·论 著·

人脑胶质瘤EPO与CD105表达及意义

徐 舒 岳志健 周晓平 王建军 王来兴 张煜辉 刘建民

【摘要】**目的** 探讨人脑胶质瘤组织促红细胞生成素(EPO)和CD105的表达变化及其意义。**方法** 收集2002~2008年人脑胶质瘤标本152例,其中WHO分级Ⅰ级4例,Ⅱ级32例,Ⅲ级68例,Ⅳ级48例;取同期颅脑损伤内减压术切除正常脑组织20例为对照,采用免疫组化染色分析EPO及CD105表达。收集2005~2008年人脑胶质瘤标本胶质瘤17例(WHO Ⅱ级6例,Ⅲ~Ⅳ级11例),正常对照5例,采用实时荧光定量PCR检测EPO mRNA表达变化。术后随访截止2010年4月23日,应用Kaplan-Meier生存曲线分析高级别(Ⅲ~Ⅳ级)胶质瘤生存曲线。**结果** 胶质瘤EPO表达阳性率(60.5%,92/152)明显高于正常脑组织(10%,2/20;$P<0.001$),胶质瘤EPO表达强度与病理分级呈正相关($r_s=0.368$,$P<0.001$)。EPO表达阳性组CD105阳性率明显高于阴性组($P<0.05$),EPO高表达组明显高于低表达组($P<0.05$)。Ⅱ级胶质瘤组EPO mRNA表达水平明显高于正常组与Ⅲ~Ⅳ级胶质瘤组($P<0.05$)。对于高级别(WHO Ⅲ~Ⅳ级)胶质瘤,EPO低表达组中位生存时间为12个月,高表达组为36个月;EPO低表达组累积生存率明显低于高表达组($P<0.05$)。**结论** 人脑胶质瘤EPO蛋白的表达与病理级别及新生血管正相关;WHO Ⅱ级胶质瘤EPO mRNA在转录水平已上调;WHO Ⅲ~Ⅳ级组胶质瘤EPO表达高者生存期长。

【关键词】胶质瘤;促红细胞生成素;CD105

【文章编号】1009-153X(2018)05-0311-04 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41; Q 786

Expressions of erythropoietin and CD105 in glioma tissues in patients with gliomas and their meanings

XU Shu[1], YUE Zhi-jian[2], ZHOU Xiao-ping[2], WANG Jian-jun[3], WANG Lai-xing[2], ZHANG Yu-hui[2], LIU Jian-min[2]. 1. Department of Neurosurgery, Affiliated Changzhou Chinese Traditional Medicine Hospital, Nanjing University of Chinese Traditional Medicine, Changzhou, 21300, China; 2. Department of Neurosurgery, Changhai Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Department of Pathology, Changhai Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

【**Abstract**】**Objective** To explore the expressions of erythropoietin (EPO) and CD105 in human glioma tissues and their meanings. **Methods** The expressions of EPO and CD105 in 152 cases of gliomas tissues including 7 cases of WHO grade Ⅰ, 29 cases of WHO grade Ⅱ, 68 cases of WHO grade Ⅲ and 48 cases of WHO grade Ⅳ and 20 cases of normal brain tissue were determined by immunohistochemiscal technique. The expression of EPO mRNA in 17 cases of gliomas including 6 cases of WHO grade Ⅱ and 11 cases of WHO grade Ⅲ~Ⅳ and 5 cases of normal brain tissue were detected by real time PCR. The relationship of EPO expression with survival rate was analyzed by survival curve. **Results** The level of EPO expression in the glioma tissues were significantly higher than that in the normal brain tissues ($P<0.01$), and was positively correlated with the WHO grade of the tumor ($r_s=0.368$, $P<0.01$). The CD105 expression level was significantly higher in the positive EPO expression group than that in the negative EPO expression group ($P<0.05$). The level of EPO mRNA expression was significantly higher in the WHO grade Ⅱ glioma tissues than those of normal brain tissues ($P<0.01$) and WHO grade Ⅲ~Ⅳ gliomas tissues ($P<0.05$). The survival curve analysis showed that the survival time was significantly longer in the patients with high WHO grade gliomas in which EPO was strongly expressed than that in the patients with high WHO grade gliomas in which EPO was weakly expressed ($P<0.05$). **Conclusions** Our results suggest that the level of EPO expression in the tumorous tissue is positively related to WHO grade and neovascularization of glioma. The level of EPO mRNA expression in WHO grade Ⅱ glioma has been upregulated in DNA transcription. The patients with WHO Ⅲ~Ⅳ gliomas in whom EPO protein is strongly expressed survive longer compared to the patients with WHO Ⅲ~Ⅳ gliomas in whom EPO is weakly expressed.

