

血管生成拟态蛋白在脑膜瘤组织的表达意义

胡朝峰^{1,2} 程宏伟¹ 单明¹ 罗婧¹ 王斌¹

摘要 探讨血管生成拟态 (VM) 在脑膜瘤组织中的表达及意义。收集 56 例脑膜瘤患者术后肿瘤病理标本, 同期 18 例颅内减压术后的脑组织标本为对照, 行免疫组织化学 SP 法染色, 检测 VM 相关蛋白血管上皮钙黏附素 (VE-cadherin)、上皮细胞激酶 (EphA2) 在脑膜瘤的脑膜组织中的表达; Western blot 进一步检测两组 VE-cadherin、EphA2 蛋白表达。结果显示, 与正常脑膜组织相比较, VE-cadherin、EphA2 在脑膜瘤中表达阳性率显著提高 ($P < 0.01$); 随着脑膜瘤病理分级的上升, 其 VE-cadherin、EphA2 蛋白的表达逐渐上升。VM 形成相关蛋白 VE-cadherin、EphA2 参与了脑膜瘤的发生与进展。

关键词 血管生成拟态; VE-cadherin; EphA2; 脑膜瘤

中图分类号 R 977.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)12-1890-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.12.032

缺血低氧是恶性肿瘤发展进程中的必经阶段, 快速增长的肿瘤需要微环境中供氧增加, 故管道结构的形成至关重要^[1]。血管生成拟态 (vasculogenic mimicry, VM) 是管道结构中虽然没有内衬血管内皮细胞, 但肿瘤细胞围成条索管道样结构而模拟血管生成, 血液可在这些无内皮细胞管道样结构中流动^[2]。研究^[3]表明, VM 相关的信号通路蛋白血管上皮钙黏附素 (VE-cadherin)-上皮细胞激酶 (epithelial cell kinase, EphA2)-磷脂酰肌醇-3-羟激酶-基质金属蛋白酶在 VM 网络状结构形成中作用明显。研究表明, 抑制胰腺癌^[4]、黑色素瘤^[5] 细胞中 VE-cadherin、EphA2 蛋白的表达可抑制 VM 形成。但有关 VM 形成过程中 VE-cadherin、EphA2 在脑膜瘤中的表达及其与临床分级间的关系尚未见文献报道。该研究探讨 56 例不同级别脑膜瘤中 VE-cadherin、EphA2 的表达, 分析脑膜瘤中 VM 表达及意义。

2017-05-16 接收

基金项目: 安徽省科技攻关项目 (编号: 12010402113)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院神经外科, 合肥 230022

² 安徽医科大学第三附属医院 (合肥市第一人民医院) 西区神经外科, 合肥 230061

作者简介: 胡朝峰, 男, 硕士研究生, 主治医师;

程宏伟, 男, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: chw001@163.com

1 材料与方法

1.1 标本与试剂 2013 年 10 月~2016 年 10 月神经外科 56 例行手术治疗的脑膜瘤患者, 其中男 23 例, 女 33 例, 年龄 41~76 (51.4 ± 12.7) 岁; 其中 I 级脑膜瘤患者 32 例, II 级 14 例, III 级 10 例; 56 例患者均为首发病例, 无较为严重的其他并发症; 选择同期 18 例脑外伤行颅内减压术后的脑组织为正常对照。患者均知情同意。兔抗人 VE-cadherin、EphA2 多克隆抗体购自美国 Bioworld Technology 生物技术公司; 免疫组织化学 SP 试剂盒、DAB 显色剂试剂盒购自北京中杉金桥有限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 血管拟态蛋白免疫组化染色方法和阳性结果判定 手术切除脑膜瘤组织和蛛网膜组织行石蜡包埋, 制备切片、常规二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化, 行免疫组化 SP 法检测 VE-cadherin、EphA2 蛋白表达。步骤如下: 柠檬酸缓冲液微波抗原修复, PBS 缓冲液洗涤; 内源性过氧化物酶用 3% H_2O_2 孵育消除, PBS 缓冲液洗涤; 山羊血清封闭 15 min。滴加一抗 (兔抗人 VE-cadherin 多克隆抗体, PBS 稀释 1:150, 兔抗人 EphA2 多克隆抗体, PBS 稀释 1:200); 4 °C 孵育过夜。次日室温放置 2 h 后, 滴加羊抗兔二抗; DAB 显色, 苏木精复染, 镜下观察, 中性树胶封固。以 PBS 代替一抗做阴性对照。阳性结果的判定由两名病理科医师进行独立完成, 细胞质染色均匀, 呈棕黄色或棕褐色判定为阳性细胞。VE-cadherin、EphA2 免疫组化结果判断标准: 以细胞质、细胞核染色为黄色颗粒者为阳性反应细胞, 显微镜下 ($\times 400$ 倍) 记数每张玻片 500 个细胞, 计算染色阳性细胞占总细胞的百分比; 阳性反应染色强弱标准: “-”: 无阳性或阳性细胞 $< 10\%$, 染色较淡; “+”: 阳性反应细胞 $10\% \sim 25\%$, 染色呈浅黄色; “++”: 阳性反应细胞 $26\% \sim 50\%$, 染色呈黄色; “+++”: 阳性反应细胞 $> 50\%$, 染色棕褐色。

