

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01152

• 短篇论著 •

人脑胶质瘤组织 CD105 的表达及意义

Expression of CD105 in human glioma tissues and its significance

徐舒¹, 岳志健^{2*}, 周晓平², 王建军³, 王来兴², 刘建民²

1. 南京中医药大学附属常州市中医医院神经外科, 常州 213003

2. 第二军医大学长海医院神经外科, 上海 200433

3. 第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨人脑胶质瘤组织 CD105 mRNA 和蛋白的表达及意义。**方法** 应用组织芯片结合免疫组化技术检测 152 例脑胶质瘤(WHO I 级 4 例, II 级 32 例, III 级 68 例, IV 级 48 例)与 20 例正常脑组织中 CD105 蛋白的表达;应用实时荧光定量 PCR 技术研究 22 例胶质瘤(II 级 7 例, III~IV 级 15 例)与 4 例正常脑组织中的 CD105 mRNA 表达。所得结果采用秩和检验、*t* 检验。**结果** 脑胶质瘤组 CD105 mRNA 表达高于正常组($P=0.0322$), III~IV 级组高于 II 级组($P<0.05$)。CD105 标记的微血管密度(MVD)在 III~IV 级组高于 I~II 级组($P<0.05$), I~II 级组高于正常组($P<0.05$)。**结论** 人脑胶质瘤组织 CD105 mRNA 在转录水平已上调, CD105 的表达与胶质瘤病理分级有关。

[关键词] 神经胶质瘤; CD105; 微血管密度; 免疫组织化学; 组织芯片; 聚合酶链反应

[中图分类号] R 739.41 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2010)10-1152-03

新生血管的生成与肿瘤的生长、侵袭和转移关系密切, 胶质瘤组织内的血管密度与其恶性程度及预后正相关。随着一些可以直接靶向作用于血管内皮细胞新型药物的出现, 抗血管生成治疗已成为胶质瘤治疗的一个方向。采用 CD105 (endoglin) 标记肿瘤中新生血管具有特异性^[1-2], 与一些肿瘤的诊断、分级、转移或预后有关^[3-8]。胶质瘤 CD105 表达及意义是目前研究的热点, 相关结论仍存有争议^[9]。因此, 本研究探讨各级胶质瘤及正常脑组织中 CD105 基因及蛋白表达的差异及意义, 为脑胶质瘤以 CD105 为靶点的抗血管生成治疗提供初步依据。

1 材料和方法

1.1 标本来源及一般资料

1.1.1 组织芯片及免疫组化染色标本 收集第二军医大学长海医院病理科 2002~2008 年部分人脑胶质瘤标本石蜡包埋组织, 另取内减压术中正常脑组织作为对照。两张组织芯片中包含胶质瘤位点 152 例, 正常脑白质组织位点 20 例。按 2007 年 WHO 中枢神经系统肿瘤分类及分级标准, 经病理组织学确诊, H-E 染色复核。其中 I 级 4 例(毛细胞型星形细胞瘤), II 级 32 例(纤维型星形细胞瘤 20 例、肥胖型星形细胞瘤 3 例、少突-星形细胞瘤 7 例、少突胶质细胞瘤 2 例), III 级 68 例(间变性星形细胞瘤 57 例、间变性少突-星形胶质细胞瘤 4 例、间变性少突胶质细胞瘤 4 例、间变性室管膜瘤 2 例、间变性脉络丛乳头状瘤 1 例), IV 级 48 例(胶质母细胞瘤 47 例、髓母细胞瘤 1 例)。小鼠抗人 CD105 抗体 M-0180 购自 Dako 公司, 工作浓度 1:30。

1.1.2 实时荧光定量 PCR 标本 收集第二军医大学长海医院神经外科 2005~2008 年部分人脑胶质瘤手术标本及内减压术中所取脑白质, 液氮内保存。三复孔法严格测定, 3 次结果有差异的样本予以剔除, 只留下部分数值可信度大者: 正常脑组织 4 例, 胶质瘤 22 例(II 级 7 例、III~IV 级 15 例, 按 2007 年 WHO 中枢神经系统肿瘤分类及分级标准, 经病理组织学确诊)。

