

## CXCR4、hTERT 表达与胶质瘤微血管密度及预后的关系

王奕丹<sup>1</sup>, 章建国<sup>2</sup>, 田薇<sup>2</sup>, 鄂群<sup>3</sup>, 王东林<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>南通大学公共卫生学院预防092班, 江苏南通 226001; <sup>2</sup>南通大学附属医院病理科, 江苏南通 226001; <sup>3</sup>南通大学医学院病理学系 江苏南通 226001)

**[摘要]** 目的:探讨趋化因子受体4(CXCR4)、端粒酶逆转录酶(hTERT)在胶质瘤中的表达与肿瘤微血管密度(MVD)及预后的关系。方法:应用免疫组织化学技术检测156例胶质瘤中CXCR4及hTERT的表达,以血管内皮生长因子(VEGF)标记检测微血管密度,分析CXCR4、hTERT表达及MVD与生存时间的关系。结果:①CXCR4、hTERT总阳性率分别为53.8%(84/156)、50.6%(79/156);Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ级胶质瘤中CXCR4的阳性率分别为30.8%(16/52)、56.5%(39/69)、82.9%(29/35),hTERT的阳性率分别为26.9%(14/52)、53.6%(37/69)、80.0%(28/35),CXCR4和hTERT在不同级别胶质瘤中的表达差异有统计学意义( $P < 0.01$ );②156例胶质瘤中MVD均值为 $44.17 \pm 13.43$ ,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ级MVD均值分别为 $29.85 \pm 4.34$ 、 $50.12 \pm 17.80$ 、 $52.53 \pm 18.16$ ( $P < 0.01$ );③Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ级胶质瘤患者术后中位生存时间分别为30.2、11.7、9.8个月;CXCR4、hTERT阳性表达组中MVD $\geq 44.17$ 的病例术后中位生存时间明显短于阴性表达组及MVD $< 44.17$ 的病例( $P < 0.01$ )。结论: CXCR4、hTERT的高表达可促进胶质瘤血管生成和侵袭性生长,三者联合检测有助于预后评估。

**[关键词]** 胶质瘤;CXCR4;hTERT;微血管密度;预后

**[中图分类号]** R739.41

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)08-1110-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20130816

## Expression of CXCR4, hTERT and its correlation with microvascular dense and prognosis in glioma

Wang Yidan<sup>1</sup>, Zhang Jianguo<sup>2</sup>, Tian Wei<sup>2</sup>, E Qun<sup>3</sup>, Wang Donglin<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>Class 092 of Preventive Medicine, College of Public Health, Nantong University, Nantong 226001; <sup>2</sup>Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001; <sup>3</sup>Department of Pathology, Medical College, Nantong University, Nantong 226001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expressions of CXCR4, hTERT and microvascular density (MVD) in gliomas and discuss their relationships with the prognosis of glioma. **Methods:** Immunohistochemistry was used to detect the expression of CXCR4 and hTERT in 156 human gliomas, MVD was analyzed by VEGF labeling. Their relationships with survival time of patients were also analyzed. **Results:** ① The positive rates of CXCR4 and hTERT in gliomas were 53.8%(84/156) and 50.6%(79/156), respectively. The positive rates of CXCR4 and hTERT in grade II, grade III and grade IV of gliomas were 30.8%(16/52), 56.5%(39/69), 82.9%(29/35), and 26.9%(14/52), 53.6%(37/69), 80.0%(28/35) respectively. A statistically significance of their expressions was observed among different grades ( $P < 0.01$ ). ② The average of MVD in 156 gliomas was  $44.17 \pm 13.43$ . In grade II, grade III and grade IV of gliomas, MVD was  $29.85 \pm 4.34$ ,  $50.12 \pm 17.80$  and  $52.53 \pm 18.16$ , respectively ( $P < 0.01$ ). ③ The median survival time of patients with grade II, III, IV of gliomas after operations was 30.2, 11.7 and 9.8 months, respectively. The median survival time in cases with positive expression of CXCR4, hTERT or MVD  $\geq 44.17$  were significantly shorter than that in cases with negative expression or MVD  $< 44.17$  ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The expressions of CXCR4, hTERT and MVD may be associated with invasive group and tumor angiogenesis, their combined assay is helpful for evaluating prognosis.

