论著

文章编号:1000-5404(2014)17-1800-05

大电导钙激活钾通道KCNMB2和KCNMB4在人不同WHO级别星形细胞瘤中的表达

范 文[1],廖正步[2],肖 虹[3],谢宗义[4],谭 戈[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:神经内科[1],神经外科[2];400014 重庆,重庆市急救中心神经外科[3];400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院神经外科[4])

[摘要] **目的** 观察大电导钙激活钾通道(large conductance calcium-activated potassium, BK_{Ca})β2亚基(KCNMB2)和β4亚基(KCNMB4)在人不同WHO级别星形细胞瘤中的表达变化,探讨星形细胞肿瘤增殖、生长的分子机制。**方法** 收集人各个WHO级别星形细胞瘤标本69例,另以15例外伤后脑减压术患者的正常脑组织作为对照。Western blot及免疫组织化学染色S-P法检测KCNMB2和KCNMB4的表达。**结果** 与正常脑组织相比,星形细胞瘤组织中KCNMB2和KCNMB4的表达水平明显升高($P<0.05$)。KCNMB2的表达与星形细胞瘤的WHO分级有关($P<0.05$),与性别、年龄及星形细胞瘤的部位无关($P>0.05$),即KCNMB2的表达水平随着星形细胞瘤WHO级别的增高而升高。KCNMB4的表达与性别、年龄、星形细胞瘤的WHO分级及部位均无关($P>0.05$)。**结论** KCNMB2和KCNMB4在星形细胞瘤中呈高表达,且KCNMB2表达与星形细胞瘤的WHO分级有关。

[关键词] KCNMB2;KCNMB4;大电导钙激活钾通道;星形细胞瘤;WHO分级

[中图法分类号] R329.27; R730.23; R730.264 [文献标志码] A

Expression of KCNMB2 and KCNMB4 in human astrocytic tumors of different WHO grades

Fan Wen[1], Liao Zhengbu[2], Xiao Hong[3], Xie Zongyi[4], Tan Ge[1] ([1]Department of Neurology, [2]Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [3]Department of Neurosurgery, Chongqing Emergency Medical Center, Chongqing, 400014; [4]Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression changes of large conductance calcium-activated potassium (BK_{Ca}) channel β2- (KCNMB2) and β4-subunits (KCNMB4) in human astrocytic tumors of different WHO grades, and to investigate the molecular mechanism of astrocytic tumor proliferation and growth. **Methods** Eighty-four brain specimens were obtained, including 15 normal brain specimens and 69 astrocytoma specimens with different WHO grades. Expression levels of KCNMB2 and KCNMB4 in these astrocytoma tissues were detected by immunohistochemical staining (IHC) and Western blotting. **Results** Compared with normal brain tissues, KCNMB2 and KCNMB4 were up-regulated in the astrocytoma tissues ($P<0.05$). The expression of KCNMB2 was correlated with WHO grade ($P<0.05$) rather than gender, age and the site of tumor ($P>0.05$). The stronger the expression of KCNMB2 was, the higher the tumor WHO grade was. The expression of KCNMB4 had no correlation with gender, age, WHO grade or the site of tumor ($P>0.05$). **Conclusion** KCNMB2 and KCNMB4 are highly expressed in astrocytoma tissues, and the expression of the former is related to the WHO grades of astrocytic tumor.

[**Key words**] KCNMB2; KCNMB4; large conductance calcium-activated potassium channel; astrocytic tumor; WHO grade

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81101473), the Specialized Research Fund for Doctoral Program of Higher Education of Ministry of Education (20115503120008) and the National Key Clinical Subject Construction Project (2012-649). Corresponding author: Tan Ge, E-mail: titot@sina.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81101473);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20115503120008);国家临床重点专科建设项目[卫办医政函(2012)649号]

[通信作者] 谭 戈,E-mail:titot@sina.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140513.0854.010.html (2014-05-13)

