

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.16.004
文章编号: 1005-8982(2020)16-0023-05

临床研究·论著

硫酸乙酰肝素在脑胶质瘤中的表达及其临床意义*

宋雨茜¹, 李鑫¹, 周高雅², 王珊¹

(1. 中南大学化学化工学院 制药工程系, 湖南 长沙 410083; 2. 湖南省脑科医院 神经内科, 湖南 长沙 410007)

摘要: 目的 探讨硫酸乙酰肝素(HS)在人脑胶质瘤中的表达水平及其在预后评估中的价值。**方法** 采用免疫组织化学法检测HS在171例脑胶质瘤组织芯片中的表达,分析HS与脑胶质瘤临床病理特征的相关性。采用Kaplan-Meier法和Cox比例风险回归模型对171例脑胶质瘤患者进行生存分析。**结果** HS在脑胶质瘤组织中的表达定位于肿瘤细胞和血管内皮细胞。不同肿瘤分级脑胶质瘤患者肿瘤细胞HS表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);不同肿瘤分级脑胶质瘤患者血管内皮细胞HS表达水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。脑胶质瘤组织肿瘤细胞中HS表达水平不同的患者的生存时间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);脑胶质瘤患者血管内皮细胞HS表达水平越高,总生存期越短($P < 0.05$)。逐步多因素Cox比例风险回归分析显示,脑胶质瘤组织血管内皮细胞HS高表达[$\hat{HR}=1.767$ (95% CI: 1.009, 3.093)]和肿瘤分级高[$\hat{HR}=6.702$ (95% CI: 4.355, 10.312)]是脑胶质瘤患者生存时间的影响因素。**结论** 脑胶质瘤血管内皮细胞HS表达水平越高、肿瘤分级越高,患者总生存期越短。

关键词: 胶质瘤/神经胶质瘤; 硫酸乙酰肝素/肝素; 病理学; 临床; 预后

中图分类号: R739.41

文献标识码: A

Heparan sulfate expression in human glioma and its clinical significance*

Yu-xi Song¹, Xin Li¹, Gao-ya Zhou², Shan Wang¹

(1. Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha, Hunan 410083, China; 2. Department of Neurology, Brain Hospital of Hunan Province, Changsha, Hunan 410007, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and prognostic role of heparan sulfate in human brain glioma. **Methods** The expression of heparan sulfate was determined by immunohistochemical technique in 171 tissue microarray samples of glioma. And relationship between the expression of heparan sulfate and clinicopathological characteristics of glioma patients was measured. The prognostic factors of 171 glioma patients were analyzed by Kaplan-Meier analysis and Cox proportional hazards regression analysis. **Results** The positive staining of heparan sulfate was localized in tumor cells and vascular endothelial cells in glioma. The heparan sulfate expression in vascular endothelial cells rather than tumor cells was observed to be different among patients with various grades of glioma (vascular endothelial cells, $P < 0.05$; tumor cells, $P > 0.05$). Furthermore, there was no significant difference in the survival time among patients with distinct expression level of heparan sulfate in tumor cells ($P > 0.05$). However, glioma patients with higher heparan sulfate expression in vascular endothelial cells had shorter overall survival ($P < 0.05$). Besides, Cox proportional hazards regression analysis demonstrated that high expression level of heparan sulfate in vascular endothelial cells of glioma tissue [$\hat{HR} = 1.767$ (95% CI: 1.009, 3.093)] and high-grade glioma [$\hat{HR} = 6.702$ (95% CI: 4.335, 10.312)] were factors impacting the survival time of glioma

收稿日期: 2020-02-28

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No: 81872919); 中南大学研究生科研创新项目(No: 2018zzts381)

[通信作者] 王珊, E-mail: wangshancsu0717@163.com; Tel: 18008425007

patients. **Conclusions** The higher were the expression of heparan sulfate in vascular endothelial cells of glioma tissue and the grade of the tumor, the shorter was the overall survival in glioma patients.

