文章编号:1000-5404(2010)06-0597-04

论著

Syntenin 在人脑胶质瘤中的表达及其临床意义

钟 东,唐文渊,吴海涛,杨 刚,晏 怡 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科)

[摘要] **目的** 研究不同级别人胶质瘤中 Syntenin 的表达规律,探讨其与胶质瘤分级的关系及临床意义。**方法** 采用免疫组化及免疫印迹方法检测 34 例脑胶质瘤组织中 Syntenin 的表达部位及表达量,比较各级之间的表达差异,分析 Syntenin 表达与病理级别的相关性及与恶性程度之间的关系。**结果** 免疫组化结果显示,正常脑组织中可见散在阳性表达细胞,Ⅰ级胶质瘤组织中未见阳性细胞表达,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ级胶质瘤组织中的阳性细胞数量增加,染色增强,吸光度值随肿瘤恶性程度增加而升高,与正常脑组织相比具有显著性差异($P<0.05$),Syntenin 表达水平与胶质瘤病理级别呈正相关($r=0.896$,$P<0.05$)。免疫印迹结果显示,Ⅰ级胶质瘤组织中未检测到阳性条带,而Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ级胶质瘤组织中阳性条带的相对光密度比值随肿瘤恶性程度增加而升高,差异具有显著性($P<0.05$)。**结论** Syntenin 的表达与胶质瘤病理分级相关,可能在肿瘤恶性进展中具有重要作用。

[关键词] Syntenin;胶质瘤;免疫组化
[中图法分类号] R341;R730.23;R730.264 **[文献标志码]** A

Expression of syntenin in human glioma and its clinical significance: report of 34 cases

Zhong Dong, Tang Wenyuan, Wu Haitao, Yang Gang, Yan Yi (Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] Objective To detect the expression of syntenin in human gliomas and evaluate the relationship between its expression and the tumor grades. Methods Clinical data of 34 cases pathologically verified human glioma, including 19 males and 15 females, with an age ranging from 17 to 68 (mean 43) were analyzed retrospectively. The tumors were pathologically categorized and graded according to WHO classification of tumours of the central nervous system 2007. The expression of syntenin protein in these tumor tissues were detected by immunohistochemical staining and Western blot analysis. The results were compared with different glioma grades and pathological differentiation. Results The positive expression cells were detected scatteredly in normal brain tissue, while not in human glioma of WHO-Ⅰ by immunohistochemistry. The number of the positive cells was increased and the staining became stronger in the tissue with the human glioma of WHO-Ⅱ, WHO-Ⅲ and WHO-Ⅳ in turn. Image analysis showed that there were more syntenin expressed with the increase of tumor grade, with significant difference with that of normal brain tissue ($P<0.05$). The expression of syntenin was positively correlated with tumor grade ($r=0.896$, $P<0.05$). The glioma tissue of WHO-Ⅰ had no positive band detected, while there were more syntenin expression in the glioma of WHO-Ⅱ, WHO-Ⅲ and WHO-Ⅳ in turn, with significantly differences ($P<0.05$). Conclusion The expression of syntenin has a significant correlation with glioma grades, which maybe play an important role in the progress of the human glioma.

[Key words] syntenin; glioma; immunchistochemistry

Corresponding author: Tang Wenyuan, Tel: 86-23-89012161

胶质瘤是成人颅内最常见的原发性肿瘤,其难治性及易复发性均与其高度的侵袭性有关[1-4]。有学者认为[5],胶质瘤细胞的迁移在脑胶质瘤侵袭过程中发挥重要作用,是决定手术或其他治疗方案疗效的制约因素,从细胞迁移的角度对胶质瘤的侵袭性进行研究,有望从分子和细胞水平揭示脑胶质瘤的发生、发展过程。近年来的研究发现,Syntenin 作为一类支架蛋白在多种肿瘤(包括乳腺癌、消化系统肿瘤、黑色素瘤等)组织中表达增强,在肿瘤细胞迁移的过程中起到关键的作用[6]。然而,国内外尚缺乏 Syntenin 在脑胶质瘤中表达的相关研究。为此,本研究应用免疫组化染色和免疫印迹方法研究不同病理级别人胶质瘤中

