

应用组织芯片技术研究 IGF-1 在反应性和肿瘤性星形胶质细胞中表达的区别

韩伟,张春庆,戚基萍,李丹阳

Expression of IGF-1 in Reactive and Neoplastic Astrocytes: An Immunohistochemical Study Using Tissue Microarray Techniques

HAN Wei, ZHANG Chun-qing, QI Ji-ping, LI Dan-yang

Department of Pathology, The First Hospital of Harbin Medical College, Harbin 150001, China

Corresponding Author: QI Ji-ping, E-mail: mingmei77@163.com

Abstract: **Objective** To study the difference of IGF-1, bcl-2 and ki-67 protein expression in reactive and neoplastic astrocytes and the significance of them. **Methods** Immunohistochemistry and tissue microarray techniques were used to determinate the expression of IGF-1, bcl-2 and ki-67 protein in 12 cases of normal brain tissues, 49 cases of astrocytes proliferation, 49 cases of low-grade astrocytomas, and 50 cases of high-grade astrocytomas, 12 cases of normal brain tissues were used as controls. **Results** The expression of IGF-1, bcl-2 and ki-67 protein were all negative in control group; The positive rates of expression of them in reactive astrocytes were 28.9%, 26.7%, 22.2% respectively; and in low-grade astrocytomas were 63.8%, 50.0%, 70.2%; in high-grade astrocytomas were 88.9%, 79.2%, 95.2%. There were all significant difference among the three experimental groups ($P < 0.01$); the expression of IGF-1, bcl-2 and ki-67 protein had close correlation to the histological grades ($r = 0.997$, $r = 0.999$, $r = 0.988$, $P < 0.01$); the expression of IGF-1 was positively correlated to bcl-2 and ki-67 protein ($r = 0.995$ or $r = 0.995$, $P < 0.01$). **Conclusion** IGF-1 and bcl-2 protein plays an important role in the progression of astrocytomas; IGF-1, bcl-2 and ki-67 protein might be combined utilized to discriminate between reactive astrocytes proliferation and low-grade astrocytomas.

Key words: Tissue chip; Reactive astrocytes proliferation; Astrocytomas; IGF-1; bcl-2

摘要: **目的** 探讨 IGF-1、bcl-2 和 ki-67 蛋白在星形胶质细胞反应性增生与低级别星形胶质细胞瘤中表达的区别及意义。 **方法** 应用组织芯片和免疫组化染色技术检测正常脑组织、星形胶质细胞反应性增生、低级别(Ⅰ~Ⅱ级)和高级别(Ⅲ~Ⅳ级)星形胶质细胞瘤中 IGF-1、bcl-2 和 ki-67 蛋白的表达情况。 **结果** 正常脑组织中三者均为阴性表达;星形胶质细胞反应性增生组中 IGF-1、bcl-2 和 ki-67 阳性率分别为 28.9%、26.7%、22.2%;低级别星形胶质细胞瘤组中 IGF-1、bcl-2 和 ki-67 阳性率分别为 63.8%、50.0%、70.2%;高级别星形胶质细胞瘤组中阳性率分别为 88.9%、79.2%、95.2%。 IGF-1、bcl-2 和 ki-67 在各实验组间比较均差异显著 ($P < 0.01$); IGF-1、bcl-2 和 ki-67 表达与组织学分级密切相关 ($r = 0.997$ 、 $r = 0.999$ 和 $r = 0.988$, $P < 0.01$); IGF-1 与 bcl-2、ki-67 表达密切相关 ($r = 0.995$ 和 $r = 0.995$, $P < 0.01$)。 **结论** IGF-1 和 bcl-2 在星形胶质细胞瘤的发生、发展中起重要作用; IGF-1、bcl-2 和 ki-67 联合应用在星形胶质细胞反应性增生与低级别星形胶质细胞瘤的鉴别诊断中可能会有一定的意义。

关键词: 组织芯片; 星形胶质细胞反应性增生; 星形胶质细胞瘤; IGF-1; bcl-2

中图分类号: R739.41 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2006)06-0394-03

