

Integrin $\alpha 6$ 在人胶质母细胞瘤组织中的表达及其临床意义

赵艳霞,孙华平,陈 胜,吴 坤,谢琳卡

Expression and Clinicopathologic Significance of Integrin $\alpha 6$ in Glioblastoma multiforme

ZHAO Yanxia,SUN Huaping,CHEN Sheng,WU Kun,XIE Linka

Cancer Center,Union Hospital,Tongji Medical College,Huazhong University of Science and Technology,Wuhan 430023,China

Corresponding Author: XIE Linka; E-mail: xlk00200@163.com

Abstract: Objective To investigate the clinicopathological significances of Integrin $\alpha 6$ expression in Glioblastoma multiforme (GBM). **Methods** Integrin $\alpha 6$ expression was assessed in 39 cases of paraffin-embedded GBM and 32 cases of normal samples by immunohistochemistry. Medical records were reviewed and the clinicopathological characteristics or outcomes were evaluated. Furthermore, we examined the association of the Integrin $\alpha 6$ expression with the CD133 expression, which was a marker of glioblastoma stem cells (GSCs). **Results** Integrin $\alpha 6$ expression was significantly higher in GBM than in normal brain tissue ($P<0.01$). Integrin $\alpha 6$ was positively correlated with the expression of CD133 ($P<0.05$) and negatively correlated with the tumor size and subtotal resection and had no significant relationship with patients' age, gender, KPS assessment and postoperative radiochemotherapy. For the patients with positive Integrin $\alpha 6$ expression in GBM, their overall survival time was obviously shorter than those with negative expression ($\chi^2=4.388, P<0.05$). **Conclusion** The overexpression of Integrin $\alpha 6$ is linked to GBM development and progression and is significantly correlated with GSCs. Hence, the expression levels of Integrin $\alpha 6$ is an useful indicators for the clinical assessment of tumor biological behavior in patients with GBM.

Key words: Integrin $\alpha 6$; Glioblastoma multiforme; CD133

摘 要:目的 检测胶质母细胞瘤(GBM)中 Integrin $\alpha 6$ 的表达及其与患者预后和 CD133 表达的关系。**方法** 免疫组织化学方法检测 39 例人胶质母细胞瘤组织和 32 例正常脑组织中 Integrin $\alpha 6$ 和 CD133 的表达,分析 Integrin $\alpha 6$ 与患者临床病理因素、预后和 CD133 之间的关系。**结果** Integrin $\alpha 6$ 蛋白在 GBM 组织中的表达明显高于正常脑组织($P<0.01$),且与 CD133 蛋白表达呈明显正相关($P<0.05$),与患者的年龄、性别、KPS 评分、术后放化疗情况均无明显相关性,而与是否完整切除和肿瘤大小呈明显负相关。Integrin $\alpha 6$ 阳性表达的 GBM 患者总生存期明显短于 Integrin $\alpha 6$ 表达阴性组($P<0.05$)。**结论** Integrin $\alpha 6$ 与 GBM 的发生、发展密切相关,且与肿瘤干细胞密切相关,检测 Integrin $\alpha 6$ 的表达可能对判断胶质母细胞瘤的预后具有一定价值。

关键词:整合素家族成员 $\alpha 6$;胶质母细胞瘤;CD133

中图分类号:R739.41 **文献标识码:**A

0 引言

胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme,GBM)是高度恶性(WHO IV级)的脑胶质瘤,占胶质瘤的

45%~50%,其平均无进展生存期只有6.9月,总平均生存时间仅12~15月^[1]。GBM中存在一群具有自我增殖和多向分化潜能的胶质瘤干细胞(glioblastoma stem cells,GSCs),它们对放化疗有抵抗性,且具有强大的再次形成肿瘤的能力^[2]。