脑星形细胞瘤是中枢神经系统最常见的神经上皮组织肿瘤,其侵袭性强、临床致死率高,严重危害人类健康。大电导钙激活钾通道(large conductance calcium-activated potassium, BK_{Ca})是钙激活钾通道家族中的一员,广泛表达于多种组织细胞,参与体内多种细胞功能的调节,如动作电位形成、神经递质释放、平滑肌收缩等[1-2]。BK_{Ca}通道由α1亚基和β亚基组成,根据β亚基的不同可分为4个亚型:KCNMB1、KCNMB2、KCNMB3和KCNMB4,其中KCNMB2和KCNMB4主要表达于脑组织[3-4]。近年来研究表明,BK_{Ca}在前列腺癌、乳腺癌、皮肤癌等多种肿瘤组织中呈高表达,与肿瘤细胞的增殖、侵袭密切相关[5-8]。目前国内外尚少见KCNMB2和KCNMB4在星形细胞瘤中表达的报道。本研究采用免疫组化法和Western blot检测KCNMB2和KCNMB4在人不同WHO级别星形细胞瘤组织的表达,探讨两者在星形细胞瘤发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 病例及标本采集

收集重庆医科大学附属第一医院神经外科、重庆医科大学附属第二医院神经外科和重庆市急救中心神经外科2009年8月至2013年3月经手术切除的星形细胞瘤标本69例,其中男性39例,女性30例,年龄16~74岁,平均年龄47.6岁。另取同期外伤后脑减压术患者正常脑组织15例作为对照。标本自术中取出后立即置于液氮中冷冻,-80 ℃冰箱保存。所有标本经病理检查证实,并按照2007年世界卫生组织(WHO)神经系统肿瘤分类标准进行分级,WHOⅠ级11例,包括9例毛细胞性星形细胞瘤及2例室管膜下巨细胞性星形细胞瘤;WHOⅡ级19例,均为纤维性星形细胞瘤;WHOⅢ级18例,均为间变性星形细胞瘤;WHOⅣ级21例,均为胶质母细胞瘤。所有患者术前未接受放化疗。

1.2 主要试剂

兔抗人KCNMB2多克隆抗体、兔抗人KCNMB4多克隆抗体、小鼠抗人β-actin单克隆抗体购自Sigma公司,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG抗体购自Santa Cruz公司,RIPA强裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、ECL化学发光试剂盒购自碧云天公司,免疫组化S-P试剂盒、DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥公司。

1.3 免疫组织化学染色

采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶链接(S-P)法。所有标本经4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋、连续切片。二甲苯脱蜡及乙醇梯度水化,枸橼酸盐缓冲液微波抗原修复20 min,3% H_2O_2去离子水室温孵育20 min,山羊血清封闭液封闭30 min,加一抗(KCNMB2,1∶100;KCNMB4,1∶100)4 ℃过夜。次日37 ℃复温1 h,二抗37 ℃孵育30 min,辣根酶标记链霉卵白素工作液37 ℃孵育30 min,DAB显色。苏木精复染,常规脱水透明,中性树胶封片。以PBS代替一抗作为阴性对照。每张切片随机选10个高倍镜视野(×400),根据阳性细胞数和染色强度进行综合评分。染色强度:阴性为0分,淡黄色为1分,黄色为2分,棕褐色为3分;阳性细胞数:<10%为0分,10%~<25%为1分,25%~<50%为2分,≥50%为3分。免疫组化总评分=染色强度评分+阳性细胞数评分:<2分为阴性(-),≥2分为阳性(+)。

1.4 Western blot检测

采用RIPA强裂解液提取组织蛋白,BCA法测定蛋白浓度。以每泳道50 μg蛋白上样,经SDS-PAGE凝胶电泳后将蛋白转至孔径为0.45 μm的PVDF膜上(恒流,250 mA),5%脱脂奶粉37 ℃封闭2 h,加一抗(KCNMB2,1∶2 000;KCNMB4,1∶2 000;β-actin,1∶3 000)4 ℃过夜。次日37 ℃复温2 h,TBST洗膜(10 min×3次)后加二抗(1∶4 000)37 ℃孵育2 h,TBST洗膜(10 min×3次)后ECL显影,Quantity One软件进行结果分析。以β-actin为内参对照,蛋白的相对表达量=蛋白条带灰度值/β-actin条带灰度值。