【**Key words**】Gliomas; Erythropoietin; CD105; Expression; Malignant degree; Survival time; Relationship

促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)是促进粒红细胞生存和分化的细胞因子,同时具有神经保护作用,以及促进血管发生、细胞增殖和细胞迁移等作用[1~11]。内皮糖蛋白CD105仅在处于增殖状态的血管内皮高度表达,被认为是新生血管的标记物[12]。本文探讨人脑胶质瘤EPO及CD105表达及意义。

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2018.05.003

基金项目:上海市重点科技攻关计划(08411953600)

作者单位:213000 江苏常州,南京中医药大学附属常州中医院神经外科(徐 舒);200433 上海,第二军医大学长海医院神经外科(岳志健、周晓平、王来兴、张煜辉、刘建民),病理科(王建军)

通讯作者:岳志健,E-mail:yuezj638@163.com

1 资料和方法

1.1 标本来源 收集2002~2008年人脑胶质瘤标本152例，按2007年WHO中枢神经系统肿瘤分类及分级标准：Ⅰ级4例（毛细胞型星形细胞瘤），Ⅱ级32例（纤维型星形细胞瘤21例，肥胖型星形细胞瘤2例，少突−星形细胞瘤7例，少突胶质细胞瘤2例），Ⅲ级68例（间变性星形细胞瘤57例，间变性少突−星形胶质细胞瘤4例，间变性少突胶质细胞瘤4例，间变性室管膜瘤2例，间变性脉络丛乳头状瘤1例），Ⅳ级48例（胶质母细胞瘤47例，髓母细胞瘤1例）。取同期颅脑损伤内减压术切除正常脑组织20例为对照。

1.2 免疫组织化学染色 兔抗人多克隆EPO抗体sc−7956购自美国SANTA CRUZ公司，工作浓度1:100；小鼠抗人CD105抗体M−0180购自DaKo公司，工作浓度1:30；二氨基联苯胺购自美国Sigma公司；EnVision试剂购自DaKo公司。

观察HE切片，挑选肿瘤细胞密集的部位，蜡块打孔，组织芯直径2.0 mm。常规脱腊，0.3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶，微波抗原修复10 min，二氨基联苯胺显色，苏木素复染，以肾脏组织作为EPO阳性对照，以扁桃体组织作为CD105阳性对照，磷酸盐缓冲液作阴性对照。

EPO结果判定：显微镜下观察在良好的组织结构及清晰的背景上细胞内出现黄色、棕褐色颗粒为阳性（图1）。阳性细胞计数：<25%为1分，25%~50%为2分，50%~75%为3分，>75%为4分。染色强度：无染色为0分，淡黄色为1分，黄或深黄色为2分，褐或棕褐色为3分。采用二级计分法，计算两者计分的乘积：0分为阴性（−），1~3分为弱阳性（+），4~7分为中度阳性（++），>7分为强阳性（+++）；+为低表达，++、+++为高表达。

CD105结果判定：位于瘤组织内计数CD105阳性细胞（胞膜或胞浆染成棕黄色，图2），在低倍镜下选择微血管最丰富区，200倍视野下计数。

1.3 实时荧光定量PCR 收集2005~2008年人脑胶质瘤标本35例及内减压术脑白质8例。使用严格的三复孔法测定，数值相差稍大则弃此例标本，数值非常接近方取其平均值，尽可能排除系统及操作误差，最后保留数据：胶质瘤17例（WHO Ⅱ级6例，Ⅲ~Ⅳ级11例），正常对照5例。Trizol一步法从冷冻组织中提取总RNA，行琼脂糖凝胶电泳检测，用紫外分光光度仪检测RNA纯度。mRNA逆转录成cDNA并进行检测，引物序列由上海赛百盛公司合成，以β−actin作为内参照。PCR引物序列：β−actin正义链5′−AGG GGC CGG ACT CGT CAT ACT−3′，β−actin反义链5′−GGC GGC ACC ACC ATG TAC CCT−3′；扩增片段长度为202 bp。EPO正义链5′−GCC AGA GGA ACT GTC CAG AG−3′，EPO反义链5′−ATG GTA GGT GCG AAA ACA GG−3′；扩增片断长度为207 bp。参照文献[13]描述的方法计算样本△△Ct值（样本同内参的对数比值）。

