

乙酰肝素酶和 syndecan-1 表达与 脑胶质瘤恶性程度的关系

邵华明, 王穗暖, 李璐, 张一

[摘要]目的:检测脑胶质瘤组织中乙酰肝素酶和 syndecan-1 的表达水平,探讨它们和肿瘤级别的关系及作用机制。方法:采用荧光实时定量聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测乙酰肝素酶 mRNA 和 syndecan-1 mRNA 在 40 例脑胶质瘤组织和 10 例良性脑肿瘤组织中的表达水平,统计分析表达水平和肿瘤级别之间的关系。结果:在胶质瘤中,乙酰肝素酶的表达明显高于良性脑肿瘤($P < 0.01$),并且随着肿瘤的恶性程度增高,乙酰肝素酶的表达也明显增高($P < 0.01$),syndecan-1 的表达明显低于良性脑肿瘤($P < 0.01$),并且随着肿瘤的恶性程度增高,syndecan-1 的表达也明显降低($P < 0.01$)。乙酰肝素酶与 syndecan-1 在 I ~ II 级脑胶质瘤中表达均呈负相关关系($P < 0.01$),在 III ~ IV 级脑胶质瘤中表达均呈负相关关系($P < 0.01$),在各级胶质瘤中表达相关性的总体分析均显示负相关关系($P < 0.01$)。结论:乙酰肝素酶在脑胶质瘤组织中高表达,syndecan-1 在脑胶质瘤中低表达,而且表达水平和恶性程度密切相关,它们的检测可以作为脑胶质瘤恶性程度判断的参考,为探讨脑胶质瘤的生物学行为、预后及治疗提供新的思路。

[关键词] 脑肿瘤;人脑胶质瘤;乙酰肝素酶;syndecan-1;荧光实时定量聚合酶链式反应

[中国图书资料分类法分类号] R 739.41

[文献标识码] A

The relationship of the expression of heparanase and syndecan-1 in glioma tissues to the grades

SHAO Hua-ming, WANG Sui-nuan, LI Lu, ZHANG Yi

(Department of Neurosurgery, Changzhou First People's Hospital, Changzhou Jiangsu 213000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the relationship between the expression of heparanase and syndecan-1 gene mRNA and the pathological grade in human gliomas. **Methods:** The realtime polymerase chain reactions was employed to detect the expression level of heparanase and syndecan-1 gene mRNA in 40 cases of human gliomas and in 10 cases of benign brain tumors, which was used to evaluate tumor grade. **Results:** The expression level of heparanase mRNA in gliomas is higher than that in brain tumors ($P < 0.01$) and rising with tumor grade. The expression level of syndecan-1 mRNA in gliomas is significant lower compared to that of benign brain tumors ($P < 0.01$) and decreasing with tumor grade. The expression level of heparanase mRNA is reversely correlated to the expression level of syndecan-1 mRNA in human gliomas ($P < 0.01$). **Conclusions:** The heparanase and syndecan-1 gene expression maybe correlate to the oncogenesis and progression of human gliomas, which can provide an effective way to diagnose and treat the human gliomas.

[Key words] brain neoplasms; human gliomas; heparanase; syndecan-1; realtime polymerase chain reactions

脑胶质瘤是神经外科领域常见的危害人类健康的疾病,占颅内肿瘤的 35.2% ~ 61.0%。乙酰肝素酶最早由 Parish 等^[1]在 20 世纪 80 年代中期发现,是一个关键的胞外基质降解酶,它降解硫酸乙酰肝素和乙酰肝素蛋白聚糖上的聚糖侧链,在肿瘤浸润和转移中起重要作用。syndecan 是一组跨膜硫酸乙酰肝素糖蛋白(HSPGs),存在于大多数上皮细胞表面,并与钙黏素、整合素共同构成细胞间黏附分子复合体,参与细胞与胞外基质之间的黏附作用。已经证实^[2] syndecan-1 表达减少或缺如可促进肿瘤生

