

Stathmin 在微血管内皮细胞的表达与胶质瘤恶性程度关系*

秦向英¹ 乔万臣² 慕璐岩² 宋玉文² 汤加斌² 董白晶²胡 炜² 王 策² 赵天书² 李 利² 赵佳鑫² 刘晓谦^{1△}

(1 哈尔滨医科大学 黑龙江 哈尔滨 150001 2 哈尔滨医科大学附属第四临床医院 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:检测 Stathmin 在正常脑组织及不同级别胶质瘤微血管内皮细胞中的表达情况。**方法:**利用结合 CD105 单克隆抗体的免疫磁珠内皮细胞分选系统特异性分选出 68 例胶质瘤微血管内皮细胞(其中低级别胶质瘤(WHO 分级 I-II) 24 例,高级别胶质瘤(WHO 分级 III-IV) 44 例)和 20 例正常脑组织微血管内皮细胞。应用免疫组化、RT-PCR 和 Western blot 检测 Stathmin 在胶质瘤微血管内皮细胞和正常脑组织微血管内皮细胞中的表达。**结果:**免疫组化证实 Stathmin 在正常脑组织微血管内皮细胞、低级别胶质瘤微血管内皮细胞和高级别胶质瘤微血管内皮细胞的表达百分率分别是 20%, 66% 和 95% ($P < 0.05$)。RT-PCR 和 Western blot 法检测显示, Stathmin 在胶质瘤微血管内皮细胞中的表达明显增高。低级别胶质瘤组、高级别胶质瘤组分别与正常组比较, 均有显著性差异($P < 0.01$); 且低级别胶质瘤组与高级别胶质瘤组比较, 有显著性差异($P < 0.01$), 随着胶质瘤恶性程度的增加, Stathmin 表达上调, 具有统计学意义。**结论:** Stathmin 在脑胶质瘤微血管内皮细胞中表达随肿瘤恶性程度增高而增加, 可能为脑胶质瘤的生物治疗提供一个新靶点。

关键词 脑胶质瘤; Stathmin; 微血管内皮细胞; 表达

中图分类号 R739.4 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)19-3628-04

Stathmin Expression in Microvascular Endothelial Cells Is Associated with Glioma Grade*

QIN Xiang-ying¹, QIAO Wan-chen², MU Lu-yan², SONG Yu-wen², TANG Jia-bin², DONG Bai-jing²,HU We², WANG Ce², ZHAO Tian-shu², LI Li², ZHAO Jia-xin², LIU Xiao-qian^{1△}

(1 Harbin medical university, Harbin 150001, China; 2 The Fourth affiliated hospital of Harbin Medical University,

Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate stathmin expression in human gliomas and normal brain specimens derived microvessels endothelial cells (GDMEC). **Methods:** Microvascular endothelial cells from human gliomas (GBMEC, n=68) and normal brain (NBMEC, n=20) were purified by incubating with magnetic beads coated with anti-CD105 antibody. There were 24 cases of low grade gliomas (WHO I-II grade) and 44 high grade gliomas (WHO III-IV grade). Expression rates and cellular distribution of stathmin in GDMEC and NBMEC were also investigated by immunohistochemistry. Semiquantitative RT-PCR and Western blot were used for comparing the expression of stathmin in GDMEC and NBMEC. **Results:** Immunohistochemical analysis demonstrated that the rates of stathmin expression in NBMEC, low grade GDMEC, and high grade GDMEC were 20%, 66%, and 95%, respectively ($P < 0.05$). The expression of stathmin in GDMEC was higher than that in NBMEC. The difference between I-II grade, III-IV grade and normal human brain tissues were significant ($P < 0.01$) respectively. The difference between I-II grade and III-IV grade was significant ($P < 0.01$). **Conclusions:** With the rise of pathological grades of glioma, the expression of stathmin increased, and it may represent a novel tumor-related target for the therapy of malignant gliomas.