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81272789);江苏省高等学校大学生实践创新训练计划项目(2011856);江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD);南通市科技局应用研究项目(BK2012065)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: donglin@ntu.edu.cn

[Key words] glioma; CXCR4; hTERT; MVD; prognosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(8): 1110-1115]

胶质瘤是中枢神经系统最常见的肿瘤,其早期症状隐匿,常难以被发现而延误诊治,其发病机制迄今不明。因此,从细胞生物学和分子生物学水平研究肿瘤的发生、发展对提高胶质瘤的早期诊断水平具有重要意义。研究表明趋化因子受体 4 (chemokine receptor 4, CXCR4) 在乳腺癌、卵巢癌等多种肿瘤中有表达,与肿瘤的生长、侵袭、血管形成存在密切关系<sup>[1]</sup>。人类端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT)<sup>[2]</sup> 是维持肿瘤持续生长的关键基因,它的表达能反映肿瘤细胞的增殖活性。本文通过对胶质瘤组织中 hTERT、CXCR4 及 VEGF 的免疫组化检测,分析三者与胶质瘤生物学行为及预后的关系,以期对肿瘤治疗方案的选择和预后评估提供理论依据。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

选取南通大学附属医院 2005 年 1 月~2008 年 9 月胶质瘤手术切除有完整临床及随访资料的存档蜡块 156 例,其中男性 92 例,女性 64 例,年龄 12~75 岁,中位年龄 46.3 岁。所有病理切片均经 2 位有经验的病理医师阅读,重新切片、HE 染色并按 WHO 中枢神经系统肿瘤 2007 分类为标准进行复核确诊,其中 II 级(弥漫型星形细胞瘤)52 例, III 级(间变性星形细胞瘤)69 例, IV 级(多形性胶质母细胞瘤)35 例。对照组 10 例均来自脑外伤组织。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 免疫组化检测 CXCR4、hTERT、VEGF 的表达

鼠抗人 CXCR4(14-6009)、hTERT(MAB-0539)、VEGF 单克隆抗体 (RB-9031)、SP 免疫组化检测试剂盒(KIT-9710)购自福州迈新生物技术公司。

所有标本均经 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,4  $\mu\text{m}$  厚切片,常规脱蜡水化,组织抗原微波修复,10% 山羊血清封闭。CXCR4 和 VEGF 抗体的工作浓度为 1:100, hTERT 抗体的工作浓度为 1:50, SP 法按说明书操作步骤进行, DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显微镜控制下显色,苏木精复染,常规脱水,中性树胶封片。使用 PBS 代替一抗处理的切片作为阴性对照,已知阳性组织切片作为阳性对照。

#### 1.2.2 免疫组化染色结果判定

CXCR4 阳性表达为肿瘤细胞浆出现黄色或棕黄色颗粒, hTERT 阳性表达为肿瘤细胞核出现棕黄色颗粒。参照 Gatalica<sup>[3]</sup> 的 H-score ( $H = I \times P$ ) 系统对实验结果进行半定量判定:染色强度(I)依次为 0 (无色)、1(淡黄色)、2(棕黄色)、3(棕褐色);染色范围(P)以染色细胞所占的百分比评分:未见染色为 0, 阳性细胞 < 25% 为 1, 25%~50% 为 2, > 50% 为 3。染色强度与阳性细胞百分比的乘积即为免疫组化的结果。积分为 0 判为阴性(-), 1~2 分判为(+), 3~4 分判为(++),  $\geq 5$  分判为(+++)。

VEGF 的阳性表达为部分肿瘤细胞胞浆棕黄色着色和血管内皮细胞胞浆棕黄色着色。微血管计数选择标准:凡是染成棕黄色、单个、数个内皮细胞均作为 1 个血管计数。计 5 个不连续(间隔两个视野)高倍视野内( $\times 400$ )的微血管数,取其平均数作为该病例的微血管密度(microvascular density, MVD)。

#### 1.2.3 随访

采用电话方式进行随访。随访时间 1.0~78.4 个月,随访至 2011 年 9 月 30 日。至随访结束,生存 66 例,死亡 90 例。总生存时间(overall survival, OS)为自手术日期至死亡或随访结束日期。

