DOI:10.16016/j.1000-5404.201411268

论著

S100A4、SEPT7在儿童神经胶质瘤的表达特点及临床意义

李毅力,李映良,梁 平,翟 暄,周渝冬,李禄生 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院神经外科)

[摘要] **目的** 研究儿童神经胶质瘤中S100A4、SEPT7的表达并比较其表达特点,探讨其在儿童神经胶质瘤中的表达与病理分级间的关系及临床意义。**方法** 采用免疫组化(S-P法)检测10例儿童正常脑组织标本和37例儿童脑神经胶质瘤标本中S100A4、SEPT7的表达,计算其阳性细胞的标记指数和阳性细胞表达率,通过SPSS 17.0分析儿童神经胶质瘤中S100A4、SEPT7的表达和儿童神经胶质瘤病理分级的相关性。**结果** S100A4呈棕黄色颗粒散在分布,在细胞质和细胞间质中阳性表达。在儿童神经胶质瘤组织中表达率为72.97%,在儿童正常对照组织中未见明显表达,病理分级与S100A4的阳性表达呈正相关($r=0.800$, $P<0.05$)。SEPT7蛋白在儿童脑神经胶质细胞瘤中的表达主要存在细胞质内,在儿童正常脑组织中的表达为100.00%,在神经胶质瘤组织中表达率为54.05%,病理分级与SEPT7的阳性表达呈负相关($r=-0.674$, $P<0.05$)。S100A4和SEPT7两者在同一级别儿童胶质瘤中的表达呈负相关($r=-0.617$, $P<0.01$)。**结论** 联合检测儿童神经胶质瘤S100A4和SEPT7的蛋白表达对评估儿童胶质瘤的恶性程度有重要的参考意义。

[关键词] 神经胶质细胞瘤;儿童;S100A4;SEPT7;免疫组织化学
[中图法分类号] R730.23;R730.43;R739.4 [文献标志码] A

Expression and clinical significance of S100A4 and SEPT7 in childhood gliomas

Li Yili, Li Yingliang, Liang Ping, Zhai Xuan, Zhou Yudong, Li Lusheng (Department of Neurosurgery, the Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression of S100A4 and SEPT7 in the glioma tissues of children, and to investigate the relationship of their expression with pathological grades and clinical significance. **Methods** Immunohistochemical staining (S-P) assay was employed to simultaneously detect the expression of S100A4 and SEPT7 in 10 tissue samples of normal children brain (autopsy from children died of accidence) and 37 glioma tissues from childhood gliomas (37 children underwent surgical treatment in our department during May 2008 to December 2012). The labeling index of positive cells and the rate of positive cells were calculated according to the expression of optical density. The correlation of their expression with the pathological grades of childhood glioma was analyzed by SPSS17.0 statistical software. **Results** S100A4 was expressed as brown granules scattering in the cytoplasm and intercellular substance of childhood gliomas. Its positive expression rate was 72.97% in children gliomas, but no expression was seen in normal brain tissue. There was a positive correlation of the pathological grade with its expression. The expression of SEPT7 was mainly localized in the cytoplasm of glioma cells, with a rate of 54.05%. The expression rate was 100.00% in normal brain tissue. Its expression rate was negatively correlated with the pathological grade. The expression of S100A4 was negatively correlated with that of SEPT7 at the same pathological grade of childhood gliomas ($r=-0.617$, $P<0.01$). **Conclusion** Combined detection of the expression levels of protein S100A4 and SEPT7 is of important significance to evaluate the malignancy of childhood glioma.

[**Key words**] glioma; children; S100A4; SEPT7; immunohistochemistry

Corresponding author: Li Yingliang, E-mail:289303539@qq.com

[通信作者] 李映良,E-mail:289303539@qq.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150617.0848.005.html(2015-06-17)

神经胶质瘤是发生于神经外胚层的肿瘤,起源于神经间质细胞,即神经胶质、室管膜、脉络丛上皮和神经实质细胞。在儿童中枢神经系统中神经胶质瘤是最为常见的肿瘤,约占中枢神经系统肿瘤的80%[1-2]。神经胶质瘤常呈浸润性生长,与正常脑组织间无明显边界,手术治疗很难达到理想效果,且容易复发,所以患儿一般预后较差。随着分子生物学、蛋白组学在肿瘤领域的研究进展,国内外学者一致认为神经胶质细胞的发生发展受多基因的调控,是原癌基因的启动或是抑癌基因的失活或者缺失共同复杂影响的结果。