1.2 组织芯片 观察 H-E 切片挑选肿瘤组织; 观察并根据 H-E 切片确定肿瘤细胞密集的部位, 避开大片的出血与坏死区域, 加以标记; 制作大小 45 mm×20 mm×20 mm 的空白蜡块; 利用组织芯片构建仪在空白蜡块中打孔(直径 2 mm), 而后在选取的组织蜡块中穿取标记组织(直径 2 mm), 准确放入空白蜡块的小孔中; 按序依次操作, 直至将有所需组织标本种植于此空白蜡块中, 加以记录; 应用石蜡切片机进行连续切片, 低温保存。组织芯片常规脱蜡至水, 0.3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶, 微波抗原修复 10 min, DAB 显色, 苏木精复染, 以扁桃体组织作为 CD105 阳性对照, PBS 作空白对照。结果判定: 参考文献^[10]方法, 于瘤组织内 CD105 阳性即胞膜或胞质染成棕黄色的单个内皮细胞或内皮细胞簇计为 1 个血管, 血管间要有明显的分离, 排除非特异着色的炎症细胞。每例在低倍镜下选择微血管最丰富区, 于高倍视野(×400)下计数, 记为该例的微血管密度(MVD)值。不同组别胶质瘤的 MVD 按是否正态分布分别用($\bar{x} \pm s$)或 $M(QR)$ 表示, 分 5 组(正常、I 级、II 级、III 级、IV 级)或分 3 组(正常、I~II 级、III~IV 级)分别进行秩和检验, 两两比较。

[收稿日期] 2010-01-08 **[接受日期]** 2010-09-09

[作者简介] 徐舒, 硕士, 主治医师. E-mail: xuxhu0000@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873453, E-mail: yuezj638@163.com

1.3 实时荧光定量 PCR 采用 TRIzol 一步法从冷冻组织中提取总 RNA, 行琼脂糖凝胶电泳检测, 用紫外分光光度仪检测 RNA 纯度。mRNA 反转录成 cDNA 并进行检测, 引物序列由上海赛百盛公司合成, CD105-F: 5'-CAC TAG CCA GGT CTC GAA GG-3', CD105-R: 5'-CTG AGG ACC AGA AGC ACC TC-3', 扩增片段长度为 165 bp; β -actin 作为内参照。PCR 引物序列如下, β -actin-F: 5'-AGG GGC CGG ACT CGT CAT ACT-3', β -actin-R: 5'-GGC GGC ACC ACC ATG TAC CCT-3', 扩增片段长度为 202 bp。PCR 反应混合物: cDNA 0.5 μ l, 引物对 0.5 μ l, SYBR Mix 10 μ l, ddH₂O 9 μ l。使用严格的三复孔法测定, 每一标本测定 3 次, 同样条件下同时测定, 数值相差大则弃此例标本, 数值接近方才取其平均值而用, 尽可能排除系统及操作误差。扩增条件: 95°C 预变性 2 min, 95°C 变性 10 s, 60°C 退火 40 s, 72°C 延伸 15 s, 共 40 个循环。参照文献^[11]方法计算样本的 $\Delta\Delta$ Ct 值(样本同内参的对数比值)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件, 采用秩和检验(Kruskal-Wallis 法、Nemenyi 法、Wilcoxon 法)、 t' 检验。

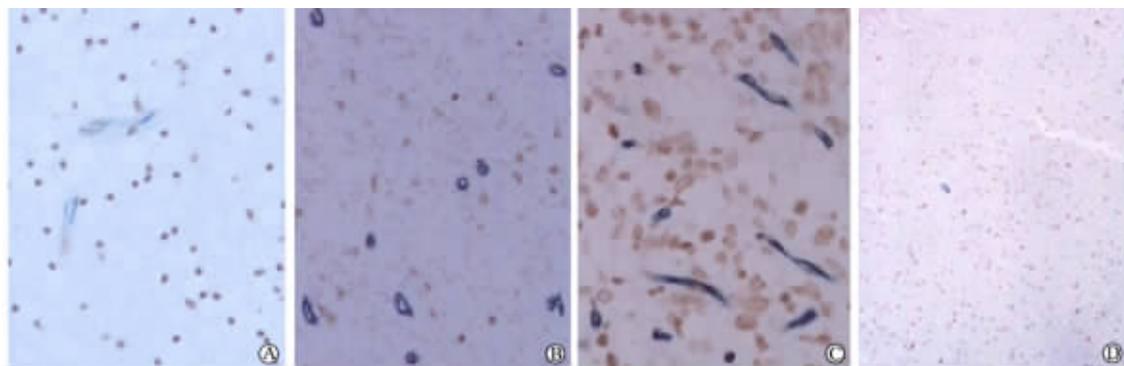


图 1 胶质瘤及正常脑组织中 CD105 的表达(免疫组化 EnVision 法)