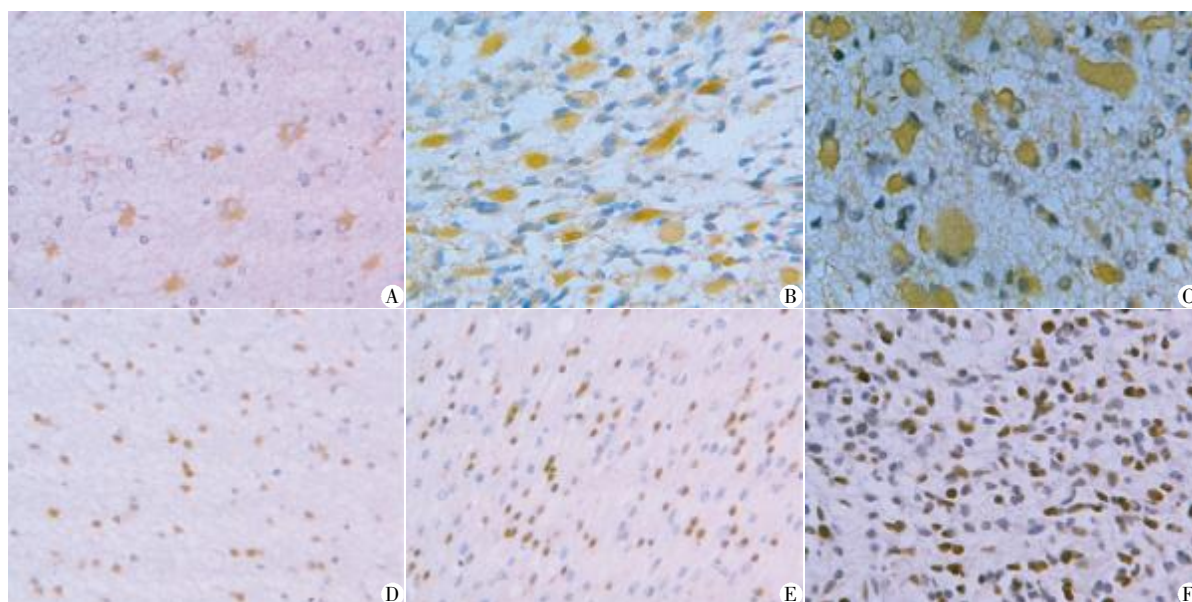
#### 1.3 统计学方法

应用 SPSS16.0 软件进行统计分析。计数资料采用  $\chi^2$  检验和确切概率法;计量资料如满足方差齐性的要求,两组比较用  $t$  检验,多组比较用方差分析;如不满足方差齐性的要求,则采用秩和检验,两组比较采用  $z$  统计量,多组比较采用  $\chi^2$  统计量;CXCR4 及 hTERT 与病理分级间的关系采用非参数统计中的 Spearman 等级相关分析、对生存数据采用 Kaplan-Meier 分析并绘制生存曲线,应用 Log-rank 法检验差异性。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CXCR4、hTERT 在胶质瘤中的表达

CXCR4 阳性表达为肿瘤细胞浆呈黄色或棕黄色颗粒;hTERT 阳性表达主要为肿瘤细胞核出现黄色颗粒,呈不均匀散在分布或弥漫分布(图 1)。156 例胶质瘤标本中, CXCR4、hTERT 的阳性表达率分别为 53.8%(84/156)、50.6%(79/156)。正常脑组织



A: CXCR4 II级; B: CXCR4 III级; C: CXCR4 IV级; D: hTERT II级; E: hTERT III级; F: hTERT IV级。

图1 胶质瘤中 CXCR4 和 hTERT 的表达(SP, ×400)

Figure 1 The expression of CXCR4 and hTERT in glioma (SP, ×400)

不表达 hTERT。

不同胶质瘤病理分级之间 CXCR4、hTERT 表达的差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 26.27, P < 0.01$ ;  $\chi^2 = 26.24, P < 0.01$ , 表 1), Spearman 等级相关分析显示, CXCR4、hTERT 表达与胶质瘤病理分级呈正相关 ( $r = 0.388, P < 0.01$ ;  $r = 0.386, P < 0.01$ ), 随胶质瘤病理分级的增高, CXCR4、hTERT 表达呈逐渐升高趋势。

