

VEGF、BMP-2、BMP-7 蛋白在复发脑胶质瘤术后的表达及分析

罗赤星 全中平 张 铭 周 波 王少波 罗心凯 黄义志

摘 要 **目的** 探讨血管内皮生长因子(VEGF)、重组人骨形态发生蛋白-2(BMP-2)、重组人骨形态发生蛋白-7(BMP-7)在原发和复发脑胶质瘤患者术后瘤组织中的表达及临床意义。**方法** 回顾性分析笔者医院神经外科 2012 年 1 月~2015 年 1 月 72 例脑胶质瘤患者首次手术及复发后再手术的完整临床资料和瘤组织标本,采用免疫组化法检测所有患者原发及复发标本蜡块中 VEGF、BMP-2、BMP-7 蛋白阳性表达水平,分析其与性别、年龄、WHO 病理分级、脑胶质瘤原发或复发等临床病理资料的关系。**结果** 对复发脑胶质瘤患者临床病理资料采用 Spearman 等级相关分析结果显示,VEGF 蛋白表达与 WHO 病理分级($r_{\text{VEGF}}=0.375$)及原发、复发情况相关($r_{\text{VEGF}}=0.319$),BMP-2、BMP-7 蛋白表达与原发、复发情况相关($r_{\text{BMP-2}}=0.492$, $r_{\text{BMP-7}}=0.381$),差异有统计学意义($P<0.05$)。VEGF、BMP-2、BMP-7 蛋白在原发脑胶质瘤中的阳性表达率为 52.8% (38/72)、61.1% (44/72)、59.7% (43/72),在复发脑胶质瘤中的阳性表达率为 68.1% (49/72)、70.8% (51/72)、69.4% (50/72),复发脑胶质瘤中 VEGF、BMP-2、BMP-7 蛋白表达高于原发,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 脑胶质瘤复发与 VEGF、BMP-2、BMP-7 蛋白表达水平呈正相关,是判断脑胶质瘤生物学行为的重要指标,VEGF、BMP-2、BMP-7 蛋白可作为脑胶质瘤分子标志物及治疗靶点。

关键词 复发 脑胶质瘤 血管内皮生长因子 重组人骨形态发生蛋白-2 重组人骨形态发生蛋白-7

中图分类号 R739.41 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.06.036

Expression and Analysis of VEGF, BMP-2 and BMP-7 Proteins in Recurrent Gliomas after Operation. Luo Chixing, Quan Zhongping, Zhang Ming, et al. Department of Neurosurgery, Jingmen Second People's Hospital, Hubei 448000, China

Abstract **Objective** The expression and clinical significance of vascular endothelial growth factor(VEGF), recombinant human bone morphogenetic protein-2(BMP-2) and recombinant human bone morphogenetic protein-7(BMP-7) in the tumor tissues of patients with primary and recurrent glioma. **Methods** Retrospective analysis 72 patients with glioma after first operation and after reoperation were reviewed with complete clinical data and tumor tissue specimens from January 2012 to January 2015 in department of neurosurgery in our hospital. Testing expression level of all patients had positive VEGF, BMP-2 and BMP-7 protein in the wax samples of primary and recurrent samples by immunohistochemical method. Analysis the relationship about Clinicopathological data between sex, age, WHO pathological grade, primary or recurrent glioma was analyzed. **Results** The clinical pathological data of recurrent glioma patients were analyzed by Spearman rank correlation analysis. The expression of VEGF protein was correlated with WHO pathological grading ($R_{\text{VEGF}}=0.375$) and primary and relapse($R_{\text{VEGF}}=0.319$). The expression of BMP-2 and BMP-7 protein was correlated with primary and relapse($R_{\text{BMP-2}}=0.492$, $R_{\text{BMP-7}}=0.381$) ($P<0.05$) with statistical significance. The positive expression rates of VEGF, BMP-2 and BMP-7 proteins in primary gliomas were 52.8% (38/72), 61.1% (44/72) and 59.7% (43/72), respectively. The positive expression rate in recurrent gliomas was 68.1% (49/72), 70.8% (51/72) and 69.4% (50/72), respectively. The expression of VEGF, BMP-2 and BMP-7 protein in recurrent glioma was higher than that in primary glioma($P<0.05$) with statistical significance. **Conclusion** The recurrence of glioma is positively correlated with the expression level of VEGF, BMP-2 and BMP-7, it is an important index to judge the biological behavior of glioma, VEGF, BMP-2 and BMP-7 proteins can be used as molecular markers and therapeutic targets for glioma.