Key words: Glioma; Stathmin; Endothelial cells; Expression

Chinese Library Classification(CLC): R739.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)19-3628-04

前言

胶质瘤是最常见的颅内恶性肿瘤,在国内约占原发性颅内肿瘤的 44.69%^[1]。胶质瘤的发生与发展不但与肿瘤细胞的恶性增殖有直接关系,也与肿瘤血管的侵袭性生长也有密切关系。Stathmin 蛋白是一种普遍存在于胞质中的磷酸蛋白,通过磷酸化/去磷酸化作用调节微管系统的动力学平衡从而调控细胞

周期,在细胞增殖和分化及肿瘤发生起重要的作用^[2-3]。但 Stathmin 在人胶质瘤微血管内皮细胞 (GDMEC) 和正常脑组织微血管内皮细胞 (NBMEC) 的表达情况尚未见报道引文。迄今为止,只有几例来自人脑肿瘤源性和正常脑组织源性微血管内皮细胞的研究报道^[4-7]。本研究建立了一个高效、高产的分离 GDMEC 和 NBMEC 的方法,并且检测 Stathmin 在 GDMEC 和 NBMEC 的表达情况。

* 基金项目 黑龙江省人力资源和社会保障厅归国留学人员重点资助项目

作者简介 秦向英,男,硕士,胶质瘤的相关研究, Tel:15804660235, E-mail:xiaoying369ok@163.com

△通讯作者 刘晓谦, E-mail:liuxiaoqian@vip.163.com

(收稿日期 2011-11-14 接受日期 2011-12-10)

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集哈尔滨医科大学附属第四医院 2009 年 11 月至 2010 年 8 月手术切除的 68 例胶质瘤标本及 20 例颅脑损伤或高血压脑出血需行内减压术切除的正常脑组织。其中 68 例胶质瘤由 30 例男性和 38 例女性组成,年龄范围从 13 岁到 74 岁,平均年龄为 39.0 岁。其中 20 例正常脑组织,由 12 例男性和 8 例女性组成,年龄范围从 20 岁到 45 岁,平均年龄为 31 岁。组织学诊断由哈尔滨医科大学第四附属医院病理系科确定。根据 2007 年最新确定、修改的 WHO 神经系统肿瘤分类标准,对所有肿瘤进行组织学分类和分级:低级别胶质瘤(I~II 级)12 例,高级别胶质瘤(III~IV 级)22 例。所有患者均为第一次手术,术前均未行任何抗肿瘤治疗。收集到的每一例标本分成两部分,一部分做成石蜡切片后做免疫组化,另一部分用来分离微血管内皮细胞。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组化 组织标本经 4%多聚甲醛固定,脱水,蜡块包埋,切片,SP 染色法检测 Stathmin 的表达(兔抗人 Stathmin 抗体,Cell Signal Tech),免疫组化结果判定以胞浆出现棕黄色颗粒为阳性反应,免疫组化结果综合微血管内皮细胞阳性范围及阳性强度进行分析:判定阳性细胞百分比 <10%为阴性表达,阳性细胞百分比 >10%为阳性表达。

1.2.2 GDMEC 和 NBMEC 分离、纯化和培养 (1)无菌条件下,

组织剪碎,800 rpm 离心 5 min 弃上清,重复洗涤一次。(2)0.25%胰酶消化液 37 °C 水浴振荡 20-30 min。(3)1000 rpm 离心 5 min,收集沉淀,用 PBS 重悬沉淀。(4)无菌钢网(150 目)过滤组织悬液,收集网上沉淀。(5)37 °C 水浴振荡,1mg/ml 胶原酶消化 1-2 h,离心弃上清。(6)加入 DMEM 培养液(Invitrogen 公司),移入培养瓶,5%CO₂ 孵箱 37 °C 培养。(7)48 h 后换液除去未贴壁细胞及细胞碎片,每 2 天换液一次至细胞接近长满瓶底。(8)运用 MACSCD105MicroBeads 免疫磁珠分选系统(德国美天旎)分选微血管内皮细胞。(9)纯化 GDMEC 和 NBMEC 用 DMEM 培养液,置 5%CO₂ 孵箱 37 °C 培养,每 2 天换液一次。(10)微血管内皮细胞 FVIII-Rag 免疫细胞化学染色,采用 ENVISON+TM 免疫组化试剂盒。