1.4 统计学处理 采用SPSS 18.0软件分析；计数资料采用χ^2检验；等级资料采用秩和检验；采用Spearman秩相关分析相关性；采用Kaplan−Meier法分析生存曲线；检验水准α=0.05。

2 结　果

2.1 人脑胶质瘤EPO与CD105表达变化 胶质瘤EPO表达阳性率（60.5%，92/152）明显高于正常脑组织（10%，2/20；P<0.001）。胶质瘤EPO表达强度与病理分级呈正相关（r_s=0.368，P<0.0001；表1）。

EPO表达阳性组CD105阳性率明显高于阴性组（P<0.05），EPO高表达组CD105阳性率明显高于低表达组（P<0.05）。见表2。

2.2 人脑胶质瘤EPO mRNA表达变化 Ⅱ级胶质瘤组EPO mRNA表达水平明显高于正常组与Ⅲ~Ⅳ级组（P<0.05）。见表3。

2.3 胶质瘤病人生存分析 术后随访截止2010年4月23日，完整随访资料32例，其中5例删失。对于高级别（WHO Ⅲ~Ⅳ级）胶质瘤，EPO低表达组中位生存时间为12个月，高表达组为36个月；EPO低表达组累积生存率明显低于高表达组（P<0.05；图3）。

3 讨　论

目前认为，EPO的表达受低氧诱导因子（hypoxia inducible factor，HIF）影响。HIF是血管发生和侵袭的激活因子，通过血管内皮生长因子、纤维蛋白酶原激活因子、转化生长因子α、转化生长因子β、内皮素及EPO等靶基因的上调而实现[14]。HIF的激活诱导加强EPO的表达，可能是缺氧通过HIF促进血管新生的一个途径。研究发现胶质瘤EPO表达与病理级别有一定关系[12,15]。本文结果发现EPO表达于脑胶质瘤细胞及血管内皮细胞，胶质瘤的EPO阳性表达率（60.5%）明显高于正常脑组织（10%；P<0.05）。胶质瘤EPO表达高于正常脑组织，可能具有高度增殖活性的肿瘤细胞过度增殖而消耗氧增多，造成低氧环境，通过HIF等途径刺激肿瘤细胞分泌

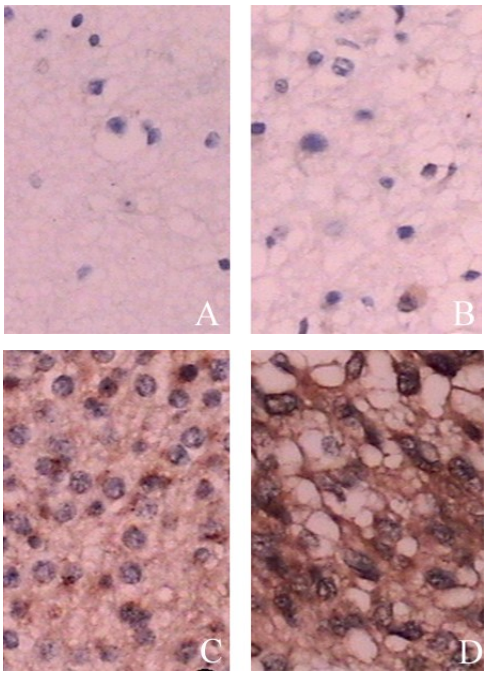

图1 胶质瘤EPO的表达(EnVision,×200)