Key words Recurrence; Glioma; Vascular endothelial growth factor; Recombinant human bone morphogenetic protein-2; Recombinant human bone morphogenetic protein-7

脑胶质瘤是最常见的中枢神经系统肿瘤,约占颅内肿瘤的 50%,且呈逐年上升趋势^[1]。脑胶质瘤患者目前治疗主要采用手术、放射治疗、化学药物治疗等综合治疗,但大部分患者首次治疗后仍会出现肿瘤进展或复发,复发的主要原因在于肿瘤细胞不能完全手术清除,复发部位多在原部位,复发性胶质母细胞瘤预后极差,平均生存期 1.0~4.5 个月,术后复发为死亡主要原因,及时进行外科手术再切除为首选治疗方案,是减少肿瘤细胞最快最有效的方法,可减轻颅内压迫症状,为后续治疗创造条件^[2-4]。

研究表明血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)参与肿瘤的局部浸润,是评估肿瘤患者病情及预后的重要指标,在人脑胶质瘤中异常表达,且表达强度与脑胶质瘤恶性程度呈正相关^[5,6]。重组人骨形态发生蛋白(recombinant human bone morphogenetic protein, BMP)除促进骨和软骨生成,在肿瘤的发生、增殖、侵袭过程也发挥重要作用,且与脑恶性肿瘤关系密切^[7]。VEGF、重组人骨形态发生蛋白-2(recombinant human bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、重组人骨形态发生蛋白-7(recombinant human bone morphogenetic protein-7, BMP-7)蛋白在复发脑胶质瘤患者中表达如何,对临床治疗预后意义如何,成为临床医生关注的热点。本研究通过分析比较 72 例脑胶质瘤患者原发和复发术后瘤组织 VEGF、BMP-2、BMP-7 蛋白的表达情况与临床病理资料之间的关系,为该疾病诊断、治疗、预后、评估提供依据,现总结归纳报道如下。

资料与方法

1. 一般资料:选择笔者医院神经外科 2012 年 1 月~2015 年 1 月收治的 72 例复发脑胶质瘤患者行手术治疗,首次手术及复发后再手术均在笔者医院完成,有完整临床病理资料。其中男性 44 例,女性 28 例;患者年龄 28~69 岁,平均年龄 45.3 ± 11.9 岁;72 例患者原发病灶术后按照 WHO CNS 2016 病理分级:I 级 4 例,II 级 18 例,III 级 31 例,IV 级 19 例,复发后病灶 I 级 0 例,II 级 7 例,III 级 34 例,IV 级 31 例^[8]。所有患者均为原位复发,病灶位于额叶 12 例,颞叶 11 例,枕叶 8 例,额顶叶 9 例,额颞叶 7 例,颞顶叶 10 例,四脑室 7 例,其他部位 8 例。按病理类型分为星形细胞瘤 17 例,少枝胶质细胞瘤 15 例,少枝星形细胞瘤 18 例,多形性胶质母细胞瘤 22 例,复发术后病理性质未发生改变。首次术后 6 个月内复发 5 例,1

年内复发 19 例,2 年内复发 35 例,3 年内复发 13 例,最短复发时间 4.2 个月,最长复发时间 31.5 个月,平均 15.3 ± 4.7 个月。

2. 试剂与仪器:兔抗人 VEGF 多克隆抗体、兔抗人 BMP-2 多克隆抗体、兔抗人 BMP-7 多克隆抗体、I 抗试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;JEDR801D 形态学图像分析系统 Version 6.0 购自捷达科技有限公司等。

3. 免疫组化方法:按照试剂盒说明书,将所有患者瘤组织标本 10% 甲醛溶液常规固定、石蜡包埋、4 μm 切片;切片后二甲苯脱蜡、乙醇梯度水化、柠檬酸盐缓冲液抗原修复,再自然冷却。3% H_2O_2 37℃ 孵育,5% 正常山羊血清 37℃ 封闭,加 I 抗(50 μl),冰箱 4℃ 过夜。次日复温,加 II 抗,滴加 SABC 液, DAB 显色 5 min,苏木精复染,二甲苯透明,中性树胶封片,再烤干。所有标本均在同一条件下采用免疫组化 SABC 方法进行染色,均设 PBS 液阴性和阳性对照。在各病理组织内随机选取 10 个视野($\times 400$ 倍),染色以胞膜、胞质出现棕黄色或黄褐色沉淀物为阳性表达。