S100A4是S100钙结合蛋白家族成员之一,属于钙离子结合蛋白,并作为细胞骨架蛋白参与细胞膜以及细胞的分化和钙离子信号传递等。S100A4蛋白的过度表达与人类多种疾病相关,目前越来越多的学者认为它与多种肿瘤的发生和/或转移有着密切的关系。研究表明S100A4蛋白在各种肿瘤中呈高表达[3]。SEPT7参与调控细胞内许多重要的生物学行为,在神经的发生、细胞质的分裂、纤毛的形成中作为支架蛋白的招募和/或扩散的障碍划分离散细胞,被视为细胞骨架蛋白[4-5]。近年研究表明SEPT7的表达与人类胶质瘤密切相关;SEPT7基因在胶质瘤中的表达较正常脑组织中明显下调[6]。

S100A4和SEPT7被认为是调节细胞骨架蛋白或直接作用于细胞骨架蛋白对肿瘤产生作用,影响肿瘤细胞的生物特性。推断在肿瘤的发生发展过程中可能存在相互影响,但两者在儿童神经胶质瘤中的表达及是否相互影响尚不清楚。本研究采用免疫组化检测儿童神经胶质瘤中S100A4、SEPT7的表达,了解S100A4、SEPT7在儿童神经胶质瘤中的表达特点,以期为评估儿童神经胶质瘤远期效果提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集2008年5月至2012年12月重庆医科大学附属儿童医院神经外科手术切除的儿童神经胶质瘤标本37例,其中男性21例,女性10例,年龄3个月至14岁,平均5岁4个月。同时收集10例颅内肿瘤阴性尸检的儿童脑组织标本作对照(交通事故定性时尸解)。标本组织均用10%中性甲醛固定,石蜡常规包埋,5 μm连续切片,所有标本在重庆医科大学病理学教研室技术人员指导下切片,并由病理专科医师行病理组织学检查并审核。

本次观察病例术前未行放、化疗,均为第1次手术,按照WHO2007病理组织学分类标准:Ⅰ级9例,Ⅱ级7例,Ⅲ级7例,Ⅳ级14例。同时将其分为低恶性组和高恶性组,低恶性组为WHO分类Ⅰ~Ⅱ级共16例,高恶性组为WHO分类Ⅲ~Ⅳ级共21例。

1.2 实验试剂

SEPT7单克隆抗体、S100A4单克隆抗体、枸橼酸钠抗原修复液(0.01 mol/L, pH 6.0)、PBS缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.4)、枸橼酸钠抗原修复液(0.01 mol/L, pH 6.0)、DAB(二氨基联苯胺)显色试剂盒、山羊封闭血清。

1.3 实验方法

采用免疫组化(S-P法)检测S100A4和SEPT7蛋白表达。结果判定:用显微镜分别观察病理组织切片,S100A4表达呈棕黄色主要存在于细胞质和细胞间质中,SEPT7表达呈棕黄色主要定位于细胞质中,均以表达定位处出现棕黄色、高出背景色者为阳性。并在高倍显微镜下分别观察染色的组织切片,随机选取10个不重复的高倍镜(×400)视野,通过阳性表达细胞占高倍镜视野中所有细胞的百分率计算标记指数(labeling index, LI)。病理分级阳性表达率认定标准:阴性(-):视野内细胞完全不着色或LI<25%;LI:25%~50%为(+);LI:>50%~75%为(++);LI大于75%为(+++)。

1.4 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件,S100A4、SEPT7在儿童正常脑组织与神经胶质瘤组织的表达差异采用单因素方差分析;采用Spearman等级相关分析S100A4和SEPT7的标记指数与儿童神经胶质瘤病理级别的相关性;采用χ^2检验分析S100A4和SEPT7的阳性表达率在低恶性组和高恶性组中的相关性。