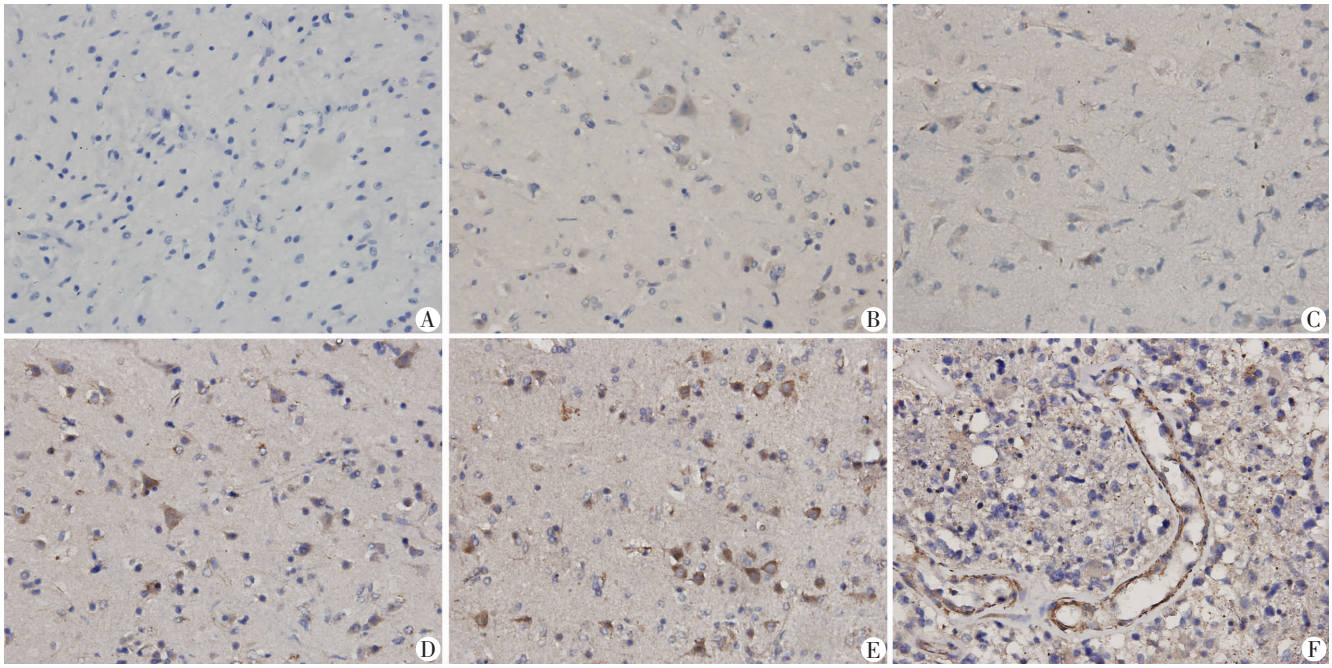
1.5 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件。计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,采用独立样本t检验比较正常脑组织与星形细胞瘤组之间KCNMB2、KCNMB4的表达差异;单因素方差分析及LSD检验比较星形细胞瘤各个WHO级别组之间KCNMB2、KCNMB4的表达差异。计数资料采用χ^2检验。采用Graphpad Prism 5.0软件作图。