4. 免疫组化染色结果判定标准:在光学显微镜下以细胞膜、细胞质染色呈棕黄色颗粒为 VEGF、BMP-2、BMP-7 蛋白表达阳性判定标准,按照 Krajewska 法进行半定量分析:在高倍镜($\times 400$)下随机抽取 10 个视野进行阳性细胞计数,计数阳性细胞率并分级:0 级:计数比率 $< 5\%$;1 级:比率 $5\% \sim 25\%$;2 级:比率 $25\% \sim 50\%$;3 级:比率 $50\% \sim 75\%$;4 级:比率 $> 75\%$ ^[9]。染色强度评价标准:阴性:0 级;1 级:弱阳性;2 级:阳性;3 级:强阳性。最后,以阳性细胞率分级 $\times$ 染色强度分级 $/2 \geq 0.5$ 判断为免疫组化阳性表达。

5. 随访生存:所有患者自复发后再次手术病理确诊时开始随访,由专人通过电话、微信、QQ 等方式联系,无失联病例,随访截止日期 2018 年 3 月 1 日,随访时间最短者 3 个月,最长者 37 个月。

6. 统计学方法:应用 SPSS 20.0 统计学软件对数据进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,计数资料分析采用 χ^2 检验,对可能影响原发复发脑胶质瘤中 VEGF、BMP-2、BMP-7 阳性表达水平的相关因素采用 Spearman 等级分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 可能影响 VEGF、BMP-2、BMP-7 蛋白阳性

表达的相关因素:对临床病理资料采用 *Spearman* 等级分析,结果显示,VEGF 蛋白表达与性别、年龄、病理类型等资料不具有相关性,与 WHO 病理分级($r_{\text{VEGF}}=0.375,P<0.05$)及原发、复发($r_{\text{VEGF}}=0.319$,

$P<0.05$)情况相关。BMP-2、BMP-7 蛋白表达与性别、年龄、病理类型、WHO 病理分级不具有相关性,与原发、复发($r_{\text{BMP-2}}=0.492,P<0.05$; $r_{\text{BMP-7}}=0.381,P<0.05$)情况有关,详见表 1。

表 1 VEGF、BMP-2、BMP-7 蛋白阳性表达与临床病理特征相关性

临床特征	<i>n</i>	VEGF		BMP-2		BMP-7	
		相关系数	<i>P</i>	相关系数	<i>P</i>	相关系数	<i>P</i>
性别		-0.156	0.086	-0.245	0.072	-0.129	0.069
男性	44						
女性	28						
年龄(岁)		0.029	0.361	0.019	0.596	0.022	0.383
≤18	12						
19~30	21						
31~50	29						
≥51	10						
病理类型		0.019	0.339	0.028	0.225	0.025	0.296
星形细胞细胞瘤	17						
少枝胶质细胞瘤	15						
少枝星形细胞瘤	18						
多形性胶质母细胞瘤	22						
WHO 病理分级		0.375	0.035	0.025	0.481	0.026	0.065
I~II 级	7						
III~IV 级	65						
原发、复发情况		0.319	0.011	0.492	0.027	0.381	0.033
原发	72						
复发	72						

2. VEGF、BMP-2、BMP-7 蛋白在原发及复发脑胶质瘤中的表达及分析:免疫组化结果显示,VEGF 蛋白阳性表达主要集中在胶质瘤细胞质中,在原发、复发脑胶质瘤表达分别为 52.8% (38/72)、68.1% (49/72)。BMP-2、BMP-7 蛋白主要位于细胞质,呈弥漫性分布的棕黄色颗粒,强弱不等,在原发脑胶质瘤表达分别为 61.1% (44/72)、59.7% (43/72),在复发脑胶质瘤表达分别为 70.8% (51/72)、69.4% (50/72),PBS 阴性对照无黄色颗粒沉积,详见表 2 和

