

血小板源性生长因子(PDGF)、血清反应因子(SRF)和波形蛋白在人脑胶质瘤中表达的临床意义

刘爱军 王树伟 徐翔[△] 孙立倩 洪铭岩 洪军

(河北省唐山市工人医院神经外科 唐山 063000)

【摘要】 目的 研究血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、血清反应因子(serum response factor, SRF)和波形蛋白(vimentin)在人脑胶质瘤中的表达及其临床意义。方法 采用免疫组化染色法检测 13 例正常脑组织和 70 例人脑胶质瘤组织中 PDGF-B、SRF 和波形蛋白的表达并分析其临床意义。结果 PDGF-B、SRF 和波形蛋白在人脑胶质瘤组织中高表达,阳性表达率分别为 67.14%、48.57%和 81.43%,差异有统计学意义($P < 0.05$);三者人脑胶质瘤中的表达与患者性别、年龄、肿瘤发生部位、肿瘤大小无关($P > 0.05$)。随着胶质瘤恶性程度增加,三者表达逐渐上调,其中 PDGF-B、波形蛋白在脑胶质瘤中的表达与肿瘤分级相关;相关性分析显示 PDGF-B 与 SRF、波形蛋白在脑胶质瘤中的表达有相关性($P < 0.05$)。结论 PDGF-B、SRF 和波形蛋白在脑胶质瘤的发生、发展中可能起到重要的调节作用,与肿瘤恶性程度具有一定的相关性。

【关键词】 胶质瘤; 血小板源性生长因子(PDGF); 血清反应因子(SRF); 波形蛋白; 免疫组化

【中图分类号】 R 739.4 **【文献标志码】** B **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2014.01.019

Expression and clinical significance of platelet-derived growth factor (PDGF), serum response factor (SRF) and vimentin in human gliomas

LIU Ai-jun, WANG Shu-wei, XU Xiang[△], SUN li-qian, HONG Ming-yan, HONG Jun

(Department of Neurosurgery, Tangshan People's Hospital, Tanshan 063000, Hebei Province, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the expression and clinical significance of platelet-derived growth factor (PDGF), serum response factor (SRF) and vimentin in human gliomas. **Methods** Seventy expressions of PDGF-B, SRF and vimentin protein from 70 cases of glioma tissue and 13 cases of normal brain tissue were measured by immunohistochemistry stain. The correlations were analyzed between the changes of PDGF, SRF and vimentin protein expressions and clinical biological behavior of glioma, including sex, age, tumor size and location, pathological grade. **Results** Immunohistochemical staining revealed that the positive rate of PDGF-B, SRF and vimentin were 67.14%, 48.57% and 81.43% respectively in glioma tissues, which were higher than those in normal brain tissues ($P < 0.05$). The expressions of PDGF-B, SRF and vimentin were not correlated with sex, age, tumor size and location ($P > 0.05$) and increased by malignancy of glioma. The positive rate of PDGF-B and vimentin were significantly higher in high-grade gliomas (III-IV) than those in low-grade gliomas (I-II) ($P < 0.05$). There is a positive correlation between PDGF-B and SRF or vimentin through spearman's and χ^2 test ($r = 0.246, P = 0.034; r = 0.347, P = 0.002$). **Conclusions** The up-regulation of PDGF-B, SRF and vimentin may play important roles in the occurrence and development of glioma.

[△]Corresponding author E-mail: xuxiang88899@sina.com

【Key words】 glioma; platelet-derived growth factor (PDGF); serum response factor (SRF); vimentin; immunohistochemistry

脑胶质瘤是颅内常见的、死亡率最高的原发性恶性肿瘤,1年生存率仅为30%左右^[1]。其具有高发病率、术后高复发性、高死亡率及低治愈率的特点,但发生机制目前尚未阐明,因此研究其发生、发展机制,选择有效的治疗靶点是目前该研究领域的难点和热点问题之一。血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor,PDGF)与脑胶质瘤血管形成密不可分,是脑胶质瘤发生、发展的基本条件之一,也是胶质瘤细胞获得侵袭性生长、转移的必要条件之一^[2]。血清应答因子(serum response factor,SRF)是一类重要的核转录因子,能够促进肿瘤细胞侵袭获得间质表型,促进其侵袭性,被认为是上皮-间质转化的重要调控因子^[3]。目前尚无SRF在脑胶质瘤中表达及其可能机制的报道。波形蛋白(vimentin)是一种重要的细胞骨架蛋白,属于中间纤维的波形纤维蛋白类,主要表达于成纤维细胞、内皮细胞和白细胞等。近年研究发现,波形蛋白作为一种肿瘤标志物,与肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移和预后密切相关^[4]。PDGF-B是否促进脑胶质瘤细胞SRF表达的上调,进而调控vimentin的表达,促进胶质瘤细胞侵袭和转移?本研究采用免疫组化染色法检测脑胶质瘤标本中PDGF、SRF、vimentin的表达,并分析其临床病理学意义,为研究脑胶质瘤发生、发展机制,选择合适的治疗靶点提供一定的实验基础和理论依据。