2 结果

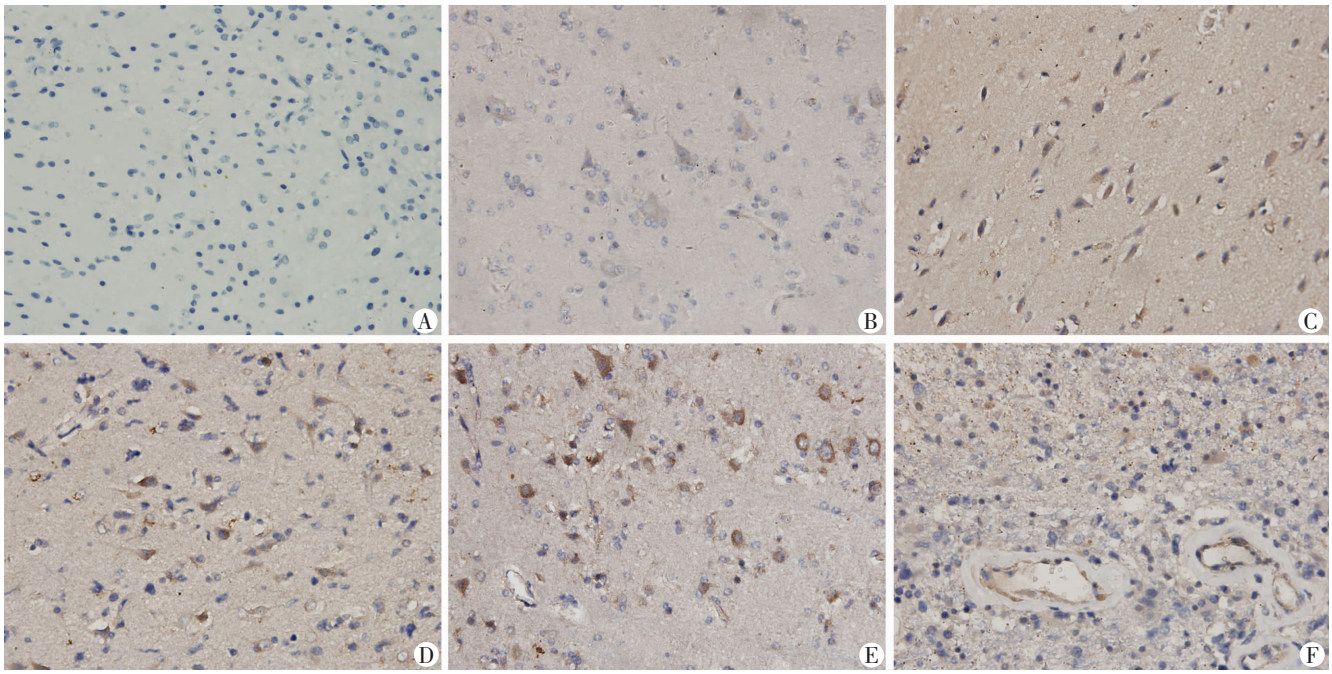
2.1 免疫组化染色检测正常脑组织及各级星形细胞瘤组织中KCNMB2、KCNMB4蛋白的表达

正常脑组织及各级星形细胞瘤组织中均可见KCNMB2、KCNMB4阳性染色,呈棕黄色颗粒(图1、2)。在正常脑组织中,KCNMB2、KCNMB4主要表达于神经元和星形胶质细胞的细胞膜和细胞质;在星形细胞瘤组织中,KCNMB2、KCNMB4主要表达于肿瘤细胞和血管内皮细胞的细胞膜和细胞质。KCNMB2在正常脑组织和星形细胞瘤组织中的阳性表达率分别为13.3%(2/15)、78.3%(54/69);KCNMB4在正常脑组织和星形细胞瘤组织中的阳性表达率分别为26.7%(4/15)、75.4%(52/69)。KCNMB2和KCNMB4在星形细胞瘤组织中的表达均明显高于正常脑组织($P<0.05$)。KCNMB2的表达与星形细胞瘤的WHO分级有关($P<0.05$),与性别、年龄及星形细胞瘤的部位无关($P>0.05$)。即星形细胞瘤WHO级别越高,KCNMB2的阳性表达率越高。KCNMB4的表达与性别、年龄、星形细胞瘤的WHO分级及部位均无关($P>0.05$,表1)。



A:未加一抗的阴性对照;B:正常脑组织;C:Ⅰ级星形细胞瘤(WHOⅠ级);D:Ⅱ级星形细胞瘤(WHOⅡ级);E:间变性星形细胞瘤(WHOⅢ级);F:胶质母细胞瘤(WHOⅣ级)

图1 免疫组化染色检测人星形细胞瘤组织中KCNMB2的表达 (S-P ×400)



