

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.35.031

ABCG2 与胶质瘤血管形成及预后的相关研究*

肖宏¹ 胡炜¹ 张涵¹ 陈赤丹² 王来藏¹ 任付宾¹ 王宏伟¹

(1 哈尔滨医科大学第四临床医学院微创神经外科 黑龙江 哈尔滨 150001;

2 哈尔滨医科大学第四临床医学院介入科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:研究 ABCG2 在胶质瘤血管形成过程中与 VEGF、VEGFR 和 CD34 的关系,探讨其在血管形成中的作用及对胶质瘤患者生存预后的影响。**方法:**采用脑胶质瘤的组织芯片技术,分析 ABCG2、VEGF 和 VEGFR(flt-1)在胶质瘤中的表达率,根据 CD34 阳性的血管计数判定微血管密度(MVD);另用免疫荧光共聚焦检测 ABCG2 与 CD34、VEGF 的共表达;用 COX 回归模型分析 ABCG2 对胶质瘤患者预后影响。**结果:**ABCG2、VEGF、VEGFR(flt-1)和 CD34 阳性表达率随着胶质瘤恶性程度的增加而增高。ABCG2 I、II 级之间无统计学差异,其余各级别之间存在统计学差异($P<0.05$);ABCG2 与病理级别呈正相关;ABCG2 表达水平与 MVD 显著相关, $\gamma=0.540, P<0.001$ 。ABCG2、VEGF 和 VEGFR (flt-1) 均为阳性表达的肿瘤标本 MVD 平均值显著高于 ABCG2 阴性表达者, $P<0.001$ 。ABCG2 与 CD34、VEGF 共表达于血管壁。COX 回归模型证明 ABCG2 是胶质瘤患者预后的危险因素。**结论:**ABCG2 阳性表达细胞具有向肿瘤血管细胞分化的潜能,对肿瘤血管研究重要意义,且 ABCG2 表达可作为考察胶质瘤患者预后的重要指标。

关键词:脑胶质瘤;组织芯片;免疫组化;预后

中图分类号:R739.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)35-6916-07

Correlative Research of ABCG2 with Angiogenesis and Prognosis in Patients of Glioma*

XIAO Hong¹, HU Wei¹, ZHANG Han¹, CHEN Chi-dan², WANG Lai-zang¹, REN Fu-bin¹, WANG Hong-wei¹

(1 Department of Neurosurgery, The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China; 2

Department of Interventional radiology, The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To study the relation of ABCG2 in glioma angiogenesis with VEGF, VEGFR and CD34, and investigate its role in angiogenesis, and to analyze its effect on prognosis of glioma patients. **Methods:** A tissue microarray technology of glioma was used to analyze the rate of ABCG2, VEGF and VEGFR (flt-1) expression in glioma. According to the numbers of CD34 positive labeled microvasculars, tumor microvasculars density (MVD) was calculated. The immunofluorescence confocal was used to detect the coexpression of ABCG2 and CD34, VEGF in the vessel wall. COX regression model was used to analyze the relation between ABCG2 and prognosis of patients with glioma. **Results:** The positive expression rate of ABCG2, VEGF, VEGFR and CD34 increased with the pathological grades. The expression of ABCG2 was statistically different ($P<0.05$) among each pathological grades except the grade I - II. The expression of ABCG2 and pathological grades was positively correlated; moreover, the expression level of ABCG2 was intimately related with MVD in tumors, $\gamma=0.540, P<0.001$. The MVD in gliomas of grade III - IV was higher than that in grade I - II. The genes of VEGF, VEGFR (flt-1) and CD34 were also analyzed, showing the average value of MVD in tumors expressing VEGF⁺, VEGFR⁺ (flt-1) and ABCG2⁺ was significantly higher than that in the ABCG2⁻ tumors ($P<0.001$). ABCG2 was co-expressed with CD34 and VEGF in the vessel wall. COX regression model showed that ABCG2 could be as a prognostic factor for the patients with glioma. **Conclusions:** ABCG2 positive cells have potential to differentiate into the tumor vascular cells, which would be significant for the study of tumor blood vessels. Furthermore, ABCG2 expression may be an important prognostic indicator in patients with glioma.

Key words: Brain Gliomas; Tissue Microarray; Immunohistochemical; Prognosis

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

Article ID: 1673-6273(2014)35-6916-07

前言

肿瘤血管生成是肿瘤生长、转移等的重要机制之一,目前

认为肿瘤生长与肿瘤干细胞和肿瘤血管形成相关因子有关^[1]。

目前,脑胶质瘤患者经治疗后,其复发率仍然较高,患者预后差。在胶质瘤中,血管生成是其生长迅速和浸润广泛的主要原

* 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12511257)

作者简介:肖宏(1968-),男,副主任医师,研究方向:胶质瘤干细胞,电话:0451-82576869, E-mail: xhx8230@163.com

(收稿日期:2014-08-13 接受日期:2014-09-11)

因^[2]。本研究探讨胶质瘤当中血管生成的机制,并研究胶质瘤干细胞在这一过程中所发挥的作用。本文利用组织芯片、免疫组织化学染色、免疫荧光染色和激光共聚焦显微镜技术,分别检测胶质瘤患者腺苷三磷酸结合盒转运体 G2 (ATP-binding cassette superfamily G member 2, ABCG2)、血管内皮生长因子(VEGF)、血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)和 CD34 表达的相关性以及 ABCG2 与 CD34 的共表达,为阐明上述理论提供实验依据。另外通过多因素分析采用 COX 比例风险模型逐步回归分析探讨 ABCG2 与胶质瘤患者预后的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

