

垂体腺瘤组织 DCX 表达水平与肿瘤侵袭性的关系

祝启海 夏国庆 宋 伟

【摘要】目的 探讨垂体腺瘤组织双皮质素(DCX)的表达水平与肿瘤侵袭性的关系。方法 采用免疫组化染色和qRT-PCR检测2017年1月~2020年1月手术切除的88例垂体腺瘤组织和56例瘤旁垂体组织DCX表达情况和DCX mRNA表达量。根据Knosp分类方法评估肿瘤侵袭性,并分成侵袭组、无侵袭组。利用多因素logistic回归分析检验发生侵袭性的危险因素。受试者工作特征(ROC)曲线分析DCX mRNA预测垂体腺瘤侵袭性的效能。结果 88例中,侵袭组41例,无侵袭组47例。垂体腺瘤组织DCX阳性率(71.59%, 63/88)明显高于瘤旁组织(17.86%, 10/56; $P<0.05$ )。垂体腺瘤组织DCX mRNA表达量( $5.65\pm 1.87$ )明显高于瘤旁组织( $0.85\pm 0.28$ ; $P<0.05$ )。侵袭组DCX mRNA表达量( $6.42\pm 0.86$ )明显高于无侵袭组( $4.98\pm 0.94$ ; $P<0.05$ )。多因素logistic回归分析显示DCX表达阳性是垂体腺瘤发生侵袭的独立危险因素( $P<0.05$ )。ROC曲线显示,DCX mRNA表达量预测垂体腺瘤侵袭性的曲线下面积为0.775(95% CI 0.676~0.874; $P<0.001$ ),最佳界值为5.640,敏感度为78.00%,特异度为61.70%。结论 垂体腺瘤组织DCX呈高表达,检测DCX表达水平对肿瘤侵袭性有一定的预测作用。

【关键词】垂体腺瘤;双皮质素;肿瘤侵袭性;危险因素

【文章编号】1009-153X(2021)08-0597-03 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41; Q 786

Relationship between DCX expression and invasion of pituitary adenoma

ZHU Qi-hai, XIA Guo-qing, SONG Wei. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Henan Polytechnic University/Jiaozuo Second People's Hospital, Jiaozuo 454000, China

【Abstract】Objective To explore the relationship between expression of doublecortin (DCX) in pituitary adenoma (PA) tissues and the invasion of PA. Methods The positive expression rate and mRNA level of DCX were detected in PA tissues obtained from 88 patients with PA who underwent microsurgery from January 2017 to January 2020 and in tissues adjacent to the PA obtained from 56 PA patients by immunohistochemistry and qRT-PCR, respectively. The PA was divided into invasive group and non-invasive group according to the Knosp classification method. Multivariate logistic regression was used to analyze the risk factors for the invasion of PA. Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the predictive power of DCX mRNA level on the the invasiveness of PA. Results The positive expression rate (71.59%, 63/88) and mRNA level ( $5.65\pm 1.87$ ) of DCX in PA tissues were significantly higher than those [(17.86%, 10/56) and ( $0.85\pm 0.28$ ), respectively] in tissues adjacent to PA ( $P<0.05$ ). The level of DCX mRNA in invasive group ( $6.42\pm 0.86$ ) was significantly higher than that ( $4.98\pm 0.94$ ) in non-invasive group ( $P<0.05$ ). Multivariate logistic regression analysis indicated that positive expression of DCX was an independent risk factor for invasion of PA ( $P<0.05$ ). ROC curve analysis showed that the area under the curve of DCX mRNA to predict the invasion of PA was 0.775 (95% CI 0.676~0.874;  $P<0.001$ ), and the best cut-off value of was 5.640, with a sensitivity of 78.00% and a specificity of 61.70%. Conclusions DCX is highly expressed in PA tissues, and the detection of DCX expression level has a certain predictive effect on the invasiveness of PA.