1.2.3 RT-PCR 检测 Stathmin 在微血管内皮细胞中 mRNA 的水平 (1)TRIzol 法抽提总 RNA。(2)两步法 RT-PCR 序列见表 1,序列由上海生工公司设计合成。(3)RT-PCR 结果分析:经 1.5g/L 琼脂糖凝胶电泳,采用 FlourChem V 2.0 凝胶成像分析系统摄像并分析结果。

1.2.4 Western Blot 检测 Stathmin 在微血管内皮细胞中蛋白表达 (1)处于对数期生长的细胞,裂解提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。(2)用 10%的聚丙烯酰胺凝胶电泳,经 2 小时 50V 硝酸纤维素膜转印,封闭,一抗、二抗孵育,碱性磷酸酶显色法显色。(3)采用 FlourChem V 2.0 凝胶成像分析系统,于可见光下采集底片上的蛋白条带图像,通过与相应 β -actin 条带密度比较,计算各个条带密度相对比值,求出其比值。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 The sequences of primer for RT-PCR

Gene	Sequences
GAPDH	F: 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACGG-3'
	R: 5'-CCTGGAAGATGGTGTATGGGATT-3'
Stathmin	F: 5'-ACTGCCTGTGCTTGTCT-3'
	R: 5'-GTCTCGTCAGCAGGGTCT-3'

1.2.5 统计学分析 采用 SPSS11.5 统计软件进行分析,计量资料的比较采用单因素方差分析及 t 检验,所得结果用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。临床病理资料等计数资料分析采用 χ^2 检验和 Fisher 确切概率法,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 微血管内皮细胞鉴定

胶质瘤微血管内皮细胞第 VIII 因子相关抗原免疫细胞化学测定 99%的微血管内皮细胞染色阳性(按每高倍视野阳性细胞百分比 $n=5$),阳性染色位于细胞浆和核周,呈棕褐色,核阴性(图 1)。FVIII-Rag 在成纤维细胞及平滑肌细胞中不表达。FVIII-Rag 染色阳性的还有巨核细胞和血小板,但这两种细胞都可以从形态上与微血管内皮细胞区别。

2.2 Stathmin 在微血管内皮细胞中的表达 (S-P 法)

Stathmin 蛋白表达阳性信号定位于微血管内皮细胞的胞浆,呈浅黄、棕黄或棕褐色阳性颗粒(图 2)。Stathmin 蛋白表达

结果显示,其在正常脑组织组、I-II 级组及 III-IV 级组的阳性表达率分别为 20%、66%、95%,呈逐渐上升趋势。经统计学分析(表 2)显示,正常脑组织分别与胶质瘤级组比较,有显著性差异($P < 0.001$);I-II 级组与 III-IV 级组比较,有显著差异($P < 0.05$)。

2.3 RT-PCR 检测 Stathmin 在微血管内皮细胞中 mRNA 的水平

RT-PCR 法检测发现,胶质瘤组织在 450bp 附近有明显表达的条带(图 3)。采用凝胶成像及分析系统,用每一个样本的条带灰度值与相应样本 GAPDH 的条带灰度值相比,求出其比值,在正常脑组织组值为 0.33 ± 0.14 、胶质瘤组值为 0.84 ± 0.23 、I-II 级组值为 0.67 ± 0.20 、III-IV 级组值为 0.89 ± 0.16 ,经统计分析显示, I-II 级组、III-IV 级组分别与正常脑组织组比较,差异均有显著性($P < 0.01$);I-II 级组与 III-IV 级组比较,差异有显著性($P < 0.01$)。