1.3 Western blot 法检测组织血管拟态蛋白表达

取少许超低温冰箱冻存管中少量脑膜瘤组织和蛛网膜组织, 添加蛋白裂解液将其研磨至粉状, 然后在冷水中运用超声细胞破碎仪反复破碎, 12 000 r/min

离心 10 min 后,转至离心管中;BCA 标准蛋白测定样品中的蛋白浓度。取 30 μg 总蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳,加入兔抗人 VE-cadherin 多克隆抗体 (PBS 稀释 1 : 1 500),兔抗人 EphA2 多克隆抗体 (PBS 稀释 1 : 1 800) 4 ℃ 孵育过夜,次日加二抗孵育后,ECL 化学发光剂显影,曝光,结果使用 Image J 软件进行灰度分析,以 β-actin 为内参,用目的条带和内参照条带的比值表示目的蛋白相对表达水平。实验重复 3 次。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行分析,脑膜瘤阳性染色表达率组间差异采用 χ^2 检验;VE-cadherin、EphA2 目的蛋白的相对表达用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 *t* 检验观察组间差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VE-cadherin、EphA2 在脑膜瘤组织中的阳性表达 与正常组相比,在脑膜瘤组织中,VE-cadherin 阳性表达 (73.21%) 水平明显提高,较正常组 (27.78%) 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 11.956, P = 0.001$),见表 1、图 1;EphA2 在脑膜瘤细胞中的阳性表达 (69.64%) 亦显著高于正常组 (33.33%),差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.536, P = 0.006$),见表 1、图 2。

2.2 不同级别脑膜瘤组织中 VE-cadherin 和 EphA2 的表达 临床中,脑膜瘤级别主要分为 I 级、II 级和 III 级,免疫组织化学染色显示,随着脑膜瘤病

理分类级别的升高,秩相关分析显示,脑膜瘤组织中 VE-cadherin 和 EphA2 的表达逐渐越高,与病理级别呈正相关性 ($F = 3.264, P < 0.05$),见表 2。

表 1 VE-cadherin 及 EphA2 在对照组和脑膜瘤组组织中表达水平比较 (n)

组别	VE-cadherin 表达				阳性率 (%)	EphA2 表达				阳性率 (%)
	-	+	++	+++		-	+	++	+++	
正常	13	5	0	0	27.78	12	6	0	0	33.33
脑膜瘤	15	14	17	10	73.21	17	19	13	7	69.64

表 2 不同级别脑膜瘤组组织中 VE-cadherin 及 EphA2 表达水平的比较 (n)

组别 (脑膜瘤)	VE-cadherin 表达				阳性率 (%)	EphA2 表达				阳性率 (%)
	-	+	++	+++		-	+	++	+++	
I 级 (n=32)	13	9	8	2	59.38	14	15	2	1	56.25
II 级 (n=14)	2	4	5	3	85.71	2	3	7	2	85.71
III 级 (n=10)	0	1	4	5	100.00	1	1	4	4	90.00

2.3 Western blot 法检测脑膜瘤组织中 VE-cadherin 和 EphA2 蛋白表达 Western blot 实验结果显示,不同分化级别脑膜瘤组织与正常脑外伤的脑组织中可检测到 VE-cadherin 和 EphA2 蛋白的表达。由图像分析可知,与正常脑组织相比,脑膜瘤组织中 VE-cadherin 和 EphA2 蛋白的表达明显增强,I 级、II 级和 III 级分化的脑膜瘤组织中 VE-cadherin /β-actin 和 EphA2 /β-actin 蛋白的表达明显高于正常脑组织组蛋白的表达,差异有统计学意义 ($t = 3.216, 6.105, P < 0.05, P < 0.01$),见图 3。

