论著

文章编号:1000-5404(2005)11-1130-04

GFAP与星形胶质细胞瘤恶性程度的关系

黄其林,张云福,张可成 (第三军医大学新桥医院神经外科,重庆 400037)

提 要:目的 研究胶原纤维酸性蛋白(GFAP)与星形胶质细胞瘤恶性程度的关系。**方法** 利用脂质体介导基因转移的方法,将反义GFAP逆转录病毒(PLBskG)转染C6细胞,观察细胞的形态学改变、细胞生长曲线、细胞增殖周期等的变化,并利用RT-PCR、免疫细胞化学染色研究转染细胞GFAP的表达,同时利用图像分析技术比较20例胶质瘤病人肿瘤标本的GFAP-IR染色与Kernohan's肿瘤恶性程度分级的关系。**结果** 转染了PLBskG的C6细胞形态发生改变,GFAP表达下调,细胞生长增快,G_2 + M期细胞比例明显增多。20例星形胶质细胞瘤病人GFAP-IR染色程度与肿瘤病理分级结果发现,GFAP-IR染色强度与肿瘤恶性程度相反,即GFAP-IR染色深、阳性细胞数量多者,病理分级肿瘤恶性程度低,相反肿瘤恶性程度高者,GFAP-IR阳性细胞数量明显减少,染色浅淡。**结论** GFAP与星形胶质细胞瘤的分化程度有关,检测GFAP表达水平的高低可在一定程度上预测肿瘤的恶性程度与预后。

关键词: 胶原纤维酸性蛋白(GFAP);星形胶质细胞瘤;反义核酸
中图法分类号: Q512.6; R730.2; R730.264 **文献标识码:** A

Relationship between GFAP and malignant degree of astrocytoma

HUANG Qi-lin, ZHANG Yun-fu, ZHANG Ke-cheng (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the relationship between GFAP and the malignant degree of astrocytoma. **Methods** After successful transfer of retrovirus with GFAP (PLBsKG) into C6 cells mediated with liposome, the morphology, growth curve and the proliferative cycle of the target cells were observed. The expression of the protein and mRNA of GFAP was determined with RT-PCR and immunocytochemical staining. In addition, the relationship between the staining GFAP-IR and the malignant degree of astrocytoma was analyzed according to Kermohan's grading standard in 20 samples of the cells of astrocytoma with imaging analytic system. **Results** PLBskG resulted in the decrease of GFAP in the target C6 cells, and changed the morphology and increased the proliferation of C6 cells. The number of the cells in the G_2 + M phages was increased. The intensity of GFAP-IR staining was negatively correlated to the malignant potency of astrocytoma. The more intensive staining of the cells, the lower of the malignant degree of astrocytoma and *vice versa*. **Conclusion** There is a close relationship between GFAP and malignant degree of astrocytoma. The level of GFAP expression serves the index of the malignant degree and prognosis of astrocytoma in certain degree.

Key words: glial fibrillary acidic protein; astrocytoma; antisense-nucleic acid

星形胶质细胞瘤是一种常见的中枢神经系统上皮性肿瘤,因其发病率高、治疗效果差,预后差、难以根治等特点成为困扰神经外科的难题。星形胶质细胞瘤患者的预后在很大程度上取决于肿瘤的分化程度,即"恶性"程度。胶原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)是一种由星形胶质细胞特异表达的中间丝细胞骨架蛋白,决定了星形胶质细胞的结构和功能[1]。然而,GFAP与星形胶质细胞的分裂、增殖以及肿瘤的恶性程度间的关系如何尚不清楚。为了明确GFAP表达水平与星形胶质细胞瘤分化程度的关系,作者利用反义GFAP抑制培养的C6细胞株GFAP表达,研究其对C6细胞生长的影响,同时比较20例病理诊断为星形胶质细胞瘤病人肿瘤标本GFAP免疫组化染色与肿瘤病理分级的关系,探讨GFAP表达水平与星形胶质细胞瘤恶性分化程度的关系。

作者简介:黄其林(1960-),男,四川省资中县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事中枢神经系统损伤与修复及颅内肿瘤等的基础与临床方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68755610

