

. 实验研究 .

脑胶质瘤病人脑脊液 Midkine 表达的临床意义

罗似亮 夏之柏

【摘要】目的 探讨人脑胶质瘤脑脊液中中期因子(MK)水平与胶质瘤病理学的关系。**方法** 2015年5~10月手术治疗并经病理证实的胶质瘤25例,其中高级别胶质瘤(WHO III~IV级)10例,低级别胶质瘤(WHO I~II级)15例。同期手术切除颅内良性肿瘤23例,非肿瘤性颅脑手术18例。酶联免疫吸附试验法检测所有病人术中以及脑胶质瘤术后腰椎穿刺术留取的脑脊液MK水平。免疫组化染色法分析胶质瘤组织MK表达水平。**结果** 胶质瘤组脑脊液MK浓度明显高于良性肿瘤组($P<0.001$)和非肿瘤组($P<0.001$),高级别胶质瘤脑脊液MK浓度显著高于低级别胶质瘤($P<0.05$);胶质瘤组织MK阳性程度与脑脊液MK的浓度呈显著正相关($r=0.75$; $P<0.001$)。根据受试者工作特征曲线,脑脊液MK浓度 >2.55 ng/ml区分胶质瘤和非肿瘤的敏感性和特异性分别为72.0%和83.3%。脑脊液MK浓度 >2.11 ng/ml区分胶质瘤和良性肿瘤的敏感性和特异性为76.0%和82.6%。术后7~14 d,脑胶质瘤病人脑脊液MK水平[(2.22±1.23) ng/ml]显著下降($P<0.05$)。**结论** 胶质瘤级别越高,肿瘤组织和脑脊液MK表达水平越高;切除肿瘤后脑脊液MK随之下降;脑脊液MK对术前诊断胶质瘤的具有较高的敏感性和特异性,同时对手术效果的评价也有重要意义。

【关键词】 脑胶质瘤;手术;脑脊液;中期因子

【文章编号】 1009-153X(2017)06-0416-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Clinical meanings of midkine expression in cerebrospinal fluid of patients with gliomas

LUO Si-liang, XIA Zhi-bo. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, Sun Ya t-sen University, Guangzhou 510080, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression of midkine (MK) in cerebrospinal fluid (CSF) and its relationship with clinicopathological features in patients with gliomas. **Methods** The level of MK in CSF were determined by enzyme linked immunosorbent assay in 25 patients with gliomas including WHO grades I ~ II gliomas (15 cases) and WHO grades III ~IV gliomas (10 cases), 23 patients with benign tumors and 18 patients with other lesions including communicating hydrocephalus (10 cases) and trigeminal neuralgia (8 cases). The MK expression were detected by immunohistochemical technique in 25 glioma patients after operative. **Results** The level of MK expression in CSF with gliomas was significantly higher in the patients with gliomas than those in the patients with benign tumors and non-neoplasms ($P<0.001$). The level [(7.02±4.62) ng/ml] of MK in CSF was significantly higher in the patients with WHO grades III ~IV gliomas than that [(3.20±1.84) ng/ml] in the patients with WHO grades I ~ II gliomas ($P<0.05$). The level of MK expression in CSF was positively related with that in the tumorous tissues in the patients with gliomas ($r=0.751$, $P<0.001$). The level of MK expression in CSF significantly declined from 7 to 14 days after the resection of tumors compared to that before the operation in the patients with gliomas ($P<0.05$). **Conclusion** It is suggested that the level of MK in CSF may be helpful to the diagnosis of human gliomas.