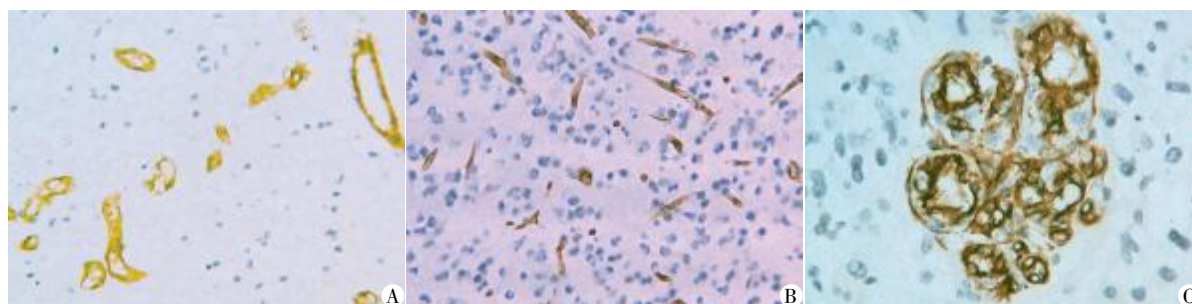
## 2.2 VEGF 染色结果及 MVD 测定

瘤组织中血管壁 VEGF 免疫组化染色呈棕黄色, 微血管形态呈小管状、芽状、条索状或肾小球丛状(图 2)。所有胶质瘤病例的 MVD 均值为  $44.17 \pm 13.43$ 。其中, II、III、IV 级胶质瘤的 MVD 均值分别为  $29.85 \pm 4.34, 50.12 \pm 17.80, 52.53 \pm 18.16$ 。随着胶质瘤恶性程度的增加, MVD 均值增大 ( $\chi^2 = 80.747, P < 0.01$ )。

表 1 CXCR4、hTERT 表达与胶质瘤病理分级的关系

Table 1 Correlation of CXCR4, hTERT expression and pathological grading of glioma

WHO 分级	例数 (n)	CXCR4 表达				阳性率 (%)	hTERT 表达				阳性率 (%)
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
II	52	36	7	5	4	30.8	38	5	7	2	26.9
III	69	30	9	14	16	56.5	32	9	13	15	53.6
IV	35	6	6	13	10	82.9	7	8	11	9	80.0
$\chi^2$ 值						26.27					26.24
P 值						<0.01					<0.01



A: II级; B: III级; C: IV级。

图2 胶质瘤中 VEGF 的表达(SP, ×400)

Figure 2 The expression of VEGF in glioma (SP, ×400)

### 2.3 MVD 与胶质瘤临床病理因素及 CXCR4、hTERT 表达的关系

MVD 与病理分级、患者情况(年龄、性别)、肿瘤特点(肿瘤大小、核分裂像、坏死)、CXCR4、hTERT

表达的关系见表 2。胶质瘤中 MVD 值与患者年龄、性别、核分裂像无关( $P > 0.05$ ),但与胶质瘤病理分级、肿瘤直径、瘤组织中有无坏死、hTERT 及 CXCR4 的表达情况有关( $P < 0.05$ )。

表 2 MVD 与胶质瘤临床病理因素及 hTERT、CXCR4 表达的关系

Table 2 Correlation between MVD and clinical pathologic factors and expression of CXCR4, hTERT in gliomas