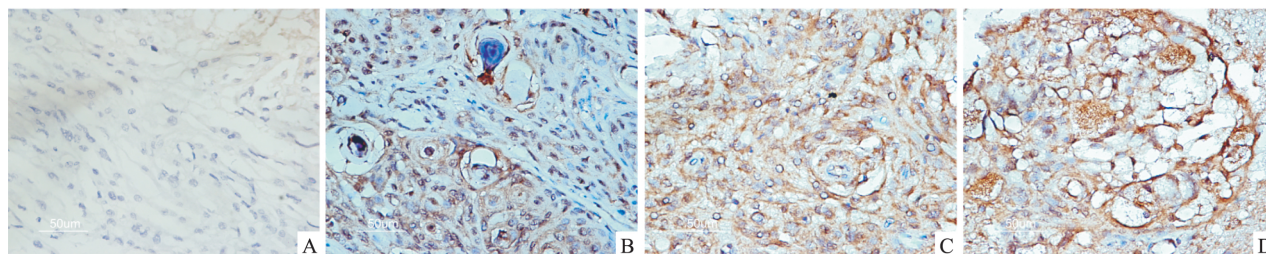


图 1 VE-cadherin 蛋白表达 SP×400

A: 正常脑组织中表达 (-); B: 脑膜瘤 I 级组织中表达 (+); C: 脑膜瘤 II 级组织中表达 (++); D: 脑膜瘤 III 级组织中表达 (+++)

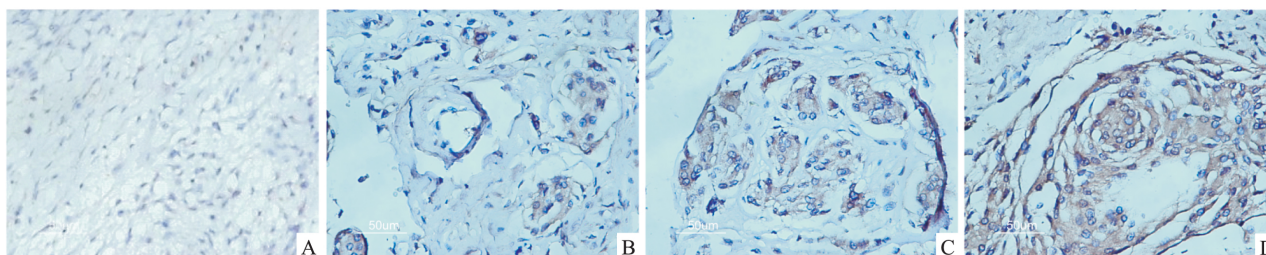


图 2 EphA2 蛋白表达 SP×400

A: 正常脑组织中表达 (-); B: 脑膜瘤 I 级组织中表达 (+); C: 脑膜瘤 II 级组织中表达 (++); D: 脑膜瘤 III 级组织中表达 (+++)

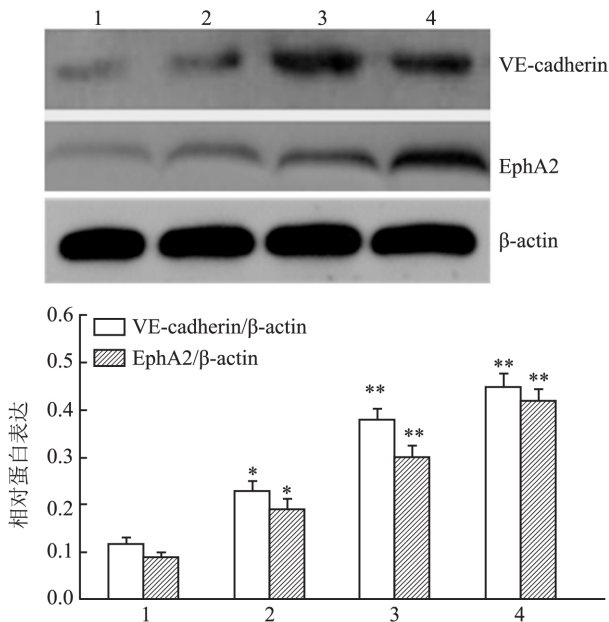


图3 Western blot 法检测 VE-cadherin 和 EphA2 的蛋白表达

1: 正常脑组织; 2: I 级脑膜瘤组织; 3: II 级脑膜瘤组织; 4: III 级脑膜瘤组织; 与正常组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