A. 毛细胞型星形细胞瘤(WHO Ⅰ级),EPO(–);B. 星形细胞瘤(WHO Ⅱ级),EPO(+);C. 间变性星形细胞瘤(WHO Ⅲ级),EPO(++);D. 胶质母细胞瘤(WHO Ⅳ级),EPO(+++);EPO. 促红细胞生成素

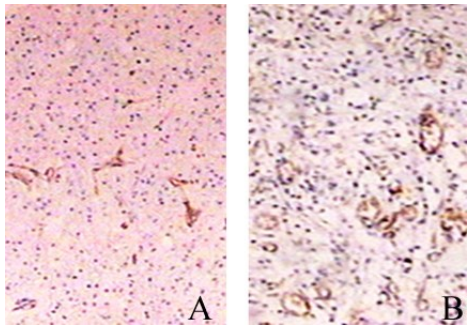

图2 胶质瘤CD105的表达(EnVision,×40)

A. 星形细胞瘤(WHO Ⅱ级);B. 间变性星形细胞瘤(WHO Ⅲ级)

EPO。本文结果还显示EPO的表达强度与胶质瘤病理分级呈正相关,表明EPO与胶质瘤的恶性程度有关,可能参与胶质瘤的恶性进展。在胶质瘤细胞恶性转化的过程中,可能通过某种途径获得旁分泌与自分泌EPO的功能或者产生EPO受体的表达上调[16]。在一定程度上,EPO及其受体表达水平可指导治疗措施的选择,预测胶质瘤病人的预后。如果能找到促使其产生的途径或相关因子,进行干预或阻断则有可能减慢或遏制组织的恶性转化。本文结果发现胶质瘤EPO表达水平与CD105表达水平呈正相关,提示EPO信号途径可能促进肿瘤内的血管新

表1 正常脑组织及胶质瘤促红细胞生成素的表达

组别	促红细胞生成素表达水平			
	–	+	++	+++
正常脑组织	18	2	0	0
Ⅰ级胶质瘤	3	1	0	0
Ⅱ级胶质瘤	18	5	1	8
Ⅲ级胶质瘤	23	24	12	9
Ⅳ级胶质瘤	16	15	8	9

表2 胶质瘤CD105表达变化

EPO表达水平	例数(例)	CD105[M(QR)]
–	60	10(14.25)
+	45	10(13)*
++	21	20(18)*#
+++	26	22.5(19.5)*#

注:与EPO表达(–)相应值比,* P<0.05;与EPO表达(+)相应值比,# P<0.05;EPO:促红细胞生成素;M:中位数;QR:四分位间距

表3 正常脑组织及胶质瘤的EPO mRNA表达变化

组别	例数(例)	EPO mRNA[M(QR)]
正常脑组织	5	4(27)
Ⅱ级胶质瘤	6	884(54964)*#
Ⅲ~Ⅳ级胶质瘤	11	46(309)

注:与正常脑组织相应值比,* P<0.05;与Ⅲ~Ⅳ级胶质瘤相应值比,# P<0.05;EPO:促红细胞生成素;M:中位数;QR:四分位间距

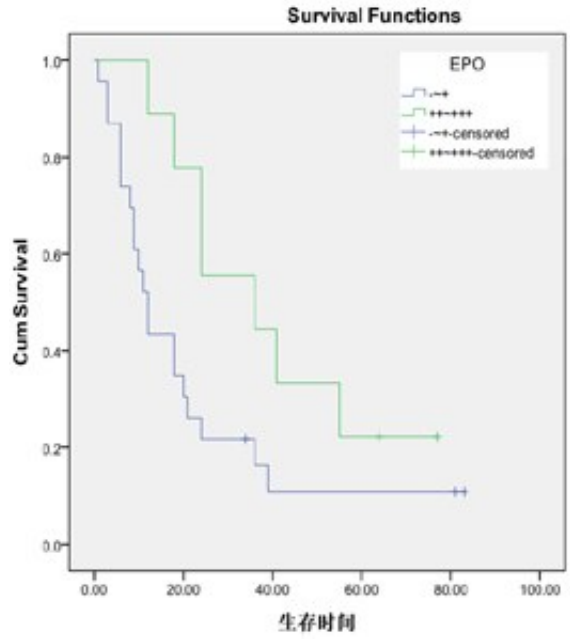

图3 高级别(WHO Ⅲ~Ⅳ级)胶质瘤生存曲线

生。Stuben等[17]发现重组人类EPO刺激毛细血管生长的速度与血管内皮生长因子的效果相近。EPO表达高的胶质瘤由于其新生血管更丰富，肿瘤的增生、浸润可能就更活跃，恶性度就更高。