所用病理标本来自哈尔滨医科大学第四临床医学院收治并接受手术治疗,取得病理标本的患者,共 135 例,其中男性 70 例,女性 65 例,年龄 4-72 岁,平均年龄 36.84 岁。病例收集内容包括性别、年龄、术前 Karnofsky 评分(Karnofsky Performance Status, KPS)、放疗情况、WHO 病理分型分级。术后随访包括:患者术后 Karnofsky 评分,患者生存时间,其中包括总生存时间(overall survival time, OS)和无进展生存时间(progression-free survival time, PFS)。病理分型分级参照 WHO 2000 年神经上皮源性肿瘤分类分级系统,在所收集的 135 例患者中,WHO I 级 18 例,毛细胞型星形细胞瘤 12 例,室管膜下巨细胞星形细胞瘤 4 例,室管膜下室管膜瘤 2 例;WHO II 级 48 例,其中弥漫型星形细胞瘤 42 例,少枝胶质细胞瘤 6 例;WHO III 级 34 例,其中间变性星形细胞瘤 31 例,间变性少枝胶质细胞瘤 3 例;WHO IV 级 35 例,其中胶质母细胞瘤 24 例,髓母细胞瘤 11 例。

1.2 胶质瘤组织芯片制备

病理专家对每例病人的病理切片进行准确的诊断分析,每例标本均编号,并且选取有代表性的肿瘤区域做定位,应用组织芯片制备仪制备芯片。制备的空白蜡块大小为长 42 mm× 宽 36 mm× 高 15 mm,在此蜡块 36 mm× 30 mm 范围内打孔(直径约 1.5 mm),从而制成阵列芯片的模块。然后在病理蜡块已做标记的区域钻取组织芯,植入空白蜡块相应的孔内。依次按序将全部病理组织芯片植入后,将组织芯片蜡块烘烤,使组织芯与空白蜡块完全融合使组织芯与受体蜡块结合紧密,并且所有组织芯处于同一平面利于切片。冷却至室温后冻存,然后用切片机做 4 μm 连续切片,建立胶质瘤临床标本的组织芯片。

1.3 免疫组化

取制作好的组织芯片,首先经二甲苯脱蜡后,以梯度乙醇脱水,自来水冲洗后 PBS 液体冲洗,滴加抗原修复液(AR)0.01 M、pH 6.0 的柠檬酸缓冲液,自然冷却后用 PBS 冲洗;以过氧化氢滴加,用来阻断内源性过氧化物酶 15 分钟;用 PBS 冲洗后滴加 20%正常羊血清室温下封闭 30 min,倾去血清再加一抗(鼠抗人 ABCG2 抗体,英国 Abcam 公司,工作浓度 1:30;兔抗人 CD34 抗体,美国 Zymed 公司,工作浓度 1:100;鼠抗人 VEGF 抗体和鼠抗人 VEGFR 抗体,丹麦 Dako 公司,工作浓度均为 1:100)。按说明书将特异性一抗稀释到一定浓度,滴加于标本上,然后在 37℃ 条件下孵育 2 小时,在 4℃ 过夜,倾去一抗,利用

PBS 清洗;然后将 EnVision 复合物(即用型)在 37℃ 共孵育 30 分钟,PBS 清洗;采用二氨基联苯胺(DAB)加过氧化氢显色 10 分钟,在显微镜下调控染色深度,适当时机流水冲洗终止反应;用蒸馏水冲洗后苏木素复染,0.5%盐酸乙醇脱色,二甲苯透明,最后中性树胶封片。

1.4 免疫组化结果判定(Immunohistochemical and Grading)

采用双盲法,由两位病理科医师对组织芯片上每个位点的免疫组化染色进行评价,不一致的结果经多镜头显微镜下讨论得出一致结果。

1.4.1 ABCG2 的免疫结果判定 ABCG2 主要表达于细胞膜,被染成棕黄色。尽可能寻找表达高的 5 个视野,分别计数阳性细胞和阴性细胞的总数,阳性细胞百分率 = 阳性细胞数 / (阳性细胞数 + 阴性细胞数) × 100%。组织芯片阳性级别划分参照 Mohan 等^[3]提出的标准,共划分为 3 个等级:阴性,阳性,强阳性,其阳性细胞百分率分别为 0%, ≤ 10%, > 10%。

1.4.2 VEGF 和 VEGFR 的免疫结果判定 采用半定量积分法,用染色强度(SI)和阳性细胞百分率(PP)的乘积方法进行^[4],即 VEGF 和 VEGFR 的免疫反应评分(immunoreactive score, IRS) = SI × PP。染色强度共划分为 4 个级别,计分为 0 分、1 分、2 分、3 分,分别表示染色颜色强度分别为:无色、淡棕黄色、棕黄色、棕褐色。阳性细胞百分率也分为 4 个级别,计分为 0 分、1 分、2 分、3 分,分别表示阳性细胞百分率区间为 ≤ 5%, 6%~25%, 26%~50%, 51%~75%, ≥ 75%。然后计算 IRS 得分:0~2 分为评定为阴性(-), 3~4 分评定为弱阳性(+), 5~6 分评定为阳性(++), 7~8 分以上评定为强阳性(+++)。

1.4.3 微血管密度判定 采用 CD34 作为参照,标本中 CD34 被染成棕色。按照 Wendner 等^[5]提出的计数方法,检测胶质瘤组织芯片中微血管密度(microvascular density, MVD)。首先应用低倍镜(100×),在视野中观察芯片上各位点血管分布形态,在瘤细胞浸润区域内,将血管形成最多的区域选择作为检测的“热点”(hot spot)。应用高倍镜(200×),选 5 个不同“热点”,计数“热点”内 CD34 标记的微血管数量,取平均值作为该位点的 MVD 值。对于被染成棕色的血管内皮细胞簇,如果它们微血管或肿瘤细胞未相邻,可视为微血管;红细胞和血管腔不作为判断微血管的标准。