[通信作者] 唐文渊,电话:(023)89012161

Syntenin 的表达情况,比较其与胶质瘤分级的关系,探讨 Syntenin 表达在胶质瘤组织中表达的临床意义。

1 材料与方法

1.1 标本来源及临床资料

收集本科自2008年6月至2009年6月手术切除并经病理检测证实的胶质瘤标本34例,其中男性19例,女性15例,年龄17~68岁,平均43岁。按照世界卫生组织(2007年)神经系统肿瘤分类标准对以上肿瘤组织进行分级和分型,其中胶质瘤Ⅰ级8例,Ⅱ级9例,Ⅲ级10例,Ⅳ级7例;病理类型中星形胶质细胞瘤25例,室管膜瘤2例,原发性胶质母细胞瘤6例,胶质肉瘤1例;幕上肿瘤26例,幕下肿瘤8例。正常脑组织为颅内深部肿瘤切除术经皮层入路中必须切除的脑组织作为对照组。将收集的胶质瘤标本中出血、坏死、电灼的组织除去,生理盐水冲洗干净后用4%的多聚甲醛固定,石蜡包埋,连续切取约4~6 μm的切片备用。

1.2 主要试剂

兔抗人 Syntenin 多克隆抗体(Abcam 公司,英国),小鼠抗人 β-actin 单克隆抗体(Sigma 公司,美国),PV9001 超敏两步法免疫组化检测系统及 DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥公司,RIPA 裂解液购自碧云天生物技术研究所。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组织化学检测脑组织中 Syntenin 的分布 以石蜡包块制作切片,所有载玻片均经过多聚赖氨酸(poly-lysine)包被处理以防脱片。免疫组化具体实验步骤按照中杉金桥公司提供的操作说明书进行(一抗工作浓度为1∶500),DAB 显色后苏木精复染细胞核,脱水透明,显微镜下观察。病理分级由重庆医科大学病理教研室医师阅 HE 切片后完成。阴性对照取相同量的正常羊血清代替 Syntenin 抗体,其余步骤同上。免疫组化染色以细胞质着色呈棕黄色为阳性表达细胞,在装有专业显微数码相机(olympus DP70)的光学显微镜下,每张切片随机选择4个200倍视野,拍摄照片。采用图像分析系统(北航 CM-2000B)进行密度扫描,检测每个视野内平均吸光度 A 值。

1.3.2 免疫印迹检测脑组织中 Syntenin 的表达 将收集的脑组织取0.5 g用 PBS 漂洗细胞后,剪碎组织,加入200 μl 裂解液,研磨至组织无肉眼可见碎片(冰上操作)。吸取组织悬液至 EP 管中,用200 μl 裂解液冲洗研磨器,把组织悬液尽量冲洗下来,吸入 EP 管中,重复1次,共600 μl 组织悬液离心12 000 ×g,30 min,4 ℃;取上清并测定蛋白浓度。将备好的样品按60 μg蛋白/道上样于10% SDS-PAGE gels(Invitrogen),加入电泳缓冲液,120 mV,2.5 h;按常规电转移步骤将蛋白转至 PVDF 膜;经5%的脱脂牛奶封闭1 h后,用5% BSA/TBST 缓冲液稀释的兔抗人 Syntenin 多克隆抗体(稀释度为1∶1 000)和 β-actin 抗体(稀释度为1∶1 000)孵育2 h;TBST 漂洗3次,每次5 min,用5%的脱脂牛奶/TBST 缓冲液稀释的二抗(浓度为1∶10 000)孵育1 h;TBST 漂洗3次,每次5 min,ECL 避光孵育15 min后,用保鲜膜完全包裹免疫印迹膜,去除皱褶。用胶带将免疫印迹膜固定在暗盒内,蛋白带面向上,暗房内压 X 光胶片,曝光、显影、冲洗。图像分析仪对条带扫描后采用 Smartview 2000 软件测定各条带(待测蛋白与内参蛋白 β-actin)的灰度值,比较二者的比值。

