

ADAMTS4、5 蛋白酶 在人脑胶质瘤中表达及其恶性程度的关系

朱德位^{1 2} 蒋广元^{1 2} 梁新强^{1 2} 赵磊³ 李瑛² 彭斐²

摘要 目的 研究人脑胶质瘤中含血小板结合蛋白基序的解聚素金属 4(ADAMTS4)蛋白酶和 ADAMTS5 蛋白酶的表达及其与胶质瘤病理分级之间的关系。方法 采用免疫组化 Envision 二步法检测 ADAMTS4 及 ADAMTS5 蛋白酶在 44 例不同级别脑胶质瘤、11 例瘤周脑组织中的表达,计算阳性细胞百分率,并通过 Image Pro Plusversion 6.0(IPP)图像分析软件测量计算其平均光密度(MOD)值。结果 ① ADAMTS4 和 ADAMTS5 蛋白酶在瘤周脑组织中不表达或极低表达,而在胶质瘤组织中高表达,为棕黄色,主要表达定位于细胞外基质及细胞质中,两组差异有统计学意义($P < 0.05$)。进一步研究显示,其蛋白表达量随着肿瘤级别的升高而升高,WHO 分级中低级别、高级别间差异有统计学意义($P < 0.05$)。② ADAMTS4 与 ADAMTS5 蛋白酶在胶质瘤中表达呈正相关性($\chi^2 = 5.614, r = 0.357, P < 0.05$)。结论 ① ADAMTS4、ADAMTS5 蛋白表达量随着胶质瘤级别的升高而升高,提示了 ADAMTS4 及 ADAMTS5 蛋白酶在胶质瘤的进展、侵袭中发挥着重要作用。② ADAMTS4 与 ADAMTS5 蛋白表达呈正相关性,揭示了在胶质瘤的发生发展中这两种蛋白酶可能互相协同,两者的过表达共同促进了胶质瘤的侵袭。

关键词 胶质瘤; ADAMTS4 蛋白酶; ADAMTS5 蛋白酶; 免疫组织化学

中图分类号 R 739.41

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2017)05 - 0766 - 04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2017.05.032

人脑胶质瘤是中枢系统最常见的恶性肿瘤,其发生、发展是多基因、多分子调制相互作用的复杂过程^[1]。在多模式治疗下,多形性成胶质细胞瘤(WHO IV级)平均生存时间也只有 9 ~ 12 个月,间

变性星形细胞瘤(WHO III级)平均生存时间为 2 年,而单个肿瘤细胞渗透侵袭到大脑组织的能力是预后不良的主要原因^[2]。含血小板结合蛋白基序的解聚素金属蛋白酶(a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs,ADAMTS)是一种新型金属蛋白酶,其中 ADAMTS4 和 ADAMTS5 蛋白酶与多种蛋白多糖的降解有关,被认为是细胞外基质(extracellular matrix,ECM)降解酶^[3]。而有研究^[4]表明人脑胶质瘤迁移和侵袭可能与 ECM 的降解有关。因此,该研究通过免疫组化法在蛋白水平上检测 ADAMTS4、ADAMTS5 蛋白酶在人脑胶质瘤中表达,并分析与肿瘤恶性程度关系,从而为临床上早期诊断、靶向治疗胶质瘤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 2013 年 5 月 ~ 2016 年 3 月广西壮族自治区南溪山医院胶质瘤手术切除的石蜡标本 44 例,其中男 24 例,女 20 例,年龄 23 ~ 71 岁,中位年龄 51 岁,按照 WHO 中枢神经系统肿瘤 2000 年分类法进行分级:低级别组(I ~ II级) 21 例,包括毛细胞星形细胞瘤 9 例(I级),弥漫性星形细胞瘤 6 例(II级),少突胶质瘤 6 例(II级);高级别组(III ~ IV级) 23 例,包括间变性星形细胞瘤 9 例(III级),间变性少突星形细胞瘤 6 例(III级),胶质母细胞瘤 8 例(IV级)。所选病例均为单一病种,且术前均未行放疗、化疗及其他治疗。对照组为瘤周脑组织共 11 例,包括毛细胞星形细胞瘤(I级)瘤周脑组织 7 例,弥漫性星形细胞瘤(II级)瘤周脑组织 4 例。