资料和方法

临床资料 收集河北省唐山市工人医院神经外科2009年9月至2012年9月手术切除并经病理证实的脑胶质瘤标本70例,所有患者术前均未接受放、化疗。其中男性43例,女性27例,年龄13~78岁(中位年龄43岁)。依据2000年WHO中枢神经系统胶质瘤分类标准分级:I、II级31例,III级27例,IV级12例。取外伤去骨瓣减压手术患者脑组织13例作为正常对照。所有标本采用4%甲醛固定,石蜡包埋,4 μm切片。切片均经唐山市工人医院病理科医师确认肿瘤类型、分类和级别。

试剂 PDGF-B(sc-7878)、SRF(sc-335),(美国Santa Cruz公司),波形蛋白(2707-1,美国

EPITOMICs公司),免疫组化试剂盒(PV-9000)和DAB显色液(ZLI-9031),(北京中杉金桥公司);磷酸盐缓冲液(PBS)、枸橼酸缓冲液及其他试剂均为国产分析纯。

免疫组化染色法 免疫组化染色法按试剂说明书进行。石蜡切片脱蜡至水,3% H₂O₂封闭内源性过氧化物酶,高压修复,一抗(1:200稀释)4℃过夜,分别滴加聚合物辅助剂和辣根酶标记的抗兔、鼠IgG多聚体。DAB显色,苏木素轻度复染。用PBS替代一抗作为阴性对照。

结果判定 PDGF-B和波形蛋白阳性染色主要定位于细胞质,SRF表达定位于细胞核,呈棕黄色或棕褐色。高倍视野下随机选取5个视野,每个视野计数100个肿瘤细胞,计算阳性细胞百分比。计分标准:0分,阳性细胞数<10%;1分,10%~25%;2分,26%~50%;3分,51%~75%;4分,>75%。染色强度评分标准:无色计0分;淡黄色计1分;棕黄色计2分;棕色或棕褐色计3分。以两者乘积作为阳性评判标准,其中4分以上定义为阳性。

统计学分析 采用SPSS 13.0统计软件进行统计分析。不同组别间PDGF-B、SRF及波形蛋白表达水平的比较采用 χ^2 检验,PDGF-B、SRF及波形蛋白之间相关性分析采用Pearson和Spearman相关系数法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

PDGF-B和波形蛋白主要定位于细胞质和细胞膜,呈棕黄色,核不着色,在脑胶质瘤细胞和血管内皮细胞中均有表达;SRF主要定位于细胞核,细胞质内亦有表达(图1)。PDGF-B、SRF及波形蛋白在脑胶质瘤中的阳性表达率均显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$,表1)。

PDGF-B、SRF和波形蛋白在脑胶质瘤中的表达与患者性别、年龄、肿瘤发生部位、肿瘤大小无关($P>0.05$,表2)。随着胶质瘤恶性程度增加,三者表达逐渐上调。其中PDGF-B在高级别脑胶质瘤(III-IV级)中的阳性表达率为78.95%(30/38),显著高于低级别脑胶质瘤(I-II级)的53.13%(17/32),差异有统计学意义($P<0.05$);波形蛋白在38

例高级别脑胶质瘤中 37 例波形蛋白表达阳性,阳性表达率为 97.37%,显著高于低级别脑胶质瘤的 62.50% (20/32),差异有统计学意义($P < 0.05$)。SRF 在高级别脑胶质瘤中的阳性表达率为 55.26% (21/38),高于低级别脑胶质瘤的 40.63% (13/32),但差异无统计学意义($P > 0.05$)。在 70 例脑胶质

瘤标本中有 27 例阳性共表达 PDGF-B 和 SRF,有 16 例均无表达,两者在脑胶质瘤中的表达呈正相关($r = 0.246, P = 0.034$)。在 70 例脑胶质瘤标本中有 43 例阳性共表达 PDGF-B 和波形蛋白,有 9 例均无表达,两者在脑胶质瘤中表达呈正相关($r = 0.347, P = 0.002$)。