2.4 Western Blot 检测 Stathmin 在微血管内皮细胞中蛋白表达

Western blot 法检测发现,胶质瘤组织在 19kd 附近有明显蛋白表达的条带(图 4)。采用凝胶成像及分析系统,用每一个

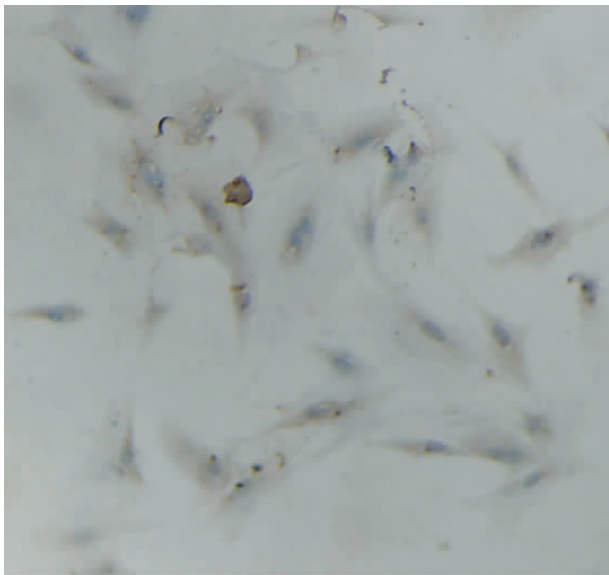


图1 GDMEC 的 FVIII-Rag 免疫细胞化学染色(显微镜× 400)
Fig. 1 Immunohistochemical staining for FVIII-Rag in cultured GDMEC
(original magnification 400 ×)

样本的条带灰度值与相应样本 β -actin 的条带灰度值相比, 求出其比值, 在正常脑组织组值为 0.44 ± 0.25 、胶质瘤组值为 0.95 ± 0.34 、I - II 级组值为 0.78 ± 0.31 、III-IV 级组值为 $0.98 \pm$

0.25, 经统计分析显示, I - II 级组、III-IV 级组分别与正常脑组织组比较, 差异均有显著性 ($P < 0.01$); I - II 级组与 III-IV 级组比较, 差异有显著性 ($P < 0.01$)。

3 讨论

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤, 临床治疗主要以手术切除, 辅以放化疗, 即便如此肿瘤仍有较高复发率, 预后较差, 是神经外科治疗中棘手的难治的肿瘤之一。Stathmin 是一种微管不稳定蛋白, 在细胞周期的不同阶段通过磷酸化和去磷酸化作用来调节细胞微管系统动力平衡, 来调控细胞的增殖、分化活性等生物学行为。已有文献报道, stathmin 基因多种实体恶性肿瘤表达上调, 与肿瘤发生和发展有着密切关系^[6-9]。前期实验已证实, Stathmin 在脑胶质瘤中高表达, 并随胶质瘤级别升高而增加^[10]。

1971 年, Folkman 最早提出实体肿瘤的发展依赖于血管生成, 并进一步提出通过抑制肿瘤微血管生成治疗肿瘤的学说^[11]。研究认为肿瘤的生长分为 2 个阶段: 第 1 阶段为血管前期, 无血管生成提供营养, 肿瘤缓慢生长; 第 2 阶段从新生血管形成开始, 称为血管期。肿瘤血管生成为肿瘤提供了营养, 肿瘤迅速增长, 向周围组织浸润, 并可能发生转移^[8]。可见胶质瘤在恶性增殖、侵袭性生长过程中, 增殖的微血管起重要作用。Mistry 等研究, 通过反 stathmin 核酶抑制人脐静脉内皮细胞中 stath-

表 2 免疫组化结果

Table 2 The statistical results of immunohistochemistry

Group	Stathmin (+) *	Stathmin (-)		P-value
Normal Brain	4	16	20%	<0.001
Glioma	58	10	85%	
Glioma				
Grade I ~ II	16	8	66%	<0.050
Grade III ~ IV	42	2	95%	

注: * 阳性细胞百分比 <10% 为阴性表达。

Note: *The tissue was regarded as negative when the positive cell rate was <10%.