A:未加一抗的阴性对照;B:正常脑组织;C:Ⅰ级星形细胞瘤(WHOⅠ级);D:Ⅱ级星形细胞瘤(WHOⅡ级);E:间变性星形细胞瘤(WHOⅢ级);F:胶质母细胞瘤(WHOⅣ级)

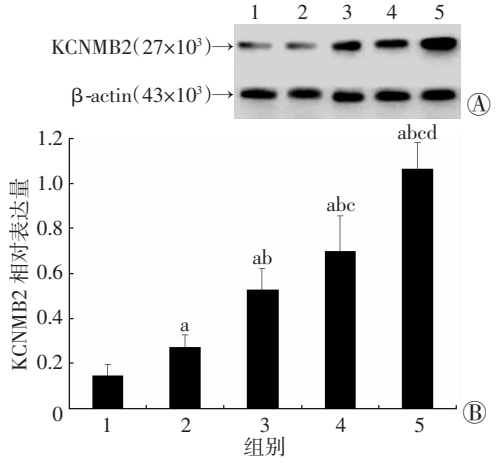
图2 免疫组化染色检测人星形细胞瘤组织中KCNMB4的表达 (S-P ×400)

表 1　KCNMB2、KCNMB4 在人星形细胞瘤组织中的表达与星形细胞瘤临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	KCNMB2 阴性	KCNMB2 阳性	χ^2值	P值	KCNMB4 阴性	KCNMB4 阳性	χ^2值	P值
性别				0.094	0.759			0.049	0.825
男	39	9	30			10	29		
女	30	6	24			7	23		
年龄(岁)				0.903	0.637			3.575	0.167
<45	25	7	18			4	21		
45 ~ <60	33	6	27			6	27		
≥60	11	2	9			7	4		
WHO 分级				8.548	0.036			3.995	0.262
Ⅰ级	11	5	6			3	8		
Ⅱ级	19	6	13			4	15		
Ⅲ级	18	3	15			2	16		
Ⅳ级	21	1	20			8	13		
肿瘤部位				0.018	0.895			0.199	0.655
幕上	52	11	41			14	38		
幕下	17	4	13			3	14		

2.2　Western blot 检测正常脑组织及各级星形细胞瘤组织中 KCNMB2、KCNMB4 蛋白的表达

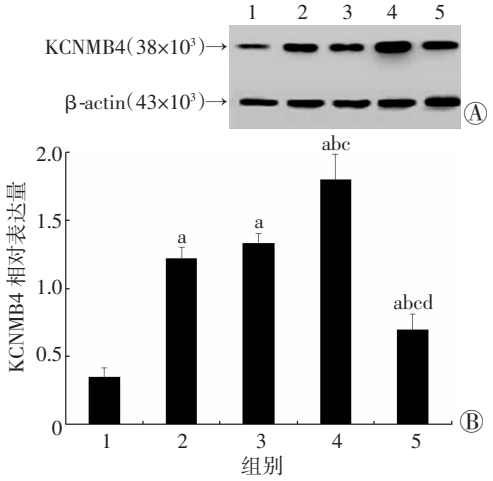
Western blot 检测结果显示，与正常脑组织相比，星形细胞瘤组织中 KCNMB2 和 KCNMB4 的表达水平明显升高（$P<0.05$，图 3、4）。KCNMB2 在胶质母细胞瘤组织中表达最高，KCNMB4 在间变性星形细胞瘤组织中表达最高。KCNMB2 的表达水平随着星形细胞瘤 WHO 级别的增高而升高，各星形细胞瘤组间比较差异均有统计学意义（$P<0.05$）。



1：正常脑组织；2：Ⅰ级星形细胞瘤（WHO Ⅰ级）；3：Ⅱ级星形细胞瘤（WHO Ⅱ级）；4：间变性星形细胞瘤（WHO Ⅲ级）；5：胶质母细胞瘤（WHO Ⅳ级）

A：Western blot 检测；B：半定量分析　a：$P<0.05$，与正常脑组织比较；b：$P<0.05$，与 WHO Ⅰ级比较；c：$P<0.05$，与 WHO Ⅱ级比较；d：$P<0.05$，与 WHO Ⅲ级比较