Keywords: heparan sulfate; glioma; clinicopathological characteristics; prognosis

脑胶质瘤是最常见的原发性颅内肿瘤^[1]。硫酸乙酰肝素 (heparan sulfate, HS) 是由重复的葡萄糖胺和己糖醛酸残基组成的二糖单元^[2]。1 个或多个 HS 链以其共价键方式与核心蛋白结合形成的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (HSPG)^[3] 是细胞外基质的主要组成部分。HS 链可与生长因子、趋化因子、成形素等多种细胞外调节蛋白相互作用, 在脑胶质瘤的生长、侵袭及血管生成中发挥重要作用。然而 HS 在脑胶质瘤患者肿瘤细胞和血管内皮细胞的表达水平及与预后的关系尚未见报道。本研究选用 171 例脑胶质瘤患者的组织芯片, 检测 HS 在脑胶质瘤患者肿瘤细胞和血管内皮细胞的表达水平, 分析其与患者临床病理特征及预后的关系。

1 资料与方法

1.1 材料与试剂

人脑胶质瘤组织芯片 HBraG171Su01 购自上海芯超生物科技有限公司, 包含 171 例脑胶质瘤患者的肿瘤组织, 所有脑胶质瘤患者临床病理资料完整。根据世界卫生组织 (WHO) 中枢神经系统肿瘤分级标准, 将脑胶质瘤分为 I ~ IV 级^[4]。其中, I 级 20 例, II 级 79 例, III 级 51 例, IV 级 21 例。

HS 鼠单克隆抗体购自美国 Amsbio 公司, 免疫组织化学试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司, 苏木精购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

组织芯片采用免疫组织化学 Envision 二步法染色。首先对组织芯片常规脱蜡、水化, 用柠檬酸修复液进行抗原修复后自然冷却、封闭, 取出片子, 用 PBS 冲洗 3 次, 滴加 1 : 1 000 稀释的 HS 抗体, 于 4℃ 冰箱过夜孵育。用标记辣根过氧化物酶的鼠二抗在室温下孵育 45 min, DAB 试剂盒显色后在流动的自来水

下冲洗 5 min。最后用苏木精复染 5 s, 自来水下冲洗 5 min, 室温晾干后用中性树脂固定、封片。为证明 HS 抗体对免疫组织化学染色的特异性, 以鼠 IgG 为空白对照进行染色, 结果为阴性。用 PBS 代替一抗对 HS 阳性的片子进行染色, 结果为阴性。

1.3 判断标准

结果的判读采用双盲法。聘请 2 位病理学专家对组织芯片的免疫组织化学结果进行评分。①根据 HS 在肿瘤细胞、血管内皮细胞的染色强度分别进行评分: (-) 阴性为 0 分, (+) 弱阳性为 1 分, (++) 阳性为 2 分, (+++) 强阳性为 3 分。②根据染色阳性率进行评分: 0% 为 0 分, >0% ~ 25% 为 1 分, >25% ~ 50% 为 2 分, >50% ~ 75% 为 3 分, >75% 为 4 分。最终总评分为染色强度评分与染色阳性率评分的乘积^[5]。总评分 ≤ 4 分为 HS 低表达, 总评分 >4 分为 HS 高表达。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件。计数资料以构成比或率 (%) 表示, 比较用 χ^2 检验; 采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, 比较用 Log-rank χ^2 检验; 影响因素的分析用 Cox 比例风险回归模型, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HS 在脑胶质瘤组织中的表达

免疫组织化学染色结果显示, HS 的阳性表达定位于肿瘤细胞和血管内皮细胞, 且 HS 在脑胶质瘤组织血管内皮细胞的染色程度及范围随肿瘤分级升高而加深或扩大。见图 1。