2 结果

2.1 S100A4在儿童神经胶质瘤的表达

高倍显微镜下观察S100A4蛋白在细胞中的表达主要存在于细胞质和细胞间质中,在高级别组织中有大量表达(图1)。S100A4在儿童神经胶质瘤组织中阳性表达率为72.97%,在儿童正常脑组织中未见明显表达;两者阳性表达率差异有统计学意义($P<0.05$);儿童各病理级别神经胶质瘤中S100A4蛋白的阳性表达率(表1);随着病理级别提高,阳性表达率呈上升趋势。儿童神经胶质瘤低恶性组S100A4蛋白的阳性表达率56.25%,显著低于高恶性组S100A4蛋白的阳性表达率(90.48%,$\chi^2=5.862$,$P<0.05$)。儿童各病理级别神经胶质瘤组织中S100A4蛋白的标记指数见表2,随着病理级别提高,LI_{S100A4}呈上升趋势;且病理分级与LI_{S100A4}蛋白呈正相关($r=0.800$,$P<0.05$)。儿童神经胶质瘤低恶性组S100A4蛋白标记指数$LI_{Ⅰ+Ⅱ}$为(31.91±11.59)%,高恶性组$LI_{Ⅲ+Ⅳ}$为(53.10±18.00)%,两组标记指数差异有统计学意义($P<$

0.05,表 2)。

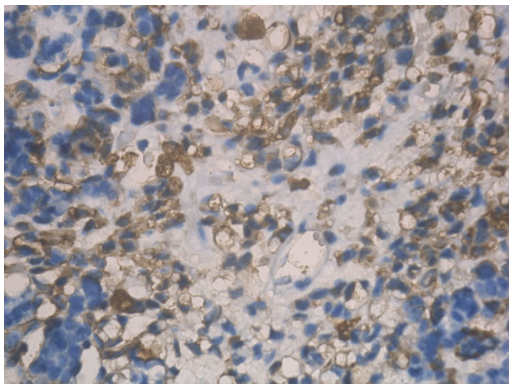


图 1 免疫组织化学染色观察 S100A4 在Ⅳ级儿童神经胶质瘤中的表达 (S-P ×400)

表 1 S100A4 在正常儿童脑组织和各级别神经胶质瘤组织中的表达

组别	例数	-	+	++	+++	阳性表达率(%)
正常对照组	10	9	1	0	0	10.00
低级别组						
Ⅰ级	9	5	3	1	0	44.44
Ⅱ级	7	2	3	2	0	71.43
高级别组						
Ⅲ级	7	2	2	2	1	71.43
Ⅳ级	14	1	3	5	5	92.86

表 2 S100A4 在各级别神经胶质瘤组织的标记指数 [$(\bar{x}\pm s)$%]

组别	例数	LI
正常对照组	10	19.40±5.38
低级别组		31.91±11.59[a]
Ⅰ级	9	27.73±9.46
Ⅱ级	7	37.30±12.50
高级别组		53.10±18.00[ab]
Ⅲ级	7	41.71±13.51
Ⅳ级	14	58.80±15.48

a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与低恶性组比较

2.2 SEPT7 在儿童神经胶质瘤的表达

在高倍显微镜下见 SEPT7 蛋白在肿瘤细胞质和细胞膜上有呈棕黄色阳性表达,且在低级别标本中有大量表达(图 2);通过统计,SEPT7 在儿童神经胶质瘤组织中阳性表达率为 54.05%,在儿童正常脑组织中表达率为 100.00%,两者阳性表达率差异有统计学意义($P<0.05$);儿童神经胶质瘤组织中各病理级别 SEPT7 蛋白的阳性表达率(表 3),随着病理级别升高,呈下降趋势。儿童神经胶质瘤低恶性组中的 SEPT7 蛋白的阳性表达率 75.00%,显著高于高恶性组 SEPT7 蛋白的阳性表达率(38.10%),两者阳性表达率差异有统计学意义($\chi^2=4.980$,$P<0.05$)。儿童各病理级别神经胶质瘤组织中 SEPT7 蛋白的标记指数(表 4),随着病理级别提高,LI_{SEPT7} 呈下降趋势,病理分级与 LI_{SEPT7} 蛋白呈负相关($r=-0.674$, $P<0.05$)。儿童神经胶质瘤低恶性组 SEPT7 蛋白标记指数 $LI_{Ⅰ+Ⅱ}$ 为(54.00±23.54)%,高恶性组为(32.15±15.30)%,两组标记指数差异有统计学意义($P<0.05$,表 4)。