【Key words】Pituitary adenoma; Doublecortin; Tumor invasiveness; Risk factors

垂体腺瘤大多源于垂体前叶,是颅内常见的良性肿瘤,但部分垂体腺瘤可见海绵窦、硬脑膜、蝶筛窦等受累<sup>[1]</sup>。垂体腺瘤早期很难预测肿瘤侵袭发生风险,通常在侵袭发生之后才能诊断,但往往错过了全切除的机会,术后残留风险高<sup>[2]</sup>。目前,垂体腺瘤侵袭的机制尚未完全明确。近年来,研究指出肿瘤发生与基因异常表达等有关<sup>[3]</sup>。有学者发现双皮质

素(doublecortin, DCX)在神经胶质瘤组织中存在过表达,可能与肿瘤侵袭有关<sup>[4]</sup>。本文探讨DCX与垂体腺瘤侵袭性的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象 ①纳入标准:术后病理证实为垂体腺瘤;年龄≥18岁;精神状态正常;认知功能、沟通能力良好。②排除标准:有其他部位肿瘤;心、肝、肾等重要脏器受损;凝血功能障碍,不适宜行手术;患造血系统疾病、自身免疫性疾病。

2017年1月至2020年1月收治符合标准的垂体

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2021.08.008  
作者单位:454000 河南焦作,河南理工大学第一附属医院神经外科  
(祝启海、夏国庆、宋 伟)

腺瘤 88 例,其中 56 例获取瘤旁垂体组织。88 例中,男 48 例,女 40 例;年龄 20~74 岁,平均(48.44±11.82)岁;肿瘤最大径 8~62 mm,平均(35.39±16.87)mm。内分泌激素免疫组化分类:混合型 19 例,生长激素型 8 例,泌乳素型 23 例,促肾上腺皮质素型 6 例,无功能型 32 例。

1.2 检测方法

1.2.1 DCX 的免疫组化检测 标本经 10%福尔马林固定,行石蜡包埋,切片厚度为 1.5 μm。脱蜡入水,行抗原修复;利用 PBS 洗涤 3 次,3 min/次;加一抗,在 37 ℃下孵育 60 min,在室温下反应 30 min,复温;PBS 洗涤 2 次,3 min/次;加二抗,在 37 ℃下反应 20 min;PBS 洗涤 2 次,3 min/次;行 DAB 显色,在避光条件下进行观察,1~3 min 内终止显色;苏木素复染 1 min;脱水、封片。免疫组化染色结果评估<sup>[5]</sup>:光学显微镜观察,若细胞膜、细胞浆内可见棕黄色则为阳性(图 1),至少选取 5 个高倍视野(×400),根据阳性细胞占比、染色强度计分:①阳性细胞占比≤5%、6%~25%、26%~50%、≥51%分别计 0、1、2、3 分;②染色强度无染色、淡黄色、棕黄色、棕褐色分别计 0、1、2、3 分。两种计分乘积为最终计分结果,总分≤2 分为阴性,≥3 分为阳性。

1.2.2 微血管密度(microvessel density, MVD)的检测 采用免疫组化法测定,若血管内皮细胞胞浆呈现为棕黄或棕褐色,为 FⅧAg 阳性细胞。利用低倍镜(×100)对血管高密度区进行选择,经高倍镜(×200)选取 3 个视野,计算该区域内 MVD,以 3 个视野均值为最终结果。

1.2.3 qRT-PCR 检测 DCX mRNA 利用 TRizol 试剂提取总 RNA,逆转录成 cDNA,行扩增 PCR。引物序列:① DCX 上游序列为 5'-TCCCCAACACCT-CAAAAGAC-3',下游序列为 5'-TTTGTAGAC-GAAGCTTGGGCTGCA-3';②内参 GAPDH 上游序列为 5'-GGCGATCTGCTGGAGTTCCT-3',下游序列为 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'。反应条件为

94 ℃ 3 min,94 ℃ 30 s、60 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s,共 35 个循环,72 ℃ 7 min。以 2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算相对表达量。

1.3 垂体腺瘤侵袭性的评价 根据 Knosp 分类方法评估肿瘤侵袭性<sup>[6]</sup>。根据 MRI 扫描,将蝶鞍中段扫描平面视作参考平面,观察海绵窦周围显影状态,分成 5 个等级:0 级,海绵窦未见侵犯,病灶处于颈内动脉侧壁连线内;1 级,内侧静脉丛增强消失,病灶处于颈内动脉内切线和中切线之间;2 级,内侧以及下方或上方静脉丛增强部分消失,病灶处于颈内动脉中切线、外切线之间;3 级,内侧以及下方或上方静脉丛增强完全消失,外侧增强也可见部分消失,病灶超过颈内动脉外切线;4 级,静脉丛增强彻底消失,肿瘤将颈内动脉完全包裹。其中 0、1 级为无侵袭组,2~4 级为侵袭组。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件分析;计数资料行 χ<sup>2</sup> 检验;计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,行 *t* 检验;利用多因素 logistic 回归分析检验侵袭性的危险因素;绘制受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析 DCX mRNA 水平预测肿瘤侵袭性的效能;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 垂体腺瘤组织 DCX 表达情况 垂体腺瘤组织 DCX 阳性率(71.59%, 63/88)明显高于瘤旁组织(17.86%, 10/56; *P*<0.05)。垂体腺瘤组织 DCX mRNA 表达量(5.65±1.87)明显高于瘤旁组织(0.85±0.28; *P*<0.05)。