图 1。

表 2 VEGF、BMP-2、BMP-7 蛋白在原发及复发脑胶质瘤中的表达[*n*(%)]

项目	<i>n</i>	VEGF	BMP-2	BMP-7
原发	72	38(52.8)	44(61.1)	43(59.7)
复发	72	49(68.1)	51(70.8)	50(69.4)
χ^2		13.246	12.492	23.851
<i>P</i>		0.032	0.014	0.031

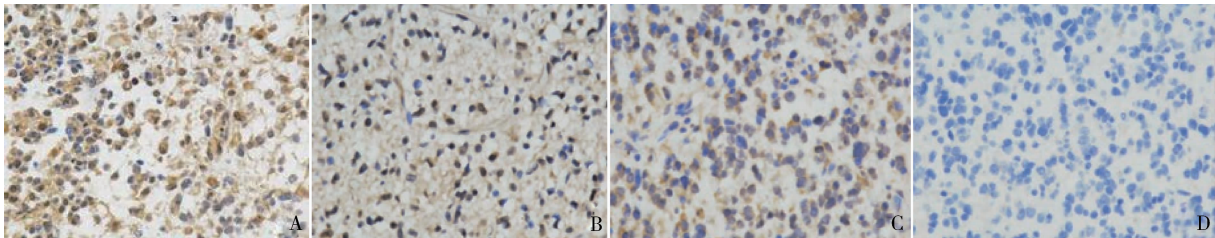


图 1 脑胶质瘤患者 VEGF、BMP-2、BMP-7 蛋白免疫组化表达(SABC, ×400)

A. VEGF 蛋白表达;B. BMP-2 蛋白表达;C. BMP-7 蛋白表达;D. PBS 阴性对照

3. VEGF、BMP-2、BMP-7 蛋白表达与随访关系:通过对脑胶质瘤患者复发术后随访统计分析,

VEGF 蛋白 49 例阳性表达者无进展生存期(progression free survival, PFS)为 6.5 ± 2.1 个月,总生存期

(overall survival, OS) 为 11.6 ± 3.9 个月; 23 例阴性表达 PFS 为 8.9 ± 2.8 个月, OS 为 14.1 ± 4.5 个月。BMP-2 蛋白 51 例阳性表达者 PFS 为 5.9 ± 1.9 个月, OS 为 10.8 ± 3.7 个月; 21 例阴性表达 PFS 为 8.2 ± 2.6 个月, OS 为 14.0 ± 4.6 个月。BMP-7 蛋白 50 例阳性表达者 PFS 为 5.2 ± 1.6 个月, OS 为 10.1 ± 3.5 个月; 22 例阴性表达 PFS 为 7.9 ± 2.2 个月, OS 为 13.5 ± 4.2 个月。VEGF、BMP-2、BMP-7 蛋白阳性表达 PFS 及 OS 均短于阴性表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

讨 论

脑胶质瘤为颅内最常见原发恶性肿瘤, 具有无控增殖, 侵袭性生长, 易复发等特点, 本质上是一种多基因疾病, 由于原癌基因过度表达, 抑癌基因突变缺失, 导致肿瘤细胞逃避正常生长调控机制, 在此发病过程与多种细胞因子有关^[10,11]。其中 VEGF 是一种具有分泌特点的外分泌蛋白, 其家族成员有 VEGF-A、PLGF、svVEGF, VEGF-A 是通常所说的 VEGF, 作用最强, 可以与特定的受体结合, 激活多种信号通路, 促进血管通透性增加, 肿瘤新生血管形成, 血管内皮细胞增殖, 引起细胞迁移^[12~14]。正常人体也会含有 VEGF, 可促进组织和器官发育, 肿瘤组织中过度表达, 过度表达的 VEGF 与其相应的受体特异性结合, 诱发肿瘤血管生成, 持续和广泛的新生血管满足了肿瘤细胞生长所需的营养成分, 促进了肿瘤细胞的恶性增殖和侵袭性生长, 加速肿瘤发展^[15]。VEGF 是促进血管生成的细胞因子, 直接参与诱导肿瘤血管生成, 已有多数研究证实 VEGF 表达程度与恶性程度密切相关^[16,17]。

