

90K/ Mac-2 BP 在人脑星形细胞瘤中的表达

陈鑫 刘运生 刘志雄 杨魁 李春涛 曾瑜 龚璇 陈敏

中南大学湘雅医院神经外科,湖南 长沙 410008

摘要:目的 分析 90K/ Mac-2 BP (Mac-2 binding protein) 在人脑星形细胞瘤中的表达。方法 RT-PCR 和 WB (Western blot) 检测 90K 蛋白在人脑星形细胞瘤以及正常脑组织中的表达。结果 RT-PCR 发现 90K mRNA 在正常脑组织中微量表达,相对表达量为 0.116 ± 0.017 ;而在人脑星形细胞瘤中高表达,相对表达量为 0.407 ± 0.151 ,两组相比有显著差异 ($t = 6.065, P < 0.05$)。低级别组 (WHO I-II 级) 与高级别组 (WHO III-IV 级) 相对表达量分别为 0.295 ± 0.067 和 0.516 ± 0.128 ,两组相比有显著差异 ($t = 8.138, P < 0.05$)。WB 发现 90K 蛋白在正常脑组织中微量表达,相对表达量为 0.291 ± 0.064 ,星形细胞瘤中 90K 蛋白相对表达量为 1.163 ± 0.391 ,两组相比有显著差异 ($t = 15.68, P < 0.05$)。低级别组与高级别组 90K 蛋白相对表达量分别为 0.902 ± 0.272 和 1.415 ± 0.318 ,两组相比有显著差异 ($t = 6.539, P < 0.05$)。WB 结果表明 90K 蛋白在星形细胞瘤中的表达情况与 RT-PCR 结果表明 90K mRNA 在星形细胞瘤中的表达情况一致。结论 90K 在星形细胞瘤中的表达显著升高,高级别星形细胞瘤中的表达较低级别更高,提示 90K 可能在星形细胞瘤的发生发展过程中发挥了重要作用,90K 蛋白可能是星形细胞瘤相关抗原,在今后的免疫治疗中可能作为一种目标抗原。

关键词: 90K/ Mac-2 BP; 星形细胞瘤; RT-PCR; Western blot

Expression of 90K/ Mac-2 BP in human brain astrocytic tumors

CHEN Xin, LIU Yun-sheng, LIU Zhi-xiong, YANG Kui, LI Chun-tao, ZENG Yu, GONG Xuan, CHEN Min. Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Abstract: Objective To investigate the expression of 90K mRNA and protein in human brain astrocytomas. **Methods** The expression of 90K mRNA in human normal brain tissue and astrocytoma tissue was detected by RT-PCR; The expression of 90K protein in human normal brain tissue and astrocytoma tissue was detected by WB. **Results** RT-PCR reveal that 90K mRNA was lowly expressed in normal human brain tissues (0.116 ± 0.017). The 90K mRNA expression was significantly higher in astrocytomas (0.407 ± 0.151) than that in normal human brain tissues ($t = 6.065, P < 0.05$), and significantly higher in high grade astrocytomas (WHO III-IV) (0.516 ± 0.128) than in low grade (WHO I-II) (0.295 ± 0.067) ($t = 8.138, P < 0.05$). WB reveal that 90K protein was lowly expressed in normal human brain tissues (0.291 ± 0.064). The 90K protein expression was significantly higher in astrocytomas (1.163 ± 0.391) than that in normal human brain tissues ($t = 15.68, P < 0.05$), and significantly higher in high grade astrocytomas (1.415 ± 0.318) than in low grade (0.902 ± 0.272) ($t = 6.539, P < 0.05$). The expression of 90K mRNA was in accordance with the expression of 90K protein both in astrocytomas and normal human brain tissues. **Conclusions** 90K expressed positive in astrocytomas. The expression of 90K is higher in higher grade astrocytomas. 90K may contribute to occurrence and progression of astrocytomas. 90K protein may be a astrocytomas-associated antigen and target antigen in immunotherapy.