图 3　Western blot 检测人星形细胞瘤组织中 KCNMB2 蛋白的表达



1：正常脑组织；2：Ⅰ级星形细胞瘤（WHO Ⅰ级）；3：Ⅱ级星形细胞瘤（WHO Ⅱ级）；4：间变性星形细胞瘤（WHO Ⅲ级）；5：胶质母细胞瘤（WHO Ⅳ级）

A：Western blot 检测；B：半定量分析　a：$P<0.05$，与正常脑组织比较；b：$P<0.05$，与 WHO Ⅰ级比较；c：$P<0.05$，与 WHO Ⅱ级比较；d：$P<0.05$，与 WHO Ⅲ级比较

图 4　Western blot 检测人星形细胞瘤组织中 KCNMB4 蛋白的表达

3　讨论

钾离子通道是细胞膜上种类最多、最复杂的一类离子通道。近年来的研究发现，钾离子通道与肿瘤的发生、发展密切相关[9-12]。BK_{Ca}通道由 4 个 α 亚基和 4 个 β 亚基组成，广泛分布于各种组织细胞，但在不同组织各亚型 β 亚基的表达不尽相同，脑组织以 β2 和 β4 亚基为主。BK_{Ca}通道属于钙激活钾通道，是电压依赖和 Ca^{2+} 敏感的钾通道，受细胞膜电位和 Ca^{2+} 的双重调控，并可通过 Ca^{2+} 参与细胞内信号传导通路的调节。已有研究表明，BK_{Ca}在前列腺癌、乳腺癌等多种肿瘤组织及细胞株中高表达，并与肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移密切相关[5-7]。此外，Kraft 等[13]研究发现 BK_{Ca}在脑（脊）膜瘤细胞中高表达，Weaver 等[14]和 Liu 等[15]发现 BK_{Ca}在神经胶质瘤细胞中高表达，但关于 KCNMB2 和 KCNMB4 在星形细胞瘤中表达情况目前尚少见报道。

本研究采用免疫组化 S-P 法和 Western blot 检测 69 例星形细胞瘤组织及 15 例正常脑组织中 KCNMB2 和 KCNMB4 的表达，分析星形细胞瘤各个病理等级组之间 KCNMB2、KCNMB4 的表达差异。研究结果显示，KCNMB2、KCNMB4 在正常脑组织和各级星形细胞瘤组织中均有表达，且与正常脑组织相比较，星形细胞瘤

组织中 KCNMB2 和 KCNMB4 的表达水平明显升高,这与 BK_{Ca} 在前列腺癌、乳腺癌等[5-7]其他肿瘤组织中的研究结果一致。Rothberg[16]研究认为,过度表达的 BK_{Ca} 通过改变细胞膜电位和细胞内 Ca^{2+} 浓度影响细胞周期,导致细胞的异常增殖和肿瘤的发生、发展。BK_{Ca} 通道激活引起 K^+ 外流,细胞膜超极化,形成的细胞内负电压吸引 Ca^{2+} 内流,细胞内 Ca^{2+} 浓度增加,促进细胞由 G_1 期向 S 期转换[17]。Han 等[18]研究发现,对离体培养的肿瘤细胞使用 BK_{Ca} 通道阻滞剂可以明显抑制肿瘤细胞的增殖。

本研究结果还显示,KCNMB2 在星形细胞瘤组织中的表达与星形细胞瘤的 WHO 分级有关,随着星形细胞瘤 WHO 级别的增高,KCNMB2 表达增强。此外,免疫组化结果显示,正常脑组织中 KCNMB2、KCNMB4 主要表达在神经元和星形胶质细胞,星形细胞瘤组织中 KCNMB2、KCNMB4 主要表达在肿瘤细胞和血管内皮细胞。Khaitan 等[6]研究发现发生脑转移的乳腺癌细胞 TEM 明显高于未发生转移的乳腺癌细胞,使用 BK_{Ca} 通道阻滞剂 Iberiotoxin 可阻止乳腺癌细胞对大脑微血管内皮细胞的侵袭。BK_{Ca} 通过改变血管通透性、促进肿瘤新生血管形成,参与肿瘤的转移和侵袭。

综上所述,KCNMB2、KCNMB4 在人星形细胞瘤组织中的表达明显升高,且 KCNMB2 表达水平与星形细胞瘤的 WHO 分级有关,提示 BK_{Ca} 通道可能与星形细胞瘤的发生、发展密切相关,对星形细胞瘤的分级具有潜在的诊断价值。但其作用机制和途径尚不明了,仍需进一步研究。

参考文献:

[1] Lee U S, Cui J. BK channel activation: structural and functional insights[J]. Trends Neurosci, 2010, 33(9): 415-423.