收稿日期:2005-02-01;修回日期:2005-03-07

1　材料与方法

1.1　细胞培养

C6 细胞株及转染了反义 GFAP 逆转录病毒 PLBskG 的 PA317 细胞均由本室冻存。复苏后，常规培养在含 5% 胎牛血清的 DMEM 中，置入 CO_2 孵箱培养，备用。按照本室常规方法收集病毒上清，并进行病毒滴度测定[2]，采用超速离心技术浓缩病毒上清，4 ℃储存备用。

1.2　实验分组

根据滴加病毒上清与否，将培养细胞分为两组，①实验组：在正常生长的 C6 细胞中滴加浓缩的病毒上清组；②对照组：在正常生长的 C6 细胞滴加不含血清的 DMEM 培养液组。两组间其余处理方法相同。

1.3　细胞形态学观察及 GFAP 免疫细胞化学染色

C6 细胞按 1×10^5 接种培养在预置有盖玻片的 24 孔板中，待细胞在盖玻片上生长至 60% 融合后，弃培养基，每孔加浓缩病毒上清 300 μl，24 h 后换含 10% 胎牛血清的新鲜培养液，分别于换液后 1、3、5、7 d，倒置显微镜下观察并记录细胞生长情况，各取 3 张盖玻片按本室常规方法进行 GFAP 免疫细胞化学染色，采用图像分析技术[3]比较 GFAP 染色强度，即测量阳性细胞胞浆平均光密度（MOD）值，用任意单位（arbitrary unit，AU）表示，以反映阳性胞浆单位面积内 GFAP 的相对含量，结果与对照组比较。GFAP 抗体为鼠抗 GFAP 单抗（购自重庆医科大学病理生理学教研室），工作浓度为 1∶100。

1.4　细胞生长曲线及细胞生长周期测定

细胞生长曲线：C6 细胞按 1×10^5 接种 24 孔板，待细胞生长至 60% 融合后，弃培养基，每孔加浓缩病毒上清 300 μl，24 h 后换含 10% 胎牛血清的新鲜培养液，分别于换液后 1、3、5、7 d 各取 3 孔细胞，胰酶消化后，收集细胞，台盼蓝染色，计数活细胞，取平均值，以培养天数为横坐标，以细胞数均数为纵坐标绘制生长曲线。结果与对照组比较。

流式细胞仪测定细胞周期：上述时间点取样，每组取 5 孔细胞，制成单细胞悬液，按常规方法制成流式细胞检测样品，上流式细胞仪（FACStarplus 型流式细胞仪，Becton Dichinson 公司产品），分析细胞周期。

1.5　RT-PCR 检测

采用 Promega 公司的 RNA 分离试剂盒提取并纯化细胞总 RNA，并用该公司的 M-MLV 逆转录试剂盒将细胞总 RNA 的 mRNA 逆转录成 cDNA，取样进行 PCR 反应，引物设计同以往方法[2]，PCR 反应条件为：95 ℃ 5 min，95 ℃ 1 min，56 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，30 个循环，PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测分析。

1.6　胶质瘤标本的 GFAP 免疫组化染色与图像分析

收集 20 例经手术证实为星形胶质细胞瘤病人的肿瘤石蜡标本，常规进行 S-P 免疫组化染色，采用图像分析技术进行 GFAP-IR 染色强度分析，同时记数单位面积内 GFAP-IR 阳性细胞数，方法：400 倍物镜下每张切片随机选取 5 个视野，每个视野内观察 100 个细胞，记数阳性细胞数，最后计算出每 100 个细胞中阳性细胞数，不论染色强弱，凡显色者均为阳性，并与 Kernohan's 胶质瘤恶性程度分级结果比较。

1.7　统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 8.0 统计程序进行 t 检验。

2　结果

2.1　逆转录病毒 PLBskG 对 C6 细胞形态的影响

C6 细胞贴壁生长，生长迅速，为成纤维细胞样细胞，胞体较小，呈梭形，细胞突起细长，胞核圆形，多位于细胞中央。转染 PLBskG 1、3 d 后，与对照组比细胞形态无明显变化，5、7 d 后，形态发生改变，部分细胞呈多角形、突起回缩、变短；细胞生长速度较对照组明显加快。

