

P-Cx43 在人胶质瘤细胞中的表达及其与肿瘤细胞增殖相关性研究

姬云翔,王业忠[△],赵冬,董江涛,田卫东,王刚刚

(石河子大学医学院第一附属医院神经外科,新疆石河子 832000)

[摘要] **目的** 探讨磷酸化缝隙连接蛋白 43(P-Cx43)在人脑胶质瘤细胞中的表达水平及其与肿瘤细胞增殖的相关性。**方法** 该科 2013 年 6 月至 2014 年 6 月手术切除内减压正常脑组织 10 例作为对照组,同时间段切除人脑胶质瘤标本 63 例为试验组。应用 HE 染色、免疫组化法确定胶质瘤性质等级,通过 Ki-67 的染色反映肿瘤细胞增殖情况。采用蛋白质印迹法(Western blot)技术检测 P-Cx43 的表达。**结果** 研究发现,在正常脑组织中,P-Cx43 的表达较 WHO I 级胶质瘤中表达略低,但二者差异无统计学意义($P=0.140$),其余各组间表达差异有统计学意义($P<0.05$)。在各组之间 P-Cx43 表达差异有统计学意义($P<0.01$),呈现逐渐增加的趋势。**结论** P-Cx43 与肿瘤细胞活性和胶质瘤恶性进展密切相关。

[关键词] 细胞增殖;连接蛋白类;细胞系,肿瘤;脑胶质瘤**[中图分类号]** R739.41**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)36-5091-04

Expression of phosphorylation gap junction protein 43 in human glioma and correlation with tumor cell proliferation

Ji Yunxiang, Wang Yezhong[△], Zhao Dong, Dong Jiangtao, Tian Weidong, Wang Ganggang

(Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital, Medical College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression of phosphorylation gap junction protein 43(P-Cx43) level in human gliomas and correlation with tumor cell proliferation. **Methods** Ten cases of normal brain tissue from June 2013 to June 2014 in Department of Neurosurgery were chosen as control group, 63 cases of glioma were resected in the same period of time was experience group. HE staining and immunohistochemistry were used to determine the grade of gliomas, and the proliferation of tumor cells was determined by Ki-67 staining. The expression of P-Cx43 protein was detected by Western blot technique. **Results** It was found that in normal brain tissue, the expression of P-Cx43 was slightly lower than that WHO I in gliomas, but there was no significant difference between the two groups($P=0.140$), there were significant differences among the other groups($P<0.05$). There was a significant difference in P-Cx43 expression between the groups ($P<0.01$), showing a gradually increasing trend. **Conclusion** The P-Cx43 protein was closely related to the activity of tumor cells and the malignant progression of gliomas.

[Key words] cell proliferation; junction proteins; cell line, tumor; brain glioma

脑胶质瘤是最常见的原发性颅内肿瘤,其 5 年病死率在全身肿瘤中仅次于胰腺癌和肺癌,位列第三位^[1]。随着影像技术的不断进步,该肿瘤的检出率日趋增高,因其恶性程度高、术后易复发、预后差等特点,严重威胁人类健康。胶质瘤发生的确切病因尚不清楚。最近几年,一些学者研究发现,连接蛋白及其形成的缝隙连接细胞间通讯与肿瘤发生、增殖、侵袭和转移有密切的关系,在其中起关键作用^[2-3]。与肿瘤联系最为密切的缝隙连接蛋白 43(Cx43)^[4-5]。研究表明,胶质瘤增殖水平与 Cx43 基因表达有相关性^[6-7];但磷酸化 Cx43(P-Cx43)水平与胶质瘤细胞增殖关系的研究罕有报道。本研究立足于胶质瘤发生、发展及其生物学特征相关的基因蛋白表达,对比研究胶质瘤恶性程度与 P-Cx43 水平的关系,探寻脑胶质瘤新的治疗靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本科 2013 年 6 月至 2014 年 6 月手术切除内减压正常脑组织 10 例作为对照组,同时间段切除人脑胶质瘤标本 63 例为试验组。每例胶质瘤标本分成两部分:冰冻保存一部分,以备试验使用;另一部分供病理分型。根据世界卫生组织(WHO)中枢神经系统肿瘤分类标准^[3],确定标本类型,其中提供试验标本 40 例。WHO I 级 10 例:毛细胞星形细胞瘤 7 例,室管膜下巨细胞星形细胞瘤 3 例;WHO II 级 10 例:少突胶质细胞瘤 4 例,弥漫性星形细胞瘤 6 例;WHO III 级 10 例:间变性少突胶质细胞瘤 5 例,间变性少突星形细胞瘤 3 例,间变性室管膜瘤 2 例;WHO IV 级 10 例:胶质母细胞瘤 4 例,髓