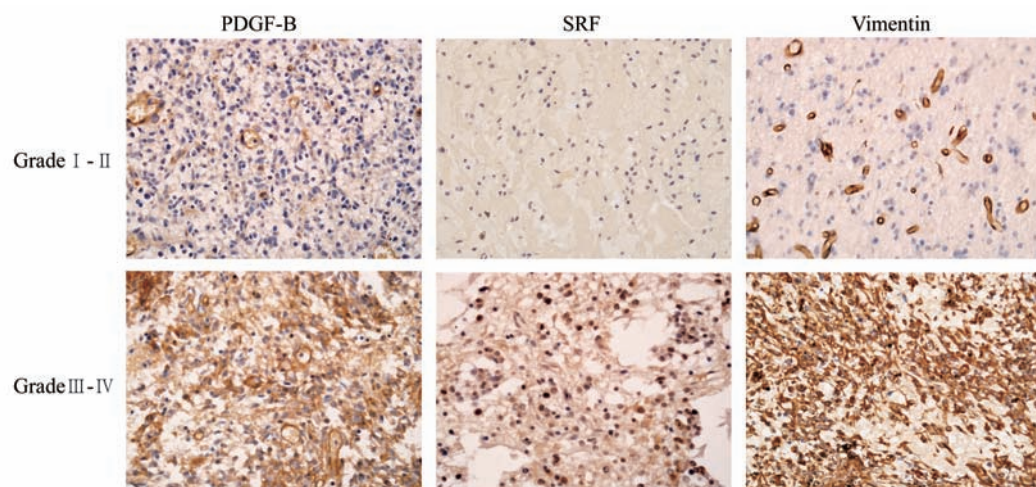


图 1 PDGF-B、SRF 和波形蛋白在脑胶质瘤组织中的阳性表达(免疫组化染色, $\times 400$)

Fig 1 The positive expressions of PDGF-B, SRF and vimentin in glioma tissues (IHC, $\times 400$)

表 1 PDGF-B、SRF 和波形蛋白在脑胶质瘤组织及正常脑组织中的表达

Tab 1 The expressions of PDGF-B, SRF and vimentin in glioma tissues and normal brain tissues

Group	n	PDGF-B			SRF			Vimentin					
		+	(%)	χ^2	P	+	(%)	χ^2	P	+	(%)	χ^2	P
Normal brain	13	4	(30.77)	6.123	0.013	2	(15.38)	4.196	0.027	0	(0)	30.114	0.000
Glioma	70	47	(67.14)			34	(48.57)			57	(81.43)		

表 2 PDGF-B、SRF 和波形蛋白在脑胶质瘤中表达的临床意义

Tab 2 The correlation between the expression of PDGF, SRF and vimentin in glioma tissues and clinical significance

Clinical significance	n	PDGF			SRF			vimentin		
		+	χ^2	P	+	χ^2	P	+	χ^2	P
Sex										
Male	43	31			23			35		
Female	27	16	1.238	0.266	11	1.079	0.299	22	0.000	0.993
Age (y)										
≥ 50	45	28			27			37		
< 50	25	19	1.383	0.240	17	0.441	0.507	20	0.047	0.828
Site of tumor										
Lobi frontalis	34	23			18			29		
Lobi temporalis	25	17	0.073	0.964	9	1.667	0.435	21	2.394	0.302
Lobi parietalis	11	7			5			7		
Size of tumor (cm)										
≤ 5	51	35			25			43		
> 5	19	12	0.188	0.665	9	0.015	0.902	14	1.034	0.309
Pathological grade										
I + II	32	17			13			20		
III + IV	38	30	5.250	0.022	21	1.490	0.222	37	13.966	0.000

讨 论

研究显示 PDGF-B 参与胶质瘤的发生发展的主要机制包括:(1)促进脑胶质瘤细胞增殖;(2)与转化生长因子、血管内皮生长因子相互作用,通过自分泌及旁分泌作用,促进胶质瘤新生血管形成;(3)诱导胶质瘤细胞恶性转化,纤连蛋白表达上调,同时伴随神经胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)表达下调,而 GFAP 表达下调提示胶质瘤细胞分化程度降低,常与波形蛋白表达上调相关;(4)能够通过 Notch 信号的活化使胶质瘤细胞获得肿瘤干细胞表型^[5-6]。研究提示无论是在人少突胶质细胞瘤还是在大鼠胶质瘤模型中,PDGF 信号的表达水平均能够预测胶质瘤的等级和恶性程度,且 PDGF-B 多表达于高级别脑胶质瘤,提示 PDGF-B 涉及胶质瘤从低级别向高级别的转化。