2.2　GFAP-IR 免疫细胞化学染色

未转染 LBskG 的 C6 细胞，呈阳性 GFAP-IR 反应，以胞体周围着色明显，细胞突起稍弱，见图 1。转染 PLBskG 的 C6 细胞，GFAP-IR 染色强度明显减弱，部分细胞甚至呈 GFAP-IR 阴性反应，见图 2。



图 1　未转染 PLBskG 的 C6 细胞的 GFAP-IR 染色　（S-P × 200）
Fig 1　GFAP-IR staining of C6 cells without PLBskG　（S-P × 200）



图 2　转染 PLBskG 的 C6 细胞的 GFAP-IR 染色　（S-P × 400）
Fig 2　GFAP-IR staining of C6 cells with PLBskG　（S-P × 400）

2.3　细胞生长曲线及细胞增殖周期

转染 PLBskG 后，细胞生长变快，生长曲线表明，3 d 后细胞生长速度较对照组明显增快，见图 3。细胞周期分析表明，转染 PLBskG 组，G_2 + M 期细胞明显多于对照组（$P < 0.05$），而 G_0 期细胞数明显减少（$P < 0.05$），说明细胞分裂加速。

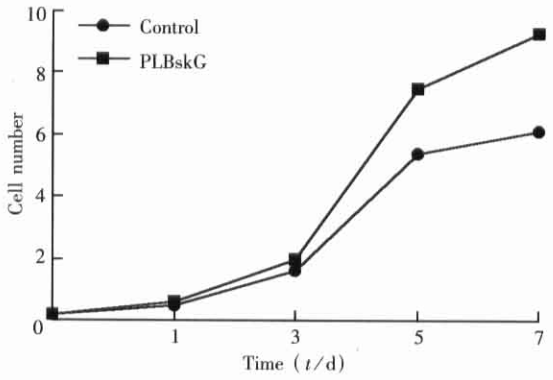
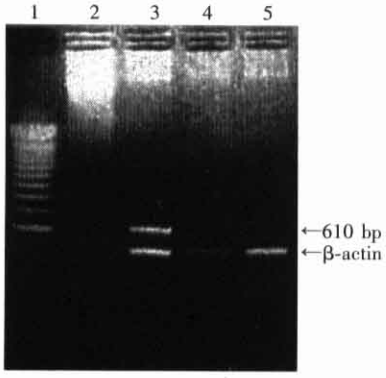


图3 PLBskG对C6细胞增殖的影响

Fig 3 Effect of PLBskG on the proliferation C6 cells

2.4 RT-PCR结果

分别提取逆转录病毒PLBskG感染5 d及7 d的C6细胞总RNA,经RT-PCR分析发现,PLBskG抑制C6细胞GFAP表达作用,结果见图4。



1: Marker; 2: Control; 3: Without PLBskG; 4: 5 days with PLBskG; 5: 7 days with PLBskG

图4 转染PLBskG的C6细胞RT-PCR结果

Fig 4 RT-PCR results of C6 cells with PLBskG

2.5 星形胶质细胞瘤GFAP-IR染色强度与细胞病理分级的关系

20例星形胶质细胞瘤肿瘤手术标本GFAP-IR染色强度与Kernohan病理分级的关系,见表1。

表1 星形胶质细胞瘤GFAP-IR阳性细胞胞浆平均光密度值、阳性细胞计数与病理分级关系

Tab 1 The relationship of MOD positive cells of GFAP-IR and pathological grade of astrocytoma

Pathological grade	n	D value ($\bar{x} \pm s$)	Count of GFAP-IR positive cells
Ⅰ	3	72 ± 9	72
Ⅱ	7	69 ± 6	65
Ⅲ	7	$61 \pm 4^{**\#}$	$53^{**\#}$
Ⅳ	3	$55 \pm 8^{*\#}$	$48^{*\#}$