2.2 垂体腺瘤发生侵袭性的影响因素 本文 88 例垂体腺瘤中,侵袭组 41 例,无侵袭组 47 例。单因素分析显示, MVD、DCX 表达水平与垂体腺瘤侵袭性有关(*P*<0.05,表 1)。多因素 logistic 回归分析显示 MVD≥28.68、DCX 表达阳性是垂体腺瘤发生侵袭的独立危险因素(*P*<0.05,表 2)。

2.3 DCX mRNA 表达量预测垂体腺瘤侵袭性的价值 侵袭组 DCX mRNA 表达量(6.42±0.86)明显高于无

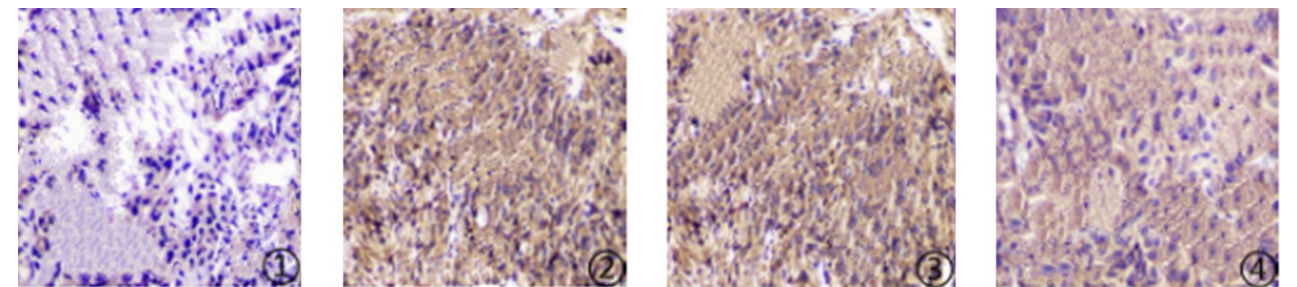


图 1 双皮激素免疫组化染色(SP 法,×400)

①. 瘤旁组织;②. 垂体腺瘤组织;③. 侵袭性垂体腺瘤组织;④. 无侵袭性垂体腺瘤组织

侵袭组(4.98±0.94; $P<0.05$ )。ROC 曲线显示,DCX mRNA 表达量预测垂体腺瘤侵袭性的曲线下面积(area under the curve, AUC)为 0.775(95% CI 0.676~0.874; $P<0.001$ ),最佳界值为 5.640,敏感度为 78.00%,特异度为 61.70%。见图 2。

表 1 垂体腺瘤发生侵袭性影响因素的单因素分析(例)			
危险因素		侵袭组	无侵袭组
性别	男	23(56.10%)	25(53.19%)
	女	18(43.90%)	22(46.81%)
年龄(岁)	≥60	9(21.95%)	12(25.53%)
	<60	32(78.05%)	35(74.47%)
肿瘤最大径	≥35 mm	22(53.66%)	27(57.45%)
	<35 mm	19(46.34%)	20(42.55%)
内分泌激素免疫组化分类	混合型	8(19.51%)	11(23.40%)
	生长激素型	3(7.32%)	5(10.64%)
	泌乳素型	10(24.39%)	13(27.66%)
	促肾上腺皮质激素型	2(4.88%)	4(8.51%)
MVD 值		35.62±8.74*	22.62±7.14
DCX 表达	阳性	36(87.80%)*	27(57.45%)
	阴性	5(12.20%)	20(42.55%)