Key words: 90K/ Mac-2 BP; astrocytomas; RT-PCR; Western blot

胶质瘤是原发性人脑肿瘤中最常见的类型^[1],主要分为四种:星形细胞瘤,少突神经胶质瘤,室管膜瘤,以及混合胶质瘤(主要是少突星形细胞瘤),其中星形细胞瘤为最常见类型。在星

收稿日期:2012-04-24;修回日期:2012-10-19

作者简介:陈鑫(1983-),男,博士研究生,主要研究方向:脑外伤、脑肿瘤的临床基础研究。

通讯作者:刘运生,男,湘雅医院神经外科教授,博士生导师,主要研究方向:脑外伤、脑水肿的临床研究。

形细胞瘤发生过程中有多种基因表达失常,同时其他基因的共同协作以及机体免疫微环境的改变等也是发病的重要原因^[2]。90K/Mac-2 BP是由许多分子量约为90 KD的亚型组成的大型低聚糖蛋白,作为配体与GL-3 (Galectins, GL半乳糖凝集素)结合^[3,4]。最初是由研究者在人类乳腺癌细胞中被当作一种肿瘤相关性抗原而发现,由于其分子量约为90 KD,因此也被称作90K。在之后的研究中发现90K也结合GL家族的其他亚型如GL-1、GL-7^[5,6],因此Mac-2 BP这一名称逐渐被90K所代替。此前大量研究显示90K在多种恶性肿瘤中存在高表达,而在中枢神经系统恶性肿瘤中则未见相关报道。本研究采用RT-PCR和WB方法检测90K在星形细胞瘤中的表达,探讨90K在星形细胞瘤发生发展过程中可能发挥的作用。

1 临床资料与方法

1.1 一般资料

作者共收集中南大学湘雅医院神经外科2011年6月~2011年9月进行手术切除的57例人脑星形细胞瘤新鲜标本,另外再选择10例原发性癫痫或脑外伤手术患者正常脑组织标本为对照组。所以标本均在手术中无菌取得,液氮运输至-80℃低温冰箱长期保存。其中男性30例,女性27例;年龄为3~70岁,平均年龄为 34.88 ± 15.94 岁;按病理分级分为低级别组(WHO分级I-II级)28例和高级别(WHO分级III-IV级)29例。57例患者手术后全都经病理组织学检查为星形细胞瘤,所有患者均为第一次手术,手术前未经放射治疗或者化学治疗。

1.2 RT-PCR检测90K mRNA在人脑星形细胞瘤中的表达

标本提取总RNA,逆转录合成cDNA。扩增体系为25 ul, Template (反转录产物)1.0 ul,上下游引物各0.5 ul, 0.05 units/ul Taq DNA Polymerase in reaction buffer, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTP。置于PCR仪上,扩增程序为95℃变性5 min后,然后℃变性30 s, 55℃复性30 s, 72℃延伸30 s,共40次循环。最后72℃延伸5 min,至4℃完成扩增。90K扩增引物序列为:上游5-CTCACCGAGGATACCTACAA-3,下游5-GAAGGACTGGTAGGGGTAGT-3,扩增片段长189 bp。内参GAPDH扩增引物序列为:上游5-AC-CACAGTCCATGCCATCAC-3,下游5-TCCACCACCCTGT-

TGCTGTA-3,扩增片段长450 bp。扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,结果在图像处理系统上分析,得出90K、GAPDH的光密度,以GAPDH的光密度为参考物,求出90K光密度与之相比的相对值,得到90K mRNA相对表达量,计算公式如下:

90K mRNA 相对含量 = 90K mRNA OD 值 / GAPDH mRNA OD 值

1.3 WB检测90K蛋白在人脑星形细胞瘤中的表达

取组织标本剪碎、匀浆,将匀浆液超声3次后9000 rpm离10 min,留取上清液-20℃冻存。取组织蛋白上清液与SDS样品缓冲液混合,在100℃加热三分钟以使蛋白质变性,离心留裂解液。取裂解液在200 V电压下电泳,待溴酚蓝迁移到分离胶底部0.5 cm处,关闭电源,卸下凝胶玻璃板,用去离子水冲洗干净。将凝胶与膜置于滤纸之间,4℃预冷的转移缓冲液中电转70 min,电转完毕后,将电转膜置于5%的脱脂奶粉(PBS配制)中封闭,37℃2小时或4℃过夜。与一抗(鼠抗人90K抗体)孵育2 h或4℃过夜;再与二抗(酶标记羊抗兔IgG抗体)室温孵育1 h或4℃过夜,PBST洗脱4次,每次5~10 min。显色后阳性条带以Gel pro4.0版凝胶光密度分析软件进行分析,测其IOD(累积光密度参考值)。