整合素家族成员 $\alpha 6$ (Integrin $\alpha 6$)是细胞外层粘连蛋白(laminnin, LN)的特异性受体,是肿瘤细胞实现细胞-基质黏附的重要分子^[3]。新近体外研究发现 Integrin $\alpha 6$ 调节 GSCs 的功能,针对 Integrin $\alpha 6$ 的靶向干预可以明显抑制 GSCs 自我更新、增殖

收稿日期:2013-01-04;修回日期:2013-02-20
基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(2011CHB011)
作者单位:430023 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院肿瘤中心
通信作者:谢琳卡, E-mail: xlk00200@163.com
作者简介:赵艳霞(1977-),女,博士,主治医师,主要从事乳腺肿瘤和肿瘤干细胞的研究

和肿瘤形成,并显著延长荷瘤小鼠的总生存期^[4]。本研究拟进一步观察 GBM 患者 Integrin α 6 的表达及其与 CD133 阳性表达 GSCs 的关系,初步探讨 Integrin α 6 与 GBM 发生和生物学行为的联系。

1 资料与方法

1.1 资料

收集华中科技大学同济医学院附属协和医院肿瘤中心 2008 年 1 月—2011 年 6 月经本院确诊并手术的 39 例 GBM 手术标本,其中男 21 例,女 18 例;年龄 25~67 岁,平均年龄 42.6 岁。术前均未进行任何放、化疗,所有病例临床资料完整,病理诊断明确,组织标本经 10% 甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,4 μ m 厚连续切片,行常规 HE 染色及免疫组织化学分析使用。本研究符合相关伦理委员会规定。同时选取正常脑组织标本 32 例为对照,均为脑外伤组织、内减压脑组织等。经病理科主治医师确认。其中男 18 例,女 14 例,年龄 20~62 岁,平均年龄 40.7 岁。两组一般临床特征无明显差别。

1.2 方法

应用免疫组织化学染色 EnVision 法,石蜡切片 65℃ 干烤 4 h,脱蜡和水化后,浸入 3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶 15 min,用 0.01 mol/L (pH 6.0) 柠檬酸盐缓冲液进行微波修复抗原 20 min,用免疫组织化学自动染色机 AUTOSTAINER (Lab Vision 公司) 按照标准程序进行两步法染色,其中一抗孵育时间为 1 h,二抗孵育时间为 30 min,DAB 显色时间为 5 min,染色完成后苏木精对比染色。设 0.01 mol/L PBS 代替一抗作为阴性对照,省略一抗为空白对照。鼠抗人 CD133 (ZA-0426) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司,兔抗人 Integrin α 6 (bs-2641R) 购自北京博奥森生物技术有限公司,工作浓度均为 1:100。二抗及 EnVision system 及 DAB 显色系统购自丹麦 DAKO 公司。

1.3 结果判定

结果判定:CD133 和 Integrin α 6 均以胞膜或胞

质中出现明显的棕黄色细颗粒为阳性,参考文献^[5]的方法按如下标准进行评分:随机选择 5 个视野,总共计数 500 个细胞,无细胞着色计 0 分,1%~20% 细胞阳性着色计 1 分,>20%~50% 细胞阳性着色计 2 分,>50% 细胞着色计 3 分。阳性染色强度按以下标准区分:0:无棕黄色;1:微弱棕黄色;2:胞膜或胞质中等强度棕黄色;3:阳性细胞膜或质呈深棕色反应。将上述两种评分之积作为评判标准,分数为 0~1 分者作为阴性表达,2 分或以上者作为阳性表达。

1.4 统计学方法

用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学分析,Integrin α 6 在 GBM 组织中的表达与临床病理因素之间的关系采用 χ^2 检验或 Fisher's 精确检验,Integrin α 6 和 CD133 在 GBM 中表达的相关性采用 Spearman 等级相关分析。生存期的计算从手术日期起到随访日期或由于复发、肿瘤进展而死亡的日期为止,截尾值为 0。应用 Kaplan-Meier 法进行单因素生存分析,差异显著性检验采用时序检验 (Log rank test)。