BMPs 约有 40 多个家族成员, 其中除了 BMP-1 为骨生长新的调节因子, 属于金属钛内切酶家族 (the astacin family of metalloen-dopeptidases) 之外, 其余 BMPs 均属于转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族, BMPs 家族成员有 4 个亚组, 包括 BMP-2、BMP-3、BMP-3b、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-12、BMP-13、BMP-14 等, 其中 BMP-2、BMP-7 的研究较早也较为重要, 近年来, 大量研究表明, 中枢神经系统肿瘤中可检测到 BMP-2 和 BMP-7 的阳性表达, 逐步认识到在肿瘤的发生、发展、增殖、侵袭和转移中起重要作用^[18]。

本研究通过免疫组化法检测笔者医院经手术确诊的脑胶质瘤患者原发和复发标本, 通过统计分析患者一般临床病理资料, VEGF 蛋白表达水平与性别、

年龄、病理类型等临床病理资料不具有相关性, 与 WHO 病理分级 ($r_{\text{VEGF}} = 0.375$)、原发或复发情况 ($r_{\text{VEGF}} = 0.319$) 具有相关性, 而 BMP-2、BMP-7 蛋白表达水平与性别、年龄、病理类型、病理分级等临床病理资料不具有相关性, 与原发或复发 ($r_{\text{BMP-2}} = 0.492$, $r_{\text{BMP-7}} = 0.381$) 情况具有相关性, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。通过 Spearman 等级资料分析结果提示, WHO 病理分级和原发复发情况是 VEGF 蛋白表达的影响因素, 原发复发情况是 BMP-2、BMP-7 蛋白表达的影响因素。进一步研究分析, VEGF、BMP-2、BMP-7 蛋白表达水平在复发患者中表达水平明显高于原发患者, 提示可作为易复发患者的判定指标。通过随访分析, VEGF、BMP-2、BMP-7 蛋白阳性表达 PFS 及 OS 均短于阴性表达患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 因此还可作为高表达患者预后不良的判定指标。

综上所述, VEGF、BMP-2、BMP-7 在复发脑胶质瘤患者中高度表达, 参与脑胶质瘤的生长浸润过程, 可以作为判定脑胶质瘤生物学行为的重要指标, 还可作为肿瘤分子标志物, 对于脑胶质瘤患者个体化治疗及判断患者预后提供指导意义。

参考文献

- 王佳, 封华, 梁奕, 等. 脑胶质瘤 H-MRS 的应用与 VEGF、MMP-9 及 uPA 表达的相关性研究[J]. 实用放射学杂志, 2017, 33(9): 1333-1336
- 谢怀姬, 代从新, 马文斌. 复发性高级别脑胶质瘤免疫治疗的研究进展[J]. 中华神经外科杂志, 2016, 32(5): 524-527
- 杨群英, 郭珍珍, 林富华, 等. 贝伐珠单抗治疗复发恶性脑胶质瘤 36 例临床分析[J]. 广东医学, 2017, 38(1): 38-41
- Kamiya-Matsuoka C, Gilbert MR. Treating recurrent glioblastoma: an update[J]. CNS Oncol, 2015, 4(2): 91-104
- Rabi Z, Todorovirakovi N, Vujasinovi T, et al. Markers of progression and invasion in short term follow up of untreated breast cancer patients[J]. Cancer Biomark, 2015, 15(6): 745-754
- 蔡强, 叶应湖, 王国安, 等. 血管内皮生长因子在人脑胶质瘤侵袭中的作用[J]. 肿瘤防治研究, 2002, 29(6): 447-449
- Liu C, Tian G, Tu Y, et al. Expression pattern and clinical prognostic relevance of bone morphogenetic protein-2 in human glioma [J]. Jpn J Clin Oncol, 2009, 39: 625-631
- 苏昌亮, 李丽, 陈小伟, 等. 2016 年 WHO 中枢神经系统肿瘤分类总结[J]. 放射学实践, 2016, 31(7): 127-134
- 隋锐, 张烨, 陈一, 等. MMP-2 及 VEGF 在脑胶质瘤中的表达及其临床意义[J]. 华南国防医学杂志, 2014, 28(5): 443-444
- 范阳华, 叶敏华, 吴雷, 等. 人脑胶质瘤中 RSUME 的 SUMO 化与 HIF-1 α /VEGF 通路的相关性[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2015, 36(4): 472-478

(转第 117 页)