

· 基础研究 ·

Wnt-1 诱导分泌蛋白 2 在人脑 星形细胞瘤中的表达研究

唐 智,袁贤瑞,伍 明,成 磊,谢源阳

(中南大学湘雅医院 神经外科,湖南 长沙 410008)

摘 要: **目的** 研究 Wnt-1 诱导分泌蛋白 2 (wnt-inducible secreted protein 2, WSIP-2) 在人脑星形细胞瘤中的表达及与临床病理指标的关系。**方法** 采用免疫组织化学 SP 法检测 WSIP-2 蛋白在 54 例人脑星形细胞瘤和 10 例正常脑组织中的表达,分析其表达与患者各临床病理指标之间的关系。**结果** WSIP-2 蛋白在正常脑组织中未见表达,在 54 例脑星形细胞瘤中,WSIP-2 蛋白阳性率为 64.8% (35/54),且 WSIP-2 蛋白在高级别组(Ⅲ~Ⅳ级)的表达显著高于低级别组(Ⅰ~Ⅱ级) ($P < 0.05$)。WSIP-2 蛋白的高表达与肿瘤的分化程度、肿瘤大小、术后有无复发相关 ($P < 0.05$)。**结论** WSIP-2 蛋白在人脑星形细胞瘤的发生、发展中起重要作用,可作为监测早期复发的一个辅助指标。

关 键 词: WSIP-2 蛋白;星形细胞瘤;临床指标;病理分型;免疫组化

中图分类号: R739.4

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2010)01-0011-05

Expression of WSIP-2 protein in human brain astrocytoma

TANG Zhi, YUAN Xian-rui, WU Ming, et al.

(Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of WSIP-2 protein in human brain astrocytoma and its clinicopathological significance. **Methods** Expression of WSIP-2 in 10 specimens of normal human brain tissue and 54 of human astrocytoma was examined by immunohistochemical staining. The relationship between the expression of WSIP-2 protein and the clinicopathological features in human brain astrocytoma was analyzed. **Results** The expression of WSIP-2 was negative in all specimens of normal human brain tissue, and positive in 35 of 54 of human astrocytoma with a positive rate of 64.8%. The expression of WSIP-2 protein in astrocytoma specimens of grade Ⅲ-Ⅳ was significantly higher than that of grade Ⅰ-Ⅱ ($P < 0.01$). The increased expression of WSIP-2 was positively correlated with the differentiation, size and recurrence of the tumor ($P < 0.01$). **Conclusion** The over-expression of WSIP-2 may be involved in the pathogenesis and development of astrocytoma. The detection of the expression level of WSIP-2 is helpful to evaluate the prognosis of the patients with this tumor.

Key words: Wnt-inducible secreted protein 2 (WSIP-2); Astrocytoma; Clinicopathological factor; Pathology grouping; Immunohistochemistry

Wnt-1 诱导分泌蛋白 2 (wnt-inducible secreted protein 2, WISP-2) 是近年发现的细胞分泌蛋白 CCN 家族新成员,在成人少数

组织中有不同程度的表达,在肿瘤组织中的表达有较大差异。但在人脑星形细胞瘤中的表达研究目前国内外尚未见报道。本研究采用免疫组织化学方法检测人脑星形细胞肿瘤中 WISP-2 蛋白的表达,探讨

WISP-2蛋白在人脑星形细胞肿瘤发生、发展过程中的作用,及其与临床病理指标之间的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

54 例人脑星形细胞瘤蜡块组织标本取自中南大学湘雅医院病理科 2008 年 1 月~2008 年 8 月存档的手术标本,所有病例均为首次手术,术前未行放疗和化疗。病理分级依照世界卫生组织(WHO)2000 年关于颅内肿瘤的分类标准^[1],对每位患者肿瘤标本进行组织学级别评估,分为星形细胞瘤Ⅰ级 13 例,Ⅱ级 15 例,Ⅲ级 14 例,Ⅳ级 12 例。其中男 29 例,女 25 例;年龄 2~71 岁,平均 38.3±16.9 岁。患者均有完整的随访资料。另取 10 例尸检正常脑组织为对照组。