母细胞瘤 4 例,胶质肉瘤 2 例。

1.2 主要试剂 人 Ki-67 免疫组化试剂盒,一抗鼠抗人 Ki-67 单克隆抗体,一抗小鼠抗人 Cx43 抗体,兔抗人 P-Cx43 抗体,二抗兔抗鼠辣根过氧化物酶(HRP)标记和山羊抗兔辣根过氧化物酶标记,牛血清白蛋白(BSA),蛋白 Marker,磷酸化蛋白抑制剂,化学增强发光试剂盒,0.45 μm PVDF 膜、丙烯酰胺、 β -actin、TEMED、APS、SDS、溴酚蓝等。

1.3 方法

1.3.1 病理检查 所有术中切除标本送病检后,应用 HE 染色、免疫组化法明确肿瘤性质及细胞增殖情况,并根据 WHO 胶质瘤病理级别判定标准对标本进行分级。免疫组织化学染色(S-P 法)-20 $^{\circ}\text{C}$ 恒冷冰冻切片 5 μm ,丙酮 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 15 min,3% H_2O_2 甲醇孵育 15 min、血清封闭 40 min,鼠抗人 Ki-67 单克隆抗体以 1:100 的比例稀释,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,二抗室温孵育 80 min,HRP 标记链霉卵白素工作液室温孵育 60 min,DAB 溶液显色,苏木素复染,封片。PBS 代替一抗作阴性对照。Ki-67 免疫组化涂片:每例镜下随机采集 10 个视野,以镜下 Ki-67 阳性细胞百分比和染色强度的乘积评分。(1)着色细胞占细胞计数百分率小于 5%计 0 分,5%~25%计 1 分,26%~50%计 2 分,51%~75%计 3 分,>75%计 4 分;(2)无染色计 0 分,染色强度淡黄色计 1 分,棕黄色计 2 分,棕褐色计 3 分;(3)二者计分相乘即阳性等级,0 分提示阴性(-),1~4 分提示弱阳性性(+),5~8 分提示阳性(++),9~12 分提示强阳性(+++)。

1.3.2 蛋白质印迹法(Western blot) 1 000 μ L 组织裂解液、冷冻脑胶质瘤组织进行匀浆,裂解后,在 4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 条件下离心 10 min。取上清液分装后再加入蛋白上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 加热,使其变性 8 min,置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。采用 Western blot 检测 P-Cx43 的表达。在恒压下,进行凝胶电泳,取出胶版。电泳后通过湿法电转移方法转移至 PVDF 膜上,封闭 2 h。封闭结束,洗膜 5 次 \times 5 min。用 5% BAS 按 1:1 000 稀释第一抗体,将膜与一抗置孵育袋中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。用 TBST 洗膜 3 次 \times 10 min。用 5% BSA 稀释按 1:20 000 稀释第二抗体,于室温下孵育 2 h。孵育完成后洗膜 3 次 \times 10 min。膜于化学发光检测试剂反应 2 min,取出膜,甩去多余的液体,感光、显影、定影。

1.4 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析;组间比较采用 χ^2 关联检验;有序变量间差异性采用非参数秩和检验;相关性分析采用 Spearman 等级相关分析进行处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 病检 HE 染色: I 级胶质瘤细胞显示神经元细胞形态正常,排列规则,胞质饱满,细胞核染色较正常,见图 1; II 级胶质瘤细胞显示神经细胞稀疏,排列较规则,数量无减少,神经细胞胞质浓缩红染,胞核紫染,见图 2; III 级胶质瘤细胞显示神经细胞数量稀少,排列不规则、紊乱稀疏,间质水肿疏松,神经细胞胞质浓缩红染,胞核皱缩,见图 3; IV 级胶质瘤细胞显示神经细胞消失、稀疏,排列不规则、紊乱,数量明显减少,间质水肿疏松,神经细胞胞质浓缩红染,胞核皱缩或溶解、碎裂,见图 4。免疫组化染色: Ki-67 阳性表现为胞核棕黄或棕褐色染色, Ki-67 在正常脑组织中表达呈阴性,随着胶质瘤级别升高, Ki-67 染色细胞数目明显增加; Ki-67(-) 未见胞核棕黄或棕褐色染色,见图 5; Ki-67(+) 胞核少量棕黄或棕褐色染色,见图 6; Ki-67(++) 胞核中量棕黄或棕褐色染色,见图 7; Ki-67(+++) 胞核大量棕黄或棕褐色染色,见图 8。