2.2 HS 与脑胶质瘤患者临床病理特征的关系

不同年龄、性别、肿瘤位置、肿瘤分级、生存

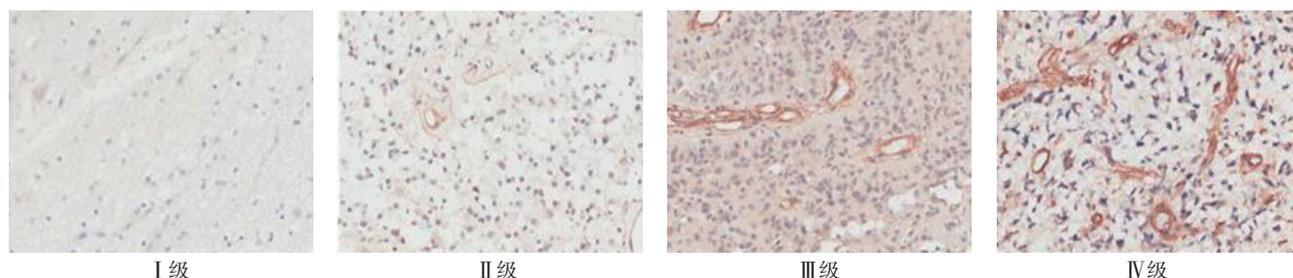


图 1 不同肿瘤分级脑胶质瘤患者肿瘤组织中 HS 的表达 (免疫组织化学染色 × 200)

状态的脑胶质瘤患者肿瘤细胞中 HS 的表达水平比较, 经 χ^2 检验, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

不同肿瘤位置、肿瘤分级、生存状态的脑胶质瘤患者血管内皮细胞 HS 表达水平比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。不同年龄、性别的脑胶质瘤患者血管内皮细胞 HS 表达水平比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

2.3 HS 表达与脑胶质瘤患者生存时间的关系

脑胶质瘤组织肿瘤细胞中 HS 表达水平不同的患者的生存时间比较, 经 Log-rank χ^2 检验, 差异无统计学意义 ($\chi^2=0.432, P=0.510$)。脑胶质瘤组织血管内皮细胞中 HS 表达水平不同的患者的生存时间比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=18.820, P=0.000$), 脑胶质瘤组织血管内皮细胞 HS 表达水平越高, 总生存期越短。见图 2。

以脑胶质瘤患者是否死亡为因变量, 以其他参数

表 1 不同临床病理特征脑胶质瘤患者的 HS 表达水平比较 例 (%)

临床病理特征	n	肿瘤细胞 HS 表达水平		χ^2 值	P 值	血管内皮细胞 HS 表达水平		χ^2 值	P 值
		低	高			低	高		
年龄									
≤ 35 岁	51	32 (62.74)	19 (37.25)	1.521	0.217	42 (82.35)	9 (17.65)	3.529	0.060
>35 岁	120	63 (52.50)	57 (47.50)			82 (68.33)	38 (31.67)		
性别									
女	63	36 (57.14)	27 (42.86)	0.102	0.750	42 (66.67)	21 (33.33)	1.712	0.191
男	108	59 (54.63)	49 (45.37)			82 (75.92)	26 (24.07)		
肿瘤位置									
额叶	49	28 (57.14)	21 (42.86)	2.175	0.703	40 (81.63)	9 (18.37)	11.957	0.022
颞叶	55	27 (49.09)	28 (50.91)			37 (67.27)	18 (32.73)		
顶叶	12	6 (50.00)	6 (50.00)			11 (91.67)	1 (8.33)		
枕叶	9	5 (55.56)	4 (44.44)			3 (33.33)	6 (66.67)		
其他	46	29 (63.04)	17 (36.96)			33 (71.74)	13 (28.26)		
肿瘤分级									
I 级	20	16 (80.00)	4 (20.00)	5.495	0.131	18 (90.00)	2 (10.00)	8.193	0.044
II 级	79	41 (51.90)	38 (48.10)			60 (75.95)	19 (24.05)		
III 级	51	27 (52.94)	24 (47.06)			35 (68.63)	16 (31.37)		
IV 级	21	11 (52.38)	10 (47.62)			11 (52.38)	10 (47.62)		
生存状态									
生存	114	65 (57.02)	49 (42.98)	0.296	0.586	94 (82.46)	20 (17.54)	16.959	0.000
死亡	57	30 (52.63)	27 (47.37)			30 (52.63)	27 (47.37)		