注:与无侵袭组相应值比,\* $P<0.05$ ;MVD.微血管密度;DCX.双皮质素

表 2 垂体腺瘤发生侵袭性影响因素的多因素 logistic 分析结果

影响因素	P 值	比值比	95%置信区间
微血管密度≥28.68	0.006	3.522	1.441~8.608
双皮质素表达阳性	0.005	2.967	1.399~6.292

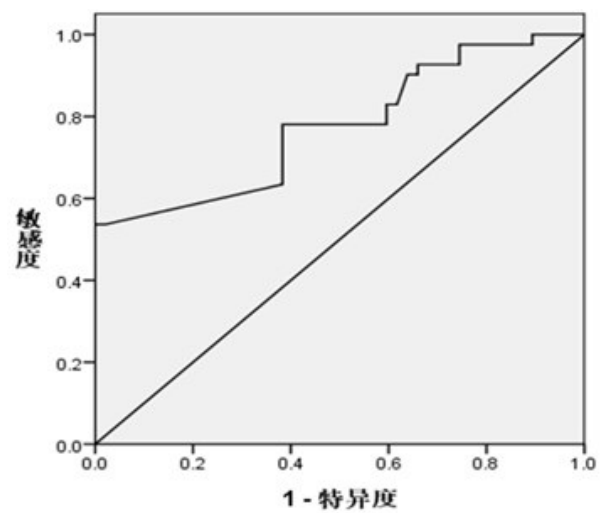


图 2 ROC 曲线分析双皮质素 mRNA 表达量预测垂体腺瘤侵袭性的效能

3 讨论

目前,垂体腺瘤的发病机制尚未完全阐明,但基因异常表达等可能参与其进展过程<sup>[7]</sup>。有学者指出抑癌基因活性丧失以及原癌基因活性增强与垂体腺瘤的发生有关<sup>[8]</sup>。侵袭性垂体腺瘤可导致海绵窦、颅骨、颈内动脉等受累,手术风险大,术后易复发,其侵袭过程涉及的机制较复杂<sup>[9]</sup>。研究认为 DCX 与肿瘤发生、发展有关,与微管结合,导致细胞骨架系统处于松散状态,促进细胞迁移<sup>[10]</sup>。本文结果显示,垂体腺瘤组织 DCX 表达水平明显高于瘤旁组织。DCX 是一种微管相关蛋白,在人脑多个部位存在表达,例如海马齿状回颗粒下层、脑室室管膜下区等。它的表达缺失可导致细胞迁移受阻,引起迁移过程紊乱,诱发智力障碍<sup>[11]</sup>。然而,DCX 过表达也会引起疾病,例如它在肿瘤组织中呈过表达,可导致大量囊泡侵袭机体,促进生长椎膨胀,使细胞核加速运动,促进细胞迁移,导致肿瘤细胞侵袭、转移<sup>[12]</sup>。有学者以前列腺癌小鼠进行研究,发现正常前列腺、前列腺癌以及转移病灶 DCX 表达未见差异<sup>[13]</sup>。这表明 DCX 在不同肿瘤中的表达可能存在特异性。

本文结果显示 MVD、DCX 阳性表达与垂体腺瘤侵袭有关。MVD 值反映肿瘤血管生成情况,该值越高提示肿瘤血管生成越明显。肿瘤血管生成是促进肿瘤细胞转移的基础条件,通常在肿瘤生长初期属于无血管期。当病灶体积长至 1~2 mm<sup>3</sup>时,则可见血管生成,肿瘤细胞能够释放大量血管生成因子,促使血管形态发生变化,致肿瘤局部血管网络形成,高侵袭性肿瘤大多可见丰富的血管网络,与肿瘤细胞迁移密切相关<sup>[14]</sup>。DCX 过表达与肿瘤侵袭也存在关联,可能通过影响肿瘤细胞运动以及细胞骨架变化,介导肿瘤细胞的迁移、侵袭<sup>[15]</sup>。本文 ROC 曲线结果显示,DCX mRNA 水平对垂体腺瘤侵袭性具有一定预测作用。

总之,垂体腺瘤 DCX 呈高表达,检测 DCX 表达水平对判断垂体腺瘤的侵袭性有一定的预测作用。

【参考文献】

[1] Zhou Y, Fu X, Zheng Z, et al. Identification of gene coexpression modules and hub genes associated with the invasiveness of pituitary adenoma [J]. Endocrine, 2020, 68(3): 377-389.