组别	n	MVD( $\bar{x} \pm s$ )	统计量	P 值
病理分级			$\chi^2 = 80.747$	$< 0.01$
II	52	29.85 $\pm$ 4.34		
III	69	50.12 $\pm$ 17.80		
IV	35	52.53 $\pm$ 18.16		
年龄(岁)			$t = 0.235$	$> 0.05$
< 50	80	43.56 $\pm$ 18.13		
$\geq 50$	76	44.78 $\pm$ 8.73		
性别			$t = 1.059$	$> 0.05$
男性	92	42.64 $\pm$ 16.99		
女性	64	45.70 $\pm$ 9.87		
肿瘤直径(cm)			$\chi^2 = 43.310$	$< 0.01$
< 4	45	28.03 $\pm$ 7.03		
4-6	74	48.96 $\pm$ 17.68		
> 6	37	55.51 $\pm$ 15.59		
核分裂像(个)			$z = 1.252$	$> 0.05$
$\leq 2$	59	38.40 $\pm$ 8.80		
> 2	97	49.94 $\pm$ 18.06		
坏死			$z = 2.114$	$< 0.01$
无	65	35.12 $\pm$ 8.71		
有	91	53.22 $\pm$ 18.15		
CXCR4			$z = 7.391$	$< 0.01$
阴性	72	32.98 $\pm$ 12.79		
阳性	84	55.36 $\pm$ 14.07		
hTERT			$z = 4.229$	$< 0.01$
阴性	77	35.28 $\pm$ 11.92		
阳性	79	53.06 $\pm$ 14.94		

### 2.4 CXCR4、hTERT 表达及 MVD 值与生存时间的关系

II、III、IV 级胶质瘤患者术后中位生存时间分别为 30.2、11.7、9.8 个月,3 年生存率分别为 48.1% (25/52)、15.9%(11/69)、0%(0/35)。CXCR4 阴性表达的 72 例胶质瘤患者的中位生存时间为 21.6 个月,阳性表达的 84 例患者中位生存时间 8.2 个月( $\chi^2 = 38.2, P < 0.01$ , 图 3)。hTERT 阴性表达的 77 例胶质瘤患者的中位生存时间为 20.2 个月,阳性表达的 79 例患者中位生存时间 9.0 个月( $\chi^2 = 14.43, P < 0.01$ , 图 4)。MVD 值 $< 44.17$  的 111 例胶质瘤患者的中位生存时间为 17.2 个月, MVD  $\geq 44.17$  的 45 例患者中位生存时间 8.2 个月( $\chi^2 = 7.41, P < 0.01$ , 图 5)。

