

血管内皮生长因子与水孔蛋白 4 在胶质瘤及脑转移瘤中的表达及意义

谭齐家 何理盛 林志雄 韩富 黄涛 张泽舜

【摘要】 目的 探讨血管内皮生长因子(VEGF)与水孔蛋白 4(AQP4)在胶质瘤及脑转移瘤中的表达,并探讨两者与胶质瘤及脑转移瘤的组织病理学关系及在瘤周水肿形成过程中的作用。方法 选择福建医科大学附属第一医院神经外科自 1999 年至 2001 年手术切除并经病理检查证实的胶质瘤石蜡组织标本 73 例和脑转移瘤组织标本 15 例,并另取正常脑组织标本 8 例作为对照,应用免疫组织化学方法检测组织标本中 VEGF 与 AQP4 的表达。结果 正常脑组织中未见 VEGF 表达;高级别胶质瘤与低级别胶质瘤之间、低级别胶质瘤与正常脑组织之间、脑转移瘤与正常脑组织及低级别胶质瘤之间 VEGF 阳性表达比较差异有统计学意义($P<0.05$),而脑转移瘤与高级别胶质瘤之间 VEGF 阳性表达比较差异无统计学意义($P>0.05$)。AQP4 在所有组织标本中均有表达,正常脑组织与高级别胶质瘤、脑转移瘤之间,低级别胶质瘤与高级别胶质瘤、脑转移瘤之间 AQP4 阳性表达比较差异有统计学意义($P<0.05$),而正常脑组织与低级别胶质瘤之间、脑转移瘤与高级别胶质瘤之间 AQP4 阳性表达比较差异无统计学意义($P>0.05$)。Spearman 相关分析显示两者在胶质瘤及脑转移瘤组织中表达呈正相关关系($r=0.516, P<0.05$)。结论 VEGF 与 AQP4 是参与形成肿瘤周围水肿的重要分子生物学因素,且两者可能存在某种协同作用。

【关键词】 神经胶质瘤; 脑转移瘤; 血管内皮生长因子; 水孔蛋白 4

【中图分类号】 R730.264 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)08-0813-04

Aquaporin 4 and vascular endothelial growth factor participate in the formation of peritumoral edema of gliomas and brain metastases TAN Qi-jia*, HE LI-sheng, LIN Zhi-xiong, HAN Fu*, HUANG Tao*, ZHANG Ze-sun*. *Department of Neurosurgery, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and aquaporin 4 (AQP4) in gliomas and brain metastases, and explore the role of VEGF and AQP4 in the histopathology and formation of peritumoral edema of primary and metastatic gliomas. **Methods** Immunohistochemical method was used to examine the protein expression of VEGF and AQP4 in 73 paraffin-embedded, pathologically confirmed glioma and 15 metastatic tumor specimens collected between 1999 and 2001. Eight normal brain tissue specimens were used as the control. **Results** VEGF protein was not detected in normal brain tissues. VEGF expression was detected in gliomas and the expression level increased obviously along with the histological grade of the tumor. Significant differences were found in VEGF expression between malignant and low-grade gliomas, between low-grade gliomas and normal brain tissues, and between intracranial metastatic tumors and normal brain tissues and low-grade gliomas ($P<0.05$), but not between intracranial metastatic tumors and malignant gliomas ($P>0.05$). AQP4 protein expression was found in all the collected samples, and its expression differed significantly between normal brain tissues and malignant gliomas or intracranial metastatic tumors, and also between low-grade gliomas and malignant gliomas or intracranial metastatic tumors ($P<0.05$), but not between normal brain tissues and low-grade gliomas or between intracranial

metastatic tumors and malignant gliomas ($P>0.05$). VEGF protein expression showed a significant positive correlation to AQP4 protein expression ($r=0.516, P<0.05$). **Conclusion** As important molecular biological factors, VEGF and AQP4 participate in the formation peritumoral brain edema of gliomas and exhibit a synergic effect in this process.