1.4 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 8.1 软件进行重复测量数据的方差分析(t 检验)和相关性分析。

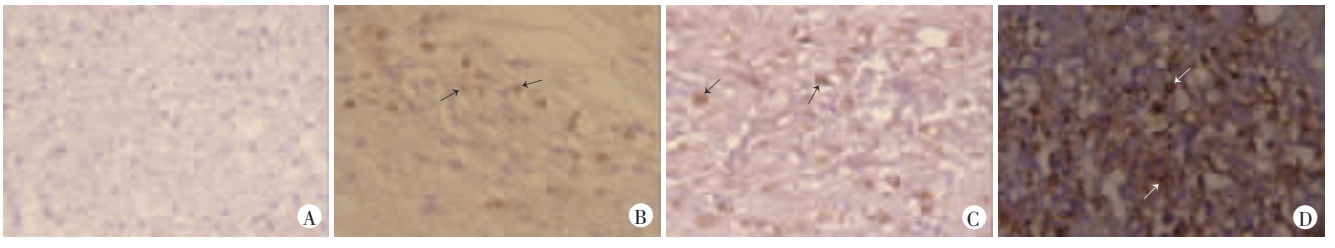
2 结果

2.1 免疫组织化学观察人胶质瘤中 Syntenin 的表达

阴性对照中未见 Syntenin 表达。正常脑组织中可见散在细胞质呈棕黄色的阳性表达细胞;在不同病理分级的胶质瘤组织中,Syntenin 的表达出现差异。Ⅰ级星形胶质细胞瘤组织中细胞密度增加,水肿严重,但未见阳性细胞表达;在Ⅱ级星形胶质细胞瘤中,可见棕黄色阳性细胞表达;Ⅲ级星形胶质细胞肿瘤组织中,棕黄色阳性细胞数量增加,染色增强;在多形性胶质母细胞瘤中,细胞形态明显变异,阳性细胞分布密集,染色增强(图1)。图像分析系统检测各组织切片平均吸光度 A 值结果显示:正常脑组织为(0.408 ± 0.035);Ⅰ~Ⅳ级胶质细胞瘤组织分别为(0.396 ± 0.016),(0.588 ± 0.007),(0.636 ± 0.014)和(0.747 ± 0.027)。其中,Ⅰ级胶质细胞瘤组织与正常脑组织的吸光度值相比无明显差异($P > 0.05$),Ⅱ~Ⅳ级胶质细胞瘤组织的吸光度值随肿瘤恶性程度增加而升高,与正常脑组织相比具有显著性差异($P < 0.05$)。根据病理检测结果,Spearman 等级相关分析显示,Syntenin 表达平与胶质瘤病理级别呈正相关($r = 0.896$, $P < 0.05$)。

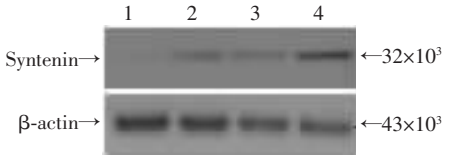
2.2 免疫印迹法检测人胶质瘤中 Syntenin 的表达水平

免疫印迹结果显示,Ⅰ级胶质瘤组织中未检测到分子量大小为 32×10^3 的目的条带,而Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ级胶质瘤组织中明显可见的阳性条带(图2)。Syntenin 条带与内参 β-actin 条带灰度值之比提示,Syntenin 蛋白的相对光密度比值随肿瘤恶性程度增加而升高,差异具有显著性($P < 0.05$)。



A:Ⅰ级胶质瘤组织;B:Ⅱ级胶质瘤组织;C:Ⅲ级胶质瘤组织;D:Ⅳ级胶质瘤组织 ↑:阳性细胞

图1 免疫组织化学观察人胶质瘤中 Syntenin 的表达 (二步法 ×200)