1.5 免疫荧光组织化学

取制作好的组织芯片,经脱蜡,脱水,抗原修复后,滴加过氧化物酶阻断内源性过氧化物酶,用 20%的正常羊血清封闭。倾去血清后,加入第一层一抗(兔抗人 CD34 抗体,美国 Zymed 公司,工作浓度 1:50;或兔抗人 GFAP 抗体,丹麦 Dako 公司,工作浓度 1:200), 37℃,室温孵育 2 小时。然后滴加第一层二抗(羊抗小鼠或/羊抗兔 IgG-FITC, sigma 公司,工作浓度 1:100), 37℃,避光孵育 1 小时。冲洗后加入第二层一抗(鼠抗人 ABCG2 抗体,英国 Abcam 公司,工作浓度 1:30;或鼠抗人 VEGF 抗体,美国 Zymed 公司,工作浓度 1:100),室温过夜,然后滴加第二层二抗(羊抗小鼠 IgG-Cy3, sigma 公司,工作浓度 1:100), 37℃,避光孵育 1 小时;用 DAPI+ 抗衰变封片剂封片。CD34 和 GFAP 阳性细胞可见细胞核内绿色荧光,ABCG2 和 VEGF 阳性细胞可见细胞核内红色荧光。

1.6 激光共聚焦显微镜观察

荧光显微镜下观察标本, 激发波长分别为 564 nm 和 490 nm, 观察切片组织内 FITC 和 CY3 所示的 CD34、VEGF、ABCG2 抗原。结果判定: 细胞核内呈现绿色荧光提示 CD34 和 VEGF 阳性细胞, 而细胞核内呈现红色荧光提示 ABCG2 阳性细胞。观察和摄影: 对切片同一部位用两种波长的激发光分别作两次曝光, 经计算机软件处理后, 获得同一区域红色或绿色标记的三种抗原。

1.7 统计学分析(Statistical Analysis)

数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SAS 软件对数据进行统计分析, 应用卡方分析, Wilcoxon 检验, Spearman 等级相关和非参数 t 检验, 预后分析采用 cox 回归模型, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

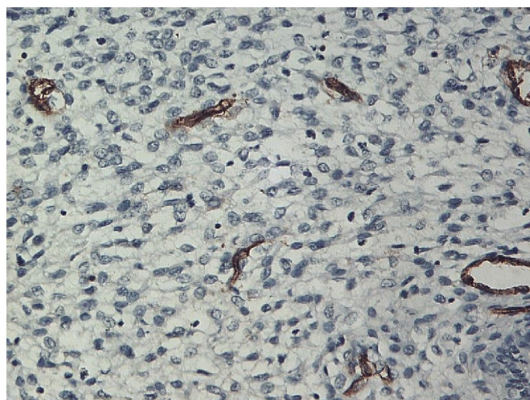
2.1 免疫组化结果

在正常人脑组织中, 未见 ABCG2 表达。而在胶质瘤组织中, 部分细胞的细胞膜被染成棕黄色, ABCG2 阳性(图 1)。在不同级别的胶质瘤组织中, 其表达率也不同, 分别 I 级为 11.1%(2/18), II 级 12.5%(6/48), III 级 44.1%(15/34), IV 级为 43.3%(13/35), 平均表达率为 26.7%(见表 1)。在所研究的胶质瘤标本中, 我们还发现围绕肿瘤组织内血管腔的细胞也表达 ABCG2, 并且在围绕血管走向的细胞中, 其 ABCG2 往往表达增强或增多; 随着胶质瘤级别的增高, ABCG2 表达水平也随之

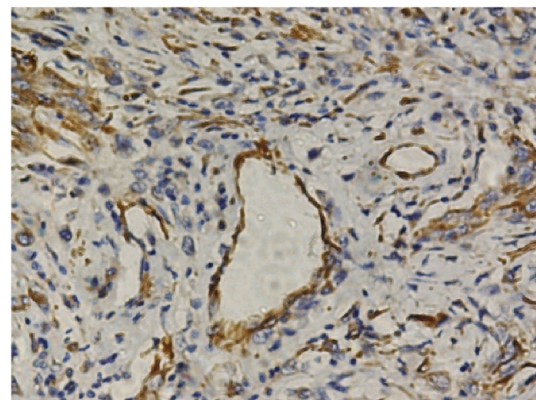
增高, I、II 级与 III、IV 级之间相比, 其差异显著($P < 0.001$)。我们对 ABCG2 与肿瘤病理级别之间进行相关分析, 结果显示两者之间呈显著正相关, $\gamma = 0.301, P = 0.004$; 另外, 我们也发现 ABCG2 与肿瘤 MVD 存在明显的显著性, $\gamma = 0.542, P < 0.001$ 。

通过研究发现, VEGF 主要表达于胶质瘤细胞(TC)胞浆和血管内皮细胞(EC), 被染成黄、棕黄、棕褐色不等, 大多呈弥漫性分布, 也有呈局灶性分布, 而在胶质瘤浸润边缘、肿瘤中心、变形坏死区域的肿瘤细胞, VEGF 往往表达增强或增多(图 1)。在 I 至 IV 级胶质瘤标本中, VEGF 阳性表达率分别为: I 级 11.1%(2/18)、II 级 58.3%(28/48)、III 级 88.2%(30/34)、IV 级 71.4%(25/35), 平均表达阳性率为 63.0%。VEGFR 阳性表达率分别为 I 级 27.8%(5/18)、II 级 43.86%(21/48)、III 级 70.6%(24/34)和 IV 级 60.0%(21/35), 平均阳性率为 52.6%, 主要表达于血管内皮细胞的胞膜及胞浆中, 染成棕黄和棕褐色(图 1)。