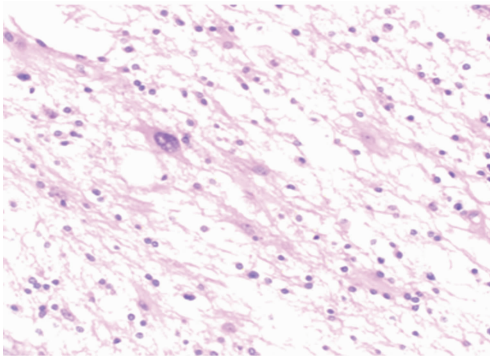


图 1 WHO I 级 HE 染色($\times 200$)

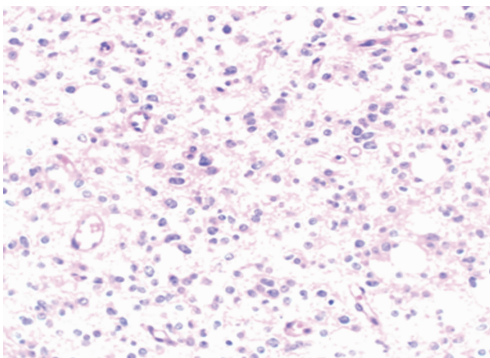


图 2 WHO II 级 HE 染色($\times 200$)

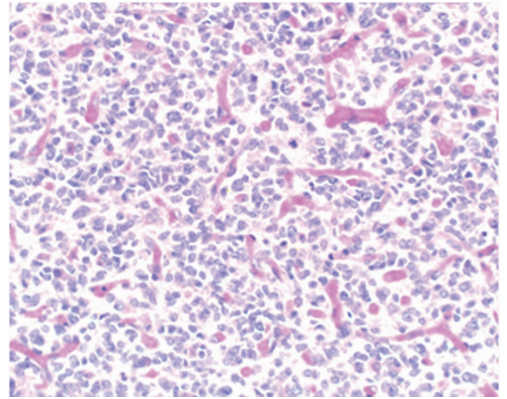


图 3 WHO III 级 HE 染色($\times 200$)

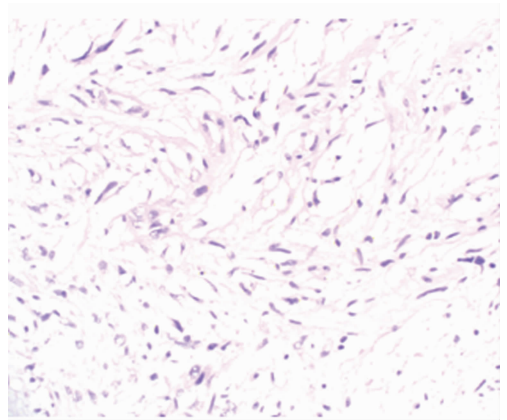


图 4 WHO IV 级 HE 染色($\times 200$)

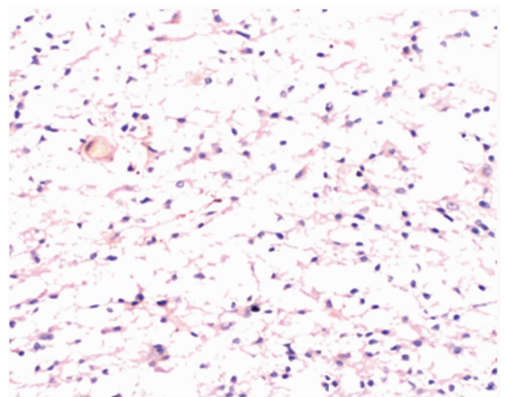


图 5 WHO I 级 Ki-67(-)

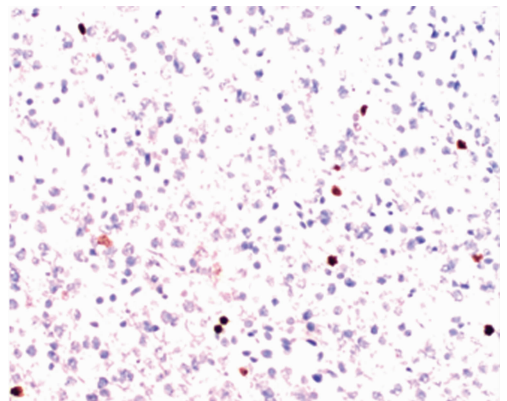


图 6 WHO II 级 Ki-67(+)