【Key words】 Gliomas; Midkine; Cerebrospinal fluid; Meanings

胶质瘤占原发性中枢神经系统恶性肿瘤的80%,预后不佳^[1,2]。中期因子(midkine, MK)是一种分泌性蛋白质,既可在实体肿瘤组织中表达,也可分泌到各种体液中^[3]。2000年, Ikematsu 等^[4]发现肺癌、

肝癌等恶性肿瘤病人血清MK浓度显著增高。此后,越来越多的研究表明MK有望成为肿瘤标志物^[5]。多项研究也证实, MK在人脑胶质瘤组织和胶质瘤细胞系中有表达,且表达水平与肿瘤的恶性程度和预后相关^[6,7]。本研究探讨脑胶质瘤病人脑脊液MK的表达及其与肿瘤临床病理学的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 所有肿瘤标本均取自中山大学附属第一医院神经外科2015年5~10月手术治疗并经病理证实的25例胶质瘤,其中男15例,女10例;年龄1~75

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2017.06.017

基金项目:国家自然科学基金(81072082);和广东省科技计划项目(2013B021800245)

作者单位:510080 广州,中山大学附属第一医院神经外科(罗似亮、夏之柏)

通讯作者:夏之柏, E-mail: xiazb12321@126.com

岁,平均(33.1±18.61)岁。另取良性肿瘤手术23例,其中男7例,女16例;年龄29~74岁,平均(51.1±12.56)岁;听神经鞘瘤13例,脑膜瘤10例。非肿瘤手术18例,其中男8例,女10例;年龄6~79岁,平均(49.7±23.25)岁;交通性脑积水10例,原发性三叉神经痛8例。所有病例均为初次手术,胶质瘤按2007年WHO分类标准^[8]:低级别(I~II级)15例,包括毛细胞型星形细胞瘤3例、脉络丛乳头状瘤2例、纤维型星形细胞瘤1例、肥胖型星形细胞瘤2例、少突胶质细胞瘤6例、混合型少突-星型胶质细胞瘤1例;高级别10例,包括III级(间变性星形细胞瘤)3例,IV级7例(包括胶质瘤母细胞瘤5例、髓母细胞瘤2例)。

1.2 检测方法

1.2.1 脑脊液MK检测 脑肿瘤和原发性三叉神经痛在术中取软细针穿刺未破裂蛛网膜下腔获取;交通性脑积水在脑室-腹腔分流术时从分流管接取;术后行腰椎穿刺术,排除感染和血性脑脊液后留取。所有样本均分装3~4管,立即存储于-80℃冰箱备用,避免反复解冻。采用美国RayBiotech公司提供的酶联免疫吸附法试剂盒测定脑脊液MK水平,按试剂盒提供的说明书进行操作,单位为ng/ml。所有样本均为盲测且重复一次,最终浓度取两次的平均值。

1.2.2 胶质瘤组织MK检测 免疫组织化学法检测胶质瘤组织MK表达。组织标本常规石蜡包埋,制成5 μm厚切片。兔单克隆抗-MK抗体(1:100,英国Abcam公司)。根据SABC免疫组化染色试剂盒说明书(武汉博士德公司)操作。

免疫组化结果判定方法:每例选取3张切片,每张切片随机观察10个高倍镜视野(×400),边缘、刀痕、褶皱或挤压区域不作为判断依据,MK阳性反应物分布于细胞质,光镜下观察可见淡黄色至褐黄色颗粒。根据阳性百分比及着色强度进行评分,具体方法同参考文献[9]。

1.3 统计学方法 采用SPSS 20.0软件分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验;采用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)分析脑脊液MK判断标准,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑脊液MK水平与胶质瘤级别的关系 胶质瘤组脑脊液MK浓度[(4.61±3.81)ng/ml]明显高于良性肿瘤组[(1.43±1.00)ng/ml; $P < 0.001$]和非肿瘤组[(1.53±1.32)ng/ml; $P < 0.001$]。高级别胶质瘤组脑脊液MK水平[(6.62±5.0)ng/ml]显著高于低级别胶质瘤组

[(3.27±2.0)ng/ml; $P < 0.05$]。

2.2 MK表达水平与胶质瘤级别的关系 免疫组化染色显示MK在肿瘤组织中阳性程度不一(图1)。25例胶质瘤中,MK呈强阳性表达11例,阳性10例,阴性4例;总阳性率为84.0%(21/25)。高级别胶质瘤组MK呈强阳性表达7例,阳性2例,阴性1例;低级别胶质瘤组呈强阳性表达4例,阳性8例,阴性3例;高级别胶质瘤组MK强阳性表达率(70.0%, 7/10)明显高于低级别胶质瘤组(26.7%, 4/15; $P < 0.05$)。