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* Ⅰ; #: $P<0.05$, *vs* Ⅱ

3 讨论

细胞的恶性转化是与细胞的生长、粘附和细胞形态的改变密切相关的。细胞形态学上的改变通常反映了细胞的功能与生长特性的改变,是最具特征的表象。决定细胞形态的物质主要与细胞骨架有关。在真核细胞中,细胞的骨架由3类呈网状结构的蛋白质,即直径约6 nm的肌动蛋白微丝、20 nm的微管,以及介于其间,直径为8~10 nm的中间丝组成。相对于进化保守的微管和微丝来说,中间丝高度多变,并显示出明显的细胞表达特异性。以往的研究证明,中间丝基因的表达与器官的发育和组织的分化程度高度一致[1]。由此可见,中间丝为研究细胞的定性和分化提供了一个非常有价值的工具。

GFAP作为Ast的中间丝,最早是从长期患多发性硬化病人的白质斑块中分离获得的,也是最广泛用于识别正常或病理情况下星形胶质细胞来源组织的标志物。大量的研究证实,GFAP在维持Ast形态的正常与稳定,促进Ast突起生长与延长等方面起着重要的作用。在损伤和炎症的情况下,Ast呈反应状态,谓之反应性胶质化,表现为胞体肥大、突起增粗、延长,GFAP的表达明显上调。在星形胶质细胞瘤的发生与发展上,有研究表明,GFAP表达量的多少与肿瘤的恶性程度似乎存在关系[4,5],随着胶质瘤恶性程度的提高,GFAP合成有呈进行性丧失的趋势。然而,迄今有关GFAP表达变化与星形胶质细胞瘤恶性程度间的确切关系尚未最终阐明,许多问题有待深入认识和理解。Toda等[6]利用基因转移技术将GFAP导入C6细胞,发现C6细胞的形态发生明显改变,GFAP的表达水平升高,C6细胞的生长明显抑制,提示GFAP与C6细胞的生长可能有关。本研究利用逆转录病毒将反义GFAP导入C6细胞,抑制GFAP的合成。结果显示,C6细胞的生长速度较对照组明显加快,细胞增殖周期分析提示,G_2+M期细胞较对照组明显增多,M_0期细胞则相对减少,说明细胞处于明显的增殖活动状态。RT-PCR检测结果也证实,转染GFAP的C6细胞GFAP mRNA呈转录抑制状态,免疫细胞化学染色结果进一步证明转染反义GFAP的C6细胞GFAP免疫染色明显变浅,提示GFAP的合成受到一定程度的抑制。然而,胶质癌病人肿瘤细胞GFAP表达水平是否与肿瘤的恶性程度密切相关?为此本研究随机抽取了20例手术证实为星形胶质细胞瘤病人的免疫组化染色切片,利用图像分析系统比较根据Kernohan肿瘤恶性程度分级标准分为Ⅰ~Ⅳ的星形胶质细胞瘤GFAP表达水平的变

化，结果显示，随着肿瘤恶性程度的增高，单位面积内 GFAP-IR 阳性细胞的光密度值逐渐下降，GFAP-IR 阳性细胞的数量也明显减少，提示 GFAP 的表达量与星形胶质细胞瘤的恶性程度有关，结果与 Rutka 等[7] 的发现类似。

为什么 GFAP 表达的变化对星形胶质细胞瘤恶性程度有如此明显的影响？这是当前有关星形胶质细胞瘤发病机制方面备受关注的问题。从 GFAP 的结构上看，GFAP 与其他中间丝一样，分享了超过 70% 的序列同源性。与角蛋白（keratins）、波形蛋白（vimentin）、结蛋白（desmin）、GFAP 和周蛋白（peripherin）一样，均属于Ⅲ型中间丝。Toda 等[6] 研究比较了转染 GFAP 与 vimentin 对 C6 细胞生长的影响，发现提高 GFAP 的表达，C6 细胞生长呈明显抑制状态，但对 vimentin 表达的变化却影响不大。分析 GFAP 的分子结构，作者认为 GFAP 激活细胞生长的部位有两种可能：一是保守的 GFAP 杆状结构域（rod domain）可能对细胞生长起一般的抑制作用；二是 C6 细胞的生长可以特异性地受 GFAP 组织特异性的氨基末端所抑制。另一个有趣的现象就是 GFAP 与胶质细胞的粘连特性有关。Rutka 等[8] 利用反义 GFAP 治疗 GFAP 阳性的胶质瘤，结果显示抑制 GFAP 的表达后，胶质瘤细胞的粘附能力显著下降，肿瘤的浸润性降低。进一步研究显示，引起胶质细胞粘附性降低的原因与整合素有关。GFAP 的表达下调使整合素的表达下调，后者的表达下降导致 ECM 和细胞骨架的分离和细胞粘附的下降，以及细胞骨架的溶解，而细胞粘附能力的降低是肿瘤扩散的基础[5,9]。这可以解释胶质瘤总是浸润性生长，没有明显边界，手术难以全切的原因。从本研究结果来看，GFAP 表达水平与星形胶质细胞瘤的分化程度之间确有一定关系，根据 GFAP 表达水平的高低可在一定程度上预测肿瘤的恶性程度与预后，对临床具有指导意义。