1.4 统计学方法

- ①两样本均数比较采用成组t检验;
- ②所有数据均使用SPSS 18.0软件进行统计学分析。
- ③所有统计检验显著性水平为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 星型细胞瘤和正常脑组织90K mRNA表达结果

星型细胞瘤和正常脑组织90K mRNA RT-PCR结果见图1。RT-PCR结果显示在正常脑组织有少量的90K mRNA表达,而在星形细胞瘤中表达则显著升高。正常脑组织中90K mRNA相对表达量为 0.116 ± 0.017 ,星形细胞瘤中90KmRNA相对表达量为 0.407 ± 0.151 ,两组相比有显著差异($t = 6.065, P < 0.05$)。低级别星形细胞瘤中90K mRNA相对表达量为 0.295 ± 0.067 ,高级别星形细胞瘤中90K mRNA相对表达量为 0.516 ± 0.128 ,两组相比有显著差异($t = 8.138, P < 0.05$)。(结

果见表 1)

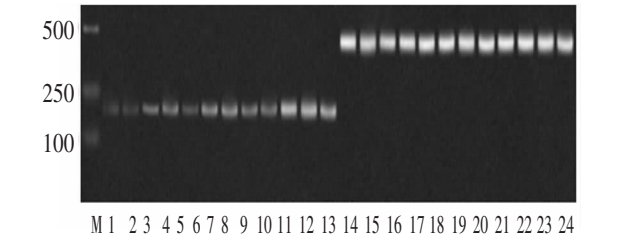


图 1 RT-PCR 分析星形细胞瘤和正常脑组织 90K mRNA 的表达情况。其中 13-24 号标本分别是 1-12 号标本的内参。1-2 号标本为正常脑组织,3-6 号标本为低级别星形细胞瘤,7-12 号标本为高级别星形细胞瘤

表 1 星形细胞瘤和正常脑组织 90K mRNA 的表达

分组	例数(n)	90K mRNA(IOD)
正常脑组织	10	0.116 ± 0.017
星形细胞瘤	57	0.407 ± 0.151★
低级别(I-II级)	28	0.295 ± 0.067
高级别(III-IV级)	29	0.516 ± 0.128★★

注:与正常脑组织相比,★ $t=6.065, P<0.05$;与低级别星形细胞瘤相比,★★ $t=8.138, P<0.05$

2.2 星形细胞瘤和正常脑组织 90K 蛋白表达结果

星形细胞瘤和正常脑组织 90K 蛋白 Western blot 结果见图 2。Western blot 结果显示在正常脑组织有少量的 90K 蛋白表达,而在星形细胞瘤中表达则显著升高。正常脑组织中 90K 蛋白相对表达量(90K IOD 值/GAPDH IOD 值)为 0.291 ± 0.064 ,星形细胞瘤中 90K 蛋白相对表达量为 1.163 ± 0.391 ,两组相比有显著差异($t=15.68, P<0.05$)。低级别星形细胞瘤中 90K 蛋白相对表达量为 0.902 ± 0.272 ,高级别星形细胞瘤中 90K 蛋白相对表达量为 1.415 ± 0.318 ,两组相比有显著差异($t=6.539, P<0.05$)。(结果见表 2)

表 2 星形细胞瘤和正常脑组织 90K 蛋白的表达

分组	例数(n)	90K 蛋白/GAPDH(IOD)
正常脑组织	10	0.291 ± 0.064
星形细胞瘤	57	1.163 ± 0.39★
低级别(I-II级)	28	0.902 ± 0.272
高级别(III-IV级)	29	1.415 ± 0.318★★