2.3 胶质瘤MK阳性程度与脑脊液MK浓度相关性 胶质瘤组织MK免疫组化强阳性组脑脊液MK浓度[(7.20±4.31)ng/ml]显著高于阳性组[(3.21±1.34)ng/ml; $P < 0.05$]和阴性组[(0.98±0.31)ng/ml; $P < 0.05$];胶质瘤组织MK阳性程度与脑脊液MK浓度呈显著正相关($r = 0.75$; $P < 0.001$)。

2.4 脑脊液MK浓度判断肿瘤性质的效能及术后浓度变化 脑脊液MK浓度>2.55 ng/ml区分胶质瘤和非肿瘤的敏感性和特异性分别为72.0%和83.3%(图2A)。脑脊液MK浓度>2.11 ng/ml区分胶质瘤和良性肿瘤的敏感性和特异性为76.0%和82.6%(图2B)。术后7~14 d,胶质瘤组脑脊液MK浓度[(2.22±1.23)ng/ml]较术前明显下降($P < 0.05$)。

3 讨论

MK是一个肝素结合生长因子,在妊娠中期胚胎形成过程中高表达,随着年龄增长逐渐下降,至成年时几乎不表达^[10]。目前研究发现,一些恶性肿瘤高表达MK^[6,11]。本研究结果显示,胶质瘤组脑脊液MK明显高于非肿瘤组和良性肿瘤组;且高级别胶质瘤组脑脊液MK显著高于低级别胶质瘤。免疫组化染色表明人脑胶质瘤异常表达MK,并随肿瘤级别增高表达增强。胶质瘤组织MK阳性程度与脑脊液MK浓度呈显著正相关。说明MK在脑胶质瘤病人脑脊液高表达且与胶质瘤级别呈正相关^[12]。

目前,越来越多的研究表明,MK作为血清学生物标志物在某些肿瘤的早期诊断、预后评价和复发监测方面具有重要意义。Zhu等^[13]发现MK在肝癌早期和小肝癌的诊断方面优于甲胎蛋白。Meng等^[14]报道血清MK在分化型甲状腺癌的筛查上甚至优于甲状腺球蛋白。本研究显示脑脊液MK浓度>2.55 ng/ml区分胶质瘤和非肿瘤的敏感性和特异性分别为72.0%和83.3%;脑脊液MK浓度>2.11 ng/ml区分胶质瘤和良性肿瘤的敏感性和特异性为76.0%和82.6%。这些结果表明脑脊液MK可能是一个潜在