1.2 试剂 免疫组织化学试剂一抗:兔抗人浓缩型多克隆抗体 ADAMTS4 及兔抗人浓缩型多克隆抗体 ADAMTS5,工作浓度均为 1 : 150,均购自北京博奥森生物技术有限公司;二抗:山羊抗兔一步法聚合物检测试剂盒,购自北京中杉金桥生物技术有限公司;DAB 显色试剂盒购自福建迈新生物技术有限公司。

1.3 免疫组化化学染色法 将石蜡标本 4 μm 切片,常规脱蜡、水化,用 3% 过氧化氢去除内源性氧

2017 - 01 - 11 接收

基金项目: 广西自然科学基金项目(编号:2013GXNSFAA019268)

作者单位: ¹ 桂林医学院 桂林 541000;

广西壮族自治区南溪山医院² 神经外科、³ 病理科 桂林 541000

作者简介: 朱德位 男 硕士研究生;

蒋广元 男 教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: Jgyjy6311@263.net

化酶,常规行柠檬酸钠抗原修复,按一步法聚合物检测试剂盒步骤操作。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.4 结果判定及标准 由两名病理科医师双盲法阅片和双评分半定量法进行评分:光镜下随机观察 8 个高倍视野,记录 5 个高倍视野中染色阳性的百分率,记分标准:靶细胞阳性率 0~10% 为 0 分,11%~50% 为 1 分,51%~75% 为 2 分,>75% 为 3 分;显色度按切片中组织显色有无及染色深浅记分,细胞无显色为 0 分,浅棕黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,深棕黄色为 3 分;最后将两项分相乘,分为 2 组:0 分为阴性; ≥ 1 分为阳性。并在曝光强度、放大倍数等相同拍摄条件一致的情况下对每张免疫组化片随机选取 10 个不重叠的高倍镜($\times 200$)视野采集图像,用 Image Pro Plus version 6.0 (IPP) 图像分析软件测量计算平均光密度(mean optical density, MOD)值。以阳性表达率及 MOD 值表示 ADAMTS4 及 ADAMTS5 蛋白表达的相对强度,行半定量分析。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 18.0 进行统计分析,对 ADAMTS4 及 ADAMTS5 蛋白在瘤周脑组织和各级别胶质瘤中的阳性表达率用 χ^2 检验;ADAMTS4 和 ADAMTS5 蛋白表达相关性分析采用 χ^2 检验及关联性分析;MOD 值采用独立样本 *t* 检验,均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胶质瘤 HE 染色观察 HE 染色图中可见肿瘤细胞大小不一,细胞质呈粉红色,细胞核呈蓝色,核异型性明显,核质比例增大;随着 WHO 级别的升高,瘤细胞的密度逐渐增加,有的可见瘤巨细胞,见图 1。

2.2 ADAMTS4、ADAMTS5 蛋白在瘤周脑组织及胶质瘤组织的表达 ADAMTS4 和 ADAMTS5 在瘤周脑组织中不表达或极低表达,而在胶质瘤组织中高表达,为棕黄色,主要表达定位于 ECM 及细胞质中,见图 2。

ADAMTS4 在瘤周脑组织组、胶质瘤组中的阳性表达率为 18.18%、77.27%,差异有统计学意义($\chi^2 = 13.589, P = 0.000$);而低级别组阳性表达率 61.90% 也明显低于高级别组的 91.30% ($\chi^2 = 5.403, P = 0.020$),见图 3A。ADAMTS5 在瘤周脑组织组、胶质瘤组中的阳性表达率分别为 18.18%、

84.09%,差异有统计学意义($\chi^2 = 14.323, P = 0.000$);在低级别组和高级别组的阳性表达率分别为 71.43%、95.65%,差异有统计学意义($\chi^2 = 4.815, P = 0.028$),见图 3B。

