔组织不相连的任何棕黄色区域作为一条独立的微血管。先在100倍光学显微镜下全面观察切片,确定肿瘤组织内血管密度最高的区域;再在200倍镜下,将与周围肿瘤细胞和结缔组织明显区别的棕黄色的内皮细胞或细胞丛作为一个血管,若不相连,分支结构即可作为一个血管。分别记录5个视野内的微血管数,取平均数作为微血管密度值。

1.5 统计学处理 采用SPSS 17.0软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验。计数资料的两组间比较采用 χ^2 检验。利用Spearman相关分析法分析 β -连环蛋白表达阳性率、VEGF表达水平、微血管密度的相关性。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 脑胶质瘤组与健康对照组的 β -连环蛋白表达阳性率、VEGF表达水平、微血管密度的比较 脑胶质瘤组的 β -连环蛋白表达阳性率、VEGF表达水平和微血管密度均较对照组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$,表1)。

2.2 高级别脑胶质瘤组与低级别脑胶质瘤组的 β -连环蛋白表达阳性率、VEGF表达水平、微血管密度比较 高级别脑胶质瘤组的 β -连环蛋白表达阳性率、VEGF表达水平和微血管密度均较低级别脑胶质瘤组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$,表2)。

2.3 β -连环蛋白表达阳性率、VEGF表达水平、微血管密度的相关性研究 β -连环蛋白表达阳性率与VEGF因子表达水平显著正相关($r_s = 0.833$, $P < 0.01$); β -连环蛋白表达阳性率与微血管密度呈显著正相关($r_s = 0.786$, $P < 0.01$);血管内皮生长因子表达水平和微血管密度呈显著正相关($r_s = 0.770$, $P < 0.01$)。

表 1 脑胶质瘤组与对照组 β-连环蛋白表达阳性率、血管内皮生长因子表达水平、微血管密度比较

组别	N	β-连环蛋白阳性表达率(%)	VEGF 表达水平(pg/mL)	微血管密度(个/视野)
脑胶质瘤组	50	74.0	23.35 ± 4.47	76.7 ± 12.1
健康对照组	40	42.5	17.25 ± 1.34	10.6 ± 3.4
t 值	—	9.19	9.15	36.85
P 值	—	0.002	0.000	0.000

表 2 高级别脑胶质瘤组与低级别脑胶质瘤组 β-连环蛋白表达阳性率、血管内皮生长因子表达水平、微血管密度比较

组别	N	β-连环蛋白表达阳性率(%)	VEGF 表达水平(pg/mL)	微血管密度(个/视野)
高级别脑胶质瘤组	21	90.5	25.13 ± 4.72	82.3 ± 13.0
低级别脑胶质瘤组	29	62.1	21.56 ± 2.81	73.4 ± 5.6
χ ² (t)值	—	5.11	3.09	2.95
P 值	—	0.024	0.002	0.003

3 讨 论

脑胶质瘤源自神经上皮层,是中枢神经系统常见的预后较差的原发性肿瘤。脑胶质瘤的年发病率约为 5/10 万,发病年龄高峰 30~40 岁^[9]。脑胶质瘤的发生是一个涉及多基因的多步骤、多阶段的复杂过程。

细胞内的许多信号转导通路参与脑胶质瘤的发生和发展过程。细胞外分子信号结合细胞表面的特异性受体,并将信号转导入细胞内,再通过细胞内各种信号转导途径的相互作用,将信号转导入细胞核,最终活化相应的核内转录因子,调节相应转导基因的表达,使该细胞完成转分化^[10]。多项研究表明,Wnt 信号通路为重要的细胞信号转导通路,参与调控细胞多种生命过程,如细胞分化、细胞增殖与凋亡、细胞免疫与应激,进而参与肿瘤的发生等^[11]。在脑胶质瘤中,Wnt 信号通路尤其是 Wnt/β-连环蛋白信号通路与肿瘤的发生和发展密切相关^[12]。

研究^[13]表明,Wnt 信号通路严重影响中枢神经系统的发育(尤其是胚胎阶段);Wnt 信号通路还参与细胞的成熟(包括细胞增殖、分化,以及细胞的转移和定位过程)。Wnt 信号通路的特异性在于其发挥作用的时间仅局限于胚胎期,在婴幼儿时期作用减弱,随着机体的成熟,Wnt 信号通路的作用逐渐消失。但在特殊的生理病理刺激信号作用下,Wnt 信号被激活,其中以脑组织缺血的刺激作用最为明显。β-连环蛋白是 Wnt 信号通路的关键蛋白。抑制 β-连环蛋白的去磷酸化、抑制 β-连环蛋白向核内转移、在 β-连环蛋白水平抑制 Wnt 信号通路的激活