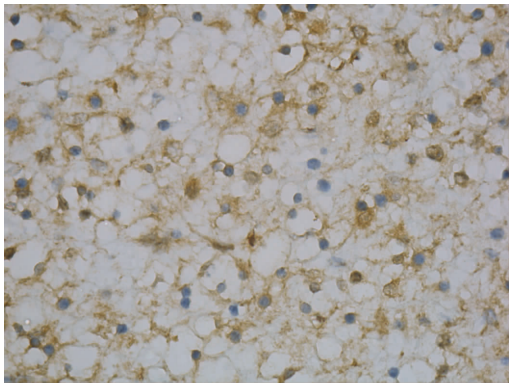


图 2 免疫组织化学染色观察 SEPT7 在Ⅰ级儿童神经胶质瘤中的表达 (S-P ×400)

表 3 SEPT7 在正常儿童脑组织和各级别神经胶质瘤组织中的表达

组别	例数	-	+	++	+++	阳性表达率(%)
正常对照组	10	0	0	1	9	100.00
低级别组						
Ⅰ级	9	2	1	2	4	77.78
Ⅱ级	7	2	2	1	2	71.43
高级别组						
Ⅲ级	7	4	1	2	0	42.86
Ⅳ级	14	9	3	1	1	35.71

表 4 SEPT7 在各级别神经胶质瘤组织的标记指数 [$(\bar{x}\pm s)$%]

组别	例数	LI
正常对照组	10	79.30±4.76
低级别组		54.00±23.54[a]
Ⅰ级	9	58.13±24.14
Ⅱ级	7	48.69±23.47
高级别组		32.15±15.30[ab]
Ⅲ级	7	34.30±14.59
Ⅳ级	14	30.54±16.25

a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与低恶性组比较

2.3 S100A4 和 SEPT7 在儿童神经胶质瘤中的关系

联合检测发现两者在神经胶质瘤中的表达不一样,提示 S100A4 和 SEPT7 在同一级别神经胶质瘤中的表达呈负相关($r=-0.617$,$P<0.05$)。

3 讨论

神经胶质瘤是儿童中枢神经系统中最为常见的肿瘤。研究显示,S100A4 能增加胶质瘤细胞的转移,同时表明细胞的 S100A4 是通过影响细胞骨架而增强肿

瘤细胞的运动[7-8]；而 Takenaga 等[9]在研究小鼠星形胶质细胞转移的实验中发现细胞内有 S100A4 的表达；同时发现 S100A4 蛋白质的上调大大增加了星形胶质细胞的迁移能力。本试验标本收集患儿年龄在3个月至14岁，结果提示 S100A4 在儿童神经胶质瘤组织中和儿童正常脑组织中阳性表达率差异有统计学意义（$P<0.05$）；且儿童低恶性组（Ⅰ～Ⅱ级）和高恶性组（Ⅲ～Ⅳ级）的阳性表达率差异有统计学意义（$\chi^2=5.862$，$P<0.05$）；其标记指数差异有统计学意义（$P<0.05$）；随着病理级别提高，LI_{S100A4} 呈上升趋势，且病理分级与 LI_{S100A4} 蛋白呈正相关（$r=0.800$，$P<0.05$）。提示儿童神经胶质瘤的恶性程度越高，S100A4 的表达量随之增加，说明 S100A4 可能参与了儿童神经胶质瘤的发生发展。