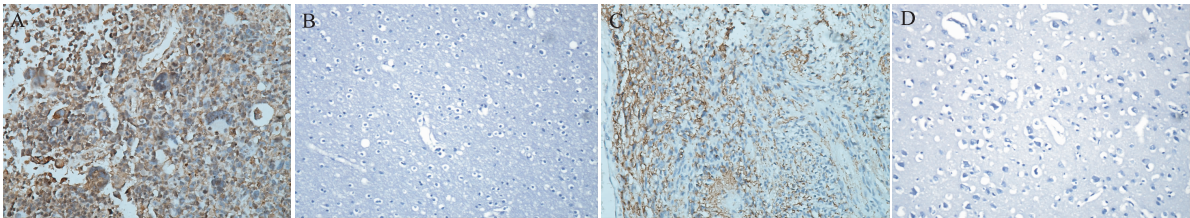
2 结果

2.1 GBM 组织中 Integrin α 6 和 CD133 免疫组织化学染色结果

GBM 中,Integrin α 6 和 CD133 分别有 24 例 (61.5%) 和 26 例 (66.7%) 呈阳性表达,见图 1A、1C,Integrin α 6 和 CD133 主要呈胞膜和胞质染色阳性;而在正常脑组织中,Integrin α 6 和 CD133 分别有 24 例 (75.0%) 和 23 例 (71.9%) 呈阴性表达,见图 1B、1D,仅极少数在胞膜和胞质中有微弱阳性反应。

2.2 Integrin α 6 和 CD133 在 GBM 中表达的关系

对 GBM 组织中 Integrin α 6 和 CD133 的表达进行 χ^2 分析,Integrin α 6 和 CD133 在 GBM 中的表达差异无统计学意义 ($\chi^2 = 4.388, P < 0.05$),见表 1。



A: Integrin α 6 protein express positive in GBM; B: Integrin α 6 protein express negative in normal brain tissue; C: CD133 protein express positive in GBM; D: CD133 protein express negative in normal brain tissue; GBM: glioblastoma multiforme

图 1 Integrin α 6 和 CD133 在 GBM 和正常脑组织中的表达 (EnVision $\times 200$)

Figure 1 Expression of Integrin α 6 and CD133 in GBM and normal brain tissue (EnVision $\times 200$)

表 1 Integrin α6 和 CD133 在 GBM 中表达的关系

Table 1 Correlation between Integrinα6 and CD133 expression in GBM

Project	CD133 negative	CD133 positive	χ^2	<i>P</i>
Integrin α6 positive	8	7		
Integrin α6 negative	5	19	4.388	0.036

2.3 Integrin α6 和 CD133 的表达与 GBM 临床病理特征之间的关系

在 GBM 中, Integrin α6 的表达与患者的年龄 ($P = 0.491$)、性别 ($P = 0.509$)、KPS 评分 ($P = 0.369$)、术后放化疗情况 ($P = 0.556, P = 0.696$) 均无明显相关性, 未完整切除和大肿瘤患者 Integrin α6 的表达分别明显高于完整切除者和小肿瘤患者, 差异均有统计学意义 ($P = 0.021, P = 0.011$), 见表 2。

表 2 Integrin α6 的表达与 GBM 临床病理因素间的关系

Table 2 Correlation of Integrin α6 expression with clinicopathologic feature of GBM

Clinicopathologic parameter		Number	Integrin α6		<i>P</i>
			Negative	Positive	
Total		39	15(38.5)	24(61.5)	
Age(years)	≥55	22	9	13	0.491
	<55	17	6	11	
Gender	Male	21	8	13	0.509
	Female	18	7	11	
KPS score	≥70	22	9	13	0.609
	<70	17	6	11	
Tumor size	≤5cm	25	13	12	0.021
	>5cm	14	2	12	
Complete resection	Yes	21	12	9	0.011
	No	18	3	15	
Postoperation radiotherapy	Yes	32	12	20	0.556
	No	7	3	4	
Postoperation chemotherapy	Yes	30	10	20	0.208
	No	9	5	4	