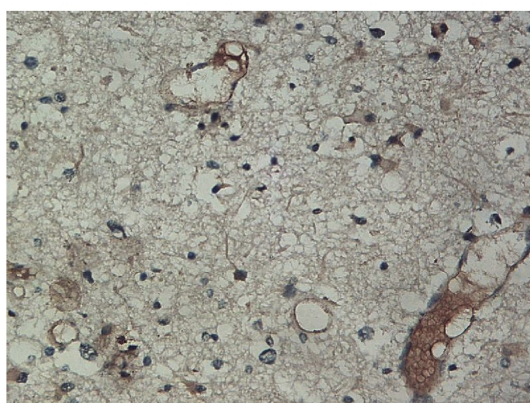
CD34 表达于血管内皮细胞, 染色程度不等。I 至 IV 级胶质瘤标本中 MVD 分别是: I 级 3.84 ± 2.63 、II 级 12.469 ± 9.45 、III 级 27.29 ± 20.45 、IV 级 25.82 ± 15.31 , 平均是 19.25 ± 16.54 。VEGF 和 VEGFR 阳性灶旁微血管丰富, 微血管大多呈裂隙状, 管腔结构不良, 肌层缺乏, 基底膜不完整, 甚至只由单个细胞或仅由血道构成, 有的呈“血管湖”样, 难以分辨血管结构。有些“血管”仅由肿瘤细胞构成, 有些血管可由内皮细胞和肿瘤细胞一道构成, 这一类肿瘤细胞也可有 CD34 的表达(图 1)。正常人脑组织中血管内皮细胞 CD34 染色较浅, MVD 均值约 2.8 ± 0.78 个。



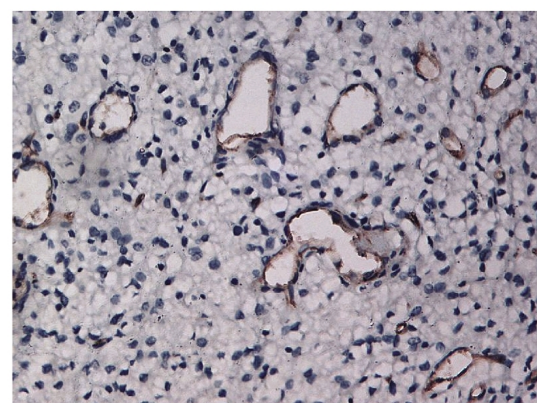
ABCG2



VEGF



VEGFR



CD34

图 1 胶质瘤组织中 ABCG2、VEGF、VEGFR 和 CD34 免疫组化光镜所见($\times 200$)

Fig. 1 The expression of ABCG2, VEGF, VEGFR and CD34 in glioma by immunohistochemical staining($\times 200$)

表 1 不同病理级别胶质瘤 ABCG2 表达水平以及与 CD34(MVD)的关系
Table 1 The level of ABCG2 in different glioma and its relationship with CD34(MVD)

(Pathological Grade)	n	ABCG2		VEGF		VEGFR		CD34(x± s) [*]
		n (%)	P	n (%)	P	n (%)	P	
I	18	2(11.1%)	0.1 [*]	2(11.1%)	0.01 [*]	5(27.8%)	0.02 [*]	3.84± 2.63
II	48	6(12.5%)	0.01 ^{**}	28(58.3%)	0.01 ^{**}	21(43.8%)	0.01 ^{**}	12.46± 9.45
III	34	15(44.1%)	0.01 [#]	30(88.2%)	0.3 [#]	24(70.6%)	0.3 [#]	27.29± 20.45
IV	35	13(43.3%)	0.001 ^{###}	25(71.4%)	0.001 ^{###}	21(60.0%)	0.001 ^{###}	25.82± 15.31

注: * I 与 II 组比较; ** II 与 III 组比较; # III 与 IV 组比较; ## IV 与 II 组比较。

Note: * compared between I and II; ** compared between II and III; # compared between III and IV; ## compared between IV and II.

2.2 ABCG2、VEGF 和 VEGFR 共表达率与 MVD 的相关性分析

本组测定了 ABCG2 与 VEGF 和 VEGFR 共表达情况,并分析其与与胶质瘤微血管密度的关系(表 2)。结果表明,在 VEGF 阴性组中,ABCG2⁻组和 ABCG2⁺组中的 MVD 值分别为 4.084± 0.234 和 14.350± 1.710, Wilcoxon 统计中 W 值为 512.00, P=0.05, P 值接近假设检验水准($\alpha=0.05$),因此我们拟通过增加收集病例数目,进一步对 ABCG2 和胶质瘤血管生成的相关性进行分析。VEGF 阳性组中,ABCG2⁻和 ABCG2⁺的 MVD 平均值分别为 21.954± 3.310 和 33.796± 5.023,而 Wilcoxon W 值为 813.00, P=0.01,表明 ABCG2 可能在 VEGF 诱发的血管生成的过程中发挥较大的作用。在 VEGFR 阴性组,ABCG2⁻组和 ABCG2⁺组的 MVD 平均值分别为 9.977± 0.968 和 23.852± 3.639, Wilcoxon W 值为 869.00, P=0.036;在

VEGFR 阳性组中,ABCG2⁻组和 ABCG2⁺组的 MVD 平均值分别为 19.152± 2.734 和 34.121± 3.8092, Wilcoxon W 值为 455.50, P=0.01,结果提示 ABCG2 参与 VEGFR 引起的血管生成,并且这种作用可能是比较重要。

2.3 胶质瘤共表达结果

血管内皮定位免疫标记物 CD34 和 ABCG2 在胶质瘤血管内皮共表达(图 2a),有的血管内皮共表达明显,有的血管内皮共表达稍弱,沿微血管分布的免疫活性不均匀。用另外一个内皮细胞标志物 VEGF 与 ABCG2 在微血管内皮也显示出共表达(图 2b),证明内皮中同时具有这两种抗原存在。CD34 和 VEGF 在微血管内皮上亦共表达(图 2c),但是表达程度有差异,一些微血管表达较强,一些微血管表达却很弱。GFAP 和 ABCG2 在微血管中没有显示出共表达情况(图 2d)。