[2] Hou S, Heinemann S H, Hoshi T. Modulation of BKCa channel gating by endogenous signaling molecules[J]. Physiology (Bethesda), 2009, 24: 26-35.

[3] Sun X, Zaydman M A, Cui J. Regulation of voltage-activated K(+) channel gating by transmembrane β subunits[J]. Front Pharmacol, 2012, 3: 63.

[4] Poulsen A N, Wulf H, Hay-Schmidt A, *et al*. Differential expression of BK channel isoforms and beta-subunits in rat neuro-vascular tissues[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1788(2): 380-389.

[5] Bloch M, Ousingsawat J, Simon R, *et al*. KCNMA1 gene amplification promotes tumor cell proliferation in human prostate cancer[J]. Oncogene, 2007, 26(17): 2525-2534.

[6] Khaitan D, Sankpal U T, Weksler B, *et al*. Role of KCNMA1 gene in breast cancer invasion and metastasis to brain[J]. BMC Cancer, 2009, 9: 258.

[7] Mound A, Rodat-Despoix L, Bougarn S, *et al*. Molecular interaction and functional coupling between type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and? BKCa channel? stimulate breast? cancer? cell proliferation[J]. Eur J Cancer, 2013, 49(17): 3738-3751.

[8] 李佳怡, 熊霞, 杜宇, 等. 人皮肤鳞状细胞癌组织大电导钙激活钾通道蛋白的表达[J]. 临床皮肤科杂志, 2011, 40(8): 470-471.

[9] Tan G, Sun S Q, Yuan D L. Expression of Kir4.1 in human astrocytic tumors: correlation with pathologic grade[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 367(4): 743-747.

[10] Pardo L A, Stuhmer W. The roles of K(+) channels in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(1): 39-48.

[11] Koshy S, Wu D, Hu X, *et al*. Blocking KCa3.1 channels increases tumor cell killing by a subpopulation of human natural killer lymphocytes[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76740.

[12] D'Amico M, Gasparoli L, Arcangeli A. Potassium channels: novel emerging biomarkers and targets for therapy in cancer[J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2013, 8(1): 53-65.

[13] Kraft R, Benndorf K, Patt S. Large conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in human meningioma cells[J]. J Membr Biol, 2000, 175(1): 25-33.

[14] Weaver A K, Liu X, Sontheimer H. Role for calcium-activated potassium channels (BK) in growth control of human malignant glioma cells[J]. J Neurosci Res, 2004, 78(2): 224-234.

[15] Liu X, Chang Y, Reinhart P H, *et al*. Cloning and characterization of glioma BK, a novel BK channel isoform highly expressed in human glioma cells[J]. J Neurosci, 2002, 22(5): 1840-1849.

[16] Rothberg B S. The BK channel: a vital link between cellular calcium and electrical signaling[J]. Protein Cell, 2012, 3(12): 883-892.

[17] Wu S N, Peng H, Chen B S, *et al*. Potent activation of large-conductance Ca(2+)-activated K^+ channels by the diphenylurea 1,3-bis-[2-hydroxy-5-(trifluoromethyl)phenyl]urea (NS1643) in pituitary tumor (GH3) cells[J]. Mol Pharmacol, 2008, 74(6): 1696-1704.

[18] Han X, Wang F, Yao W, *et al*. Heat shock proteins and p53 play a critical role in K^+ channel-mediated tumor cell proliferation and apoptosis[J]. Apoptosis, 2007, 12(10): 1837-1846.

(收稿:2014-02-08;修回:2014-03-06)

(编辑 王小寒)