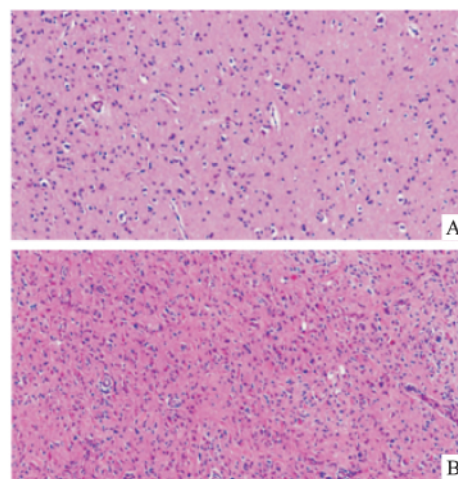


图1 胶质瘤的 HE 染色结果 $\times 200$
A: 低级别组; B: 高级别组

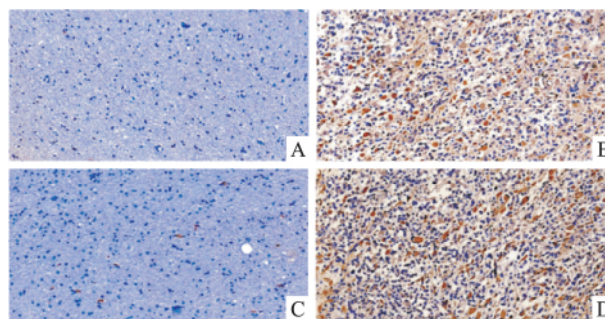


图2 ADAMTS4、5 在瘤周脑组织、胶质瘤中的表达 IHC $\times 200$

A: ADAMTS4 在瘤周脑组织中表达为阴性; B: ADAMTS4 在胶质瘤中表达为阳性; C: ADAMTS5 在瘤周脑组织中表达为阴性; D: ADAMTS5 在胶质瘤中表达为阳性

MOD 提示: ADAMTS4 在低级别组和高级别组分别为 (0.17840 ± 0.02153)、(0.27230 ± 0.02725),差异有统计学意义($F = 1.175, t = -12.600, P = 0.000$); ADAMTS5 在低级别组和高级别组分别为(0.19200 ± 0.02654)、(0.28520 ± 0.03098),差异有显著性($F = 1.816, t = -10.661, P = 0.000$)。而在低级别组中 ADAMTS4 及 ADAMTS5 差异无统计学意义;在高级别组中 ADAMTS4 及 ADAMTS5 差异也无显著性。见图 4。