2.4 生存分析

Kaplan-Meier 生存分析结果显示 GBM 组织中表达 Integrin α6 的患者总生存时间 OS($P = 0.038$) 显著缩短, 见图 2。

3 讨论

整合素家族是细胞表面的黏附分子, 常表达于肿瘤细胞表面, 通过介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质 (extracellularmatrix, ECM) 之间的双向信号

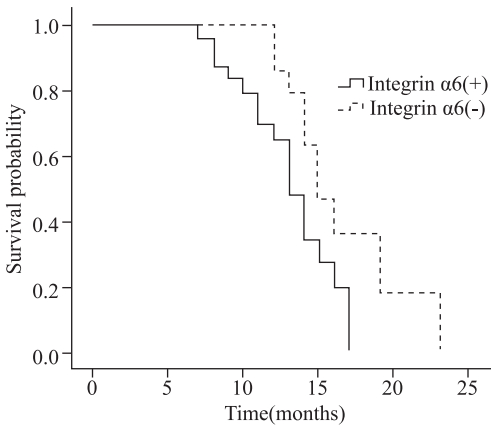


图 2 Kaplan-Meier 生存分析 Integrin α6 表达与 GBM 患者总生存时间的关系

Figure 2 Kaplan-Meier overall and curves of the GBM patients with or without Integrin α6 expression

为传递而影响肿瘤细胞的基因表达和各种生物学行, 与肿瘤的发生、发展和转移有着非常密切的关系。目前已知的整合素有 16 种 α 亚单位和 9 种 β 亚单位。Integrin α6 亚单位是整合素家族分子之一, 主要和 β1 和 β4 亚单位非共价结合形成二聚体而发挥作用, 是细胞外层粘连蛋白(LN)的特异性受体。Previtali 等^[6]在对胶质瘤小鼠移植模型研究后发现: Integrin α6β4 表达在移植小鼠胶质瘤形成的早期阶段, 尤其在胶质瘤增殖活跃区域有较高的表达, 首次提出 Integrinα6β4 表达可能在胶质瘤的发生发展中发挥一定作用。Gingras 等^[7]研究发现 Integrin α6β1 高表达于恶性度较高的胶质瘤组织, 而在正常脑组织中表达量极低。Delamarre 等^[8]研究也发现 Integrin α6β1 表达于多种 GBM 细胞系, 而且高表达 Integrin α6β1 的 GBM 细胞在体内外均表现为更强的细胞增殖和侵袭性。以上研究均提示 Integrin α6 分子与恶性胶质瘤的恶性生物学行为相关, 但 Integrin α6 在人 GBM 组织中的表达以及与预后的关系均无相关报道。本文中通过免疫组织化学染色, 观察到 39 例人胶质母细胞瘤组织中有 24 例(61.5%) Integrin α6 阳性表达, 而在 32 例正常脑组织中仅有 8 例(25%)有阳性表达。通过分析 Integrin α6 的表达与患者临床病理因素之间的关系, 发现虽然 Integrin α6 的表达与患者的年龄、性别、KPS 评分、术后放化疗情况均无关, 但与患者是否完整切除和肿瘤大小相关。鉴于肿瘤呈弥漫浸润性生长特性是 GBM 手术难以完整切除的主要因素之一, 肿瘤大小反映 GBM 的恶性增殖活性, 我们推测 Integrin α6 分子表达可能与 GBM 的恶性增殖和侵袭等生物学行为密切相关, 这与前期体内外研究结果一致。