长、侵袭和转移。乙酰肝素酶和 syndecan-1 的表达与脑胶质瘤的关系报道较少。本研究采用荧光实时定量 PCR (RT-PCR) 技术检测乙酰肝素酶、syndecan-1 的 mRNA 在脑胶质瘤和良性脑肿瘤中的表达水平,探讨它们表达水平和肿瘤恶性程度之间的关系及可能的作用机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2002 ~ 2006 年江苏省常州市第一人民医院 40 例经病理证实的脑胶质瘤手术标本。肿瘤组织按 WHO 胶质瘤分级标准(1993 年)分为 I 级 8 例,II 级 12 例,III 级 13 例,IV 级 7 例。其中 I 级、II 级为高分化组 20 例,III 级、IV 级为低分化组 20 例。同时收集良性脑肿瘤标本 10 例,其中

[收稿日期] 2011-07-10

[作者单位] 江苏省常州市第一人民医院 神经外科 213000

[作者简介] 邵华明(1977-) 男 硕士 主治医师。

良性脑膜瘤 6 例 ,非侵袭性垂体瘤 4 例 ,均经病理证实。

1.2 方法 提取总 RNA。反转录合成 cDNA。RT-PCR 检测 ,以 3-磷酸甘油脱氢酶基因 (GAPDH 基因) 的表达作为内参。乙酰肝素酶和 syndecan-1 的引物及 TaqMan 探针序列由 Primer Premier 5.0 软件设计。乙酰肝素酶的上游引物: 5'-TCA CCA TTG ACG CCA ACC T-3', 下游引物: 5'-CTT TGC AGA ACC CAG GAG GAT-3', TaqMan 探针: 5'-FAM-CCA CGG ACC CGC GGT TCC T-3'; TAMRA ,syndecan-1 上游引物: 5'-CCT CGG GGG AGA ATA CGG-3', 下游引物: 5'-CCC ACC AGG CAC ACA GCA-3', TaqMan 探针: 5'-FAM-TGT AGT GGC CGT GGA GCC TGA CCG C-3'; TAMRA ,GAPDH 的上游引物: 5'-GGA AGG TGA AGG TCG GAG TC-3', 下游引物: 5'-CGT TCT CAG CCT TGA CGG T-3', TaqMan 探针: 5'-FAM-TTT GGT CGT TTT GGC GGG TG-3', TAMRA。

1.3 乙酰肝素酶和 syndecan-1 的基因表达计算方法 计算方法为简化的 $2^{-\Delta Ct}$ 法。在计算乙酰肝素酶 mRNA 的表达量时 ,以同一份标本的乙酰肝素酶 mRNA 的 Ct 值 (C 即 Cycle threshold ,Ct 值的含义即 PCR 扩增过程中 ,扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时所经过的扩增循环次数) 减内参 GAPDH 的 Ct 值 ,设其为 ΔCt 。各标本的 $2^{-\Delta Ct}$ 为 amount ,良性脑肿瘤的 amount 的平均数为 average。各标本的 amount/average 即为乙酰肝素酶 mRNA 的相对表达量 (相对于良性脑肿瘤 ,用百分数表示)。同样计算 syndecan-1 的基因表达水平。

1.4 统计学方法 采用方差分析和 q 检验及直线相关分析。

2 结果

2.1 乙酰肝素酶和 syndecan-1 在脑胶质瘤和良性脑肿瘤中表达的比较 脑胶质瘤中乙酰肝素酶的表达明显高于良性脑肿瘤 ($P < 0.01$) ,并且随着肿瘤的恶性程度增高 ,乙酰肝素酶的表达也明显增高 ($P < 0.01$)。脑胶质瘤中 syndecan-1 的表达明显低于良性脑肿瘤 ($P < 0.01$) ,并且随着肿瘤的恶性程度增高 ,syndecan-1 的表达也明显降低 ($P < 0.01$) (见表 1)。

2.2 脑胶质瘤中乙酰肝素酶与 syndecan-1 表达的相关性分析 乙酰肝素酶与 syndecan-1 在 40 例脑胶质瘤中的表达显示 ,两者在 I ~ II 级脑胶质瘤中表达均呈负相关关系 ($r = -0.897$, $P < 0.01$) ;两者在 III ~ IV 级脑胶质瘤中表达均呈负相关关系 ($r =$