1：Ⅰ级胶质瘤组织；2：Ⅱ级胶质瘤组织；3：Ⅲ级胶质瘤组织；4：Ⅳ级胶质瘤组织

图2 免疫印迹法检测人胶质瘤中 Syntenin 的表达水平

3 讨论

Syntenin（又称为 mda-9）最早由人黑色素瘤中克隆出来，其 cDNA 全长约 21 kb，包含 894 bp 的开放阅读框架，编码 298 个氨基酸残基，分子量大小约为 32×10^3[7,8]。临床研究发现，Syntenin 在多种肿瘤（包括乳腺癌、消化系统肿瘤、黑色素瘤等）组织中表达增强，推测其在肿瘤的转移和浸润过程中发挥重要作用[6]。对其分子结构及作用机制的研究结果表明，Syntenin 具有两个 PDZ 结构域（或称“盘状同源区域”，是一种由 80～100 个氨基酸残基组成的保守序列，最初的名称是“突触前密度蛋白”PSD-95，或称“膜相关性鸟苷酸激酶”DLG4），可与多种细胞膜受体胞内端以及细胞内的信号分子结合，从而作为支架蛋白调控细胞膜受体的聚集、细胞骨架的重建等细胞病理生理过程，与肿瘤细胞的黏附、增殖和迁移能力密切相关[9]。脑胶质瘤细胞的迁移能力强，广泛侵袭性周围组织，是影响各种治疗效果的关键因素；而胶质瘤组织中是否有 Syntenin 的表达以及其规律如何，目前国内外尚缺乏相关的研究。

本实验通过免疫组织化学和免疫印迹方法系统检测了正常脑组织和不同级别胶质瘤组织中 Syntenin 的表达，分析了其与肿瘤组织病理分级的关系。结果发现，正常脑组织可见散在细胞质呈棕黄色的阳性表达细胞；在不同病理分级的胶质瘤组织中，Syntenin 的表达出现较大差异。Ⅰ级星形胶质细胞瘤组织中几乎未见阳性细胞表达；而在Ⅱ、Ⅲ级星形胶质细胞瘤以及多形性胶质母细胞瘤组织中，可见阳性细胞数量增加，染色增强。免疫印迹结果显示，除Ⅰ级胶质瘤组织外，Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ级胶质瘤组织中均可见明显的阳性条带。根据病理检测结果，Spearman 等级相关分析显示，Syntenin 表达水平与胶质瘤病理级别呈正相关（$r=0.896$，$P<0.05$）。对 Syntenin 亚细胞定位的研究发现，其主要分布于细胞浆靠近胞膜处，尤其是与周围细胞相接触的部位，提示 Syntenin 可能通过细胞间的相互作用调节肿瘤细胞的转移；不同类型的细胞中过表达 Syntenin 可诱导包括皱褶、片状伪足、指突样以及神经突样质膜结构的形成，进一步证实了其可能通过调节肿瘤细胞前导端质膜的结构和功能发挥促肿瘤转移因子的作用[10]。细胞伤痕愈合实验结果显示，黑色素瘤细胞从辐射状生长期向侵袭性垂直生长期转换的过程中伴随着 Syntenin 的表达上调，运动能力增强以及广泛的树状突起形成，推测 Syntenin 可影响黑色素瘤细胞肌动蛋白的动力学；分子机制研究发现 Syntenin 与调节细胞膜突起和细胞迁移的局部连接结构关键成分——黏着斑激酶（FAK）共表达，并上调 FAK 的活性，证实了 Syntenin 可通过这一机制介导黑色素瘤的转移[11]。而在脑胶质瘤中 Syntenin 是否也通过与 FAK 相互作用而促进胶质瘤细胞的迁移，还有待于进一步的研究。