2.3 ADAMTS4 与 ADAMTS5 蛋白表达在胶质瘤中相关性分析 根据 χ^2 检验及关联性分析可得

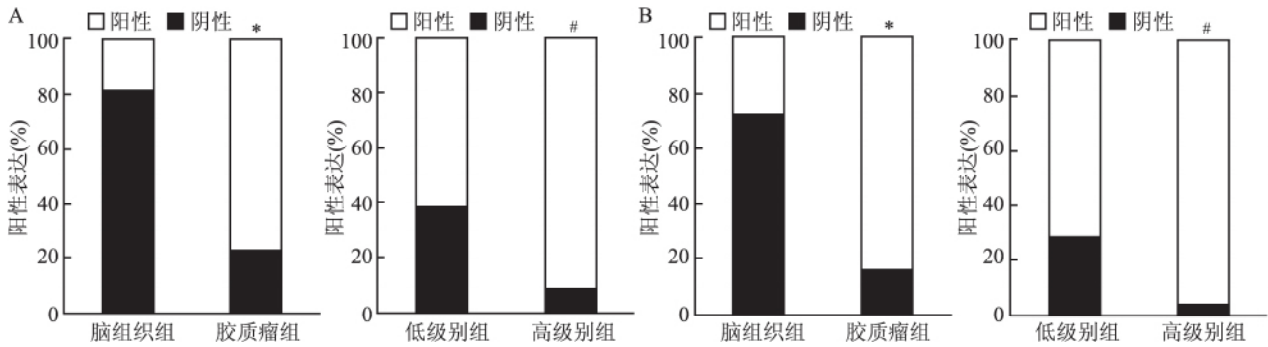


图3 ADAMTS4、ADAMTS5 的表达

A: ADAMTS4; B: ADAMTS5; 与脑组织组阳性率比较: * P < 0.05; 与低级别组阳性率比较: # P < 0.05

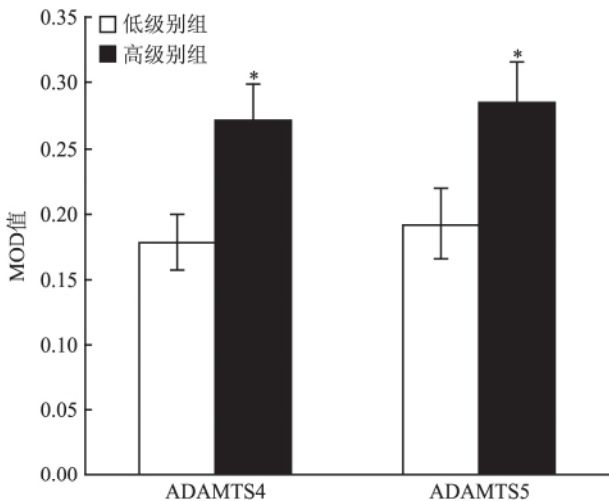


图4 ADAMTS4、ADAMTS5 在低级别组、高级别组中的 MOD 值与低级别组比较: * P < 0.05

ADAMTS4 与 ADAMTS5 在胶质瘤中的表达呈正相关性($\chi^2 = 5.614$ $r = 0.357$ $P = 0.018$) ,见表 1。

表 1 ADAMTS4 与 ADAMTS5 蛋白表达在胶质瘤中相关性分析(n)

ADAMTS4	ADAMTS5		合计
	阴性	阳性	
阴性	4	6	10
阳性	3	31	34
合计	7	37	44

3 讨论

有研究^[2]证明 ADAMTS4 及 ADAMTS5 蛋白酶在正常脑组织中表达极少。而本实验对象是胶质瘤组织,正常脑组织根据伦理学标准不便采集,脑外伤减压术切去的脑组织有恐对结果造成影响。故以 I ~ II 胶质瘤周脑组织代替。

成熟大脑 ECM 与其他部位 ECM 不同,胶原蛋白、纤维粘连蛋白、层粘连蛋白含量较少,而较多为

硫酸软骨素蛋白聚糖及透明质酸。brevican 又称脑富含的透明质酸结合蛋白(brain enriched hyaluronan binding , BEHAB) ,简称 B/b(BEHAB/brevican) ,是一种中枢系统特有的硫酸软骨素蛋白聚糖,是脑内最丰富的 ECM 成分之一,功能主要为抑制正常的神经细胞和轴突的运动,在保持大脑 ECM 的完整性必不可少^[5]。由于神经细胞、胶质细胞及神经组织占据 ECM 的巨大空间,所以使得神经系统细胞不能任意运动。而胶质瘤细胞可能通过多种机制来克服 ECM,完成迁移侵袭,包括正常胶质细胞的过表达、改变正常 ECM 成分、改变细胞表面受体结构等等。此外有研究^[6]表明,胶质瘤细胞能够产生蛋白水解酶和透明质酸酶,促进 ECM 周围成分分离,从而使细胞迁移,且在人类脑胶质瘤中 B/b 裂解物明显增加,且这些碎片能增加胶质瘤细胞的运动和迁移。研究^[7]表明在敲除 B/b 基因的动物模型中发现,高级别胶质瘤侵袭性明显降低,能为胶质瘤的靶向治疗提供有效帮助。

本实验研究显示 ADAMTS4 和 ADAMTS5 蛋白在胶质瘤组织中高表达,主要定位于细胞质及 ECM 中,但值得注意的是这两种蛋白酶在胶质瘤中表达呈显著正相关性,两者协同促进胶质瘤的发生、发展、侵袭,但目前两者的协同机制国内外尚无研究。ADAMTS4、ADAMTS5 蛋白酶与胶质瘤病理分级密切相关,原因可能与 ECM 的降解、B/b 的裂解及肿瘤微环境的改变有关。Frischknecht et al^[5]认为 ADAMTS4 蛋白能在特定的位置裂解 B/b,在当 ADAMTS4 蛋白检测到裂解的 B/b 片段后,ADAMTS4 蛋白抗体就会显著的抑制 B/b C 端的新暴露;使用该抗体后 50 ku 片段被检测到,并且在钾镁盐诱导损害后急剧上调,从而进一步证明 ADAMTS4 蛋白负责体内特定条件下对 B/b 的处理。Gu et al^[8]研