0 引言

目前关于星形胶质细胞反应性增生与低级别星形胶质细胞瘤的相关性研究,国内外都较少见。胰

岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 是一种自分泌或旁分泌的癌基因,具有刺激 DNA 合成和转录的能力。 bcl-2 是目前研究较为深入的凋亡抑制基因。 ki-67 是目前已知的增殖抗原中最具增殖能力的代表指标。本研究旨在探讨 IGF-1、bcl-2 和 ki-67 在星形胶质细胞反应性增生与低级别星形胶质细胞瘤中表达的区别,为深入研究两者的鉴别诊断奠定基础。

收稿日期: 2005-08-29; 修回日期: 2006-11-15
 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30470661)
 作者单位: 150001 黑龙江省哈尔滨医科大学第一临床医学院病理科
 通讯作者: 戚基萍, E-mail: mingmei77@163.com
 作者简介: 韩伟 (1977-), 女, 硕士, 医师, 主要从事脑缺血与神经元凋亡的研究

1 资料与方法

1.1 资料 收集哈尔滨医科大学第一临床医学院病理科 2001~2004 年库存脑星形胶质细胞反应性增生及星形胶质细胞瘤石蜡标本 148 例,其中男 101 例,女 47 例,年龄 8~73 岁,平均年龄 39.4 岁。反应性增生组 49 例均选自临床诊断为肿瘤但病理确诊为星形胶质细胞反应性增生的病例;肿瘤组按 WHO 中枢神经系统肿瘤分型(2000),在光镜下区分为低级别星形胶质细胞瘤组(Ⅰ~Ⅱ级)49 例,高级别星形胶质细胞瘤组(Ⅲ~Ⅳ级)50 例;对照组 12 例正常脑组织取自非脑部疾病引起死亡的成人尸检脑标本。

1.2 组织芯片的制备 采用组织芯片制作机细针打孔的方法制作芯片,打孔针直径为 2mm。

1.3 免疫组化染色

1.3.1 试剂 一抗为兔抗人 IGF-1 多克隆抗体(BA0939)浓度为 1:100,SABC 试剂盒购自博士德生物技术有限公司。鼠抗人 bcl-2(bcl-2-100)单克隆抗体(即用型);鼠抗人 ki-67(K-2)单克隆抗体(即用型)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3.2 方法 应用 SABC 法和 PV6000 通用型二步法进行免疫组化染色。

1.3.3 结果判定 IGF-1、bcl-2 阳性细胞以细胞浆出现棕黄色颗粒为标准,ki-67 以细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性细胞,根据阳性细胞所占百分比和染色强度分为:无明显阳性细胞为(-);阳性细胞数 < 25%,着色浅棕色为(+);阳性细胞数 ≥ 25%,着色棕色或深棕色为(++).

1.4 统计学分析 利用 SPSS11.0 软件进行统计学分析,用 Pearson χ^2 检验及直线相关性分析,认为 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 IGF-1、bcl-2 和 ki-67 蛋白在各实验组中的表达

在切片及免疫组织化学染色过程中,正常组芯片中无组织缺失;反应性增生组 49 例中 4 片组织缺失,有效样本 45 例;低级别肿瘤组 49 例中 IGF-1 和 ki-67 两个指标均有 2 片组织缺失,有效样本 47 例,

bcl-2 有 7 片组织缺失,有效样本 42 例;高级别肿瘤组 50 例中 ki-67 有 8 片组织缺失,有效样本 42 例,IGF-1 有 5 片组织缺失,有效样本 45 例,bcl-2 有 2 片组织缺失,有效样本 48 例。免疫组化结果,见表 1、图 1~4。

2.2 IGF-1、bcl-2 和 ki-67 蛋白在各实验组中的统计学检验

(1) IGF-1、bcl-2 和 ki-67 在各组间差异均具有显著性(χ^2 值分别为:49.546、38.007、66.458, P 值分别为:0.000、0.000、0.000);正常组与增生组之间差异均不具有显著性(χ^2 值分别为:3.000、2.608、1.880, P 值分别为:0.083、0.106、0.170);增生组与低级别组之间差异均具有显著性(χ^2 值分别为:11.275、5.024、21.269, P 值分别为:0.001、0.025、0.000);低级别组与高级别组之间差异均具有显著性(χ^2 值分别为:7.934、8.439、9.420, P 值分别为:0.005、0.004、0.002)。