A: 毛细胞型星形细胞瘤(I级); B: 间变性少支星形细胞瘤(III级); C: 胶质母细胞瘤(IV级); D: 正常脑组织。Original magnification: $\times 200$ (A,B,C); $\times 40$ (D)

2.2 实时荧光定量 PCR 检测结果 扩增曲线拟合良好, Ct 值接近, 说明 PCR 反应体系稳定, 结果可靠, 熔解曲线只有单一峰型, 没有引物二聚体等非特异性扩增产生, 说明引物设计合理, PCR 反应条件较理想, 无基因组来源 DNA 模板的污染扩增。有效数据 26 例, 3 组皆为正态分布, 但方差不齐: 正常 4 例(54.55 \pm 82.33); II 级 7 例(104.33 \pm 48.93); III~IV 级 15 例(1 560.89 \pm 1 855.52)。趋势是随肿瘤级别增高而升高。经秩和检验, 两两比较, 仅正常组与 III~IV 级组有差别($P<0.05$)。若将正常组与合并的肿瘤组(II~IV 级, 非正态分布)经秩和检验, 有差异($P=0.0322$)。II 级组与 III~IV 级组经 t' 检验, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

CD105 是一种同型二聚体的膜结合性糖蛋白, 是转化生长因子 β (TGF- β)受体复合物成分之一。它是内皮细胞表面与增殖相关的膜抗原, 在血管内皮细胞中有表达, 在有血管新生的组织中高表达且具特异性, 是内皮细胞增殖的相关标志物。Kumar 等^[12]在乳腺癌中的研究发现, 相同部位的

2 结果

2.1 组织芯片结合免疫组化染色结果 CD105 阳性细胞着色定位于血管内皮细胞胞膜与胞质, 胶质瘤组织微血管被染成棕色, 阳性内皮细胞多为单个细胞或呈条索状, 或为多个簇集的细胞团。阳性血管多为管腔不完整的微小血管。少量能形成管腔但也极不规则, 且多为一层内皮细胞或含有少量结缔组织, 未见平滑肌组织。在低级别中阳性表达少且为浅棕色; 高级别中阳性表达多且为深棕色; 在正常脑组织中亦有表达, 但较少, 色浅(图 1)。在一些较大的、管壁较厚的血管中亦有表达。

各组 MVD 按是否正态分布分别用 $\bar{x}\pm s$ 或 $M(QR)$ 表示, 分 5 组(正常、I 级、II 级、III 级、IV 级)数据为 2(2)、5.00 \pm 4.16、4(4.5)、8(9)、8.5(11); 分 3 组(正常、I~II 级、III~IV 级)数据为 2(2)、4(4.5)、8(10)。分别进行秩和检验, 两两比较。结果表明: CD105 标记的 MVD 在 III~IV 级组高于 I~II 级组($P<0.05$), I~II 级组高于正常组($P<0.05$)。

CD105 阳性新生血管 CD34 不着色, 而 CD105 阴性的正常血管 CD34 却表现为阳性。Yu 等^[13]证实抗 CD105 的出现更增加了对肿瘤组织中新生微血管检出的准确率, 它不仅包含血管数量的变化, 更含有质量的改变。本研究采用组织芯片技术检测 CD105 的表达。它使尽可能多的标本研究处在一个平行的标准下, 能够最大限度地避免操作及统计中造成的误差。CD105 mRNA 的检测使用实时荧光定量 PCR 技术, 灵敏度高, 较常用的终点定量方法更加准确, 且本实验使用三复孔法保证数据的可靠性。

本研究发现, CD105 阳性的胶质瘤组织微血管形态多倾向于新生血管。本研究在较大样本基础上发现随着胶质瘤级别的增高, CD105 标记的 MVD 总体上有增大趋势, 但 I 级与 II 级间、III 级与 IV 级间比较接近, 两两比较有差异的仅占少数, 其差异性不如已有文献^[9]显著。经过组间合并, 可以发现正常组、I~II 级组、III~IV 级组的 MVD 逐渐增高, 两两之间皆有差异。本研究发现正常脑组织存在少量 CD105 阳性血管。本研究结果表明胶质瘤中确实存在着活跃的血管生成, 而且随着肿瘤病理级别的升高, 血管增生更加活跃,