本研究在正常脑组织中亦观察到部分散在分布的阳性表达细胞，但尚不清楚阳性细胞的类型。有研究学者在少突胶质前体细胞（OPCs 的细胞）中通过酵母双杂交技术以 NG2 为诱饵，发现 Syntenin-1 是其相互作用的对象，二者在 OPC 的细胞表面形成多个树突样突起；免疫共沉淀进一步证实了二者的相互作用，静默 Syntenin-1 的表达可降低 NG2 阳性 OPC 细胞的迁移能力；作者认为 NG2 与下游肌动蛋白的作用必须依靠支架蛋白的调节，而 Syntenin-1 可通过其 PDZ 结构域与 NG2 的胞内端位点结合，将其引导到迁移细胞前驱端的片状伪足上，也即 Syntenin-1 作为 Syntenin-1/NG2 复合物的接头蛋白与肌动蛋白相互作用，对细胞骨架进行调节，促进少突胶质前体细胞的迁移过程[12]。大量研究证实，少突胶质前体细胞可存在于成熟的脑组织中，其与海马神经元之间存在快速神经元-胶质细胞突触传递[13]；并且可分化成神经元和神经胶质细胞[14-17]。我们所观察到正常脑组织中 Syntenin 阳性的细胞是否为少突胶质前体细胞，还需要研究证实。

参考文献：

[1] Nakada M, Nakada S, Demuth T, *et al*. Molecular targets of glioma invasion[J]. Cell Mol Life Sci, 2007, 64(4): 458-478.

[2] 赵林涛，卞修武，姜建勇，等. 下调 CXCR4 表达对胶质瘤干细胞侵袭能力和 VEGF 分泌量的影响[J]. 第三军医大学学报，2009，31(11)：1049-1052.

[3] 蒋雪峰，卞修武，王清良，等. 人脑恶性胶质瘤微血管内皮细胞的分离培养与体外血管生成特性[J]. 第三军医大学学报，2005，27(4)：291-294.

[4] 程迎新，唐文渊. 恶性胶质瘤患者外周血淋巴细胞基因表达谱的研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(16)：1707-1709.

[5] Sontheimer H. An unexpected role for ion channels in brain tumor metastasis[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2008, 233(7): 779-791.

[6] Sarkar D, Boukerche H, Su Z Z, *et al*. mda-9/Syntenin: more than just a simple adapter protein when it comes to cancer metastasis[R]. Cancer Res, 2008, 68(9): 3087-3093.

[7] Jiang H, Su Z Z, Boyd J, *et al*. Gene expression changes associated with reversible growth suppression and the induction of terminal differentiation in human melanoma cells[J]. Mol Cell Differ, 1993, 1:

41-66.
[8] Lin J J, Jiang H, Fisher P B. Characterization of a novel melanoma differentiation-associated gene, mda-9, that is down-regulated during terminal cell differentiation[J]. Mol Cell Differ, 1996, 4: 317-333.
[9] Beekman J M, Coffer P J. The ins and outs of syntenin, a multifunctional intracellular adaptor protein[J]. J Cell Sci, 2008, 121(Pt 9): 1349-1355.
[10] Zimmermann P, Tomatis D, Rosas M, *et al*. Characterization of syntenin, a syndecan-binding PDZ protein, as a component of cell adhesion sites and microfilaments[J]. Mol Biol Cell, 2001, 12(2): 339-350.
[11] Boukerche H, Su Z Z, Emdad L, *et al*. mda-9/Syntenin: a positive regulator of melanoma metastasis[J]. Cancer Res, 2005, 65(23): 10901-10911.
[12] Chatterjee N, Stegmuller J, Schatzle P, *et al*. Interaction of syntenin-1 and the NG2 proteoglycan in migratory oligodendrocyte precursor cells[J]. J Biol Chem, 2008, 283(13): 8310-8317.
[13] Tong X P, Li X Y, Zhou B, *et al*. Ca(2+) signaling evoked by activation of Na(+) channels and Na(+)/Ca(2+) exchangers is required for GABA-induced NG2 cell migration[J]. J Cell Biol, 2009, 186(1): 113-128.
[14] Wang A, He B P. Characteristics and functions of NG2 cells in normal brain and neuropathology[J]. Neurol Res, 2009, 31(2): 144-150.
[15] 陈鹏慧, 蔡文琴, 王丽雁, 等. NG2胶质细胞在成年大鼠脑内的分布及形态特征[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(1): 31-34.
[16] 陈鹏慧, 蔡文琴, 王丽雁. 大鼠少突胶质细胞前体细胞的生后发育特点及围生期电生理特性的研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(19): 1783-1786.
[17] 焦岩, 胡俊, 范沁林, 等. 大鼠脑缺血血管内皮生长因子与NG2细胞增殖关系的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(2): 123-126.