研究表明在伴有淋巴结转移肺癌中,ADAMTS5 表达上调,并且能促进肿瘤细胞的迁移、侵袭,他们认为肿瘤转移的最早阶段是局部肿瘤细胞突破基底膜与肿瘤基质及实质细胞接触发生相互作用,基底膜的降解退化与肿瘤的侵袭转移密切相关。ADAMTS5 蛋白酶能降解 ECM,使之释放膜束缚的前体细胞,从而调节细胞与细胞、细胞与基质的相互作用^[8]。同时,Held-Feindt et al^[2]研究表明,ADAMTS4 和 ADAMTS5 蛋白表达受胶质瘤微环境的影响,转化生长因子- β 能促进 ADAMTS4 蛋白表达,白介素-1 β 、表皮生长因子及肿瘤坏死因子- α 能促进 ADAMTS5 的表达,使得 ADAMTS4、ADAMTS5 蛋白酶与胶质瘤的发生、发展、侵袭起到正向反馈作用。

参考文献

- [1] Yao J, Zhou B, Zhang J, et al. A new tumor suppressor lncRNA ADAMTS9-AS2 is regulated by DNMT1 and inhibits migration of glioma cells[J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(8): 7935-44.
- [2] Held-Feindt J, Paredes E B, Blömer U, et al. Matrix-degrading

- proteases ADAMTS4 and ADAMTS5 (disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin motifs 4 and 5) are expressed in human glioblastomas[J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(1): 55-61.
- [3] Kumar S, Rao N, Ge R. Emerging roles of ADAMTSs in angiogenesis and cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2012, 4(4): 1252-99.
- [4] Mawrin C, Seidenbecher C. Glioma and Extracellular Matrix[M]. Springer Vienna, 2014: 271-92.
- [5] Frischknecht R, Seidenbecher C I. Brevican: a key proteoglycan in the perisynaptic extracellular matrix of the brain[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(7): 1051-4.
- [6] Viapiano M S, Hockfield S, Matthews R T. BEHAV/brevican requires ADAMTS-mediated proteolytic cleavage to promote glioma invasion[J]. *J Neurooncol*, 2008, 88(3): 261-72.
- [7] Dwyer C A, Bi W L, Viapiano M S, et al. Brevican knockdown reduces late-stage glioma tumor aggressiveness[J]. *J Neurooncol*, 2014, 120(1): 63-72.
- [8] Gu J, Chen J, Feng J, et al. Overexpression of ADAMTS5 can regulate the migration and invasion of non-small cell lung cancer[J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(7): 8681-9.

Expressions of ADAMTS4 and ADAMTS5 protease in brain gliomas and their relationship with malignance degree

Zhu Dewei^{1,2}, Jiang Guangyuan^{1,2}, Liang Xinqiang^{1,2}, et al

(¹Guilin Medical College Guilin 541000; ²Dept of Neurosurgery,

Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541000)

Abstract Objective To study the expressions of a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motif 4 and 5(ADAMTS4 and ADAMTS5) proteases in human brain gliomas and their relationship with pathological staging. **Methods** 44 cases of gliomas of different pathological staging, and 11 cases of peri-cancerous brain tissue were selected. Expressions of ADAMTS4 and ADAMTS5 proteases were determined by Envision immunohistochemistry technique. Then the percentage of positive expressed cells was calculated, and the mean optical density (MOD) was measured by the Image Pro Plus version 6.0 (IPP) Image analysis software. **Results** ADAMTS4 or ADAMTS5 protease was highly expressed in the glioma tissues, which was mainly localized in the cytoplasm and extracellular matrix with brown granular, its expression was lowest in peri-cancerous brain tissue, compared two groups, the difference was statistically ($P < 0.05$). The expression level of ADAMTS4 or ADAMTS5 protease gradually increased while the WHO grade of glioma increasing, there was statistically significant difference in comparison with the WHO classification low-grade and high-grade ($P < 0.05$). In 44 cases of brain gliomas, a positive correlation was found between the expression of ADAMTS4 and ADAMTS5 proteases expression ($\chi^2 = 5.614, r = 0.357, P < 0.05$). **Conclusion** ADAMTS4 and ADAMTS5 proteases expression are markedly increased with the ascending of tumor grade and correlated with the progression and invasiveness of gliomas. In addition, human gliomas tissues, ADAMTS4 and ADAMTS5 proteases expression are positive correlated. The overexpression of them may greatly promote invasiveness and migration of gliomas.

Key words gliomas; ADAMTS4 protease; ADAMTS5 protease; immunohistochemistry