3 讨论

脑膜瘤属于脑部的良性肿瘤,由于肿瘤细胞异常增殖和侵袭周围正常脑组织,脑膜瘤术后患者易复发^[2]。肿瘤的生长和侵袭需要丰富的血管为其提供充足的氧和营养,脑膜瘤是一种实体肿瘤,血供丰富,研究其血管新生的机制可能为降低脑膜瘤复发率和辅助分子靶向治疗提供理论依据;在脑膜瘤抗血管治疗中,以血管内皮生长因子为靶点的贝伐单抗已应用于 III 级脑膜瘤和复发性脑膜瘤中,且有一定的疗效^[6]。但抗血管新生分子靶向单一的药物疗效不够理想,抗肿瘤血管新生的多分子靶向治疗为药物研发的一个方向,研究^[7]显示,肿瘤细胞可塑性的一种常见表现是 VM 形成,其本质是发生于内胚层的上皮细胞向中胚层的血管内皮细胞分化,并形成具有间充质细胞的特性,故肿瘤细胞上皮-间质转化过程的一种表现形式为 VM 的形成,VE-cadherin 是其中一个重要的交叉作用位点。钙依赖黏附素家族的 VE-cadherin 是第一个被明确的 VM 重要调控因子,可以介导同型细胞间的黏附^[3]。研究^[4-5]表明,抑制胰腺癌和黑色素瘤细胞中 VE-cadherin 的表达,可以抑制 VM 的形成。本研究表明,正常脑组织中 VE-cadherin 的表达明显弱于脑膜瘤组织,而且随着脑膜瘤病理分级水平的升高,VE-cadherin 的表达逐渐增加,可见 VE-cadherin 可能在

脑膜瘤组织的 VM 发生和信号转导通路中发挥功能。

EphA2 为受体蛋白酪氨酸激酶,可以调节血管生成和迁移,以及组织细胞的增生和凋亡。有研究^[8]显示,在胰腺癌治疗中抑制 EphA2 的表达可以通过阻止 VM 管道的形成而取得一定的疗效。EphA2 生物功能多样,在正常人体组织中低表达,在肿瘤组织中表达升高,且与肿瘤浸润转移、病理分级和预后有一定的相关性^[9]。本研究通过免疫组织化学和 Western blot 技术观察了 EphA2 在正常脑组织和不同级别的脑膜瘤中的表达,结果显示,在脑膜瘤细胞中的阳性表达明显高于正常组,差异有统计学意义,表明 EphA2 蛋白的表达与脑膜瘤的发生有相关性。EphA2 在高级别的脑膜瘤组织中表达更高。

Guo et al^[10]通过连续切片、免疫荧光、免疫共沉淀等技术发现在胰腺癌的血管形成中 VE-cadherin 和 EphA2 共定位,主要位于细胞黏附处。显示两者之间有着密切联系。Lai et al^[11]抑制黑色素瘤中 EphA2 和 VE-cadherin 的表达,可以抑制 VM 形成和肿瘤的进展。本研究需要通过免疫共沉淀等技术进一步确定 EphA2 和 VE-cadherin 是否均参与 VM 的形成,以及调控 VM 形成机制中的下游靶点。综上所述,本研究推测,VE-cadherin 和 EphA2 蛋白在脑膜瘤组织中高表达,两者可能参与了脑膜瘤的发生与发展,两者与脑膜瘤的复发相关性有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Ruffini F, Graziani G, Levati L, et al. Cilengitide downmodulates invasiveness and vasculogenic mimicry of neuropilin 1 expressing melanoma cells through the inhibition of αvβ5 integrin [J]. Int J Cancer, 2015, 136(6): E545-58.
- [2] 李丽丽, 夏瑞祥, 吴炜, 等. 脑膜瘤 1 基因在 216 例成人急性髓细胞性白血病中的表达及意义 [J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(6): 694-8.
- [3] Shao R, Taylor S L, Oh D S, et al. Vascular heterogeneity and targeting: the role of YKL-40 in glioblastoma vascularization [J]. Oncotarget, 2015, 6(38): 40507-18.
- [4] Guo J Q, Zheng Q H, Chen H, et al. Ginsenoside Rg3 inhibition of vasculogenic mimicry in pancreatic cancer through downregulation of VE-cadherin/ EphA2/ MMP9/MMP2 expression [J]. Int J Oncol, 2014, 45(3): 1065-72.
- [5] Orecchia P, Conte R, Balza E, et al. Targeting Syndecan-1, a molecule implicated in the process of vasculogenic mimicry, enhances the therapeutic efficacy of the IL2 immunocytokine in

(下转第 1896 页)