-0.846 , $P < 0.01$) ;两者在各级脑胶质瘤中表达相关性的总体分析均显示负相关关系 ($r = -0.853$, $P < 0.01$) 。

表 1 脑胶质瘤和良性脑肿瘤中乙酰肝素酶和 syndecan-1 的表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	乙酰肝素酶表达量 (%)	Syndecan-1 表达量 (%)
良性脑肿瘤	10	100.00 \pm 21.63	100.00 \pm 25.55
I ~ II 级脑胶质瘤	20	155.16 \pm 27.99**	40.63 \pm 3.59**
III ~ IV 级脑胶质瘤	20	242.41 \pm 52.47** $\Delta\Delta$	21.61 \pm 5.99** $\Delta\Delta$
F	—	50.75	177.53
P	—	< 0.01	< 0.01
MS _{组内}	—	1519.255	117.531

q 检验: 与脑良性肿瘤比较 ** $P < 0.01$; 与 I ~ II 级脑胶质瘤比较 $\Delta\Delta P < 0.01$

3 讨论

自 1979 年 ,Klein 等首次报道人类胎盘乙酰肝素酶降解 HS ,Parish 及以色列 Vlodavsky 的实验室进行测序 ,再在 EST 的数据库中寻找能够编码该肽段的 DNA 序列 ,得到了编码该肽段的克隆。在许多正常和恶性肿瘤细胞、组织中发现此酶 ,如皮肤成纤维细胞、细胞滋养层、肝细胞、黑素瘤细胞和各种癌细胞系^[3]。但是乙酰肝素酶与脑胶质瘤关系的报道还不多 ,我们对 40 例脑胶质瘤和 10 例良性脑肿瘤用 RT-PCR 法进行乙酰肝素酶 mRNA 的检测 ,发现其在良性脑肿瘤、I ~ II 级、III ~ IV 级脑胶质瘤相对表达均显著高于依次显著升高 ,证实了乙酰肝素酶在脑胶质瘤中是高表达的 ,因此考虑乙酰肝素酶在脑胶质瘤的发生中起着某种重要作用。在肿瘤的侵袭转移酶中 ,乙酰肝素酶是一种关键的胞外基质降解酶 ,它与肿瘤的恶性程度有密切的关系。研究^[4]发现 ,人淋巴细胞瘤、纤维肉瘤、口腔癌、食管癌、肺癌、恶性黑素瘤、乳腺癌、胃癌和结肠癌、胰腺癌、前列腺癌和膀胱癌等恶性程度高或转移能力较强的癌组织或细胞系中乙酰肝素酶表达水平或表达率增高 ,而低或无转移能力的肿瘤细胞无或仅有少量表达。本研究显示 ,随着脑胶质瘤的恶性程度升高 ,乙酰肝素酶的表达水平明显升高。说明乙酰肝素酶在脑胶质瘤的侵袭性生长中可能起着重要作用 ,与脑胶质瘤的恶性程度密切相关。

syndecan-1 属于黏附分子整合素跨膜黏结蛋白聚糖家族成员 ,现在的研究^[5]发现 ,syndecan-1 分子的表达在控制恶性肿瘤细胞生长和转移等过程中具有重要作用 ,而且可作为判断肿瘤预后的指标 ,指导临床诊断与治疗。syndecan-1 与脑胶质瘤关系的报

道亦不多见。本研究发现, syndecan-1 在脑胶质瘤的表达中较良性脑肿瘤明显下降, 且随着脑胶质瘤的恶性程度升高, syndecan-1 的表达水平明显降低。这说明 syndecan-1 的表达水平与脑胶质瘤的病理分级及预后可能存在负相关。

本研究结果表明, 在脑胶质瘤中乙酰肝素酶与 syndecan-1 的表达之间呈负相关关系, 即随着胶质瘤恶性程度升高, 乙酰肝素酶表达增加, syndecan-1 表达降低。乙酰肝素酶在恶性肿瘤的发生、发展中通过特异性地切断 HSPGs 上的聚糖侧链, 降解后引起的生物学效应, 以及乙酰肝素酶促进肿瘤血管的形成; 而 syndecan-1 分子的低表达, 通过控制碱性纤维母细胞生长因子的生物学效应, 以及正常细胞的失黏附, 促进了恶性肿瘤的侵袭与转移。除此之外, 乙酰肝素酶的表达增加与 syndecan-1 降低之间存在相互作用, 分析可能的原因是肿瘤细胞表面 syndecan-1 表达减少或缺失, 可能与肿瘤状态下肝素酶活性增高, 降解 syndecan-1 分子胞外 HS 链有关, 并进而影响预后。研究显示, 乙酰肝素酶能裂解位于转移性黑素瘤细胞表面上的 HS 侧链, 且还能特定降解纯化的 syndecan-1 的 HS 侧链; 并通过体外化学侵袭测定证实, 外源性的 syndecan-1 存在可抑制乙酰肝素酶调节黑素瘤细胞的侵袭性行为, 提示黑素瘤细胞表面 syndecan-1 表达及由乙酰肝素酶引起的降解作用是控制肿瘤细胞侵袭和转移的重要决定因素。