(2) IGF-1、bcl-2 和 ki-67 与组织学分级相关性检验均呈正相关(r 值分别为:0.998、0.999、0.989, P 值分别为:0.002、0.001、0.011);IGF-1 与 ki-67、IGF-1 与 bcl-2、ki-67 与 bcl-2 之间的相关性检验均呈正相关(r 值分别为 0.995、0.995、0.984, P 值分别为 0.005、0.005、0.016)。

3 讨论

3.1 实验方法的选择及研究目的

在当今病理工作中,星形胶质细胞反应性增生和低级别星形胶质细胞瘤的鉴别诊断始终是个难题。虽然可根据胶质细胞排列密度、细胞的异型性、微囊形成、Rosenthal 纤维、钙化、炎症反应和血管变化等做出诊断,但受主观影响较大,容易发生误诊。因此,临床病理诊断工作中迫切需要鉴别两者的客观指标的出现。本实验力求在免疫组化方面,能够找到鉴别两者的指标。

3.2 IGF-1 与 ki-67 蛋白的表达及相关性

在体外培养条件下诱导细胞凋亡模型中,IGF-1 在生理浓度下能抑制神经母细胞在应激高渗状态诱导的凋亡;能明显降低心肌缺血再灌注损伤时心肌细胞的凋亡数目^[1,2]。越来越多的实验证明,在脑

表 1 IGF-1、bcl-2 和 ki-67 蛋白在各组的表达

组织类型	有效样本	IGF-1				有效样本	bcl-2				有效样本	ki-67			
		-	+	++	阳性率(%)		-	+	++	阳性率(%)		-	+	++	阳性率(%)
正常组	12	12	0	0	0	12	12	0	0	0	12	12	0	0	0
增生组	45	32	11	2	28.9	45	33	12	0	26.7	45	35	10	0	22.2
低级别组	47	17	19	11	63.8	42	21	12	9	50.0	47	14	29	4	70.2
高级别组	45	5	12	28	88.9	48	10	21	17	79.2	42	2	22	18	95.2

部恶性肿瘤的生成中、中枢神经系统损伤后的修复和神经的再生中发挥着重要的作用^[3,4]。相关研究证实^[5],在人体多种肿瘤组织,如小细胞肺癌、乳腺癌和脑胶质瘤等,以及人与动物来源的体外培养的肿瘤细胞中有 IGF-1 的异常高表达,这提示 IGF-1 的异常升高与肿瘤的发生密切相关。

本实验结果表明 IGF-1 蛋白在正常脑组织中不表达,在胶质瘤各实验组中的表达水平差异显著,并且与胶质瘤的级别呈正相关。说明 IGF-1 蛋白的表达水平随胶质瘤细胞恶性程度的升高而增高,提示 IGF-1 可以作为评价胶质瘤恶性度的一个客观指标。本实验低级别组 IGF-1 蛋白表达水平明显高于增生组,提示 IGF-1 蛋白在胶质瘤的发生、发展中可能起着重要的作用。同时本实验 ki-67 蛋白在正常脑组织及胶质瘤中的表达水平与国内外相关研究基本一致。并且结果显示低级别组 ki-67 蛋白表达水平明显高于增生组,提示低级别组瘤细胞的增殖活性明显高于增生组细胞增殖活性。在相关分析 IGF-1 和 ki-67 蛋白在各实验组中的表达水平呈正相关,这提示 IGF-1 亦可以反映肿瘤细胞的增殖活性,IGF-1 促进肿瘤细胞增殖可能与其抑制凋亡有关,并且在人脑胶质瘤的研究中,已经证实 IGF-1 是神经胶质细胞的有丝分裂原^[6],但其确切促肿瘤细胞增殖机制有待进一步研究。所以我们认为 IGF-1 和 ki-67 蛋白在鉴别星形胶质细胞反应性增生与低级别星形胶质细胞瘤中可能会有一定的意义。