1.2 主要试剂及溶液

兔抗人 WISP-2 单抗购自 santa cruz 公司。PV6000 通用型试剂盒、DAB 显色试剂盒和柠檬酸盐抗原修复液购自北京中杉试剂公司。

1.3 免疫组化技术检测

用 SP 法检测 WISP-2,灭活内源性过氧化酶活性,微波修复抗原,滴加兔抗人 WISP-2 单抗 50 μl,4℃湿盒中过夜,滴加生物素标记的第二抗体 50 μl,滴加 SP 复合物。显色:PBS 4 ml、DAB 5 g、H₂O 25 μl,至显色满意后冲洗,终止显色反应,苏木素复染。酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶固封,显微镜检。

1.4 结果判定

由两位病理学专家独立阅片,确定免疫组化结果。计分参考 Remmele 等^[2-3]的 IRS

(immuno-reactive score)法,根据染色强度、阳性细胞数和两者计分的乘积进行综合判断。阳性细胞着色强度(SI)分为:未着色记为 0 分;淡黄色记为 1 分;黄色记为 2 分;棕黄色记为 3 分。组织细胞中阳性细胞数所占的百分比(PP)分为:未着色记为 0 分;1%~10%记为 1 分;11%~50%记为 2 分;51%~80%记为 3 分;80%~100%记为 4 分。两积分相乘为最后结果:0 分为阴性(-);1~4 分为弱阳性(+);5~8 分为阳性(++);9~12 分为强阳性(+++)。

1.5 统计分析

采用 SPSS 14.0 统计软件包进行统计分析。实验数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料的比较采用 *t* 检验。临床病理资料等计数资料分析采用 χ^2 检验。*P* < 0.05 定为有统计学意义。

2 结果

2.1 WISP-2 蛋白在正常脑组织和人脑星形细胞瘤中的表达

10 例正常脑组织未见 WISP-2 蛋白阳性表达。54 例星形细胞瘤标本中,35 例肿瘤组织检出 WISP-2 蛋白,其在人脑星形细胞瘤的表达阳性率为 64.8%(表 1)。按照 Kernohan 病理分级将标本分为低级别组(Ⅰ~Ⅱ级)和高级别组(Ⅲ~Ⅳ级)。低级别组(Ⅰ~Ⅱ级)和高级别组(Ⅲ~Ⅳ级)中 WISP-2 蛋白的阳性表达率分别为 50.0%(14/28)和 80.8%(21/26),两者相比,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。WISP-2 在人脑星形细胞瘤细胞阳性表达在细胞浆,呈黄色、棕黄色或棕褐色(图 1)。

表 1 WISP-2 蛋白在正常脑组织和星形细胞瘤中的表达

组别	n	WISP-2 蛋白				阳性率
		-	+	++	+++	
正常脑组织组	10	10	0	0	0	0
星形细胞瘤组	54	19	13	9	13	64.8%*
低级别组(Ⅰ~Ⅱ)	28	14	7	2	5	50.0%
高级别组(Ⅲ~Ⅳ)	26	5	6	7	8	80.8%★