(**收稿**:2010-01-29;**修回**:2010-02-02)
(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2010)06-0600-01

346例术后残胃病变内镜检查分析

冯定奇 (402760 重庆,重庆市璧山县人民医院内二病区)

[关键词] 胃残端;胃镜检查;胃切除术
[中图法分类号] R573 **[文献标志码]** B

1 临床资料

本组病例346例(2003年5月至2009年5月),其中男性267例,女性79例,年龄29~84岁,平均53.6岁。术后距胃镜检查间隔时间2个月至39年。其中毕Ⅰ式胃143例,毕Ⅱ式胃203例。术前原发病:胃癌67例,胃溃疡193例,十二指肠球部溃疡(含幽门梗阻)59例,胃十二指肠复合溃疡27例。胃镜检查前主要临床表现有上腹疼痛78.24%,腹胀不适46.30%,恶心呕吐11.18%,呕血或黑便10.76%,消瘦6.20%。

采用日本OLYMPUS-V70电子胃镜对346例残胃患者的残胃、吻合口、输出入袢进行观察,并对可疑病变行粘膜组织活检送病理学及组织学染色检查。均在吻合口及胃体取胃黏膜组织作快速尿素酶检测幽门螺杆菌(*Hp*)。

数据采用χ^2检验。

2 结果

2.1 胃镜及病理结果

346例患者经胃镜及病理检查证实有残胃及吻合口炎259例(74.86%);残胃溃疡12例(3.47%);吻合口溃疡35例(10.12%);残胃癌19例(5.49%);无异常21例(6.07%)。其中胃镜检查发现胆汁反流有237例,无胆汁反流有109例。

2.2 幽门螺杆菌检出结果

346例患者中*Hp*阳性79例(22.83%),其中残胃及吻合口炎*Hp*阳性66例(25.48%);残胃溃疡*Hp*阳性3例(25%);吻合口溃疡*Hp*阳性7例(20%);残胃癌*Hp*阳性3例(15.79%),各残胃病变的*Hp*阳性率相比无统计学差异($P>0.05$)。

2.3 不同术式与残胃病变的关系

毕Ⅰ式与毕Ⅱ式两种手术方式下各残胃病变发生率相比较有显著性差异($P<0.01$)。见表1。

表1 不同术式与残胃病变发生的关系[例数(%)]

	残胃吻合口炎	残胃溃疡	吻合口溃疡	残胃癌	胆汁反流
例数	259	12	35	19	237
毕Ⅰ式	86(33.20)	4(33.33)	11(31.43)	5(26.32)	75(31.65)
毕Ⅱ式	173(66.80)	8(66.67)	24(68.57)	14(73.68)	162(68.35)

3 讨论

本组资料显示,残胃吻合口炎74.86%(259/346)及胆汁反流68.50%(237/346)最常见,与文献[1]报道相似,其次是良性溃疡13.58%(47/346)、残胃癌5.49%(19/346)。可以看出残胃的各种病变发生率均较正常人群高。这可能是因为胃大部切除术后,切除了幽门及其神经支配,破坏了胃窦-幽门-十二指肠的正常解剖结构,导致十二指肠液返流入胃内,其中的胆汁和胰液能溶解残胃黏膜上皮细胞及黏液,从而破坏胃黏膜屏障,引起残胃及吻合口炎症、黏膜腺体萎缩、糜烂、出血甚至溃疡形成。反流的胆汁还可促使黏膜细胞增生,从而提高对突变性刺激(如硝酸盐、亚硝酸盐及次级胆酸)的敏感性,增强了上述物质的致癌性。同时胃内长期低酸、高pH值,有利于细菌的生长繁殖,加速胆汁分解,使胃内硝酸盐减少而亚硝胺增加,导致残胃癌的发生。

(下转603页)

[通信作者] 冯定奇,E-mail:fdq_bs@sina.com