注:与正常脑组织相比,★ $t=15.68, P<0.05$;与低级别星形细胞瘤相比,★★ $t=6.539, P<0.05$

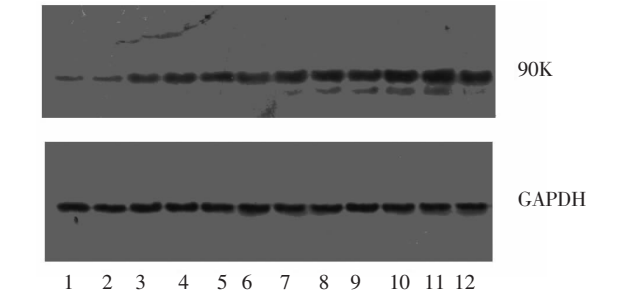


图 2 星形细胞瘤和正常脑组织 90K 蛋白表达情况。1-2 号标本为正常脑组织,3-6 号标本为低级别星形细胞瘤,7-12 号标本为高级别星形细胞瘤。GAPDH:450 bp 90K:189 bp

3 讨论

90K 蛋白属于 SRCR (Scavenger Receptor Cysteine-Rich, 富半胱氨酸清道夫受体) 领域超家族,这个家族的其他蛋白还包括 CD5, CD6, M130, 补体因子 1, 以及一些参与免疫防御和免疫调节的蛋白^[7]。90K 蛋白的一个显著特征是其低聚物在电子显微镜下呈大型环形结构^[8]。90K 蛋白由许多不同种类的细胞合成并分泌,主要为造血细胞、腺状或者黏膜上皮细胞^[3, 4]。90K 蛋白在血清以及其他体液如脑脊液、乳汁、精液中存在,其浓度范围在 $\mu\text{g/ml}$ 内^[4, 9]。Ullrich 等人^[3]通过 RT-PCR 检测发现,在许多人正常组织中,90K mRNA 也有不同水平的表达,其中胃、肺、结肠和十二指肠表达量最高,而前列腺、小肠、卵巢等组织中表达稍低,而在大脑、骨髓、肝脏以及肾脏中则只有微量表达。在一些疾病中血清 90K 蛋白水平的显著升高,如病毒性乙肝和丙肝, HIV (Human Immunodeficiency Virus, 人类免疫缺陷病毒), 自身免疫性疾病和癌症等^[10-14]。

使用 ELISA 可以检测出癌症及其他疾病患者的血清 90K 蛋白水平。在健康人的血清中,大部分人的 90K 蛋白浓度小于 $11 \mu\text{g/ml}$;与此相反的是在 90K 表达升高的大部分癌症患者中,血清 90K 蛋白浓度都大于 $11 \mu\text{g/ml}$ 。此前许多研究表明升高的血清 90K 水平与癌症患者的预后相关^[15-21]。Tinari 等人^[22]研究了未发生淋巴结转移且未接受系统性辅助治疗的乳腺癌患者的 90K 蛋白表达情况。170 例患者中有 43 例 (25.3%) 90K 蛋白表达明显升高 (IRS > 8 分), 90K 蛋白水平表达高者远处复发以及总死亡率较表达低者明显升高,经过多因素分析后 90K 蛋白表达水平是乳腺癌复发和死亡的主要危

险因素。因此作者认为检测 90K 蛋白表达水平对于判断未发生淋巴结转移的乳腺癌患者的发生复发和死亡具有重要意义。Ozaki 等人^[23]研究了肺癌中 90K 蛋白的表达情况以及其作为一种肿瘤相关抗原的免疫原性。作者通过 RT-PCR 以及免疫组化检测了 8 个细胞株和 28 例肺癌组织标本中 90K mRNA 以及蛋白的表达情况。RT-PCR 结果显示有 7 个细胞株 (87.5%) 和 17 例肺癌组织标本 (60.7%) 90K mRNA 表达升高,免疫组化的结果也显示 90K 蛋白在肺癌组织中也有着类似的表达。而 ELISA 检测结果只有 30.4% 的患者血清 90K 蛋白水平升高,但在所有血清 90K 蛋白升高的患者中均检测到了 90K 相关的 IgG (immunoglobulin G, 免疫球蛋白 G)。此研究的结论认为肺癌中 90K 的表达明显升高,并且作为一种肺癌相关抗原 90K 蛋白有足够的免疫原性引起相关的免疫反应。90K 蛋白可能成为一种有用的肺癌肿瘤标记物,并在其免疫治疗中将其作为一种目标抗原。Lacovazzi 等人^[24]研究了未发生远处转移的结肠癌患者血清中 GL-3 与 90K 蛋白的表达水平,发现这两种糖蛋白表达均明显升高,并认为 GL-3 的表达与肿瘤转移有关,而 90K 的表达可能介导了结肠癌肿瘤的分型。Ulmer 等人^[25]研究了在结肠癌细胞中 90K 蛋白的生物学特性,认为 90K 是 MMP-2、MMP-7 和 MMP-9 的一种新型酶作用物,并且能够调节 MMP-7 前体在 HT-29 中的表达水平,同时推测 90K 蛋白水解物在结肠癌中发挥了一定的生物学作用。

