短篇论著

文章编号:1000-5404(2012)03-0274-03

ANXA 2 和 EGFR 在人脑胶质瘤中的表达及临床意义

杨 斌[1],刘献志[1],李进军[1],辛艳超[1],翟 瑛[2] (450052 郑州,郑州大学第一附属医院:神经外科[1],口腔颌面外科[2])

[摘要] **目的** 研究 EGFR 和 ANXA 2 信号通路在不同级别人脑胶质瘤组织中的表达情况及临床意义。**方法** 采用免疫组化 S-P 法分别对 38 例低级别胶质瘤(Ⅰ、Ⅱ级)和 38 例高级别胶质瘤(Ⅲ、Ⅳ级)以及 10 例正常脑组织中的 ANXA 2 和 EGFR 的表达情况进行检测,并分析 EGFR 和 ANXA 2 表达情况及其相关性。**结果** 与正常脑组织相比,EGFR 和 ANXA 2 在人脑胶质瘤中的表达均显著增加。通过阳性区平均积分光密度定量分析,在正常组、低级别胶质瘤组、高级别胶质瘤组 EGFR 和 ANXA 2 数值分别为(106.49 ± 5.69)和(103.52 ± 3.75)、(124.96 ± 3.39)和(125.62 ± 2.37)、(149.66 ± 4.63)和(148.23 ± 5.29),各组之间 EGFR 和 ANXA 2 的测定值有统计学差异($F = 86.58$, $F = 101.83$, $P < 0.05$),并且EGFR 和 ANXA 2 表达也呈现显著正相关($r = 0.521$, $P < 0.05$)。**结论** EGFR 和 ANXA 2 在人脑胶质瘤中的表达均显著增加,且其表达具有的相关性。EGFR 和 ANXA 2 信号通路可能在人脑胶质瘤的发生、发展中起着一定的协同作用。

[关键词] 人脑胶质瘤;EGFR;ANXA 2;免疫组化
[中图法分类号] R730.23; R730.264; R739.41 [文献标志码] A

胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤,其本质是一种多基因异常疾病。由于人脑胶质瘤在在发病过程中程侵袭性生长,所以治疗困难,手术难以全部切除,预后较差。膜联蛋白 A2(annexin 2,ANXA 2)是一类钙依赖的磷脂结合蛋白,在 DNA 合成及细胞增殖中起重要作用,其 C 端可以和 c-myc mRNA 结合,来调节 c-myc 基因的功能,c-myc 基因编码的蛋白可以作为转录来促进因子细胞增殖,在肿瘤形成中发挥着生理和病理的多重作用[1]。上皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)的是一种具有酪氨酸蛋白激酶活性的膜受体,与生长因子(epidermal growth factor,EGF)构成的 EGF/EGFR 信号通路,被激活后可以将细胞外的信号传递到细胞内和细胞核,现在已发现 EGFR 在恶性肿瘤中活性明显增高,可能与肿瘤的恶性程度有一定关系[2]。本研究观察 EGFR 和 ANXA2 在不同病理级别人脑胶质瘤组织以及正常脑组织中的表达及其相关性,进一步探索人脑胶质瘤侵袭性的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选取本科 2008 年 5 月至 2011 年 2 月收治的胶质瘤住院患者手术切除且保存完好的胶质瘤组织石蜡包埋标本 76 例,其中女性 40 例,男性 36 例,患者年龄 6.5 ~ 83 岁(44.09 ± 2.06)岁。根据 2000 年修改的 WHO 神经系统肿瘤分级标准来对其进行组织学的分级,其中Ⅰ级 10 例,Ⅱ级 28 例,Ⅲ级 22 例,Ⅳ级 16 例,其中把Ⅰ级和Ⅱ级人脑胶质瘤合并为低级别度恶性组,把Ⅲ级和Ⅳ级人脑胶质瘤级合并为高级别度恶性组,另取 10 例脑外伤患者的正常脑组织作对照,正常脑组织均来自本科同期因颅脑损伤行颅内减压术中切除的正常脑组织,并经我院病理科病理检验证实为正常脑组织。选取标准,所有患者无其他严重合并症,无肥胖、糖尿病等代谢性疾病,术前均行 MRI 或 CT 检查,且患者均为第 1 次手术治疗,术前未进行过化疗和放疗。所有标本在手术切除后去除出血、坏死、电灼的组织,用生理盐水反复冲洗去除血污,2 h 内用 10% 福尔马林溶液浸泡固定,1 周内用石蜡包埋,留以备用。