- [18] 林萍, 汤依群, 杨莉等. 束花石斛抗凝血作用的初步研究[J]. 中国天然药物, 2005, 3(1): 44-7.
- [19] Disis M L. Immune regulation of cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(29): 4531-8.
- [20] Engels E A, Pfeiffer R M, Fraumeni J F Jr, et al. Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients[J]. *JAMA*, 2011, 306(17): 1891-901.
- [21] 王文慧, 李海滨, 宋玉国. 乳腺癌患者细胞免疫指标的检测及意义[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2017, 18(1): 53-6.
- [22] 覃辉艳, 梁慧莉, 姚思宇等. 铁皮石斛颗粒增强免疫力作用的实验研究[J]. 应用预防医学, 2016, 22(1): 81-3.
- [23] 任泽明, 戴关海, 董晔玲等. 铁皮石斛洋参浸膏对肿瘤生长及荷瘤小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 浙江中医杂志, 2016, 51(7): 485-7.
- [24] 薛达冰. 石斛多糖对肿瘤特异性细胞毒性 T 淋巴细胞抗肿瘤作用的影响[J]. 生物技术世界, 2016, 99(2): 192-2.
- [25] 罗慧玲, 蔡体育, 陈巧伦等. 石斛多糖增强脐带血和肿瘤病人外周血 LAK 细胞体外杀伤作用的研究[J]. 癌症, 2000, 19(12): 1124-6.
- [26] 王波波, 董晔玲, 戴关海等. 铁皮枫斗颗粒对化疗药的增效解毒作用[J]. 浙江中医杂志, 2012, 47(3): 211-3.
- [27] 秦秋荣, 刘庆军, 张国庆. 铁皮枫斗颗粒对放射损伤小鼠存活情况及肺病理组织学改变的影响[J]. 中国血液流变学杂志, 2008, 18(3): 332-4.
- [28] 张晓峰, 夏菁, 裘伟民. 铁皮石斛饮品对 91 例放疗后肿瘤患者的血液常规影响分析[C]. 第七届全国 SOD 学术研讨会论文集, 2011.
- [29] 梁颖, 戚静燕, 闫峰等. 连续食用鲜铁皮石斛对中晚期非小细胞肺癌化疗患者生活质量及无进展生存期的影响[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(4): 901-3.
- [30] 陈晓萍, 张沂平, 朱娴如等. 铁皮枫斗颗粒(胶囊)治疗肺癌放疗患者气阴两虚证的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(5): 394-7.

(上接第 1892 页)

- human melanoma xenografts[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(35): 37426-42.
- [6] Och W, Szmuda T, Kulbacki K, et al. The correlation of clinical and chromosomal alterations of benign meningiomas and their recurrences[J]. *Neurol Neurochir Pol*, 2016, 50(6): 395-402.
- [7] Scully S, Francescone R, Faibish M, et al. Transdifferentiation of glioblastoma stem-like cells into mural cells drives vasculogenic mimicry in glioblastomas[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(37): 12950-60.
- [8] Wang H, Lin H, Pan J, et al. Vasculogenic mimicry in prostate cancer: the roles of EphA2 and PI3K[J]. *J Cancer*, 2016, 7(9): 1114-24.
- [9] Wang H, Sun W, Zhang W Z, et al. Inhibition of tumor vasculogenic mimicry and prolongation of host survival in highly aggressive gallbladder cancers by nor cantharidin *via* blocking the ephrin type a receptor 2/focal adhesion kinase/paxillin signaling pathway[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96982.
- [10] Guo J Q, Zheng Q H, Chen H, et al. Ginsenoside Rg3 inhibition of vasculogenic mimicry in pancreatic cancer through downregulation of VEcadherin/EphA2/MMP9/MMP2 expression[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(3): 1065-72.
- [11] Lai Y W, Wang S W, Chang C H, et al. Butein inhibits metastatic behavior in mouse melanoma cells through VEGF expression and translation-dependent signaling pathway regulation[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15: 445-54.

Expression and significance of vasculogenic mimicry proteins in meningiomas

Hu Chaofeng^{1,2}, Cheng Hongwei¹, Shan Ming¹, et al

¹Dept of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Neurosurgery, West Area of The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, The First People's Hospital of Hefei, Hefei 230061)

Abstract To investigate the expression and significance of vasculogenic mimicry (VM) proteins in meningiomas. 56 cases of meningioma surgical pathology specimens and in the same period, 18 cases after decompression of normal arachnoid tissue as normal control group. VM related proteins of vascular epithelial calcium (VE-cadherin) and epithelial cell kinase (EphA2) expression in meningioma tissues were detected by immunohistochemical SP staining and Western blot. Results showed that compared with normal control groups, the positive rate of VE-cadherin, EphA2 expression in meningioma increased significantly ($P < 0.01$). With the increase of pathological grade of meningiomas, the expression of VE-cadherin and EphA2 protein increased gradually. VE-cadherin and EphA2 protein involved in the VM formation occurrence and progress in meningioma.

Key words angiogenesis mimicry; VE-cadherin; EphA2; meningioma