总结以上研究发现,90K 蛋白在人类多种恶性肿瘤中均有不同程度的表达,在恶性肿瘤的发生发展过程中发挥了一定的生物学特性。而此前对于 90K 蛋白是否在中枢神经系统恶性肿瘤尤其是星形细胞瘤中存在表达则未见有相关报道。本研究采用 RT-PCR 和 WB 方法检测发现 90K 蛋白在星形细胞瘤中高表达,且在高级别星形细胞瘤中的表达较高级别更高,因此我们推测,在星形细胞瘤的发生发展过程中,90K 蛋白发挥了重要的生物学作用。

近年来许多针对胶质瘤的免疫治疗研究发现这种治疗方法有望改善胶质瘤患者的预后^[26-30]。90K 蛋白作为一种新发现的星形细胞相关抗原,在今后对于星形细胞瘤的免疫治疗中有可能成为目标抗原而发挥治疗作用。至于 90K 蛋白是否能作为一种生物学标记物早期诊断星形细胞瘤的发生,以及

判断星形细胞瘤的预后,还需进一步的研究来论实。

参 考 文 献

- [1] Okada H, Kohanbash G, Zhu X, et al. Immunotherapeutic approaches for glioma. *Crit Rev Immunol*, 2009, 29 (1): 1-42.
- [2] Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Arjona D, et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in astrocytic gliomas. *Int J Oncol*, 2003, 22 (3): 601-608.
- [3] Ullrich A, Sures I, D'Egidio M, et al. The secreted tumor-associated antigen 90K is a potent immune stimulator. *J Biol Chem*, 1994, 269 (28): 18401-18407.
- [4] Koths K, Taylor E, Halenbeck R, et al. Cloning and characterization of a human Mac-2-binding protein, a new member of the superfamily defined by the macrophage scavenger receptor cysteine-rich domain. *J Biol Chem*, 1993, 268 (19): 14245-14249.
- [5] Tinari N, Kuwabara I, Huflejt ME, et al. Glycoprotein 90K/MAC-2BP interacts with galectin-1 and mediates galectin-1-induced cell aggregation. *Int J Cancer*, 2001, 91 (2): 167-172.
- [6] André S, Pieters RJ, Vrasidas I, et al. Wedgelike glycodendrimers as inhibitors of binding of mammalian galectins to glycoproteins, lactose maxicusters, and cell surface glycoconjugates. *ChemBiochem*, 2001, 2 (11): 822-830.
- [7] Resnick D, Pearson A, Krieger M. The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19 (1): 5-8.
- [8] Sasaki T, Brakebusch C, Engel J, et al. Mac-2 binding protein is a cell-adhesive protein of the extracellular matrix which self-assembles into ring-like structures and binds beta1 integrins, collagens and fibronectin. *EMBO J*, 1998, 17 (6): 1606-1613.
- [9] Iacobelli S, Arnò E, D'Orazio A, et al. Detection of antigens recognized by a novel monoclonal antibody in tissue and serum from patients with breast cancer. *Cancer Res*, 1986, 46 (6): 3005-3010.
- [10] Artini M, Natoli C, Tinari N, et al. Elevated serum levels of 90K/MAC-2 BP predict unresponsiveness to alpha-interferon therapy in chronic HCV hepatitis patients. *J Hepatol*, 1996, 25 (2): 212-217.
- [11] Natoli C, Dianzani F, Mazzotta F, et al. 90K protein: a new predictor marker of disease progression in human immunodeficiency virus infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1993, 6 (4): 370-375.
- [12] Briggs NC, Natoli C, Tinari N, et al. A 90-kDa protein serum marker for the prediction of progression to AIDS in a cohort