Integrin 家族与多种肿瘤干细胞功能的调节有一定关系,已有研究报导不同类型的 Integrin 分子可用于富集和筛选前列腺癌干细胞和乳腺癌干细胞,干扰其表达并可抑制前列腺癌干细胞和乳腺癌干细胞的体内成瘤能力^[9-10]。在 GBM 的研究中,Corsini 等^[11]发现 Integrin $\alpha 6$ 通过介导 GCS 与其赖以生存的血管龕状微环境(perivascular niche)间的相互作用,从而调节和维持 GCS 的功能。CD133 分子是人们通常用于富集和筛选 GSCs 的经典表面标志分子^[12],而 Integrin $\alpha 6$ 是新近发现的调节 GSCs 功能的重要分子。我们的研究结果显示:39 例人 GBM 组织中 Integrin $\alpha 6$ 的阳性表达与 CD133 的阳性表达呈明显正相关,而在 32 例正常脑组织中两者均无阳性表达,并且 Integrin $\alpha 6$ 阳性表达的 GBM 患者生存期明显缩短。此结果进一步说明 Integrin $\alpha 6$ 的表达与 GSC 密切相关,检测 Integrin $\alpha 6$ 的表达可能对判断胶质母细胞瘤的预后具有一定价值。

综上所述,本研究初步探讨 Integrin $\alpha 6$ 在 GBM 中表达的意义,发现 Integrin $\alpha 6$ 表达与 GBM 的恶性生物学行为和 GSC 关系密切,靶向遏制 Integrin $\alpha 6$ 可能是清除 GCS、改善患者预后的新的靶点。

参考文献:

[1] Zhang X, Zhang W, Cao WD, *et al.* Glioblastoma multi-forme: Molecular characterization and current treatment strategy[J]. *Exp Ther Med*,2012, 3(1):9-14.

[2] Knights MJ, Kyle S, Ismail A. Characteristic features of stem cells in glioblastomas: from cellular biology to genetics[J]. *Brain Pathol*,2012, 22(5):592-606.

[3] Fu BH, Wu ZZ, Qin J. Effects of integrin $\alpha 6\beta 1$ on migration of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Mol Biol Rep*,2011, 38(5):3271-76.

[4] Lathia JD, Gallagher J, Heddleston JM, *et al.* Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells[J]. *Cell Stem Cell*,2010,6(5):421-32.

[5] Won KY, Kim GY, Kim YW, *et al.* Clinicopathologic correlation of beclin-1 and bcl-2 expression in human breast cancer [J]. *Hum Pathol*,2010,41(1): 107-12.

[6] Previtali SC, Quattrini A, Pardini CL, *et al.* Laminin receptor alpha6beta4 integrin is highly expressed in ENU-induced glioma in rat[J]. *Glia*,1999,26(1):55-63.

[7] Gingras MC, Roussel E, Bruner JM, *et al.* Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multi-forme and autologous normal brain tissue[J]. *J Neuroimmunol*, 1995, 57(1-2):143-53.

[8] Delamarre E, Taboubi S, Mathieu S, *et al.* Expression of integrin alpha6beta1 enhances tumorigenesis in glioma cells[J]. *Am J Pathol*,2009,175(2):844-55.

[9] Vaillant F, Asselin-Labat ML, Shackleton M, *et al.* The mammary progenitor marker CD61/beta3 integrin identifies cancer stem cells in mouse models of mammary tumorigenesis[J]. *Cancer Res*,2008, 68(19):7711-7.

[10] Patrawala L, Calhoun-Davis T, Schneider-Broussard R, *et al.* Hierarchical organization of prostate cancer cells in xenograft tumors: The CD44 + alpha2beta1 + cell population is enriched in tumor-initiating cells[J]. *Cancer Res*,2007, 67: 6796-805.

[11] Corsini NS, Martin-Villalba A. Integrin alpha 6:anchors away for glioma stem cells[J]. *Cell Stem Cell*,2010,6(5):403-4.

[12] Choy W, Nagasawa DT, Trang A, *et al.* CD133 as a marker for regulation and potential for targeted therapies in glioblastoma multiforme[J]. *Neurosurg Clin N Am*,2012, 23(3): 391-405.

[编辑:刘红武;校对:周永红]