注:与正常脑组织相比,**P* < 0.01;与Ⅰ~Ⅱ级(级别组)星形细胞瘤相比,★*P* < 0.05

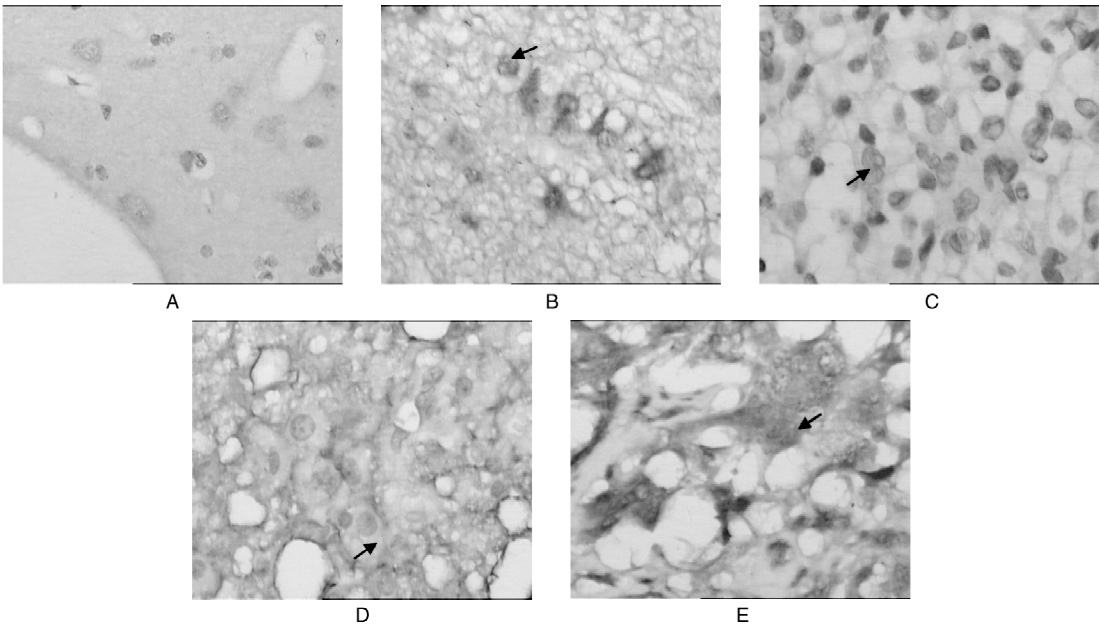


图 1 WISP-2 蛋白的阳性表达(×400)。A:正常脑组织;B:星形细胞瘤 I 级;C:星形细胞瘤 II 级;D:星形细胞瘤 III 级;E:星形细胞瘤 IV 级

2.2 WISP-2 蛋白的表达与人脑星形细胞瘤临床病理指标的关系

WISP-2 蛋白的表达与年龄、性别、部位无明显关系(均 $P>0.05$),与肿瘤大小、病理分级有显著关系(均 $P<0.05$,表 2)。随访 1 年并已确认的复发患者 18 例,WISP-2 蛋白在人脑星形细胞瘤术后复发组的阳性表达率为 83.3%(15/18),术后无复发组的阳性表达率为 55.6%(20/36),两者间差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 WISP-2 蛋白表达水平与星形细胞瘤临床病理特征的关系

临床病理指标	n	WISP-2 蛋白表达		P 值
		—	+	
性别				0.492
男	29	9	20	
女	25	10	15	
年龄				0.393
<40 岁	27	8	19	
≥40 岁	27	11	16	
肿瘤部位				0.807
幕上	46	16	30	

续上表

临床病理指标	n	WISP-2 蛋白表达		P 值
		—	+	
幕下	8	3	5	
肿瘤直径(cm)				0.039
<3	11	6	5	
≥3~5	26	11	15	
>5	17	2	15	
肿瘤细胞分化程度				0.018
I~II	28	14	14	
III~IV	26	5	21	
肿瘤复发				0.044
有	18	3	15	
无	36	16	20	

3 讨论

星形细胞肿瘤作为颅内最为常见的恶性肿瘤,有相对特殊的颅内生长环境和生物学行为,高级别星形细胞肿瘤侵袭性强,术后复发快,病死率高,是神经外科最棘手的难治性肿瘤之一,手术治疗难以彻底切除又易致功能损害,术后即使采取放疗、化疗等综合治疗,但疗效仍不理想。治疗上的差异

无疑是其重要的影响因素,但肿瘤内在的生物学特性,特别是分子水平的差异应该是关键所在。已有研究证实星形细胞肿瘤发生发展是一个多步骤、多因素、多基因变异累积的复杂的病变过程,与多种基因及其蛋白产物密切相关。Wnt-1 诱导分泌蛋白 2 (WISP-2) 又称 CCN5, 是近年发现的 CCN 家族新成员, 在大多数组织中除骨骼肌、卵巢、结肠、胎肺组织外均不表达或低表达^[4], 但可在多种肿瘤组织中表达异常, 与肿瘤的发生、发展密切相关。然而, 国内外有关人脑星形细胞瘤中表达情况的报道较少。