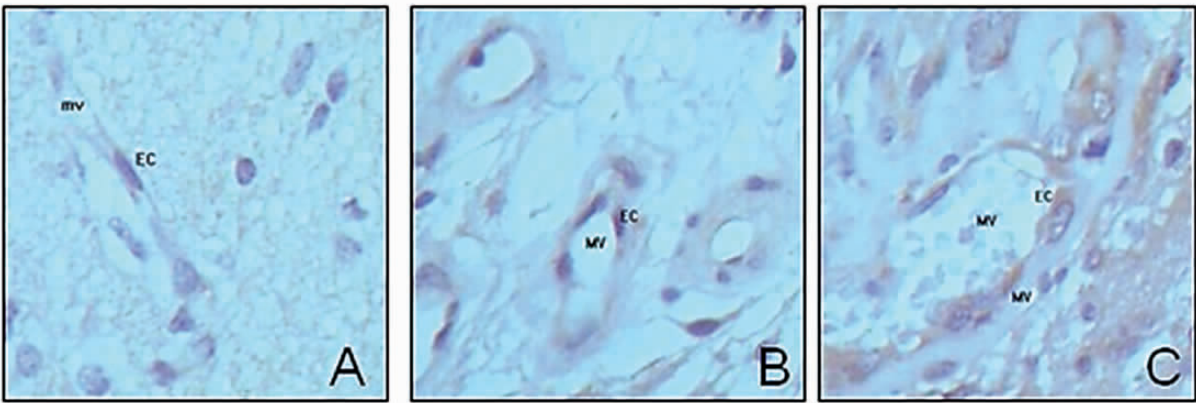


图 2 Stathmin 在不同级别胶质瘤血管内皮细胞中的表达 (SP 法, × 400) MV, 微血管 EC, 内皮细胞

A 正常脑组织 B I-II 级胶质瘤 C III-IV 级胶质瘤

Fig. 2 Analysis of stathmin expression in human glioma by immunohistochemistry. Stathmin was detected mainly in the cytoplasm of VEC from microvessels and in glial cells (original magnification, × 400). MV, microvessel; EC, endothelial cell. (A) Expression of stathmin in normal brain. (B) Expression of stathmin in low-grade glioma (WHO grade I-II). (C) Expression of stathmin in high grade glioma (WHO grade III-IV)

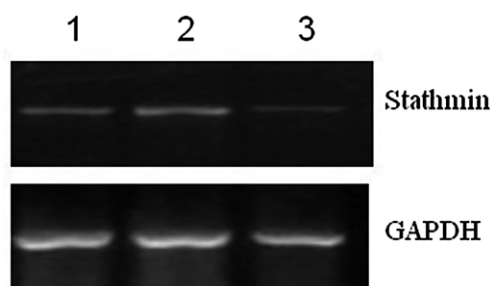


图3 Stathmin 在不同级别胶质瘤微血管内皮细胞中 RNA 水平的表达 1: I-II 级胶质瘤 2: III-IV 级胶质瘤 3: 正常脑组织

Fig. 3 western blot analysis of stathmin protein expression in GDMEC and NDMEC, lanes: 1, GDMEC from WHO I-II tumors; 2, GDMEC from grade III-IV tumors; 3, NDMEC

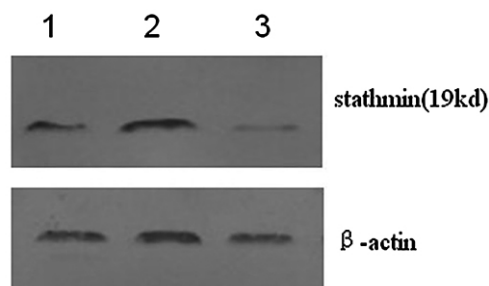


图4 Stathmin 在不同级别胶质瘤微血管内皮细胞中蛋白水平的表达 1: I-II 级胶质瘤 2: III-IV 级胶质瘤 3: 正常脑组织

Fig. 4 RT-PCR analysis of stathmin mRNA in GDMEC and NDMEC, lanes: 1, GDMEC from WHO I-II tumors; 2, GDMEC from WHO III-IV tumors; 3, NDMEC