SRF 是一类进化上高度保守的 MADS 转录因子家族成员,能够与 60 多个辅因子结合,形成蛋白复合物来控制依赖于 CarG-盒的 DNA 转录。在多种肿瘤中均发现 SRF 高表达,包括食管癌^[7]、胃癌^[8]、结肠癌、肝癌^[9]、乳腺癌和甲状腺癌。体外实验也发现,过表达 SRF 能够促进肿瘤细胞增殖,使其获得间质表型(即上皮细胞表达波形蛋白),迁移和侵袭能力显著提高,采用基因沉默抑制 SRF 表达则能够引起相反的效应^[7-11],说明 SRF 在肿瘤中,尤其是上皮来源肿瘤中能够诱导上皮细胞向间质细胞转化,以表达波形蛋白为特征,促进肿瘤细胞的迁移、浸润和转移。

在神经系统发育中,波形蛋白与 GFAP 均属于中间丝结构蛋白,其中波形蛋白主要表达于间充质来源的细胞,而 GFAP 则是胶质细胞特异性分化标志物,两者在胶质细胞发育、分化不同阶段的表达具有差异性,一般以 GFAP 作为胶质细胞成熟的标志。在体外培养的脑胶质瘤细胞中,原代培养有 30%~70%可表达 GFAP,4 代以后 GFAP 表达缺失,细胞均表达波形蛋白,提示波形蛋白可能是脑胶质瘤细胞恶性转化的指标之一^[12-13]。

在本研究中,PDGF-B、SRF 和波形蛋白在脑胶质瘤中高表达,且与胶质瘤级别相关,提示三者脑胶质瘤发生、发展中起到重要的调控作用,但具体机制尚不明确。有研究发现,以 PDGF-B 刺激 T98G 胶质瘤细胞株,能够通过 PI3K 和 ERK 信号活化 SRF,促

进其转录调控^[14]。PDGF-B 可能通过促进脑胶质瘤细胞 SRF 表达的上调,诱导其靶蛋白——波形蛋白的表达,从而使胶质瘤细胞侵袭性增加,促进其转移并导致脑胶质瘤预后不良,PDGF-β、SRF 和波形蛋白有可能是今后胶质瘤治疗的靶蛋白之一。

参 考 文 献

- [1] Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(19): 6892-6899.
- [2] Nazarenko I, Hede SM, He X, et al. PDGF and PDGF receptors in glioma [J]. *Ups J Med Sci*, 2012, 117(2): 99-112.
- [3] Fan L, Sebe A, Péterfi Z, et al. Cell contact-dependent regulation of epithelial-myofibroblast transition via the rho-rho kinase-phospho-myosin pathway [J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(3): 1083-1097.
- [4] Zhu OS, Rosenblatt K, Huang KL, et al. Vimentin is a novel AKT1 target mediating motility and invasion [J]. *Oncogene*, 2011, 30(4): 457-470.
- [5] Guo P, Hu B, Gu W, et al. Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment [J]. *Am J Pathol*, 2003, 162(4): 1083-1093.
- [6] Jiang Y, Boije M, Westermark B, et al. PDGF-B can sustain self-renewal and tumorigenicity of experimental glioma-derived cancer-initiating cells by preventing oligodendrocyte differentiation [J]. *Neoplasia*, 2011, 13(6): 492-503.
- [7] Xi H, Hong X, Min Z, et al. Serum response factor is overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma and promotes Eca-109 cell proliferation and invasion [J]. *Oncol Lett*, 2012, 5(3): 819-824.
- [8] Zhao M, Xu H, He X, et al. Expression of serum response factor in gastric carcinoma and its molecular mechanisms involved in the regulation of the invasion and migration of SGC-7901 cells [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2012, 28(2): 146-152.
- [9] Kwon CY, Kim KR, Choi HN, et al. The role of serum response factor in hepatocellular carcinoma: implications for disease progression [J]. *Int J Oncol*, 2010, 37(4): 837-844.
- [10] Park MY, Kim KR, Park HS, et al. Expression of the serum response factor in hepatocellular carcinoma: implications for epithelial-mesenchymal transition [J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(6): 1309-1315.
- [11] Kwon CY, Kim KR, Choi HN, et al. The role of serum response factor in hepatocellular carcinoma: implications for disease progression [J]. *Int J Oncol*, 2010, 37(4): 837-844.

(下转第 132 页)