2.2 P-Cx43 表达 伴随胶质瘤恶性程度的增加,P-Cx43 的表达逐渐升高($P < 0.05$),见图 9。

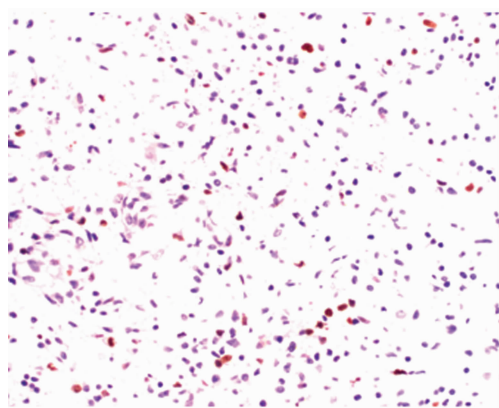


图 7 WHO Ⅲ级 Ki-67(++++)

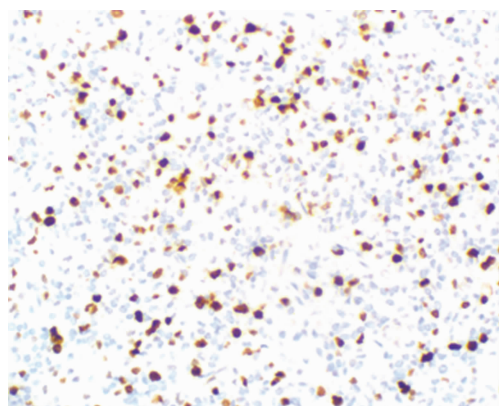
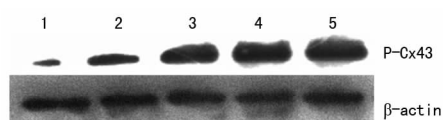


图 8 WHO Ⅳ级 Ki-67(++++)



1:正常脑组织;2~5:分别为 WHO I~Ⅳ级胶质瘤。

图 9 P-Cx43 在各组中表达

2.3 等级资料 Ki-67 在不同级别胶质瘤的表达差异有统计学意义($P < 0.01$),呈现递增态势,见表 1。

表 1 Ki-67 在不同级别胶质瘤中表达和相关性(n)

胶质瘤等级	-	+	++	+++	χ^2	P	Spearman 系数	P
WHO I	6	4	0	0	35	<0.01	0.837	<0.01
WHO II	0	10	0	0				
WHO III	0	6	3	1				
WHO IV	0	0	0	10				

表 2 各组 P-Cx43 的表达情况

组别	n	P-Cx43	F	P
对照组	10	0.3898±0.1359	98.257	<0.01
WHO I	10	0.5215±0.1349		
WHO II	10	1.2403±0.2950		
WHO III	10	1.5545±0.2376		
WHO IV	10	1.7661±0.1085		

2.4 单因素方差分析 各组 P-Cx43 的表达差异有统计学意义($P < 0.01$),胶质瘤等级增加,P-Cx43 表达呈递增的态势,见

表 2。正常脑组织中 P-Cx43 表达较 WHO I 级差异无统计学意义($P = 0.140$),其余各组间的表达差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

2.5 P-Cx43 与 Ki-67 表达的相关性 P-Cx43 和 Ki-67 表达秩相关(spearman)系数为 0.769 9,二者之间呈正相关($P < 0.01$)。

3 讨论

作为颅内最常见肿瘤的胶质瘤,其生物学特性各异,因级别、性质不同有极大的变异性。检测肿瘤增殖活性,对于了解肿瘤分化情况、预测生物学行为、评估预后和抉择治疗方案均有非凡的意义。目前细胞增殖标记物应用最普遍,敏感性及特异性相对较高的是 Ki-67。在细胞有丝分裂的整个周期中,均有 Ki-67 表达,对细胞增殖数量能够更全面、更精确地反映,而且其半衰期短,出现假阳性结果的概率小,因此比评价细胞增殖活性的其他检测方法更具优势。研究表明,随着胶质瘤 WHO 级别升高,肿瘤的恶性程度就越高,其 Ki-67 的表达就越高,反映肿瘤组织的增殖活性能力就越强^[8-9]。本研究结果与既往研究相符,进一步证实胶质瘤增殖潜能与 Ki-67 的表达呈正相关。