本文结果发现Ⅱ级胶质瘤组EPO mRNA最高，说明其在转录水平就已上调。Ⅲ~Ⅳ级胶质瘤转录后EPO mRNA低于Ⅱ级胶质瘤组，但蛋白表达更高。这说明胶质瘤在翻译水平又进行调控，而且恶性度高的肿瘤调控的幅度更大。这提示EPO与胶质瘤的恶性度有关，EPO及其受体信号途径很可能促进胶质瘤的恶性进展。恶性度高的胶质瘤，EPO高表达者生存期更长，这可能是人体的自救反应。高恶性度促使EPO高表达，从而促使血管新生，导致低氧状态的缓解，使肿瘤增殖受限，生存期延长。某些恶性肿瘤病人若不能启动此自救机制，则肿瘤增殖顺利，生存期缩短。所以，EPO或许可以改善恶性胶质瘤病人的生存预后。

【参考文献】

[1] Zhou B, Damrauer JS, Bailey ST, *et al*. Erythropoietin promotes breast tumorigenesis through tumor-initiating cell self-renewal [J]. J Clin Invest, 2014, 124(2): 553-563.

[2] Grover A, Mancini E, Moore S, *et al*. Erythropoietin guides multipotent hematopoietic progenitor cells toward an erythroid fate [J]. J Exp Med, 2014, 211(2): 181-188.

[3] Sugawa M, Sakurai Y, Ishikawa-Ieda Y, *et al*. Effects of erythropoietin on glial cell development; oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation [J]. Neurosci Res, 2002, 44(4): 391-403.

[4] Robertson CS, Hannay HJ, Yamal JM, *et al*. Effect of erythropoietin and transfusion threshold on neurological recovery after traumatic brain injury: a randomized clinical trial [J]. JAMA, 2014, 312(1): 36-47.

[5] Jaspers A, Baron F, Willems E, *et al*. Erythropoietin therapy after allogeneic hematopoietic cell transplantation: a prospective, randomized trial [J]. Blood, 2014, 124(1): 33-41.

[6] Kim WS, Zhu Y, Deng Q, *et al*. Erythropoiesis from human embryonic stem cells through erythropoietin-independent AKT signaling [J]. Stem Cells, 2014, 32(6): 1503-1514.

[7] Barbosa C, Romao L. Translation of the human erythropoietin transcript is regulated by an upstream open reading frame in response to hypoxia [J]. RNA, 2014, 20(5): 594-608.

[8] Yang Z, Wang H, Jiang Y, *et al*. VEGFA activates erythropoietin receptor and enhances VEGFR2-mediated pathological angiogenesis [J]. Am J Pathol, 2014, 184(4): 1230-1239.

[9] Ruiz M, Martinez-Vidal AF, Morales JM, *et al*. Neurodegenerative changes are prevented by erythropoietin in the pmn model of motoneuron degeneration [J]. Neuropharmacology, 2014, 83: 137-153.

[10] 刘　坤，姚　阳，杨　宇，等. 促红细胞生成素预处理对脑缺血再灌注大鼠水通道蛋白4的影响[J]. 中风与神经疾病杂志，2014，31(2)：111-113.

[11] 高广生，张福森. 促红细胞生成素对心肺复苏后大鼠神经功能及脑细胞凋亡的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志，2014，23(5)：402-404.

[12] Mohyeldin A, Dalgard CL, Lu H, *et al*. Survival and invasiveness of astrocytomas promoted by erythropoietin [J]. J Neurosurg, 2007, 106(2): 338-350.

[13] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (-Delta Delta C(T)) method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[14] Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, *et al*. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis [J]. Neuro Oncol, 2005, 7(2): 134-153.

[15] 刘志忠，张宇新，阚志生，等. 脑胶质瘤促红细胞生成素的表达及其生物学意义[J]. 实用肿瘤杂志，2005，20(1)：43-45.

[16] 徐　舒，岳志健，周晓平，等. 人脑胶质瘤组织促红细胞生成素受体的表达及其与新生血管的关系[J]. 中华实验外科杂志，2013，30(5)：977-979.

[17] Stuben G, Thews O, Pottgen C, *et al*. Recombinant human erythropoietin increases the radiosensitivity of xenografted human tumours in anaemic nude mice [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2001, 127(6): 346-350.

（2017-09-15收稿，2018-02-04修回）