参考文献：

[1] Chen M H, Yang W K, Whang Peng J, *et al*. Differential inducibilities of GFAP expression, cytostasis and apoptosis in primary cultures of human astrocytic tumours[J]. Apoptosis, 1998, 3(3): 171 - 182.

[2] Huang Q L, Cai W Q, Zhang K C. The Effect of the control GFAP gene expression on the growth of astrocytes and formation of glial scars[J]. Chin Sci Bull, 2000, 45(1): 38 - 44.

[3] 黄其林，蔡文琴，张可成. 反义 GFAP 逆转录病毒表达载体的构建及其对反应性星形胶质细胞作用[J]. 解剖学报，2000，31(2)：102 - 107.

[4] Peraud A, Mondal S, Hawkins C, *et al*. Expression of fascin, an actin-bundling protein, in astrocytomas of varying grades[J]. Brain Tumor Pathol, 2003, 20(2): 53 - 58.

[5] Zamecnik J, Vargova L, Homola A, *et al*. Extracellular matrix glycoproteins and diffusion barriers in human astrocytic tumours[J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2004, 30(4): 338 - 350.

[6] Toda M, Miura M, Asou H, *et al*. Cell growth suppression of astrocytoma C6 cells by glial fibrillary acidic protein cDNA transfection[J]. J Neurochem, 1994, 63(5): 1975 - 1978.

[7] Rutka J T, Hubbard S L, Fukuyama K, *et al*. Effects of antisense glial fibrillary acidic protein complementary DNA on the growth, invasion, and adhesion of human astrocytoma cells[J]. Cancer Res, 1994, 54(12): 3267 - 3272.

[8] Rutka J T, Murakami M, Dirks P B, *et al*. Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review[J]. J Neurosurg, 1997, 87(3): 420 - 430.

[9] Perzelcova A, Macikova, Tardy M, *et al*. Co-expression of GFAP, vimentin and cytokeratins in GL-15 glioblastoma cell line[J]. Neoplasma, 2000, 47(6): 362 - 366.

（编辑　陈聪连）

2005 年骨折微创治疗与生物学固定技术学习班

由《中华创伤骨科杂志》编辑部和山东省医学会骨科学分会主办，青岛市骨伤科医院承办的"2005 年骨折微创治疗与生物学固定技术学习班"，定于 2005 年 8 月 19 - 22 日在青岛举行。研讨会将邀请上海第九人民医院戴克戎院士，北京积水潭医院荣国威教授、王满宜教授，南方医科大学南方医院裴国献教授，山东大学齐鲁医院陈允震教授，山东省医院骨科周东升教授等创伤骨科专家就骨折的解剖、生物力学、影像学及 CT/MRI 诊断、分类、急救处理、内固定及外固定治疗、手术入路等进行专题演讲。

本项目为国家级继续教育项目，记国家Ⅰ类学分 10 分。欢迎报名参加！

会务费：780 元/人，食宿费：100 元·d^{-1}·$人^{-1}$。

报名地址：①广州市南方医科大学南方医院《中华创伤骨科杂志》编辑部　张宁　编辑收

邮编：510515，电话：(020)61641748，E-mail：zhangn-79@yahoo.com.cn

②山东省青岛市骨伤科医院科教信息科　丁梅　老师收，邮编：266021，电话：(0532)3615013

报到地点：青岛市市南区彰化路 4 号邮电部疗养院