- of HIV-1 + homosexual men. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1993, 9(9): 811-816.
- [13] Pelliccia P, Natoli C, Petitti MT, et al. Elevated levels of circulating immunostimulatory 90K in Henoch-Schoenlein purpura. *J Clin Immunol*, 1999, 19(2): 143-147.
- [14] Iacobelli S, Arno E, Sismondi P, et al. Measurement of a breast cancer associated antigen detected by monoclonal antibody SP-2 in sera of cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 1988, 11(1): 19-30.
- [15] Scambia G, Panici PB, Baiocchi G, et al. Measurement of a monoclonal -antibody-defined antigen (90K) in the sera of patients with ovarian cancer. *Anticancer Res*, 1988, 8(4): 761-764.
- [16] Natoli C, Garufi C, Tinari N, et al. Dynamic test with recombinant interferon- α -2b: effect on 90K and other tumour-associated antigens in cancer patients without evidence of disease. *Br J Cancer*, 1993, 67(3): 564-567.
- [17] Iacobelli S, Sismondi P, Giai M, et al. Prognostic value of a novel circulating serum 90K antigen in breast cancer. *Br J Cancer*, 1994, 69(1): 172-176.
- [18] Rea A, Palmieri G, Tinari N, et al. 90k is a serum marker of poor-prognosis in non-hodgkins-lymphoma patients. *Oncol Rep*, 1994, 1(4): 723-725.
- [19] Zeimet AG, Natoli C, Herold M, et al. Circulating immunostimulatory protein 90K and soluble interleukin-2-receptor in human ovarian cancer. *Int J Cancer*, 1996, 68(1): 34-38.
- [20] Marchetti A, Tinari N, Buttitta F, et al. Expression of 90K (Mac-2 BP) correlates with distant metastasis and predicts survival in stage I non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res*, 2002, 62(9): 2535-2539.
- [21] Fornarini B, D' Ambrosio C, Natoli C, et al. Adhesion to 90K (Mac-2 BP) as a mechanism for lymphoma drug resistance in vivo. *Blood*, 2000, 96(9): 3282-3285.
- [22] Tinari N, Lattanzio R, Querczoli P, et al. High expression of 90K (Mac-2 BP) is associated with poor survival in node-negative breast cancer patients not receiving adjuvant systemic therapies. *Int J Cancer*, 2009, 124(2): 333-338.
- [23] Ozaki Y, Kontani K, Hanaoka J, et al. Expression and immunogenicity of a tumor-associated antigen, 90K/Mac-2 binding protein, in lung carcinoma. *Cancer*, 2002, 95(9): 1954-1962.
- [24] Iacovazzi PA, Notarnicola M, Caruso MG, et al. Serum levels of galectin-3 and its ligand 90k/mac-2bp in colorectal cancer patients. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2010, 32(1): 160-164.
- [25] Ulmer TA, Keeler V, Andre S, et al. The tumor-associated antigen 90K/Mac-2-binding protein secreted by human colon carcinoma cells enhances extracellular levels of promatrilysin and is a novel substrate of matrix metalloproteinases-2, -7 (matrilysin) and -9; Implications of proteolytic cleavage. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1800(3): 336-343.
- [26] Li Z, Lee JW, Mukherjee D, et al. Immunotherapy targeting glioma stem cells-insights and perspectives. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12(2): 165-178.
- [27] Maes WS, Van Gool W. Experimental immunotherapy for malignant glioma: lessons from two decades of research in the GL261 model. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60(2): 153-160.
- [28] Daga A, Bottino C, Castriconi R, et al. New perspectives in glioma immunotherapy. *Curr Pharm Des*, 2011, 17(23): 2439-2467.
- [29] Ohno M, Natsume A, Ichiro Iwami K, et al. Retrovirally engineered T-cell-based immunotherapy targeting type III variant epidermal growth factor receptor, a glioma-associated antigen. *Cancer Sci*, 2010, 101(12): 2518-2524.
- [30] Dietrich PY, Dutoit V, Tran Thang NN, et al. T-cell immunotherapy for malignant glioma: toward a combined approach. *Curr Opin Oncol*, 2010, 22(6): 604-610.