总之, 乙酰肝素酶和 syndecan-1 与人脑胶质瘤

的发生、发展及恶性程度密切相关, 乙酰肝素酶 mRNA 和 syndecan-1 mRNA 在人脑胶质瘤的表达水平呈负相关, 两者可能存在协同作用, 共同对人脑胶质瘤的发生、发展起作用。两者的联合检测可以作为判断人脑胶质瘤恶性程度的参考。目前, 脑胶质瘤的治疗还是以手术为主的综合治疗, 有研究^[6]表明手术后 3 周开始放化疗, 有利于提高疗效, 但是随着转基因技术、基因沉默技术等的发展, 我们相信以乙酰肝素酶和 syndecan-1 为靶点的手段可能成为治疗人脑胶质瘤的有效方法之一。

[参 考 文 献]

- [1] Parish CR, Coombe DR, Jakobsen KB *et al.* Evidence that sulphated polysaccharides inhibit tumour metastasis by blocking tumour-cell-derived heparanases [J]. *Cancer*, 1987, 40(4): 511-518.
- [2] Choi DS, Kim JH, Ryu HS *et al.* Syndecan-1, a key regulator of cell viability in endometrial cancer [J]. *Cancer*, 2007, 121(4): 741-750.
- [3] Arvatz G, Shafat I, Levy-Adam F *et al.* The heparanase system and tumor metastasis: is heparanase the seed and soil? [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2011, 30(2): 253-268.
- [4] Zhang YF, Tang XD, Gao JH *et al.* Heparanase: a universal immunotherapeutic target in human cancers [J]. *Drug Discov Today*, 2011, 16(9/10): 412-417.
- [5] Manon-Jensen T, Itoh Y, Couchman JR. Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding [J]. *FEBS*, 2010, 277(19): 3876-3889.
- [6] 段宝奇, 高觉民, 李海林, 等. 恶性胶质瘤综合治疗的疗效观察 [J]. *临床神经外科杂志*, 2009, 6(3): 142-144.

(本文编辑 姚仁斌)

(上接第 1342 页)

MMP-9 及其他炎症因子作用于动脉粥样硬化斑块, 使斑块变得不稳定, 最终导致斑块破裂。

[参 考 文 献]

- [1] Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M *et al.* Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin [J]. *Science*, 2005, 307(5708): 426-430.
- [2] Chang YC, Chang TJ, Lee WJ *et al.* The relationship of visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor/nicotinamide phosphoribosyltransferase in adipose tissue with inflammation, insulin resistance, and plasma lipids [J]. *Metabolism*, 2010, 59(1): 93-99.
- [3] Chen MP, Chung FM, Chang DM *et al.* Elevated plasma level of visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(1): 295-299.
- [4] Kim SR, Bae YH, Bae SK *et al.* Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF- κ B activation in endothelial cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783(5): 886-895.

- [5] Liu SW, Qiao SB, Yuan JS *et al.* Visfatin stimulates production of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-6 in human vein umbilical endothelial cells [J]. *Horm Metab Res*, 2009, 41(4): 281-286.
- [6] van der Veer E, Nong Z, O'Neil C *et al.* Pre-B-cell colony-enhancing factor regulates NAD⁺-dependent protein deacetylase activity and promotes vascular smooth muscle cell maturation [J]. *Circ Res*, 2005, 97(1): 25-34.
- [7] Dahl TB, Yndestad A, Skjelland M *et al.* Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization [J]. *Circulation*, 2007, 115(8): 972-980.
- [8] Adya R, Tan BK, Punn A *et al.* Visfatin induces human endothelial VEGF and MMP-2/9 production via MAPK and PI3K/Akt signalling pathways: novel insights into visfatin-induced angiogenesis [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 78(2): 356-365.
- [9] 李骊华, 雷寒. 基质金属蛋白酶-9 与动脉粥样硬化及斑块稳定性 [J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(3): 771-773.

(本文编辑 刘畅)