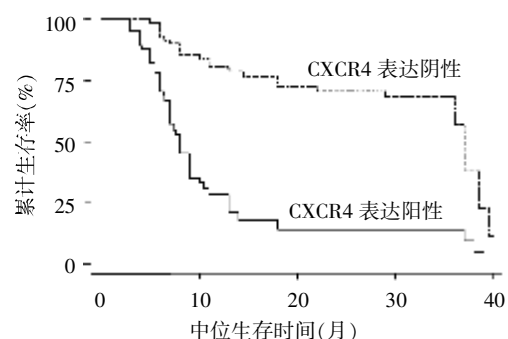


图 3 CXCR4 表达与胶质瘤患者生存关系

Figure 3 Correlation of CXCR4 expression and survival time in glioma

## 3 讨论

胶质瘤尤其是多形性胶质母细胞瘤是病死率较

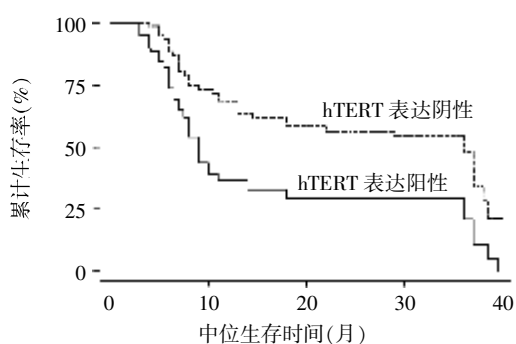


图4 hTERT表达与胶质瘤患者生存关系

Figure 4 Correlation of hTERT expression and survival time in glioma

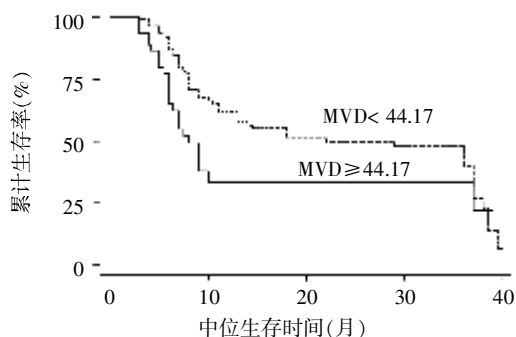


图5 MVD与胶质瘤患者生存关系

Figure 5 Correlation of MVD and survival time in glioma

高的一种恶性肿瘤,多年来基础研究的进展和临床治疗方法的改进并未使肿瘤的预后明显改善。研究表明,肿瘤的侵袭性生长和血管生成增加是影响肿瘤患者术后生存的重要因素。胶质瘤是典型的多血管肿瘤,血管生成与肿瘤的发生、侵袭有关。VEGF是目前认为最直接参与诱导肿瘤血管形成的重要因子。它不仅可诱导内皮细胞的迁移、增殖、管样结构的形成,而且可以增加微血管的渗透性,加剧肿瘤细胞的播散<sup>[4]</sup>。我们对156例胶质瘤组织中的VEGF进行免疫组化检测,计数MVD值来表示肿瘤的新生血管,结果表明,156例胶质瘤MVD均值为 $44.17 \pm 13.43$ ,随着胶质瘤恶性级别的增加,MVD均值增大( $P < 0.01$ ),两者呈正相关( $P < 0.01$ )。其机制可能为肿瘤细胞分泌的VEGF通过与分布在血管内皮细胞表面的特异性受体结合,从而促进血管内皮细胞的增殖、分离和迁移,并形成血管祥,新生的肿瘤血管又可为肿瘤细胞生长提供营养并间接促进肿瘤细胞的增殖及恶性转化<sup>[5]</sup>。

我们在对临床病理因素(年龄、性别、肿瘤直径、核分裂像、坏死)与MVD值关系的分析中发现,

MVD值与年龄、性别、核分裂像无关,但与肿瘤的大小、肿瘤组织中有无坏死有关,体积大及有坏死者MVD值高于体积小及无坏死者。提示肿瘤体积较小时,生长缓慢,但随着瘤体内微血管的逐渐生成、数量逐渐增多,瘤体随之迅速增大,进而发生细胞异型性变及瘤组织的广泛浸润。

CXCR4为趋化因子受体家族的成员,在多种肿瘤中有表达,可能与胶质瘤侵袭性生长和血管生成有关。本研究检测了胶质瘤组织中CXCR4的表达情况,发现156例胶质瘤中有84例表达CXCR4,总阳性率为53.8%,在恶性程度不同的胶质瘤组织表达差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),随胶质瘤级别的升高表达增强,与Stevenson等<sup>[6]</sup>的结果一致。研究表明阻断CXCR4可明显诱导细胞凋亡,离体实验中抑制CXCR4后恶性胶质瘤细胞的侵袭能力明显受损<sup>[7]</sup>。本研究还发现CXCR4的表达与MVD密切相关,表明CXCR4在肿瘤血管形成过程中参与了血管内皮细胞的迁移和增殖,与Christine等<sup>[8]</sup>的结果一致。研究报道在U251n和U87MG胶质瘤细胞系中加入VEGF,CXCR4 mRNA和SDF-1 mRNA均上调表达,提示VEGF与CXCR4在胶质瘤细胞增殖和侵袭中的作用密切相关<sup>[9]</sup>。

hTERT是位于染色体5p15.33,全长约40 kb的单拷贝基因<sup>[10]</sup>,它在干细胞和胚胎组织中高表达,但在绝大多数成人体细胞中检测不到<sup>[11]</sup>。Divella等<sup>[12]</sup>的研究表明人类hTERT基因的血浆水平可作为肿瘤侵袭性的指标。与正常细胞相比,肿瘤细胞生长增殖更快,其端粒更为缩短,为维持染色体末端的端粒稳定,恶性肿瘤细胞通过激活端粒酶,合成端粒DNA,阻止端粒丢失,从而使肿瘤细胞获得永生<sup>[13-14]</sup>。本研究发现,hTERT在正常脑组织中无表达,而在各级胶质瘤中有程度不等的表达,阳性率分别为26.9%、53.6%、80.0%,随着胶质瘤病理分级的升高,其表达逐渐增强( $P < 0.01$ ),两者呈正相关( $P < 0.01$ ),与Maes等<sup>[15]</sup>的结果一致。提示hTERT表达上调可促进正常细胞的恶性转变和肿瘤细胞增殖,hTERT可作为肿瘤诊断的标志物和肿瘤治疗的新靶点。本研究结果发现hTERT阴性组和阳性组的MVD值差异有统计学意义,阴性组的MVD值低于阳性组,表明hTERT在肿瘤的血管形成中起一定作用,其机制有待进一步研究。