CCN 家族包括高半胱氨酸蛋白 61 (cysteine-rich 61, Cyr 61)、结缔组织生长因子 (CTGF)、肾母细胞瘤过度表达基因 (NOV)、WISP-1、WISP-2、WISP-3^[5]。CCN 家族间在氨基酸序列上有着高度的同源性和保守性, 同时具有相似的结构模块, WISP-2 基因位于 20q12-20q13.1。与其他成员相比, WISP-2 在结构上缺少 C 末端结构模块且仅含有 28 个半胱氨酸, 可编码多种细胞外基质蛋白, 参与细胞增殖、分化、迁移、凋亡、血管生成、肿瘤形成等多种重要的病理生理过程^[6-7]。近年来的研究发现, WISP-2 与某些肿瘤的发生和发展有着密切的关系。然而, 在不同的肿瘤组织中, WISP-2 的分布及生物学作用不同, 正向或负向调节肿瘤的发展。Dhar 等^[8]研究表明在胰腺癌组织中 WISP-2 的表达缺失, 在正常胰腺组织中高表达, WISP-2 的失表达导致胰腺癌基因激活从而参与胰腺癌的发生发展。Pennica 等^[9]运用定量 PCR 测定结、直肠腺癌和邻近正常结肠组织 WISP-2 mRNA, 结果显示, 在 79% 人结肠肿瘤组织中 WISP-2 mRNA 水平明显低于正常结肠组织, 并认为 WISP-2 在结肠癌中表现为抑癌基因, 是肿瘤细胞增殖的负性调控因子。但 Saxena 等^[10]的研究说明 WISP-2 在 4 种乳腺癌细胞系 (MCF-7、ZR-75、T-47D 和 SKBR2) 中都有高表达, 而在正常乳腺上皮细胞中几乎没有检测到 WISP-2 的表达, WISP-2 基因是雌激素作用的早期效应基因之一, 它直接受雌二醇的调控, WISP-2 基因的表达改变与细胞增殖相关, 可能是与乳

腺癌发展相关的早期基因改变。

本组实验研究显示 WISP-2 蛋白在正常脑组织的中未见表达, 但是随着星形细胞瘤病理级别恶性程度的增高其表达也随之增高, WISP-2 蛋白在高级别组 (Ⅲ~Ⅳ) 的表达明显高于其在低级别组 (Ⅰ~Ⅱ) 中的表达, 差异有统计学意义, 这提示了 WISP-2 蛋白与人脑星形细胞瘤的发生、发展和恶性演变关系密切, WISP-2 蛋白在星形细胞瘤中可能是一个有致癌潜能基因产物, 并且本研究结合临床病理指标分析 WISP-2 蛋白的表达水平与星形细胞瘤的病理分级、肿瘤大小密切相关, 而与年龄、性别、肿瘤部位等其他临床病理特征无明显相关, 据此, 我们推测 WISP-2 蛋白可能在脑星形细胞瘤的发生发展过程中通过调控细胞增殖、凋亡机制发挥重要作用。同时研究表明 WISP-2 蛋白表达与肿瘤复发有关, 提示 WISP-2 蛋白可作为监测早期复发的一个重要指标。

综上所述, WISP-2 在星形细胞瘤的发生和发展过程中起重要作用, 可作为监测早期复发的一个辅助指标, 并可能是人脑星形细胞瘤基因治疗新的重要靶点。

参考文献:

- [1] Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2002, 61(3): 215-225.
- [2] Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue[J]. Pathologe, 1987, 8(3): 138-140.
- [3] 钟喆, 袁贤瑞, 何正文, 等. MT1-MMP 和 Factor Ⅺ 在人脑胶质瘤中表达差异及其意义[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2009, 15(1): 12-16.
- [4] Bleau AM, Planque N, Perbal B. CCN proteins and cancer: two to tango[J]. Front. Biosci, 2005, 10: 998-1009.
- [5] Holbourn KP, Acharya KR, Perbal B. The CCN family of proteins: structure functions relationships[J]. Trends Biochem Sci, 2008, 33(10): 461-473.
- [6] Inadera H, Dong H, Matsushima K. WISP-2 is a secreted protein and can be a marker of estrogen exposure in MCF-7 cell[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002,

294(3): 602-608.