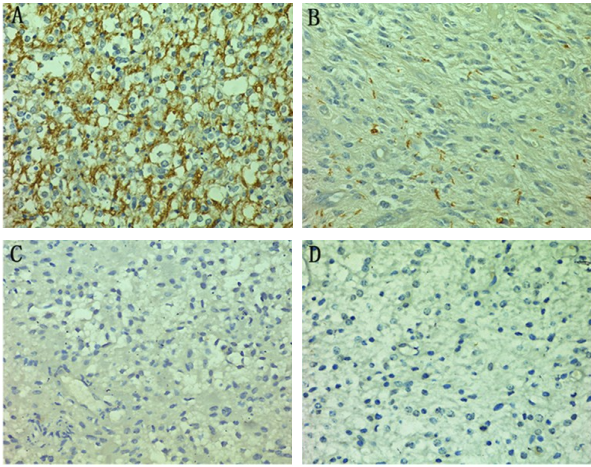


图1 不同组织中中期因子表达的免疫组化染色(×400)
A~C.分别为胶质瘤中期因子呈强阳性、阳性和阴性表达;
D. 非肿瘤组织中期因子阴性表达

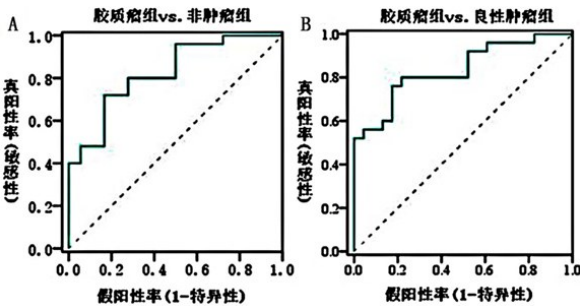


图2 脑脊液中中期因子判断病变性质的受试者工作特征曲线
A. 脑脊液中中期因子判断胶质瘤和非肿瘤组织的受试者工作特征曲线;
B. 脑脊液中中期因子判断胶质瘤和良性肿瘤的受试者工作特征曲线

的术前诊断胶质瘤学生物指标。

当然,对治疗的应答也是评价肿瘤标志物的一个重要指标。本文胶质瘤术后7~4 d脑脊液MK浓度较术前明显下降($P < 0.05$)。Zhu等^[13]发现肝细胞癌术后4周血清MK浓度较术前显著降低。本文结果表明胶质瘤脑脊液MK浓度在术后2周内即可出现有意义的减低。Shimada等^[3]研究显示血清MK是食管鳞状细胞癌的预后指标。当肿瘤复发时,血清MK浓度随之升高,例如甲状腺癌^[14]和肝细胞癌^[13]。

总之,脑脊液MK水平高低可反映胶质瘤级别;既可用于术前诊断胶质瘤,又可用于评估手术效果。

【参考文献】

[1] Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, *et al.* Epidemiology and molecular pathology of glioma [J]. *Nat Clin Pract*

Neurol, 2006, 2(9): 494–503.
[2] Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, *et al.* CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006–2010 [J]. *Neuro Oncol*, 2013, 15(suppl 2): 1–56.
[3] Shimada H, Nabeya Y, Tagawa M, *et al.* Preoperative serum midkine concentration is a prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2003, 94(7): 628–632.
[4] Ikematsu S, Yano A, Aridome K, *et al.* Serum midkine levels are increased in patients with various types of carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2000, 83(6): 701–706.
[5] Tong Y, Mentlein R, Buhl R, *et al.* Overexpression of midkine contributes to anti-apoptotic effects in human meningiomas [J]. *J Neurochem*, 2007, 100(4): 1097–1107.
[6] Cheng YP, Lin C, Lin PY, *et al.* Midkine expression in high grade gliomas: correlation of this novel marker with proliferation and survival in human gliomas [J]. *Surg Neurol Int*, 2014, 5: 78.
[7] Ma J, Lang B, Wang X, *et al.* Co-expression of midkine and pleiotrophin predicts poor survival in human glioma [J]. *J Clin Neurosci*, 2014, 21(11): 1885–1890.
[8] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system [J]. *Acta Neuropathologica*, 2007, 114(2): 97–109.
[9] Mochizuki S, Okada Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression [J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(5): 621–628.
[10] Muramatsu H, Shirahama H, Yonezawa S, *et al.* Midkine, a retinoic acid-inducible growth/differentiation factor: immunohistochemical evidence for the function and distribution [J]. *Dev Biol*, 1993, 159(2): 392–402.
[11] Jono H, Ando Y. Midkine: a novel prognostic biomarker for cancer [J]. *Cancers*, 2010, 2(2): 624–641.
[12] Cheng YP, Lin C, Lin PY, *et al.* Midkine expression in high grade gliomas: correlation of this novel marker with proliferation and survival in human gliomas [J]. *Surg Neurol Int*, 2014, 5: 78.
[13] Zhu WW, Guo JJ, Guo L, *et al.* Evaluation of Midkine as a Diagnostic Serum Biomarker in Hepatocellular Carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(14): 3944–3954.
[14] Meng ZW, Tan J, Zhang GZ, *et al.* Evaluation of serum midkine as a biomarker in differentiated thyroid cancer [J]. *Life Sci*, 2015, 130: 18–24.

(2017-03-07收稿,2017-04-30修回)