近年来,诸多肿瘤基础研究方面发现,连接蛋白、缝隙连接细胞间通讯对肿瘤的发生、发展起到重要调控作用。细胞间隙连接通讯是细胞间信息直接交流的方式,是以细胞间隙连接(gap junction,GJ)为路径构成的。GJ 也是细胞间信息直接交流的惟一膜通道结构,除分化了的骨骼肌、红细胞及睾丸中成熟的精子细胞外,GJ 在所有实质性器官或组织中也广泛存在。通道蛋白 Cxs 组成 GJ。Cxs 是一种蛋白质,具有结构相似而相对分子质量不同的多基因家族编码。在哺乳动物及人体中发现 Cxs 共有 21 种。依相对分子质量不同,Cxs 命名划分为:Cx26、Cx32、Cx37、Cx43 等。目前,GJ 在细胞活动、内环境稳定的维持、生长和发育调控等生命过程中被证明发挥十分关键的作用;链接蛋白表达变化和细胞间隙通讯功能异常,均会导致包括肿瘤等多种疾病的发生^[2-3],是一种极具研究价值的肿瘤治疗新靶点^[10]。多项研究已表明 Cx43 与肿瘤的发生、转移和治疗均有紧密联系^[11-12]。因此,对 Cx43 表达的调控可以作为对肿瘤生物学特性控制的方法之一。

连接蛋白大半可归属于磷蛋白,只是它们的磷酸化水平不同。磷酸化是蛋白转录后常见的一种修饰,调控细胞间信号传导方式主要是通过蛋白激酶和蛋白磷酸化酶的相互作用,并调控着许多细胞内过程。这些过程可能参与涉及 Cx 转运、组装、解离、降解及通道的门控等各个环节。目前研究证实,P-Cx43 与肝癌的发生^[13]、卵巢上皮癌的生物学特性密切相关^[14]。但少见 P-Cx43 水平与胶质瘤细胞增殖关系的报道。

本研究通过对标本进行 P-Cx43 表达水平检测,发现:对照组脑组织 P-Cx43 均呈现低表达,在低级别胶质瘤细胞中也仅仅是部分表达,随着胶质瘤级别升高,P-Cx43 表达水平呈上升趋势($P < 0.05$)。P-Cx43 水平在胶质瘤中,随着肿瘤恶性程度的增加而升高,与其增殖程度呈正相关。本研究认为,在低级别胶质瘤中,P-Cx43 受到某种机制的阻碍,而在高级别胶质瘤中,P-Cx43 的能力被极大提高,导致其蛋白表达显著升高。种种迹象均提示:在 Cx43 蛋白磷酸化过程中存在某种协同调节细胞增殖周期的机制,可以促进肿瘤细胞的增殖活性。

P-Cx43 可能有促进胶质瘤发生及向高级别转化作用,而 Cx43 抑制胶质瘤发生、发展。已有研究显示 miRNA 可间接调节脑胶质瘤的生长和发育。Jin 等^[15]研究显示 miR-125 通过抑制 Cx43 部分地促进胶质瘤生长。如此,就可以假设增加 Cx43 的表达可以抑制胶质瘤的发生。Yu 等^[16]对此进行了实

验证,他们对胶质瘤细胞引入外源性 Cx43,可逆转胶质瘤细胞的恶性表现,甚至可逆转胶质瘤干细胞的恶性表现。调控 miRNA 识别特定的目标 mRNA 和转录后水平促进 Cx43 翻译从而抑制胶质瘤发生,那么假设抑制或阻滞 Cx43 磷酸化是否可以减缓胶质瘤的生长甚至抑制其发生,miRNA 是否参与 P-Cx43 基因表达,它们之间存在怎么样的联系,种种假设和疑问还有待进一步研究。

综上所述,P-Cx43 水平变化与人胶质瘤细胞增殖性密切相关,这可能是由于多种致癌因素协同参与了肿瘤的发生、发展。在这一领域深入研究,可以进一步了解胶质瘤生物学病因提供重要途径。

参考文献

[1] Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, et al. Epidemiology of brain tumors[J]. *Neurol Clin*, 2007, 25(4): 867-890.

[2] Vinken M, Vanhaecke T, Papeleu P, et al. Connexins and their channels in cell growth and cell death[J]. *Cell Signal*, 2006, 18(5): 592-600.

[3] Mesnil M, Crespin S, Avanzo JL, et al. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1719(1/2): 125-145.