min 的表达能够抑制人脐静脉内皮细胞血管生成^[12]。

在本研究中脑胶质瘤微血管内皮细胞中 Stathmin 蛋白阳性表达随胶质瘤病理级别的上升逐渐上调,说明 Stathmin 在脑胶质瘤微血管形成过程中起了重要的作用,可能参与了肿瘤血管生成,对胶质瘤的生长、转移和浸润起促进作用。其作用机制推测为 (1)Survivin 可以通过介导血管内皮生长因子(VEGF)促进血管形成,还能介导血管形成素 1(Ang1)抑制微血管内皮细胞凋亡,而 p53 基因可以通过抑制 Stathmin 启动子来下调 Survivin 表达^[13-15],但是胶质瘤中 P53 基因发生了突变。因此推测这种突变导致其对 Stathmin 的抑制减弱,而使 Stathmin 基因表达上调。并间接使 Survivin 表达上调,从而使微血管内皮细胞异常增殖。(2)Stathmin 在胶质瘤微血管内皮细胞中的高水平表达可能导致微管动力学紊乱,促进异常的有丝分裂,细胞周期失控,使胶质瘤微血管内皮细胞得以维持高增殖率与转化表型。

本研究揭示 Stathmin 对肿瘤血管生成有重要作用,其作用阐明可能提供了更精确的靶向治疗和更有效的抗癌策略。我们进一步的研究重点将会集中在 Stathmin 是否可作为人脑胶质瘤抗血管生成治疗的一个靶点。

参考文献(References)

- [1] 王忠诚. 颅内肿瘤的发发病率[M]. 王忠诚神经外科学, 2005: 518
Wang Zhong-cheng. The incidence of intracranial tumor [M]. Wang Zhongcheng neurosurgery, 2005: 518
- [2] Sobel A. Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction[J]. Trends Biochem Sci, 1991, 16 (8): 301-305
- [3] Sobel A, Bouterin MC, Beretta L, et al. Intracellular substrates for extracellular signaling: characterization of a ubiquitous, neuron enriched phosphoprotein (Stathmin)[J]. J Biol Chem, 1989, 264 (7): 3765-3772
- [4] Stins MF, Gilles F, Kim KS. Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells[J]. J Neuroimmunol, 1997, 76: 81-90
- [5] Unger RE, Oltrogge JB, Von Briesen H, et al. Isolation and molecular characterization of brain microvascular endothelial cells from human brain tumors[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2002, 38: 273-281
- [6] Bian XW, Jiang XF, Chen JH, et al. Increased angiogenic capabilities of endothelial cells from microvessels of malignant human gliomas [J]. Internat Immunopharmacol, 2006, 6: 90-99
- [7] Miebach S, Grau S, Hummel V, et al. Isolation and culture of microvascular endothelial cells from gliomas of different WHO Grades [J]. J Neuro-Oncol, 2006, 76: 39-48
- [8] Naumov GN, Akslen LA, Folkman J. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch [J]. Cell Cycle, 2006, 5: 1779-1787
- [9] Hayot C, Farinelle S, De Decker R, et al. In vitro pharmacological characterizations of the anti-Angiogenic and anti-tumor cell migration properties mediated by microtubule-affecting drugs, with special emphasis on the organization of the actin cytoskeleton [J]. Int J Oncol, 2002, 21: 417-425
- [10] 王大鹏, 慕璐岩, 刘东健, 等. Stathmin/Oncoprotein18(Op18)在人脑胶质瘤中的表达研究 [J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2008, 7(6): 517-520
Wang Da-peng, Mu Lu-yan, Liu Dong-jian, et al. Research on expression of stathmin/oncoprotein18 (Op18) gene in human brain gliomas [J]. Chinese journal of neurosurgical disease research, 2008, 7(6): 517-520
- [11] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications [J]. New England Journal of Medicine, 1971, 285(21): 1182-1186
- [12] Mistry SJ, Bank A, Atweh GF. Synergistic antiangiogenic effects of stathmin inhibition and taxol exposure [J]. Mol Cancer Res, 2007, 5: 773-782
- [13] Coonor DS, Schechner J, Adid C, et al. Control of apoptosis during angiogenesis by surviving expression in endothelial cells [J]. Am J Pathol, 2000, 156: 393-398
- [14] Mesri M, Morales M, Ackermann EJ, et al. Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by surviving targeting [J]. Am Pathol, 2001, 158: 1757-1765
- [15] Lohr K, Moritz C, Contente A, et al. p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53 [J]. Biol Chem, 2003, 278: 32507-32516