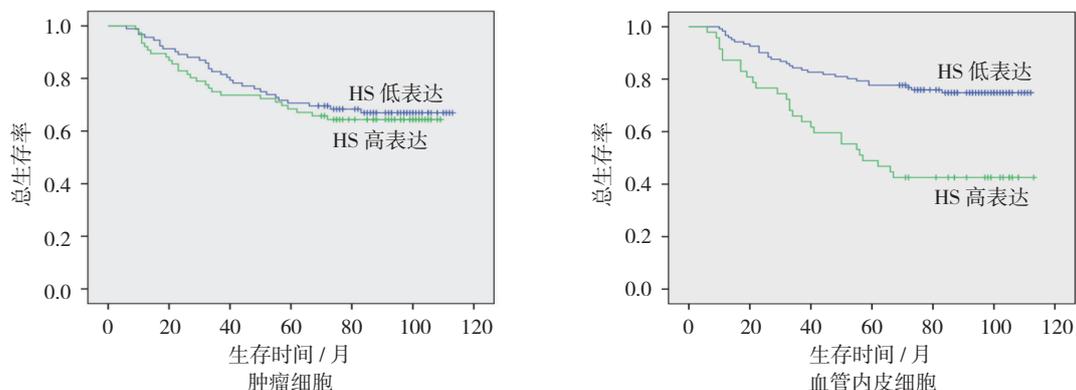


图 2 不同 HS 表达水平脑胶质瘤患者的生存曲线

为自变量,其中年龄 >35 岁、男性、肿瘤位置为额叶、病理分级 I 级、肿瘤细胞 HS 高表达、血管内皮细胞 HS 高表达赋值为 1。逐步多因素 Cox 比例风险回归分

析结果显示,HS 在脑胶质瘤组织血管内皮细胞中高表达和肿瘤分级高是脑胶质瘤患者生存时间的影响因素 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 脑胶质瘤患者生存时间的多因素 Cox 比例风险回归分析参数

自变量	<i>b</i>	<i>S_e</i>	Wald χ^2	<i>P</i> 值	$\hat{H}R$	95% CI	
						下限	上限
年龄	0.685	0.399	2.957	0.086	1.984	0.909	4.334
性别	-0.025	0.306	0.007	0.935	0.975	0.535	1.777
肿瘤位置	-0.014	0.091	0.025	0.874	0.986	0.825	1.178
肿瘤分级	1.902	0.220	74.867	0.000	6.702	4.355	10.312
肿瘤细胞 HS 表达水平	0.013	0.271	0.002	0.962	1.013	0.595	1.724
血管内皮细胞 HS 表达水平	0.569	0.286	3.970	0.046	1.767	1.009	3.093

3 讨论

HS 与核心蛋白结合,以 HSPG 的方式出现在细胞膜和细胞外基质表面,HS 链是细胞与细胞、细胞与细胞外基质相互作用的重要调节者。HS 链的硫酸化序列对 HS 链与生长因子、细胞因子、蛋白质的相互作用有影响^[6]。在肿瘤微环境中,高度硫酸化的 HS 链通过与血管生成因子、成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2)、肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF)、血管生成素 1 等促血管生成因子结合,激活下游信号通路,促进肿瘤血管生成,进一步加速肿瘤的生长和转移^[7]。有研究发现,HS 链特异性结构或组成变化都会影响肿瘤生长^[8]。在黑色素瘤中,高度硫酸化的 HS 链促进 FGF2 生成,刺激细胞增殖。HS 链与 HGF、血小板释放生长因子、脂蛋白脂肪酶的结合都依赖于 HS 链的 6-O-硫酸化^[9]。作用于 HS 链生物合成和降解途径中的酶可调节胚胎发育和组织稳态过程,对肿瘤发展也有重要调控作用^[10]。硫酸酯酶 1 (SULF1) 和硫酸酯酶 2 (SULF2) 可特异性切掉 6-O-硫酸盐,影响 FGF2、细胞外基质、HGF、胶质瘤细胞释放的神经营养因子等生长因子与 HS 结合,并发生相互作用,从而影响肿瘤生长的信号通路^[11]。已证实 SULF2 在胶质瘤组织高表达,并通过调节 HSPG 依赖的受体酪氨酸激酶信号通路,促进肿瘤的增殖^[12]。

有研究表明,HS 主要在胶质母细胞瘤的肿瘤细胞中表达,只有少数几个组织样本在细胞外有 HS 表达,且 HS 主要出现在坏死区域或腺性结构边界,与细胞类型无关^[13]。事实上,除了肿瘤组织,HS 在脑