1.2 主要仪器与试剂

1.2.1 实验仪器 电子天平(BS224S 德国,220 g/0.1 mg)、德国 Lecia 显微照相系统(上海山富科学仪器有限公司)、分析系统(上海山富科学仪器有限公司,Biosens Digital Imaging System v1.6)。

1.2.2 实验试剂 兔抗人多克隆抗体 EGFR 和 ANXA2 为美国 Signalway antibodys 公司生产;免疫组化染色采用 S-P 法,S-P9001 试剂盒、DAB 试剂盒、苏木精染液、PBS 缓冲液(pH 7.2 ~ 7.4)均购于北京市中杉金桥生物技术有限公司;其他实验必备试剂均由郑州大学基础医学院生化实验室提供。

1.3 实验方法

采用 S-P 法进行 EGFR 和 ANXA 2 检测,操作严格按照试剂盒说明书进行。兔抗人多克隆抗体 EGFR 和 ANXA 2 分别用 PBS 稀释为 1∶100 的浓度;PBS 代替一抗作为阴性对照;采用已知阳性表达的胶质瘤标本作为阳性对照。

1.4 免疫组织化学结果分析

EGFR 和 ANXA 2 免疫组化均采用 PBS 代替一抗作空白对照,已知有阳性表达的肿瘤标本作为阳性对照,同时应用组内对照。

采用 Biosens Digital Imaging System v1.6 分析系统在统一光强,统一放大倍数(10 × 40)下测量表达情况,以染色最淡的视野为起点。任选 5 个视野测定其阳性区平均积分光密度作

[通信作者] 刘献志,电话:(0371)66862242 E-mail:lxz@zzu.edu.cn

为 EGFR 和 ANXA2 阳性表达的量化指标。实验采用配对设计的方法,将 EGFR 与 ANXA 2 按照编号进行配对,并排除其他可能影响因素,从而便于相关性分析。

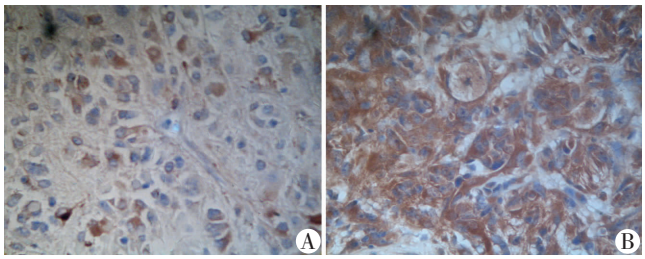
1.5 统计学处理

应用 SPSS 16.0 统计软件,对于样本均数的比较用方差分析,以及 LSD-*t* 检验和 Bonferroni 法检验。

2 结果

2.1 EGFR 在各组人脑胶质瘤中的表达

根据 Biosens Digital Imaging System v1.6 分析系统分析示阳性区平均积分光密度。平均积分光密度反映了 EGFR 阳性表达情况:在正常组为(106.49 ± 5.69),在低级别胶质瘤中为(124.96 ± 3.39),在高级别胶质瘤中为(149.66 ± 4.63)。行方差分析结果显示有统计学差异($F = 86.58$, $P < 0.05$),提示阳性区平均积分光密度在正常组、低级别胶质瘤组、高级别胶质瘤组中不全相同,再行 LSD-*t* 检验和 Bonferroni 法检验,结果各组之间均有统计学差异($P < 0.05$),提示 EGFR 表达随着胶质瘤恶性级别的提高而增加(图 1)。

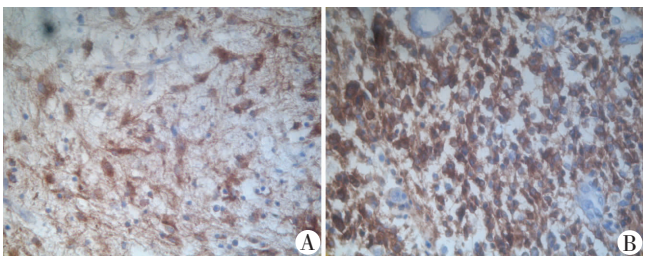


A:低级别胶质瘤组织;B:高级别胶质瘤组织

图 1 EGFR 在不同级别质瘤组织中的表达 (S-P ×400)

2.2 ANXA 2 在各组人脑胶质瘤中的表达

根据 Biosens Digital Imaging System v1.6 分析系统分析示阳性区平均积分光密度。平均积分光密度反映了 ANXA 2 阳性表达情况:在正常组为(103.52 ± 3.75),在低级别胶质瘤中为(125.62 ± 2.37),在高级别胶质瘤中为(148.23 ± 5.29)。行方差分析结果为有统计学差异($F = 101.83$, $P < 0.05$),提示阳性区平均积分光密度在正常组、低级别胶质瘤组、高级别胶质瘤组中不全相同,再行 LSD-*t* 检验和 Bonferroni 法检验,结果各组之间均有统计学差异($P < 0.05$),提示 ANXA 2 表达随着胶质瘤恶性级别的提高而增加(图 2)。