同是在神经胶质瘤中的实验研究中，Kim 等[10]发现 SEPT7 仅在远离核区的细胞质被强染色；本实验在儿童神经胶质瘤中发现 SEPT7 的表达主要定位于细胞质和细胞膜中。近年研究认为 SEPT7 的表达与人类胶质瘤也有着密切的相关性：SEPT7 在恶性星形胶质瘤中的表达较正常组织低 50% 以上[11]；实验得出 SEPT7 在儿童神经胶质瘤中阳性表达率为 54.05%，在儿童正常脑神经组织中表达率为 100%，两者阳性表达率差异有统计学意义（$P<0.05$）。2011 年 Tsang 等[12]和 Connolly 等[13]认为基因表达的改变导致神经胶质瘤发生的主要机制是通过 SEPT7 的下调或缺失，从而导致多倍体或异倍体的细胞分裂；并体现在蛋白的相应表达，实验中儿童神经胶质瘤低恶性组（Ⅰ～Ⅱ级）与高恶性组（Ⅲ～Ⅳ级）的阳性表达率差异有统计学意义（$\chi^2=4.980$，$P<0.05$）；即随着儿童神经胶质瘤恶性程度的增高，SEPT7 的表达随之降低。因此，目前认为胶质瘤的发生可能与 SEPT7 在蛋白和基因水平上的表达下调有关。综上认为 SEPT7 调控蛋白的表达可能影响儿童神经胶质瘤的恶性程度。

通过本次试验并查阅文献，发现 S100A4 和 SEPT7 都是调节细胞骨架蛋白或直接作用于细胞骨架蛋白对肿瘤及其他疾病产生作用的，实验数据提示两者在神经胶质细胞瘤中的表达趋势不同：S100A4 蛋白随着胶质瘤病理级别的升高而呈高表达，而 SEPT7 蛋白随着病理级别的升高而表达降低，且两者在儿童神经胶质瘤中同病理级别的表达呈负相关（$r=-0.617$，$P<0.05$）；推测 S100A4 和 SEPT7 在神经胶质瘤的发生发展中存在相互作用；但目前两者相互作用的机制仍不明朗，有待深入研究。因此以细胞骨架蛋白为突破口，进一步探讨儿童神经胶质瘤恶性程度、侵袭性、远期预后等的研究具有一定的临床意义。

参考文献：

[1] Paul S P, Perrow R, Webster M A. Brain tumours in children: reducing time to diagnosis. [J]. Emerg Nurse, 2014, 22(1): 32-36.

[2] Hardy J, Selkoe D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [J]. Science, 2002, 297(5580): 353-356.

[3] Mishra S K, Siddique H R, Saleem M. S100A4 calcium-binding protein is key player in tumor progression and metastasis: preclinical and clinical evidence[J]. Cancer Metastasis Rev, 2012, 31(1/2): 163-172.

[4] Sandrock K, Bartsch I, Blaser S, *et al*. Characterization of human septin interactions[J]. Biol Chem, 2011, 392(8/9): 751-761.

[5] Mostowy S, Cossart P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(3): 183-194.

[6] 江荣才，浦佩玉. 基因芯片及其在肿瘤研究中的应用[J]. 中国肿瘤临床，2002，29(2)：146-149.

[7] Boye K, Maelandsmo G M. S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles[J]. The Am J Pathol, 2010, 176(2): 528-535.

[8] Belot N, Pochet R, Heizmann C W, *et al*. Extracellular S100A4 stimulates the migration rate of astrocytic tumor cells by modifying the organization of their actin cytoskeleton[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1600(1/2): 74-83.

[9] Takenaga K, Kozlova E N. Role of intracellular S100A4 for migration of rat astrocytes[J]. Glia, 2006, 53(3): 313-321.

[10] Kim D S, Hubbard S L, Peraud A, *et al*. Analysis of mammalian septin expression in human malignant brain tumors [J]. Neoplasia, 2004, 6(2): 168-178.

[11] Huang H, Colella S, Kurrer M, *et al*. Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays[J]. Cancer Res, 2000, 60(24): 6868-6874.

[12] Tsang C W, Estey M P, DiCiccio J E, *et al*. Characterization of presynaptic septin complexes in mammalian hippocampal neurons[J]. Biol Chem, 2011, 392(8/9): 739-749.

[13] Connolly D, Abdesselam I, Verdier-Pinard P, *et al*. Septin roles in tumorigenesis[J]. Biol Chem, 2011, 392(8/9): 725-738.

（收稿：2014-11-30；修回：2015-02-03）

（编辑　汪勤俭）