[4] Elzarrad MK, Haroon A, Wiilecke K, et al. Connexin-43 upregulation in tumor cell and tumor vasculature and its role attachment to pulmonary endothelium [J]. *BMC Med*, 2008, 6: 20.

[5] Mclachlan E, Shao Q, Laird DW. Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression[J]. *J Membr Biol*, 2007, 218(1/2/3): 107-121.

[6] Ozog MA, Bechberger JF, Naus CC. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) in combination with its soluble receptor (CNTFRalpha) increases connexin43 expression and sup-

presses growth of C6 glioma cells[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(12): 3544-3548.

[7] 宋国智,李利敏,焦保华,等. 人脑胶质瘤 Cx43 基因表达及其与肿瘤细胞增殖关系的研究[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2009, 9(5): 489-493.

[8] 邱吉庆,闫世军,赵刚,等. Ki-67 表达强度对人脑胶质瘤恶性度的评价[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2001, 18(2): 17-19.

[9] 武文浩,马俊艳,万虹,等. β -catenin 和 Ki-67 在脑干胶质瘤中的表达及意义[J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2010, 15(4): 172-174.

[10] 范高福,童旭辉,陶亮. 缝隙连接:一个潜在的肿瘤治疗新靶点[J]. *蚌埠医学院学报*, 2012, 37(2): 234-237.

[11] Tang B, Peng ZH, Yu PW, et al. Expression and significance of Cx43 and E-cadherin in gastric cancer and metastatic lymph nodes [J]. *Med Oncol*, 2011, 28(2): 502-508.

[12] 徐灿霞,贾燕,杨文斌,等. 胃癌和癌前病变患者 Cx32, Cx43 表达与幽门螺杆菌感染的相关性[J]. *中华医学杂志*, 2008, 88(22): 1523-1527.

[13] 马向东,马兴,隋延仿,等. 肝细胞肝癌和正常肝细胞间隙连接蛋白 Connexin32, Connexin43 蛋白质酪氨酸磷酸化分析[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2002, 8(8): 45-47.

[14] 李醒,廖秦平. 间隙连接蛋白 43 的磷酸化调节在卵巢上皮性癌化疗耐药中的作用[J]. *中华妇产科杂志*, 2009, 44(1): 50-55.

[15] Jin Z, Xu S, Yu H, et al. miR-125b inhibits connexin43 and promotes glioma growth[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2013, 33(8): 1143-1148.

[16] Yu SC, Xiao HL, Jiang XF, et al. Connexin 43 reverses malignant phenotypes of glioma stem cells by modulating E-cadherin[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(2): 108-120.

(收稿日期:2016-07-18 修回日期:2016-09-06)

(上接第 5090 页)

standard ablative percutaneous treatments? [J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2013, 2(4): 184-187.

[13] Cheung TT, Fan ST, Chan SC, et al. High-intensity focused ultrasound ablation; an effective bridging therapy for hepatocellular carcinoma patients[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(20): 3083-3089.

[14] Cheung TT, Fan ST, Chu FS, et al. Survival analysis of high-intensity focused ultrasound ablation in patients with small hepatocellular carcinoma[J]. *HPB (Oxford)*, 2013, 15(8): 567-573.

[15] Zhu J, Zhu H, Mei Z, et al. High-intensity focused ultrasound ablation for treatment of hepatocellular carcinoma and hypersplenism: preliminary study [J]. *J Ultrasound Med*, 2013, 32(10): 1855-1862.

[16] Cui L, Liu XX, Jiang Y, et al. Comparative study on transcatheter arterial chemoembolization, portal vein embol-

ization and high intensity focused ultrasound sequential therapy for patients[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(12): 6257-6261.

[17] Ni S, Liu L, Shu Y. Sequential transcatheter arterial chemoembolization, three-dimensional conformal radiotherapy, and high-intensity focused ultrasound treatment for unresectable hepatocellular carcinoma patients [J]. *J Biomed Res*, 2012, 26(4): 260-267.

[18] 柯庆华,苏小岩,周世琼,等. 超声聚焦刀联合三维适形放疗治疗原发性肝癌的疗效分析[J]. *实用癌症杂志*, 2011, 26(2): 184-187.

[19] 姚晖,龚金兰,李莉,等. 立体定向放疗联合高强度聚焦超声治疗原发性肝癌的临床研究[J]. *实用癌症杂志*, 2014, 29(1): 29-32, 50.

(收稿日期:2016-07-22 修回日期:2016-10-06)