是目前人们广泛关注的靶向治疗方案。抑制 Wnt 信号通路是脑胶质瘤等肿瘤的基因治疗策略之一。本研究结果显示,脑胶质瘤组 β-连环蛋白阳性表达率较对照组升高,高级别脑胶质瘤组的 β-连环蛋白阳性表达率较低级别脑胶质瘤升高,说明 β-连环蛋白表达增加与脑胶质瘤的发生和发展相关。

肿瘤血管生成是一个复杂的病理生理过程。充足的血供才能支持肿瘤细胞的生长、浸润和转移。VEGF 是促进肿瘤血管生成的关键刺激因子,几乎参与肿瘤血管生成的每个环节^[14]。VEGF 可以通过旁分泌等方式,加快血管内皮细胞的增殖,重构血管,促进新生血管的形成。VEGF 可能通过促进原有血管网的扩张和过度生长,以及刺激血管内皮祖细胞的分化,从而促进新生血管形成。微血管密度可用来判定肿瘤血管的生成情况^[15]。本研究发现,脑胶质瘤组的 VEGF 表达水平及微血管密度较对照组升高($P<0.05$),高级别脑胶质瘤组的 VEGF 表达水平及微血管密度较低级别脑胶质瘤显著升高($P<0.05$),说明 VEGF 参与肿瘤血管的形成,进而使肿瘤细胞过度增殖。此外,本研究发现,β-连环蛋白表达阳性率、VEGF 表达水平、微血管密度三者之间均呈正相关性,提示 Wnt 信号通路与脑胶质瘤的血管生成明显相关。

综上所述,本研究发现脑胶质瘤中 β-连环蛋白表达、VEGF 表达及微血管密度均显著增加,在高级别脑胶质瘤中增加更明显,提示 β-连环蛋白表达阳性可反映脑胶质瘤的发生和发展。但本研究入组例数较少,且为单中心研究,故结论尚须多中心、大样本的研究来进一步证实。

参考文献

- [1] Hao L, Wang D, Zhang G, et al. Vascular endothelial growth factor expression correlated with microvessel density in the antral follicle of sheep ovary[J]. *Livestock Science*, 2014, 165(7):212-216.
- [2] Ma C, Li Y, Zhang X, et al. Levels of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 proteins in patients with glioma[J]. *J Int Med Res*, 2014, 42(1): 198-204.
- [3] 陈晨, 陈元渊, 张硕, 等. 脑胶质瘤患者 FAM46A 基因表达水平与生存期的相关性研究[J]. *临床神经病学杂志*, 2015, 28(3):201-204.
- [4] Zhou ZW, Ju HX, Sun MZ, et al. Serum fetuin-A levels are independently correlated with vascular endothelial growth factor and C-reactive protein concentrations in type 2 diabetic patients with diabetic retinopathy[J]. *Clin Chim Acta*, 2016, 455:113-117.
- [5] Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system; physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases[J]. *J Biochem*, 2013, 153(1):13-19.
- [6] 郑帅, 许豪, 刘华杰, 等. HMGA1 在脑胶质瘤侵袭性及其血管生成中的作用[J]. *山东大学学报:医学版*, 2014, 52(2):78-81.
- [7] Xu HW, Huang YJ, Xie ZY, et al. The expression of cytoglobin as a prognostic factor in gliomas; a retrospective analysis of 88 patients[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13:247.
- [8] Eichten A, Adler AP, Cooper B, et al. Rapid decrease in tumor perfusion following VEGF blockade predicts long-term tumor growth inhibition in preclinical tumor models[J]. *Angiogenesis*, 2013, 16(2):429-441.
- [9] 张冉, 王全义, 张军臣, 等. IMP3 蛋白及 Ki-67 在脑胶质瘤中的表达及临床意义[J]. *济宁医学院学报*, 2015, 14(1): 28-32.
- [10] Zhao H, Wang C, Lu B, et al. Pristimerin triggers AIF-dependent programmed necrosis in glioma cells via activation of JNK[J]. *Cancer Lett*, 2016, 374(1): 136-148.
- [11] Shen SH, Yu N, Liu XY, et al. Gamma-glutamylcyclotransferase promotes the growth of human glioma cells by activating Notch-Akt signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 471(4):616-620.
- [12] 张瑞生. 脑胶质瘤中转录反式作用因子结合蛋白与血管内皮生长因子的表达及其与预后的关系[J]. *中国药物与临床*, 2015, 9(2):264-267.
- [13] Zhou B, Wu G, An Y, et al. The effect of continuous elastic outside distraction on the expressions of vascular endothelial cell growth factor and microvessel density in female porcine nipple[J]. *Aesthetic Plast Surg*, 2012, 36(3):723-731.
- [14] Lu KV, Bergers G. Mechanisms of evasive resistance to anti-VEGF therapy in glioblastoma[J]. *CNS Oncol*, 2013, 2(1): 49-65.
- [15] Keunen O, Johansson M, Oudin A, et al. Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(9):3749-3754.

[本文编辑] 叶婷, 张艺鸣