【Key words】 Gliomas; Brain metastatic tumors; Vascularendothelial growth factor; Aquaporin 4

胶质瘤与脑转移瘤是中枢神经系统中最常见的恶性肿瘤,其中大部分肿瘤常伴有严重的瘤周水肿,这不仅加重了肿瘤的占位效应,引起了持久的弥漫性颅内压增高,加重了已有的临床症状,也与肿瘤的侵袭密切相关,故有关胶质瘤和脑转移瘤周水肿的分子机制研究始终是神经肿瘤领域研究的热点。本研究检测血管内皮生长因子(vascularendothelial growth factor, VEGF) 和水孔蛋白 4 (aquaporin 4, AQP4) 在胶质瘤及脑转移瘤中的表达,重点分析 VEGF、AQP4 与胶质瘤及脑转移瘤的病理级别、瘤周水肿的关系,并进一步探讨二者的相互关系。

材料与方 法

一、标本来源

(1) 选择福建医科大学附属第一医院神经外科自 1999 年至 2001 年手术切除并经病理检查证实的胶质瘤石蜡组织标本 73 例(原发 71 例,复发 2 例),其中男 45 例,女 28 例;年龄 3~70 岁,平均 36.6 岁;参照 1999 年 WHO 神经系统肿瘤分类分级标准,低级别胶质瘤 42 例(I 级 7 例,II 级 35 例),高级别胶质瘤 31 例(III 级 11 例,IV 级 20 例,包括胶质母细胞瘤 5 例、髓母细胞瘤 3 例、间变型星形细胞瘤 6 例及 17 例高级别星形细胞瘤)。(2)选择同期手术切除并经病理检查证实的脑转移瘤石蜡组织标本 15 例,其中男 11 例,女 4 例;年龄 25~70 岁,平均 49.3 岁;原发病灶均在肺部,均未接受过放疗或化疗。(3)另取正常脑组织标本(为暴露胶质瘤或脑转移瘤需要切除的脑组织)8 例作为对照。所有组织标本一经取下立即用 10%福尔马林固定,常规石蜡包埋。

二、免疫组织化学染色

应用免疫组化 Elivision 法检测上述肿瘤组织标本中 VEGF 的表达,即用型鼠抗人 VEGF 多克隆抗体购自福州迈新生物技术开发公司(即用型);应用免疫组化 SP 法检测上述肿瘤组织标本中 AQP4 的表达,羊抗人 AQP4 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司(工作浓度为 1:200);SP 及 Elivision 免疫组化试剂盒均购自福州迈新生物技术开发公司。染色方法按照试剂盒说明书进行,以 PBS 代替一抗作为

空白对照。DAB 显色,苏木精复染,光镜下观察。

三、结果判断

实验结果判断由两名高年资病理科医师盲法阅片进行,每张切片选取 5 个 400 倍视野观察评分。VEGF 阳性染色定位于胶质细胞、微血管内皮细胞胞浆,AQP4 染色阳性细胞的判断标准是细胞膜周围为密集棕黄色颗粒。根据染色程度及染色细胞百分比进行评分:染色缺如者为 0 分,淡者为 1 分,适中者为 2 分,深者为 3 分;染色细胞占细胞计数的百分比<5%为 0 分,5%~25%为 1 分,25%~50%为 2 分,>50%为 3 分;每张切片染色程度得分与染色细胞百分比得分相乘结果为其最后得分,0~1 分者为阴性(-),2~3 分者为弱阳性(+),4~6 分者为阳性(++),6 分以上者为强阳性(+++)。

四、统计学分析

应用 SPSS11.5 统计软件进行处理,采用成组设计的多个独立样本比较的秩和检验(Kruskal-Wallis H 法),多个样本两两比较采用 Nemenyi 检验;AQP4、VEGF 之间的相关性用 Spearman 等级相关分析,以 $P\leq 0.05$ 示差异有统计学意义。

结 果

一、VEGF 的表达情况

VEGF 在免疫组化染色中阳性产物为棕黄色颗粒,大部分定位于肿瘤细胞胞浆及包膜,也有一部分着色于肿瘤组织内血管内皮细胞(图 1)。本组 73 例胶质瘤组织标本中,VEGF 免疫组化染色阳性 68 例,其中表达为“+”者 23 例,“++”者 26 例,“+++”者 19 例;15 例脑转移瘤组织标本中,VEGF 均呈阳性表达,其中表达为“+”者 2 例,“++”者 6 例,“+++”者 7 例;8 例正常脑组织标本中无 VEGF 阳性表达。具体情况见表 1。