A:低级别胶质瘤组织;B:高级别胶质瘤组织

图 2 ANXA2 在不同级别胶质瘤组织中的表达 (S-P ×400)

2.3 EGFR 与 ANXA 2 相关性分析

在对实验材料分组处理时,采用将 EGFR 与 ANXA 2 实验编号配对设计的方法,分析它们之间的相关性。在 76 例病例标本中,EGFR 和 ANXA 2 在人脑胶质瘤中阳性表达率分别为 57.89% 和 60.52%,其中 34 例为同时阳性表达。行 Spearman 相关性分析,结果显示人脑胶质瘤中 EGFR 与 ANXA 2 的表达呈现一定的正相关性($r_s = 0.402$, $P < 0.01$)。而根据阳性区平均积分光密度测定结果也提示 ANXA 2 与 EGFR 的表达存在相关($r = 0.521$, $P < 0.05$)。两种测定方法的相关系数存在差异,可能是由于仪器的精确度或者实验操作等因素所造成的误差引起。

3 讨论

ANXA 2 是一类受 Ca^{2+} 调节、能够与带负电荷的膜磷脂结合的蛋白家族,在许多原核和真核细胞中广泛表达。目前已发现 ANXA2 在人类多种恶性肿瘤中均有异常表达。ANXA2 的过表度达程度与肿瘤组织大小、侵袭力、组织类型、和病理级别密切相关[3]。本实验结果显示:ANXA 2 的表达随着人脑脑胶质瘤恶性程度的增高而增高,对于 ANXA 2 在人脑胶质瘤的发生发展过程中的可能的作用机理主要有以下 4 个方面:首先,ANXA2 的 C 端可以和 c-mycmRNA 相结合,以调节 c-myc 基因的功能,c-myc 基因编码的蛋白质可以作为转录因子致使肿瘤细胞的增殖,因此 ANXA 2 在 DNA 的合成及人脑胶质瘤细胞的分化和增殖中起重要作用。其次,ANXA 2 可以在一定程度上增强 DNA 聚合酶的活性,使肿瘤细胞的生长和扩散速度增快。再者,ANXA 2 还是 EGFR/ras/MAPK/PKC 信号转导通路的底物, EGFR 的自分泌是目前认为是人脑胶质瘤生长和侵袭的主要原因之一,而 ANXA 2 对此信号通路可能有重要的作用[4]。最后,ANXA2 还参与了人脑胶质瘤向周围组织的局部浸润和转移,这可能是由于 ANXA 2 与组织蛋白酶 B 、PL、t-PA、PLG 以及 S100 家族等等物质的共同协同作用,并且促进人脑胶质瘤血管的形成和延伸,进一步增强人脑胶质瘤的侵袭性和恶性度[5]。

EGFR 影响基因表达主要是通过跨膜信号传导系统将细胞外的信号转送到细胞内,从而促进细胞的增殖。根据研究发现在人体许多的实体肿瘤中均存在着 EGFR 的高度表达或者异常表达[6]。本实验采用阳性区平均光密度定量测定的方法检测人脑胶质瘤中 EGFR 的表达情况,结果显示 EGFR 表达随着胶质瘤恶性程度的提高而增加。其原因可能是与 EGFR 基因在恶性人脑胶质瘤中的重排,突变和过表达有关。EGFR 基因重排后,产生异常转录物,同时阻遏基因的作用弱化,导致正常结构的 EGFR 基因大量表达,异常和正常转录物的共同表达使得大量转录产物借助于信号转导使细胞的生长失去控制,最终恶性化[7]。另外 EGFR

基因的突变也是诱发过度表达的因素之一,EGFR 基因扩增的部位大部分在细胞内区和跨膜区,只有小部分在胞外区,扩增程度常与受体过表达程度一致,突变基因较正常基因表达的 EGFR 缺少了与配体结合的胞外区及梭基末端二个酪氨酸自磷酸化部位,这样的改变导致 EGFR 不受配体的调控便可以持续的产生相当于 EGF 的信号从而被激活,从而促使细胞增殖,细胞侵袭性也同时增强[8-9]。通过研究提示 EGFR 的阳性表达率与胶质瘤级别有一定的正相关性,这启发我们如果能够阻断 EGFR 的重排或突变所导致的过度表达,则可能会抑制细胞异常增殖,从而阻断人脑胶质瘤恶性进展。