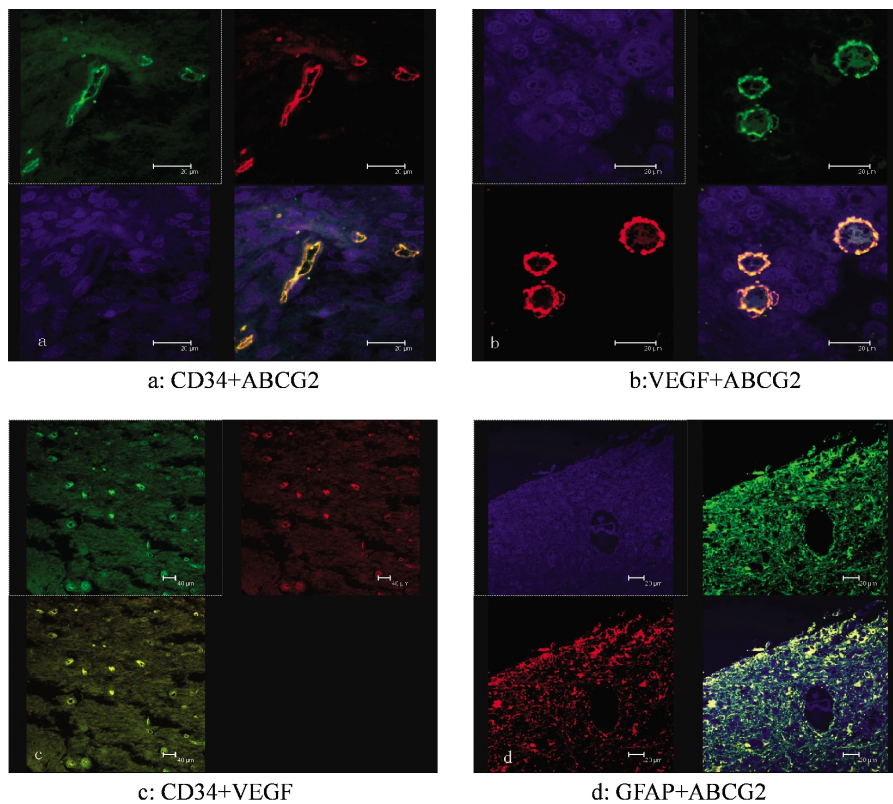


图 2 ABCG2、VEGF、CD34 和 GFAP 在脑胶质瘤组织标本中免疫荧光共聚焦表达

Fig. 2 Fluorescence microscopy analysis of ABCG2, VEGF, CD34, GFAP in glioma

注: a: ABCG2(红色)和 CD34(绿色)免疫双染; b: ABCG2(绿色)和 VEGF(红色)免疫双染; c: CD34(绿色)和 VEGF(红色)免疫双染; d: ABCG2(红色)和 GFAP(绿色)免疫双染。

Note: a: Double labeling of CD34 (green) and ABCG2(red); b: Double labeling of ABCG2 (red) and VEGF(red); c: Double labeling of CD34 (green) and VEGF(red); d: Double labeling of GFAP (green) and ABCG2 (red).

表 2 VEGF、VEGFR 和 ABCG2 共表达与 MVD 的关系

Table 2 The coexpression of VEGF, VEGFR and ABCG2 and their relationship with CD34(MVD)

Groups	n	MVD($\bar{x} \pm s$)	Wilcoxon W	P
ABCG2 ⁻ /VEGF ⁻	48	4.084± 0.234	512.00	0.05
ABCG2 ⁺ /VEGF ⁻	3	14.350± 1.710		
ABCG2 ⁻ /VEGF ⁺	51	21.954± 3.310	813.00	0.01
ABCG2 ⁺ /VEGF ⁺	33	33.796± 5.023		
ABCG2 ⁻ /VEGFR ⁻	61	9.977± 0.968	869.00	0.036
ABCG2 ⁺ /VEGFR ⁻	4	23.852± 3.639		
ABCG2 ⁻ /VEGFR ⁺	38	19.152± 2.734	455.50	0.01
ABCG2 ⁺ /VEGFR ⁺	32	34.121± 3.8092		

2.4 影响胶质瘤预后的多因素 COX 回归风险比例模型分析

将单因素分析,有 9 个因素有显著性差异,将上述筛选出的因素进行 COX 风险比例回归模型分析(表 3),结果发现有 5 个因素对患者生存期有影响,分别是 ABCG2、VEGF 及 CD34,术前 Karnofsky 评分,病理级别(表 4)。结果表明术前 Karnofsky 评分 <70 者预后差,低级别胶质瘤预后优于高级别胶质瘤的预后。ABCG2、VEGF 和 CD34 三个基因表达进入回归模型,三者的高表达显示胶质瘤病人预后较差。并且通过生存分析,我们发现 ABCG2 阴性患者的无进展生存时间好于 ABCG2 阳性患者。

表 3 135 例脑胶质瘤病人单因素分析

Table 3 Summary of univariate analysis of survival data of 135 cases of glioma patients

Variables	Univariate analysis	
	P (log-rank test)	HR (95% CI)
Age	0.0230	2.75(1.56- 4.84)
Sex	0.0250	0.50(0.26- 0.93)
Pre-operative KPS	0.0010	0.63(0.369- 1.07)
Pathological Grade	0.0001	2.84(1.61- 5.01)
Post-operative radiotherapy	0.0110	0.45 (0.22-0.87)
ABCG2	0.0030	2.33(1.36- 4.01)
VEGF	0.0033	2.42(1.27- 4.56)
VEGFR	0.7720	1.13 (0.53-2.34)
CD34	0.0005	4.01 (2.01-8.01)

表 4 135 例脑胶质瘤病人 COX 回归多因素分析

Table 4 Summary of multivariate Cox regression analysis of survival data of 135 cases of glioma patients