经秩和检验分析,各组织标本间 VEGF 表达比较差异有统计学意义($P<0.05$),进一步两两比较发现,高级别胶质瘤与低级别胶质瘤之间、低级别胶质瘤与正常脑组织之间、脑转移瘤与正常脑组织及低级别胶质瘤之间 VEGF 阳性表达比较差异有统计学意义($P<0.05$),而脑转移瘤与高级别胶质瘤之间

VEGF 阳性表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

二、AQP4 的表达情况

AQP4 典型阳性表达见于广泛脑实质的胶质细胞、毛细血管内皮细胞、脉络丛上皮细胞和室管膜上皮细胞,血管周细胞及周围胶质细胞表现更为明显。胶质细胞的着色主要在细胞浆和细胞膜上,呈不同程度的黄色或棕黄色染色,且着色具有一定的极性现象。脑转移瘤与 III、IV 级胶质瘤中 AQP4 阳性细胞明显增多,染色强度以中等和强阳性居多,且极性分布现象消失 (图 2)。本组 73 例胶质瘤组织标本中, AQP4 均呈阳性表达,其中表达为“+”者 24 例,“++”者 28 例,“+++”者 21 例;15 例脑转移瘤组织标本中, AQP4 均呈阳性表达,其中表达为“+”者 2 例,“++”者 5 例,“+++”者 8 例;8 例正常脑组织标本中可见 AQP4 表达,但表达强度多为“+”(6 例)。具体情况见表 2。

经秩和检验分析,各组织标本间 AQP4 表达比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),进一步两两比较发现,正常脑组织与高级别胶质瘤、脑转移瘤之间,低

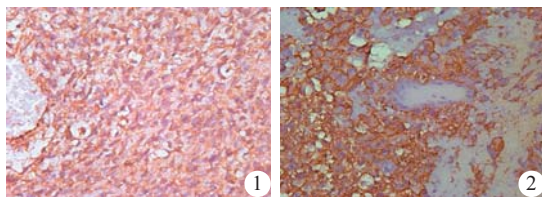


图 1 星形细胞型胶质瘤(WHO III 级)VEGF 呈强阳性表达 (Elivision 法, $\times 400$) 图 2 多形性胶质母细胞瘤(WHO IV 级)AQP4 呈强阳性表达 (SP 法, $\times 400$)

Fig.1 Strong VEGF positivity in astrocytic glioma tissue (Elivision, $\times 400$) Fig.2 Strong AQP4 positivity in glioblastoma multiforme tissue (SP, $\times 400$)

表 1 各组织标本中 VEGF 表达情况

Tab.1 Expression of VEGF in different samples

组别	例数	-	+	++	+++
正常脑组织	8	8	0	0	0
低级别胶质瘤	42	4	19	16	3
高级别胶质瘤	31	1	4	10	16
颅内转移瘤	15	0	2	9	7

$\chi^2=14.253, P=0.000$

表 2 各组织标本中 AQP4 表达情况

Tab.2 The expression of AQP4 in all samples

组别	例数	-	+	++	+++
正常脑组织	8	0	6	2	0
低级别胶质瘤	42	0	18	19	5
高级别胶质瘤	31	0	6	9	16
颅内转移瘤	15	0	2	5	8

$\chi^2=10.723, P=0.000$

级别胶质瘤与高级别胶质瘤、脑转移瘤之间 AQP4 阳性表达比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),正常脑组织与低级别胶质瘤之间、脑转移瘤与高级别胶质瘤之间 AQP4 阳性表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

三、AQP4 表达与 VEGF 表达的相关关系

本组胶质瘤及脑转移瘤组织标本中 AQP4 表达与 VEGF 表达的情况见表 3,经 Spersman 相关分析显示两者在胶质瘤及脑转移瘤组织标本中表达呈正相关关系 ($r=0.516, P < 0.05$)。