Kaplan-Meier分析结果显示,CXCR4,hTERT及MVD与胶质瘤患者生存时间的关系有统计学意义,CXCR4、hTERT阳性表达者的生存时间短于阴性表

达者, MVD 值较高者生存时间短于较低者, 提示 CXCR4、hTERT 及 MVD 测定可作为胶质瘤预后指标。本研究发现 CXCR4、hTERT 表达及 MVD 与胶质瘤的恶性程度呈正相关, 与患者的术后生存时间呈负相关。我们认为 hTERT 及 CXCR4 在胶质瘤细胞增殖、侵袭性生长和微血管形成中发挥了重要的作用, 联合检测 CXCR4、hTERT 及 MVD 有助于胶质瘤预后评估。

[参考文献]

- [1] Joseph K, Hagen K, Donald W, et al. An antagonist of the chemokine receptor CXCR4 induces mitotic catastrophe in ovarian cancer cells [J]. *Mol Cancer Therapeutics*, 2009, 8(7): 1893-1905
- [2] Inthrani RI, Manoor PH, Shazib P. hTERT overexpression alleviates intracellular ROS production, improves mitochondrial function, and inhibits ROS-mediated apoptosis in cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(1): 266-276
- [3] Gatalica Z, Lele SM, Rampy BA, et al. The expression of Fhit protein is related inversely to disease progression in patient with breast carcinoma [J]. *Cancer*, 2000, 88(6): 1378-1383
- [4] Whoon J, Philip JT, Kevin C. Post-radiation increase in VEGF enhances glioma cell motility *in vitro* [J]. *Radiat Oncol*, 2012, 22(7): 25-33
- [5] Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, et al. Tumor vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells [J]. *Nature*, 2010, 468(7325): 824-828
- [6] Stevenson CB, Ehtesham M, McMillan KM, et al. CXCR4 expression is elevated in glioblastoma multiforme and correlates with an increase in intensity and extent of peritumoral T2-weighted magnetic resonance imaging signal abnormalities [J]. *Neurosurgery*, 2008, 63(3): 560-569
- [7] do Carmo A, Patricio I, Cruz MT, et al. CXCL12/CXCR4 promotes motility and proliferation of glioma cells [J]. *Cancer Biol Therapy*, 2010, 9(1): 56-65
- [8] Christine MC, Brian M, Katherine H. A role for the CXCL12 receptor, CXCR7, in the pathogenesis of human pulmonary vascular disease [J]. *Eur Respiratory J*, 2012, 39(6): 1415-1424
- [9] Hong X, Jiang F, Kalkanis SN, et al. SDF-1 and CXCR4 are up-regulated by VEGF and contribute to glioma cell invasion [J]. *Cancer Lett*, 2006, 236(1): 39-45
- [10] Rosa D, Stefania T, Rosanna L, et al. Circulating hTERT DNA in early breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(7): 2845-2849
- [11] Shuwen W, Chunguang H, Jiyue Z. Distinct and temporal roles of nucleosomal remodeling and histone deacetylation in the repression of the hTERT gene [J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(5): 821-832
- [12] Divella R, Lacalamita R, Tommasi S, et al. PAI-1, t-PA and circulating hTERT DNA as related to virus infection in liver carcinogenesis [J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(1): 223-228
- [13] Jeeyun C, Prabhat K, Kwon C. Nuclear import of hTERT requires a bipartite nuclear localization signal and Akt-mediated phosphorylation [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(11): 2684-2697
- [14] Joseph G, Naren LB, Swapan KR. Combination of hTERT knockdown and IFN- $\gamma$  treatment inhibited angiogenesis and tumor progression in glioblastoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(23): 7186-7195
- [15] Maes L, Kalala JP, Cornelissen M, et al. Progression of astrocytomas and meningiomas: an evaluation *in vitro* [J]. *Cell Proliferation*, 2007, 40(1): 14-23

[收稿日期] 2013-01-14

欢迎投稿 欢迎订阅