Variables	Regression coefficients	P	Relative risk
Pre-operative KPS	-0.015	0.031	0.752
Pathological Grade	1.241	0.025	3.396
ABCG2	0.962	0.020	2.602
VEGF	0.406	0.010	1.534
CD34	-0.431	0.043	0.650

3 讨论

在研究肿瘤发生、发展机制时,既要研究肿瘤细胞的本身,

还要考虑肿瘤血管内皮细胞的形成,这已经成为共识。自从肿瘤干细胞学说问世以来,肿瘤细胞来源于肿瘤干细胞已基本得到肿瘤学界的认同。就肿瘤微血管形成而言,在肿瘤干细胞学说问世前,似乎肿瘤的微血管都来源于宿主,但是,肿瘤干细胞学说问世后,现在普遍的看法是脑肿瘤细胞是由肿瘤干细胞直接生成而不是由正常胶质细胞突变而来。Manotis 等^[9]首先在葡萄膜黑色素瘤血管中发现了某些肿瘤细胞可以在没有血管内皮细胞参与下形成供血的管道,称“拟血管生成(vasculogenic mimicry)”。随后,Chang 等^[7]又在结肠癌中发现由血管内皮细胞和肿瘤细胞共同参与组成的供血管道,称“马赛克(mosaic)血管”。有学者提出,和肿瘤细胞一样,肿瘤中的血管内皮细胞也是分化不成熟的细胞,都具有侵袭性^[8]。我们通过对胶质瘤 ABCG2 的研究,期望能证实胶质瘤干细胞可以转分化成血管内皮细胞。

ABCG2 是 ATP 结合盒(ABC)蛋白 G 家族的成员之一,它首先是胎盘和多药耐药肿瘤细胞中克隆出来,目前它是发现的唯一 ABC 转运体。在骨髓干细胞中有一侧群(side-population, SP)干细胞,约占总干细胞的 0.05%,其具有保守的细胞表型,并具有横向分化潜能。不同来源的侧群干细胞均有 ABCG2 基因的高表达,其表达与侧群干细胞的表型密切相关,并且在血细胞发育阶段的不同,ABCG2 发生表达、消失。目前发现 ABCG2 不但是侧群干细胞的转运体,ABCG2 可以增加正常 SP 造血干细胞中的增殖活性,但是 ABCG2 在细胞中的发挥何种角色还未完全清楚^[9]。目前推测,ABCG2 可能通过维持干细胞的静息状态或影响造血增殖分化,从而参与造血系统的发育过程^[10]。由于前体细胞和成熟的血细胞并不表达 ABCG2,因此,ABCG2 被作为一种干细胞标记物,籍此从造血系统肿瘤中分离干细胞^[9-11]。Miranville 等^[12]将脂肪组织经胶原酶消化、过滤、离心除去成熟脂肪细胞后,得到血管基质部分(Stroma-Vascular Fraction, SVF),并将 ABCG2 作为干/祖细胞标志物,研究脂肪组织中血管基质部分的干细胞。Aronica 等^[13]研究耐药癫痫患者进行研究,比较在肿瘤和非肿瘤因素致癫痫灶中 ABCG2 的表达情况,结果发现在非肿瘤因素致癫痫患者病灶中,胶质细胞和神经元均不表达 ABCG2;而在导致癫痫的肿瘤病灶中,ABCG2 其表达水平明显升高,且主要集中于血管管腔表面,并且这一现象在肿瘤的新生血管中更为明显。目前,ABCG2 在干细胞分化和细胞对药物反应中的作用正在研究中^[14-17]。ABCG2 阳性的胶质瘤干细胞是否可以分化为血管内皮细胞

胞,或直接参与肿瘤组织血管壁的组成,如果这一推测成立,ABCG2 发挥何种角色,这些均需要寻找更为直接的证据加以证明。我们的结果显示(图 1),干细胞标志蛋白 ABCG2 既在胶质瘤干细胞表达,还在胶质瘤组织的血管壁上表达,并且随着病理级别的增高其表达率也相应增高,I、II 级与 III、IV 级相比差异显著($P<0.001$),ABCG2 阳性表达率与肿瘤病理级别呈正相关, $P=0.004$ 。蛋白表达水平与胶质瘤血管生成密切相关,ABCG2⁺肿瘤 MVD 明显高于 ABCG2⁻肿瘤,另外,蛋白阳性表达呈局灶性,与高 MVD 分布区域基本一致,在高级别胶质瘤中更明显。

VEGF、VEGFR 和 CD34 在血管生成过程中都是不可缺少的重要分子,胶质瘤血管生成也不例外,那么干细胞标准蛋白 ABCG2 参与调控血管细胞生长,而 VEGF、VEGFR 和 CD34 在胶质瘤血管生成也发挥作用,两者是否具有相关性呢?我们的研究表明:VEGF、VEGFR 和 CD34 阳性表达率在随着胶质瘤恶性程度增加的同时,ABCG2 表达水平也增高($P<0.05$);ABCG2 与病理级别的 Spearman 等级相关分析呈正相关;并且 ABCG2 表达水平与肿瘤 MVD 显著相关, $\gamma=0.540$, $P<0.001$ 。研究证明,干细胞标志蛋白 ABCG2 基因与肿瘤细胞诱导肿瘤血管生成的代表性基因 VEGF、VEGFR 和 CD34 具有统计学上的相关性。以上研究说明 ABCG2 在人脑胶质瘤血管生成中起重要作用,可能是肿瘤血管生成的重要基因。