表 3 AQP4 与 VEGF 在胶质瘤及脑转移瘤组织标本中表达的相关关系

Tab.3 Relationship between AQP4 and VEGF expressions in gliomas and brain metastatic tumors

AQP4 表达	VEGF 表达				合计
	-	+	++	+++	
-	0	0	0	0	0
+	5	9	11	0	25
++	0	11	13	10	34
+++	0	4	8	17	29
合计	5	24	32	27	88

讨 论

胶质瘤与脑转移瘤是中枢神经系统中常见的恶性肿瘤,瘤周水肿是其常见的并发症,也是导致患者出现症状和死亡的主要原因之一。但迄今尚没有一种学说能从分子水平全面解释脑水肿的形成机制。根据形成机制的不同,目前认为脑水肿大体上可分为两种:血管源性脑水肿和细胞毒性脑水肿。在脑水肿的发生发展过程中,两种类型脑水肿可同时存在并相互演变。有大量研究表明,胶质细胞瘤周水肿与恶性程度呈正相关,胶质细胞瘤级别越高,在颅脑 CT 及 MRI 表现为指样水肿越明显,而绝大多数脑转移瘤在影像学上亦有明显的瘤周水肿。本研究在收集病例资料时亦证实这点。

在微血管渗出过程中,许多具有生物活性的细胞因子都发挥着作用,而近年来的研究显示 VEGF 表达的增多是最主要的因素。星形细胞瘤合成和分泌 VEGF^[1],且微血管上的 VEGF 受体亦随恶性度增高而增加。肿瘤细胞产生的 VEGF 通过旁分泌方式与其受体特异地结合,作用于血管内皮细胞,诱导内皮细胞分裂增殖,促进肿瘤新生血管生成,并增加血管通透性,使血脑屏障受损,血浆和一些大分子物质外渗导致细胞外液增多,在肿瘤周围形成广泛的瘤周水肿。Yao 等^[2]用免疫组化方法检测了 50 例星形

细胞瘤中 VEGF 及其受体表达,发现 VEGF 和胚胎肝激酶 1(fetal liver kinase 1, Flk-1)(VEGF 受体)的表达与胶质瘤的恶性级别、肿瘤血管分布以及瘤周水肿的关系密切,低级别星形细胞瘤和恶性胶质瘤中 VEGF 阳性表达者比阴性表达者的生存期明显缩短。Struger 等^[3]对 22 例脑转移瘤组织进行免疫组化研究,结果 21 例 VEGF 染色阳性,而术前检查均显示有瘤周水肿,提示 VEGF 增加血管通透性作用与临床常见的脑肿瘤周围水肿有关。

本研究中正常脑组织、低级别胶质瘤及高级别胶质瘤之间 VEGF 阳性表达比较差异有统计学意义($P < 0.05$),脑转移瘤与正常脑组织及低级别胶质瘤之间 VEGF 阳性表达比较差异有统计学意义($P < 0.05$),与高级别胶质瘤之间 VEGF 阳性表达比较差异无统计学意义($P > 0.05$),表明 VEGF 在胶质瘤中的表达与肿瘤的分级(恶性程度)密切相关,在脑转移瘤中亦呈高表达。故临床上可把 VEGF 作为胶质瘤与脑转移瘤诊断及预后判断的辅助指标。

有学者认为胶质瘤性脑水肿不一定是血浆等大分子物质通透性增加的结果,血脑屏障中水通道的表达变化是胶质瘤性脑水肿发生的重要分子机制。水孔蛋白(aquaporin, AQP)是最近十余年来发现的一种膜通道蛋白,由于其仅对水分子及一些小分子物质有通透性,是水分子跨膜运动的主要分子基础。AQPs 是具有高度选择性的水通道蛋白质家族,其所介导的水转运与简单扩散不同,水分子可以通过水通道向高渗方向移动。在脑组织中分布最广且目前研究最多的是 AQP4。Kobayashi 等^[4]用免疫组化法发现 AQP4 在脑内表达最丰富的部位是脉络丛、室管膜细胞及血管周围的胶质细胞。由此得知, AQP4 在脑组织的这种分布为脑脊液代谢、脑水肿形成及其它水代谢疾病提供理论依据。