3.3 bcl-2 与 ki-67 蛋白的表达及相关性

bcl-2 阻碍细胞凋亡的机制可能在于 bcl-2 与凋亡促进基因 bax 拮抗,抑制细胞色素 C 自线粒体释放至胞质,阻止胞质细胞色素 C 对 caspase 蛋白酶的激活,从而抑制凋亡的发生^[7]。本研究结果表明,bcl-2 蛋白在正常脑组织中未见表达,在胶质瘤各实验组中的表达水平随胶质瘤级别的增高而升高,说明 bcl-2 蛋白的表达水平与胶质瘤的恶性程度呈正相关;并且 bcl-2 在各实验组中的表达随 ki-67 的升高而升高,这表明 bcl-2 亦可能作为反映肿瘤细胞增殖能力的指标。bcl-2 促进肿瘤细胞增殖的原因可能与其抑制凋亡有关,但其确切的分子机制有待进一步研究。同时发现 bcl-2 蛋白在星形胶质细胞反应性增生中有一定的表达,与 Alderson 等^[8]的研究一致,而且 bcl-2 蛋白在低级别组的表达水平明显高于反应性增生组,差异有显著性。这提示 bcl-2 蛋白在胶质瘤的发生、发展中亦可能起着重要的作用。因此,bcl-2 亦有可能成为鉴别星形胶质细胞反应性增生与低级别星形胶质细胞瘤的有

用指标。

3.4 IGF-1 与 bcl-2 蛋白表达的相关性

IGF-1 与 bcl-2 的相关性检验结果表明两者呈正相关,其密切相关的分子机制为 IGF-1 能在转录水平提高 bcl-2 的表达,因为 bcl-2 启动子可由细胞核转录因子 cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)调节,IGF-1 能激活 CREB,而且 IGF-1 激活 CREB 涉及 P38MAPK 介导的信号途径^[9]。这提示 IGF-1 和 bcl-2 在星形胶质细胞瘤的发生、发展中可能起到某种协同作用。因此认为 IGF-1 与 bcl-2 联合检测对于鉴别两者可能会更有意义。

综上所述,可以认为 IGF-1 和 bcl-2 在星形胶质细胞瘤的发生、发展中起重要作用,且 IGF-1、bcl-2 与 ki-67 联合应用,在星形胶质细胞反应性增生与低级别星形胶质细胞瘤的鉴别诊断中可能会有一定的意义。

(本文图见第 474 页)

参考文献:

- [1] Van Golen CM, Feldman EL. Insulin-like growth factor I is the key growth factor in serum that protects neuroblastoma cells from hyperosmotic-induced apoptosis[J]. *J Cell Physiol*, 2000, 182(1): 24-32.
- [2] Buerke M, Murohara T, Skurk C, et al. Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(17): 8031-8035.
- [3] Shu-Lian Li, Shu-Jian Liang, Ning Guo, et al. Single-chain antibodies against human insulin-like growth factor I receptor: expression, purification, and effect on tumor growth[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2000, 49(4-5): 243-252.
- [4] LeRoith D, Roberts CT Jr. The insulin-like growth factor system and cancer[J]. *Cancer Lett*, 2003, 195(2): 127-137.
- [5] Xihong Zhang, Min Lin, Kenneth L, et al. Multiple Signaling Pathways are Activated During Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) Stimulated Breast Cancer Cell Migration[J]. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2005, 93(2): 159.
- [6] Lichtor T, Kurpakus MA, Gurney ME. Expression of insulin-like growth factors and their receptors in human meningiomas[J]. *J Neurooncol*, 1993, 17(3): 183-190.
- [7] Rosse T, Olivier R, Monney L, et al. bcl-2 prolongs cell survival after bax-induced release of cytochrome c[J]. *Nature*, 1998, 391(6666): 496-499.
- [8] Alderson LM, Castleberg RL, Harsh GR, et al. Human gliomas with wild-type P53 express bcl-2[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(5): 999-1001.
- [9] Pugazhenti S, Miller E, Sable C, et al. Insulin-like growth factor induces bcl-2 promoter through the transcription factor cAMP response element-binding protein[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(39): 27529-27535.