在免疫荧光共聚焦对血管的研究方面,Sisodiya 等^[18]在耐药性癫痫患者中,利用激光共聚焦显微镜观察到,ABCG2 与 CD34 和 Factor VIII 在导致癫痫的脑肿瘤组织内血管中共表达。Gussoni 等报告^[19],Duchenne's 肌营养不良小鼠通过静脉注射的方式,接受表达 ABCG2 的骨髓来源 SP 细胞移植后,观察到受体造血干细胞重建,细胞在肌肉中融合,并有肌肉再生。表达 ABCG2 的 SP 细胞还可以使心肌缺损的小鼠心肌再生。目前有实验研究报告^[20,21],神经干细胞、骨髓造血干细胞、肌肉组织干细胞三者之间可以转分化。结合文献,综合 ABCG2 既表达于肌肉和神经干/祖细胞,也在造血干/祖细胞表达的特性,由此推测 ABCG2 在脑组织中,胶质瘤干细胞可能转化为血液、血管组织细胞,从而可能在血管重构方面发挥重要作用。而且本研究的免疫荧光共聚焦显示(图 2),ABCG2 分别与 CD34、VEGF 在胶质瘤血管细胞中共表达。ABCG2 和 CD34 在胶质瘤血管内皮共表达(a),有的血管内皮共表达明显,有的血管内皮共表达稍弱,免疫活性沿微血管的分布不均匀。VEGF 和 CD34 在微血管内皮上亦共表达(b),表达程度有差异,一些微血管表达较强,一些微血管表达却很弱。ABCG2 和 GFAP 没有共表达(d)。本研究证明了胶质瘤血管中的某些内皮细胞既表达干细胞标志蛋白 ABCG2,又表达血管内皮细胞标志蛋白 CD34 和血管内皮细胞生长因子 VEGF,证明了 TC 和 TdMEC 起源于它们共同的前体细胞,即肿瘤干/祖细胞。而且 ABCG2 影响着脑屏障,从而影响着病灶局部抗肿瘤药物的浓度,从而影响抗肿瘤的疗效,这可能是 ABCG2 影响患者预后的机制之一。^[22,23]

胶质瘤患者的预后受到诸多因素影响,通过本研究,我们证实性别、年龄、病理级别、术前 Karnofsky 评分、术后放疗影响

患者预后,ABCG2、VEGF、VEGFR 和 CD34 在不同级别胶质瘤表达水平存在差异,ABCG2 与其余三者之间具有相关性,且都影响患者预后。多因素回归分析筛选出 5 个影响预后的主要因素:胶质瘤患者的术前 Karnofsky 评分、病理级别及 ABCG2、VEGF 和 CD34 的表达。在本文研究中 ABCG2 单因素的 $HR=2.33$, $P=0.0032$,对胶质瘤病人的生存有显著意义;ABCG2 在多因素回归模型中的 $HR=2.594$, $P=0.02$,阳性表达病人 3 年生存率低,该基因可能作为独立的预后因素。在胶质瘤中,ABCG2 对肿瘤的分子生物学特性有何影响,其对胶质瘤的血管形成有无影响,这些问题仍需进一步与研究。

参考文献(References)

- [1] Cao Z, Shang B, Zhang G, et al. Tumor cell-mediated neovascularization and lymphangiogenesis contrive tumor progression and cancer metastasis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1836(2):273-286
- [2] Seftor RE, Hess AR, Seftor EA, et al. Tumor cell vasculogenic mimicry: from controversy to therapeutic promise [J]. *Am J Pathol*, 2012,181(4):1115-1125
- [3] Mohan A, Kandalam M, Ramkumar HL, et al. Stem cell markers: ABCG2 and MCM2 expression in retinoblastoma [J]. *Br J of Ophthalmol*, 2006, 90(7):889-893
- [4] Burkhardt M, Mayordomo E, Winzer KJ, et al. Cytoplasmic overexpression of ALCAM is prognostic of disease progression in breast cancer[J]. *Clin Pathol*, 2006, 59(4):403-409
- [5] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density with breast carcinoma and other solid tumor[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1995,36(2):169-180
- [6] Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro:vasculogenic mimicry[J]. *Am J Pathol*,1999,155(3):739-752
- [7] Chang YS, Tomaso E, Mc Donald DM, et al. Masic blood vessels in tumors:frequency of cancer cells in contact with flowing blood [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(26):14608-14613
- [8] Gacche RN, Meshram RJ. Targeting tumor micro-environment for design and development of novel anti-angiogenic agents arresting tumor growth[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2013,113(2):333-354
- [9] Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors[J]. *Blood*,2002,99(2):507-512
- [10] Roy S, Tripathy M, Mathur N, et al. A Hypoxia improves expansion potential of human cord blood-derived hematopoietic stem cells and marrow repopulation efficiency [J]. *Eur J Haematol*,2012,88 (5): 396-405
- [11] Yao CL, Hsu SC, Hwang SM, et al. A stromal-free, serum-free system to expand ex vivo hematopoietic stem cells from mobilized peripheral blood of patients with hematologic malignancies and healthy donors[J]. *Cytotherapy*,2013,15(9):1126-1135
- [12] Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, et al. Improvement of Postnatal Neovascularization by Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells[J]. *Circulation*,2004,110(3):349-355
- [13] Aronica E, Gorter A, Redeker S, et al. Localization of Breast Cancer