- [7] Rachfal AW, Brigstock DR. Structural and functional properties of CCN proteins[J]. Vitam. Horm, 2005, 70: 69-103.
- [8] Dhar G, Mehta S, Banerjee S, et al. Loss of WISP-2/CCN5 signaling in human pancreatic cancer: a potential mechanism for epithelial-mesenchymal-transition [J]. Cancer Lett, 2007, 254(1): 63-70.
- [9] Pennica D, Swanson TA, Welsh JW, et al. WISP gene-

sare members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(25): 14717-14122.

- [10] Saxena N, Banerjee S, Sengupta K, et al. Differential expression of WISP-1 and WISP-2 genes in normal and transformed human breast cell lines[J]. Mol Cell Biochem, 2001, 228(1-2): 99-104.

(修回日期:2010-02-10)

(上接第 10 页)

恶性肿瘤,转移是其发展的最终阶段。对于喉癌转移的发生机制,目前尚不十分清楚,研究其发生侵袭和转移的机制具有重要的临床意义。

Fu 等^[4]检测了在前列腺癌中 RKIP 的表达,发现 RKIP 在肿瘤原发灶中有表达,在转移组织如肝、肺、肾上腺、胃、骨及淋巴结中表达基本缺失。Hagan 等^[2]检测了 103 例乳腺癌患者的病理标本,发现在淋巴结转移灶中 RKIP 表达显著下降,同时发现有转移的乳腺癌和无转移的乳腺癌原发灶比较,RKIP 的差异虽无统计学意义,但观察到原发灶的 RKIP 表达下调者更易有转移的趋势。本组资料经统计分析后发现,RKIP 在有淋巴结转移的喉癌中比无淋巴结转移的喉癌表达阳性率显著下降,但在有淋巴结转移喉鳞癌的原发灶与淋巴结转移灶中表达无显著差别,出现这种差异的原因可能是 RKIP 在喉鳞状上皮及喉鳞癌中还有其他未知功能,也可能因样本例数有限,使原发灶与转移灶间的差异不能体现。我们发现在部分标本中肿瘤边缘向间质侵袭的地方表达是逐渐下降的。所以我们认为,RKIP 在喉癌中是具有抑制转移作用的,且 RKIP 表达低的喉癌更易发生转移。

RKIP 是 Raf/MEK/ERK 通路的天然内源性抑制蛋白,通路的中心就是此三个激酶的级联反应:Raf 磷酸化后激活 MEK 激酶,

MEK 激酶磷酸化后激活 ERK,ERK 磷酸化后发挥作用^[2]。本组实验中用 P-ERK 代表 MAPK 通路的活性,将 RKIP 与 P-ERK 在所有喉癌原发灶中的表达行 Spearman 秩相关分析,发现两者之间呈正相关性($P=0.003$, $r=0.456$)。产生这种现象的原因可能是由于这条通路在胞内还受其他许多复杂的上游信号活化,虽然机体上调 RKIP 表达也并不能完全抑制 ERK 的激活。由此推测,RKIP 可能不完全通过 MAPK 信号通路,它还执行其他未知功能来抑制喉癌转移的发生。

参考文献:

- [1] Yamazaki T, Nakano H, Hayakari M, et al. Differentiation induction of human keratinocytes by phosphatidylethanolamine-binding protein[J]. J Biol Chem, 2004, 279(31): 32191-32195.
- [2] Hagan S, Al-Mulla F, Mallon E, et al. Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(20): 7392-7397.
- [3] 许良中,杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准[J]. 中国癌症杂志,1996, 6(4): 229-231.
- [4] Fu Z, Smith PC, Zhang L, et al. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis[J]. J Natl Cancer Inst, 2003, 95(12): 878-889.

(修回日期:2009-10-19)