[编辑:安 凤]

VEGF-C 和 VEGF-R3 在乳腺癌中的表达及与淋巴结转移的关系

(正文见 385 页)

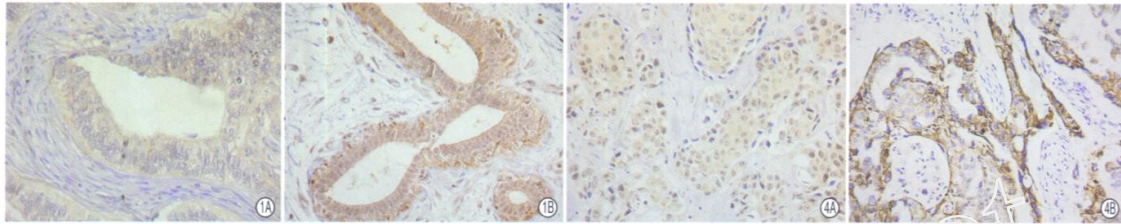


图1 VEGF-C在乳腺导管癌淋巴结非转移组(A)及淋巴结转移组(B)的表达 (SP × 200)

图4 VEGF-R3在乳腺癌淋巴结非转移组(A)及淋巴结转移组(B)的表达 (SP × 200)

多西紫杉醇诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡及相关基因表达的影响

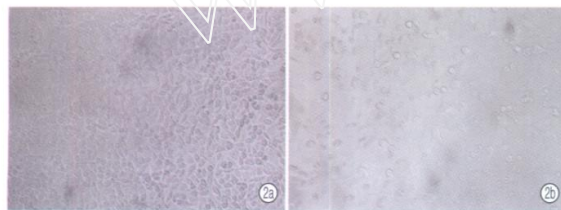


图2 光镜下观察多西紫杉醇对人乳腺癌细胞MCF-7形态学结果

a. 未经处理的MCF-7细胞; b. 加药后的MCF-7细胞 (× 560)

(正文见 388 页)

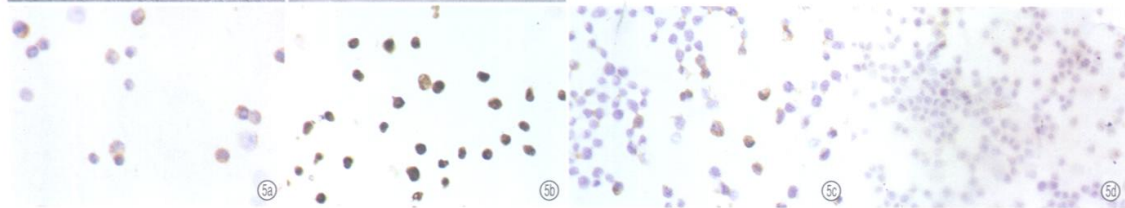


图5 多西紫杉醇对 bcl-2 基因和 bax 基因蛋白表达的影响

a. 经多西紫杉醇 1.2μM 处理 bcl-2 表达; b. 未经处理 bcl-2 表达; c. 经多西紫杉醇 1.2μM 处理 bax 表达; d. 未经处理 bax 表达

应用组织芯片技术研究 IGF-1 在反应性和肿瘤性星形胶质细胞中表达的区别

(正文见 394 页)

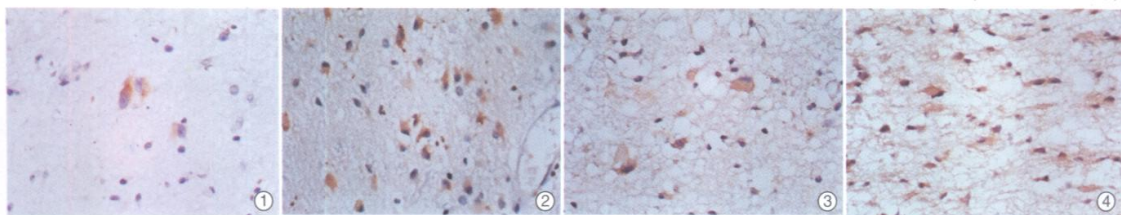


图1 星形胶质细胞反应性增生组中, IGF-1(+)阳性细胞胞浆呈棕黄色, 数量较少, 散在分布 (SABC × 400)

图2 低级别星形胶质细胞瘤组中, IGF-1(++)阳性细胞胞浆呈棕黄色, 数量增多, 密度增加 (SABC × 400)

图3 星形胶质细胞反应性增生组中, bcl-2(+)阳性细胞胞浆呈棕黄色, 数量较少, 散在分布 (PV6000 通用型二步法 × 400)

图4 低级别星形胶质细胞瘤组中, bcl-2(++)阳性细胞胞浆呈棕黄色, 数量增多, 密度增加 (PV6000 通用型二步法 × 400)