- Resistance Protein (BCRP) in Microvessel Endothelium of Human Control and Epileptic Brain[J]. *Epilepsia*, 2005, 46(6):849-857
- [14] Bhatia P, Bernier M, Sanghvi M, et al. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) localises to the nucleus in glioblastoma multiforme cells[J]. *Xenobiotic*, 2012, 42(8):748-755
- [15] Selbo PK, Weyergang A, Eng MS, et al. Strongly amphiphilic photosensitizers are not substrates of the cancer stem cell marker ABCG2 and provides specific and efficient light-triggered drug delivery of an EGFR-targeted cytotoxic drug [J]. *Control release*, 2012, 159(2):197-203
- [16] Castillo V, Valenzuela R, Huidobro C, et al. Functional characteristics of cancer stem cells and their role in drug resistance of prostate cancer[J]. *nt J Oncol*, 2014, 45(3):985-994
- [17] Szafraniec MJ, Szczygiał M, Urbanska K, et al. Determinants of the activity and substrate recognition of breast cancer resistance protein (ABCG2) [J]. *Drug Metab Rev*, 2014, 18(1):1-16
- [18] Sisodiya SM, Martinian L, Scheffer GL, et al. Vascular colocalization of P-glycoprotein, multidrug-resistance associated protein 1, breast cancer resistance protein and major vault protein in human epileptogenic pathologies [J]. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2006, 32(1):51-63
- [19] Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation [J]. *Nature*, 1999, 401(6751):390-394
- [20] Mathieu ME, Saucourt C, Mournetas V, et al. LIF-dependent signaling: new pieces in the Lego[J]. *Stem Cell Rev*, 2012, 8(1):1-15
- [21] Lopes MH, Santos TG. Prion potency in stem cells biology[J]. *Prion*, 2012, 6(2):142-146
- [22] Gjorevski N, Ranga A, Lutolf MP. Bioengineering approaches to guide stem cell-based organogenesis [J]. *Development*, 2014, 141(9):1794-1804
- [23] Nicolazzo JA, Katneni K. Drug transport across the blood-brain barrier and the impact of breast cancer resistance protein (ABCG2) [J]. *Curr Top Med Chem*, 2009, 9(2):130-147

(上接第 6912 页)

形式的哮喘知识健康讲座，必要时不局限于在医院内的活动，可以走向社区、厂矿等，从而使更多患者受益。根据 2014 年全球哮喘防治策略，更提倡一个全面综合的，适合当地状况和个体化的治疗方案，故哮喘专病门诊的工作需要更加细致和完善。

参 考 文 献(References)

- [1] Reddel HK, Hurd SS, FitzGerald JM, et al. World Asthma Day. GINA 2014: a global asthma strategy for a global problem [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2014, 18(5):505-506
- [2] Zhang JH. Epidemiology and dangerous factors of bronchitic asthma [J]. *Appl clin pediater*, 2008, 23(4):241-243
- [3] Yan Long. 30 million asthma patients in our country standardized treatment is less than 5%[N]. *Health News*, 2014-05-06
- [4] Lin JT, He QY, Yao WZ, et al. Investigation on cognitive degree of control and disease status of patients with bronchial asthma in Beijing City [J]. *Chinese Journal of tuberculosis and respiratory*, 2007, 30(7):345-348
- [5] The Chinese medical association respiratory neurology, asthma group. Prevention and treatment of bronchial asthma guidelines (the definition, diagnosis, treatment and management of bronchial asthma) [J]. *The tuberculosis and respiratory journal*, 2008, 31(3):177-185
- [6] Deschildre A, Pin I, El Abd K, et al. Asthma control assessment in a pediatric population: comparison between GINA/NAEPP guidelines, Childhood Asthma Control Test (C-ACT), and physician's rating [J]. *Allergy*, 2014, 69(6):784-790
- [7] Su N, Lin JT, Chen P, et al. Evaluation of asthma control: a questionnaire-based survey in China [J]. *Chinese Medical journal*, 2014, 127(11):2030-2036
- [8] Ahlbeck L. Asthma inhaler with feedback system provided better care and lower costs[J]. *Lakartidningen*, 2014, 111(5):160
- [9] Price D, Fletcher M, Van der Molen T, et al. Asthma control and management in 8,000 European patients: the REcognise Asthma and LInk to Symptoms and Experience (REALISE) survey[J]. *NPJ Prim Care Respir Med*, 2014, 24(3):140-149
- [10] Barnes PJ. Glucocorticoids [J]. *Chem Immunol Allergy*, 2014, 100:311-316
- [11] Mapel DW, Robert MH. Management of asthma and chronic obstructive pulmonary disease with combination inhaled corticosteroids and long-acting β -agonists: a review of comparative effectiveness research[J]. *Drugs*, 2014, 74(7):737-755
- [12] Lai CK, De Guia TS, Kim YY, et al. Asthma control in the Asia-Pacific region: The Asthma Insights and Reality in Asia-Pacific Study[J]. *Allergy Clin Immunol*, 2003, 111:263-268
- [13] Loyman RJ, Gemperli A, Cohen J, et al. Comparative effectiveness of long term drug treatment strategies to prevent asthma exacerbations [J]. *BMJ*, 2014, 13(5):348-354
- [14] Kanemitsu Y, Matsumoto H, Mishima M, et al. Factors contributing to an accelerated decline in pulmonary function in asthma[J]. *Allergol Int*, 2014, 63(2):181-188
- [15] Newby C, Agbetile J, Hargadon B, et al. Lung function decline and variable airway inflammatory pattern: Longitudinal analysis of severe asthma[J]. *Allergy Clin Immunol*, 2014, 13(4):231-236
- [16] Ayala GX, Gillette C, Williams D, et al. A prospective examination of asthma symptom monitoring: provider, caregiver and pediatric patient influences on peak flow meter use [J]. *Asthma*, 2014, 51(1):84-90
- [17] Wang JM, Li Y, Guo C, et al. Clinical value of peak flow meter in measurement of peak expiratory flow in children with asthma [J]. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, 2011, 13(4):348-350
- [18] Caldera-Alvarado G, Khan DA, Defina LF, et al. Relationship between asthma and cognition: the Cooper Center Longitudinal Study [J]. *Allergy*, 2013, 68(4):545-548
- [19] Ye L, Jin ML, Hu ZL, et al. Comparison of asthma control and cognition for the first visit outpatients to the specialist clinic for asthma between the return visit outpatients [J]. *Chin J Asthma (Electronic Version)*, 2008, 2(3):202-207
- [20] De Tratto K, Gomez C, Ryan CJ, et al. Nurses' knowledge of in haler technique in the inpatient hospital setting [J]. *Clin Nurse Spec*, 2014, 28(3):156-160