对 EGFR 和 ANXA2 人脑胶质瘤中的表达相关性的研究,国内尚没有明确的结论,但是国外文献中有所报道,本实验通过使用免疫组织化学的方法试图探索 EGFR 和 ANXA 2 之间的关联性,通过阳性区平均光密度分析,提示了 ANXA 2 的表达与 EGFR 的过度表达有一定正相关性,说明在人脑胶质瘤的发生、发展过程中,EGFR 与 ANXA 2 可能起着协同作用,共同参与人脑胶质瘤的侵袭性生长。其机制可能是 ANXA 2 是 EGFR/ras /MAPK/PKC 信号转导通路的底物,ANXA 2 可明显增强 DNA 聚合酶的活性,并且诱导 ERK1/2 的磷酸化,从而激活 MAPK 的信号转导通路,当 EGFR 和 ANXA 2 在人脑胶质瘤细胞中同时高表达时 MAPK 信号通路的作用得到显著加强,从而促进人脑胶质瘤细胞的侵袭性生长[10]。同时,ANXA 2 还可以促使肿瘤细胞外基质的降解和纤维蛋白的级联水解,从而加速了人脑胶质瘤细胞的迁移和脱落,这更加促进了人脑胶质瘤细胞的相周围组织的转移。但是 EGFR 与 ANXA 2 相互作用的具体分子生物学机制,还待进一步研究。

综上所述,EGFR 和 ANXA2 都是反映人脑胶质瘤细胞增殖和侵袭活性的标志性物质,因而针对 EGFR 的过度表达进行干预的同时,适当运用 ANXA2 抑制剂联合治疗人脑胶质瘤,可能会产生一定的治疗效果,尤其是在原发的人脑经胶质瘤中可能将更加有效。

参考文献:

[1] Filipenko N R, MacLeod T J, Yoon C S, *et al*. Annexin A2 is a novel RNA-binding protein [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (10): 8723-8731.

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

[3] Mussunoor S, Murray G I. The role of annexins in tumour development and progression[J]. J Pathol, 2008, 216(2): 131-140.

[4] Kwon M, MacLeod T J, Zhang Y, *et al*. S100A10, annexin A2, and annexin a2 heterotetramer as candidate plasminogen receptors [J]. Front Biosci, 2005, 10: 300-325.

[5] 卢仲谦, 高宜录, 陆建霞. 脑胶质瘤中膜联蛋白 A2 的表达及意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(8): 787-789.

[6] Bronte G, Terrasi M, Rizzo S, *et al*. EGFR genomic alterations in cancer: prognostic and predictive values[J]. Front Biosci (Elite Ed), 2011, 3: 879-887.

[7] 周红建, 覃晓林, 王雄伟, 等. EGFR 和 Ki-67 在胶质瘤中表达的研究进展[J]. 生物技术通报, 2011, (1): 56-59.

[8] 董伦, 浦佩玉. 胶质瘤中 EGFR 基因异常及其靶向性治疗研究进展[J]. 国外医学:遗传学分册, 2004, 27(1): 46-50, 53.

[9] 姚声涛, 唐文渊, 郭川. LRIG1 诱导人胶质瘤细胞凋亡与表皮生长因子受体基因关系[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(2): 157-160.

[10] Franceschi E, Tosoni A, Bartolini S, *et al*. Treatment options for recurrent glioblastoma: pitfalls and future trends [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2009, 9(5): 613-619.

(**收稿**: 2011-09-23;**修回**: 2011-10-08)

(编辑　王小寒)

作者投稿注意事项

本刊已正式启用远程稿件处理系统,作者首次投稿时,须先登录本刊网站注册。具体操作方法:进入本刊主页(外网:http://aammt.tmmu.com.cn;内网:http://202.202.224.153),通过左上角"用户登录"中"作者读者入口"进行"作者注册"申请账号。注册时请注意:一定要填写有效资料,并留下作者常用的邮箱地址和手机号,方便编辑部与您联系,如有变更,请及时修改资料,并通知编辑部。

注册成功后,请点击"作者读者入口"登录进入系统,点击右上角"我要投稿"并按提示进行操作;最后点击"投稿完成",获得稿件编号。并请确认稿件是否上传成功、能否正常打开。

投稿成功后,请及时寄/送单位介绍信(除证明稿件内容的真实性之外,还应证明稿件无一稿多投、不涉及保密问题、署名无争议等)、论文授权书(在本刊主页下载,请各位署名作者亲笔签名)和审稿费至编辑部。同时请作者关注邮箱里本刊发送的信息,也可随时登录本刊在线系统查看稿件状态。

如有任何疑问,可与本刊编辑部联系(023-68752187)。