微血管密度更大,这说明 CD105 是一个很好的新生血管的指标,它能够很好地对恶性胶质瘤中丰富的新生血管进行染色,以 CD105 标记的 MVD 与肿瘤恶性度相关^[14]。

CD105 mRNA 的检测结果显示,正常组与肿瘤组的差异、肿瘤 II 级组与 III~IV 级组的差异都有统计学意义。这说明 CD105 mRNA 在胶质瘤中比正常脑组织高,在高级别肿瘤较低级别肿瘤高,其相关性与蛋白表达分析结果一致。这就说明胶质瘤中 CD105 至少在转录水平就已开始进行调控,其与胶质瘤的发生、发展关系密切。CD105 标记的 MVD 在一定程度上能够反映脑胶质瘤患者的恶性进展。对其进行检测可更全面地反映胶质瘤的临床病理特征、预测治疗效果、进行预后分析。进一步研究其调控血管生成的机制,以其信号通路中的某些因子为靶点,抑制转录或翻译的活性,从而抑制靶基因的表达,将可能为胶质瘤的治疗开辟新的途径。

综上所述,本研究从蛋白与基因水平初步明确了 CD105 在脑胶质瘤中的上调,丰富了其在肿瘤学中的研究,为探讨其作用机制与临床治疗提供了初步依据。

[参考文献]

- [1] Wikström P, Lissbrant I F, Stattin P, Egevad L, Bergh A. Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer[J]. *Prostate*, 2002, 51: 268-275.
- [2] Fonsatti E, Jekunen A P, Kairemo K J, Coral S, Snellman M, Nicotra M R, et al. Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: *in vivo* evidence in a canine mammary carcinoma model[J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6: 2037-2043.
- [3] Benetti A, Berenzi A, Gambarotti M, Garrafa E, Gelati M, Dessy E, et al. Transforming growth factor-beta1 and CD105 promote the migration of hepatocellular carcinoma-derived endothelium[J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 8626-8634.
- [4] Chiba H, Ishii G, Ito T K, Aoyagi K, Sasaki H, Nagai K, et al. CD105-positive cells in pulmonary arterial blood of adult human lung cancer patients include mesenchymal progenitors[J]. *Stem Cells*, 2008, 26: 2523-2530.
- [5] Oxmann D, Held-Feindt J, Stark A M, Hattermann K, Yoneda T, Mentlein R. Endoglin expression in metastatic breast cancer

cells enhances their invasive phenotype[J]. *Oncogene*, 2008, 27: 3567-3575.

- [6] Svatek R S, Karam J A, Roehrborn C G, Karakiewicz P I, Slawin K M, Shariat S F. Preoperative plasma endoglin levels predict biochemical progression after radical prostatectomy[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 3362-3366.
- [7] Sandlund J, Hedberg Y, Bergh A, Grankvist K, Ljungberg B, Rasmuson T. Endoglin (CD105) expression in human renal cell carcinoma[J]. *BJU Int*, 2006, 97: 706-710.
- [8] Chien C Y, Su C Y, Hwang C F, Chuang H C, Hsiao Y C, Wu S L, et al. Clinicopathologic significance of CD105 expression in squamous cell carcinoma of the hypopharynx[J]. *Head Neck*, 2006, 28: 441-446.
- [9] 王艳芬, 丁永玲, 李家驹, 周晓明. Ang-2、CD105 和 CD34 在脑胶质瘤中的表达及生物学意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2008, 16: 23-26.
- [10] Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, Kawano Y, Miyahara R, Li M, et al. Correlation between apoptotic index and angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between CD105 and CD34 as a marker of angiogenesis[J]. *Lung Cancer*, 2003, 39: 289-296.
- [11] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method[J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [12] Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang J M, et al. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis[J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 856-861.
- [13] Yu J X, Zhang X T, Liao Y Q, Zhang Q Y, Chen H, Lin M, et al. Relationship between expression of CD105 and growth factors in malignant tumors of gastrointestinal tract and its significance [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9: 2866-2869.
- [14] Takahashi N, Kawanishi-Tabata R, Haba A, Tabata M, Haruta Y, Tsai H, et al. Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7: 524-532.

[本文编辑] 贾泽军