血管系统亦有表达^[14]。鉴于血管增生在肿瘤发生、发展中的重要作用,本实验检测了 HS 在肿瘤细胞和血管内皮细胞的表达水平,发现肿瘤细胞 HS 表达水平与脑胶质瘤的恶性程度无关,但血管内皮细胞 HS 表达水平与脑胶质瘤恶性程度有关,提示血管内皮细胞 HS 的表达可能参与脑胶质瘤的发生、发展,可能是反映脑胶质瘤恶性程度的重要指标。此外,本研究结果表明脑胶质瘤患者血管内皮细胞 HS 表达水平越高,总生存期越短,且 HS 在血管内皮细胞中高表达是脑胶质瘤患者总生存期的影响因素,而肿瘤细胞 HS 表达水平与脑胶质瘤的恶性程度无关。

综上所述,血管内皮细胞的 HS 可能在脑胶质瘤的发生、增殖、侵袭及转移中发挥重要作用,但其作用机制尚需进一步探讨。

参 考 文 献:

- [1] OSTROM Q T, CIOFFI G, GITTLEMAN H, et al. Cbtrus statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the united states in 2012-2016[J]. Neuro Oncol, 2019, 21(5): 1-100.
- [2] DULANEY S B, XUY, WANG P, et al. Divergent synthesis of heparan sulfate oligosaccharides[J]. J Org Chem, 2015, 80(24): 12265-12279.
- [3] PURUSHOTHAMAN A, BANDARI S K, LIU J, et al. Fibronectin on the surface of myeloma cell-derived exosomes mediates exosome-cell interactions[J]. J Biol Chem, 2015, 291(4): 1652-1663.
- [4] LOUIS D N, OHGAKI H, WIESTLER O D, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system[J]. Acta Neuropathologica, 2007, 114(2): 97-109.
- [5] LU H Z, NIU F F, LIU F, et al. Elevated glypican-1 expression

- is associated with an unfavorable prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cancer Med*, 2017, 6(6): 1181-1191.
- [6] MALAVAKI C J, THEOCHARIS A D, LAMARI F N, et al. Heparan sulfate: biological significance, tools for biochemical analysis and structural characterization[J]. *Biomed Chromatogr*, 2011, 25(1-2): 11-20.
- [7] WIJK X, KUPPEVELT T. Heparan sulfate in angiogenesis: a target for therapy[J]. *Angiogenesis*, 2014, 17(3): 1-20.
- [8] XIONG A, KUNDU S, FORSBERGNILSSON K. Heparan sulfate in the regulation of neural differentiation and glioma development[J]. *FEBSJ*, 2014, 281(22): 4993-5008.
- [9] BRUNETTI J, RIOLO G, DEPAU L, et al. Unraveling heparan sulfate proteoglycan binding motif for cancer cell selectivity[J]. *Front Oncol*, 2019, 24(9): 843.
- [10] YAN Y, ADAM W, LI F, et al. Heparan sulfate proteoglycan sulfation regulates uterine differentiation and signaling during embryo implantation[J]. *Endocrinology*, 2018, 159(6): 2459-2472.
- [11] DAM G B, van de WESTERLO E M A, PURUSHOTHAMAN A, et al. Antibody GD3G7 selected against embryonic glycosaminoglycans defines chondroitin sulfate-E domains highly up-regulated in ovarian cancer and involved in vascular endothelial growth factor binding[J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(4): 1324-1333.
- [12] KAZUCHIKA N. Heparan sulfate S-domains and extracellular sulfatases (Sulfs): their possible roles in protein aggregation diseases[J]. *Glycoconj J*, 2018, 35(4): 387-396.
- [13] KAZANSKAYA G M, TSIDULKO A Y, VOLKOV A M, et al. Heparan sulfate accumulation and perlecan/HSPG2 up-regulation in tumour tissue predict low relapse-free survival for patients with glioblastoma[J]. *Histochem Cell Biol*, 2018, 149(3): 235-244.
- [14] ESTHER S, GABY U E, RUTH L, et al. The heparan sulfate proteoglycan agrin contributes to barrier properties of mouse brain endothelial cells by stabilizing adherens junctions[J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 358(2): 465-479.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 宋雨茜, 李鑫, 周高雅, 等. 硫酸乙酰肝素在脑胶质瘤中的表达及其临床意义 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(16): 23-27.