Warth 等^[5]发现在高级别星形细胞瘤中会出现 AQP4 的重新分布,而在较低级别的星形细胞瘤没有出现,并认为这种分布是可能对血脑屏障破坏所致的血管性水肿的反应。在本研究中, AQP4 阳性细胞在正常脑组织见于胶质细胞、毛细血管内皮细胞、室管膜上皮细胞及脉络丛上皮细胞,血管周围的胶质细胞表达更为明显,其着色主要在细胞浆和细胞膜上,呈不同程度的黄色或棕黄色染色,表达强度多为“+”、“++”,且着色具有一定的极性现象。从这 AQP4 的分布情况发现,其多表达于脑内水代谢、脑脊液分泌吸收等结构上,这与相关文献吻合。

本研究同时发现, AQP4 的染色程度与肿瘤的恶性程度有关,胶质瘤恶性级别越高,细胞阳性比例

越高,染色越深。脑转移瘤与胶质瘤Ⅲ、Ⅳ级中阳性细胞明显增多,染色强度以中等和强阳性居多,且极性分布现象消失。经统计学分析,正常脑组织与高级别胶质瘤、脑转移瘤之间,低级别胶质瘤与高级别胶质瘤、脑转移瘤之间 AQP4 阳性表达比较差异有统计学意义($P < 0.05$),正常脑组织与低级别胶质瘤之间、脑转移瘤与高级别胶质瘤之间 AQP4 阳性表达比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。目前有报道表明, AQP4 随脑胶质瘤级别的升高,总的趋势是降低的,认为随着肿瘤级别升高,大量正常胶质细胞被肿瘤细胞取代,或是由于正常胶质细胞因大量吸收组织间隙水分,低渗透压破裂死亡,以致 AQP4 总体表达下降。而本实验结果表明, AQP4 随脑胶质瘤级别的升高,总的趋势是升高的,故认为可能为适应周围环境渗透压的改变及减轻瘤周水肿而反应性地高表达,以期将组织间隙的水重吸收;而在高级别胶质瘤及脑转移瘤中 AQP4 极性消失且重新分布的现象亦进一步说明这种可能。

大量研究表明,肿瘤周围脑水肿的形成可能有许多分子生物学因素参与,而不是由单一的因素起决定性作用。在本实验中, AQP4 与 VEGF 在胶质瘤及脑转移瘤组织标本中的表达呈正相关关系,两者在肿瘤周围水肿的形成过程中可能起协同作用。故认为 VEGF 可能通过促进肿瘤新生血管生成、促进瘤周水肿等作用参与胶质瘤的病理过程; AQP4 可能是在脑胶质瘤及脑转移瘤周围水肿中起细胞毒性脑水肿作用的责任因子。

参 考 文 献

- [1] Machein MR, Kullmer J, Fiebich BL, et al. Vascular endothelial growth factor expression, vascular volume, and capillary permeability in human brain tumors[J]. *Neurosurgery*, 1999, 44(4): 732-741.
- [2] Yao Y, Kubota T, Sato K, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and Flk-1 in astrocytic tumors[J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2001, 143(2): 159-166.
- [3] Struger J, Rothbart D, Harrington W, et al. Vascular permeability factor in brain metastases: correlation with vasogenic brain edema and tumor angiogenesis[J]. *J Neurosurg*, 1994, 81(4): 560-566.
- [4] Kobayashi H, Minami S, Itoh S, et al. Aquaporin subtypes in rat cerebral microvessels[J]. *Neurosci Lett*, 2001, 297(3): 163-166.
- [5] Warth A, Mittelbronn M, Wolburg H, et al. Redistribution of the water channel protein aquaporin-4 and the K⁺ channel protein Kir4.1 differs in low- and high-grade human brain tumors [J]. *Acta Neuropathol (Berl)*, 2005, 109(4): 418-426.

(收稿日期:2009-02-03)

(本文编辑:刘凯)