

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学 号: 21720080150413

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

# 荧光鼠源人脑胶质瘤原位移植模型建立及 PSMB4 在胶质瘤组织中的表达研究

## Nude Mice with Green Fluorescent Protein Expression-based Human Glioma Animal Model and Expression of PSMB4 in Human Gliomas

谭国伟

指导教师姓名: 陶 涛 教授  
李祺福 教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2012 年 08 月

论文答辩日期: 2012 年 08 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: 张云武 教授

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2012 年 08 月

荧光鼠源人脑胶质瘤原位移植模型建立及蛋白酶体PSMB4在胶质瘤组织中的表达研究

谭国伟

指导教师 陶涛 教授

李祺福 教授

厦门大学

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(陶涛)课题(组)的研究成果,获得(陶涛)课题(组)经费或实验室的资助,在(陶涛)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名): 谭国伟

2012年8月6日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）： 谭国伟

2012年8月6日

## 摘要

胶质瘤是中枢神经系统最常见的肿瘤，占颅内肿瘤的40%~45%，同时也是颅内肿瘤中最难治愈的肿瘤。长期以来都是采用手术切除及放化疗辅助的综合性治疗，但是其治疗效果仍然不佳，5年生存率不足5%。随着分子生物学技术的发展，这就促使人们进一步从分子水平深入探讨胶质瘤发生发展的分子机制，寻求更为有效的治疗措施。

高表达表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 的人脑恶性胶质瘤能上调血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和其他血管生成因子表达而促进血管生成，这新生的血管又促进了肿瘤细胞增殖、侵袭和远处转移。过去几十年来虽然外科切除和术后放化疗对治疗恶性胶质瘤有一定的积极作用，但是患者临床预后并没有太大的改善。因此建立一个稳定的并能模拟临床人脑多形性胶质母细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM) 高侵袭性、高 EGFR 表达及富血管化的人脑 GBM 动物模型是对 GBM 进行实验性治疗的基础。最新研究资料表明，利用基因芯片和siRNA方法发现蛋白酶体 PSMB4亚基可能在胶质瘤的发生发展中起着重要的作用。本实验将在表达绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 裸小鼠脑内建立人脑 GBM 原位移植模型，以便为人脑 GBM 的实验治疗提供更为合适的动物模型。同时，利用免疫组织化学染色和 RT-PCR 等实验方法对蛋白酶体 PSMB4 亚基在胶质瘤组织肿瘤的表达和分布进行初步探讨，为进一步深入研究 PSMB4 可否成为胶质瘤分子病理诊断的分子标志物及其分子靶向治疗的靶标等奠定基础。

实验证明，我们成功培育出了表达 GFP 的荧光裸小鼠，移植瘤在 GFP 裸小鼠脑内侵袭性生长，血管丰富及 EGFR 高表达，这 GFP 裸小鼠源的人脑 GBM 原位移植模型为胶质瘤发病分子机制的进一步深入研究及其治疗后的动态活体观察和研究提供了更为理想的动物模型。在 PSMB4 在人脑胶质瘤组织中的表达及分布的相关研究中，发现在  $\alpha=0.05$  检验水准下，PSMB4 蛋白表达量在实验组中明显高于对照组，其阳性表达率差异具有统计学意义。但在  $\alpha=0.05$  检验水平下，各级胶质细胞瘤之间 PSMB4 蛋白表达的差异不具有统计学意义，

其染色强度的总体分布也无统计学差异。有关 PSMB4 可否成为胶质瘤分子病理诊断的分子标志物及其分子靶向治疗的靶标等尚有待于进一步研究。

**关键词：**荧光裸小鼠；多形性胶质母细胞瘤；原位移植模型；荧光成像；侵袭性生长；表皮生长因子受体；PSMB4；免疫组化

厦门大学博硕士论文摘要库

## **Abstract**

Human glioma with a bad prognosis is the most common tumor in the central nervous system, accounting for 40% - 45% intracranial tumors. The main treatment method for glioma includes surgical resection and auxiliary radiotherapy and chemotherapy treatment for a long time, but its efficiency is still poor, with the 5-year survival of less than 5%. With the development of molecular biology techniques, people will further explore the molecular mechanisms of glioma development, and seek more effective treatment measures under the molecular level.

Human malignant gliomas with high expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) can up-regulate vascular endothelial growth factor (VEGF) and other angiogenic factors expression resulting in angiogenesis, whereas this newborn blood vessels more promote tumor cell proliferation, invasion and distant metastasis. Although surgical resection and postoperative radiotherapy and chemotherapy have a positive role in the treatment of malignant glioma since the past decades, the prognosis of patients has not yet been much improved. Therefore, a stable and clinical relevant animal model of human brain glioblastoma multiforme (GBM) with high EGFR expression, invasion and rich vascularization is a foundation for experimentally treating glioma. The latest research data shows that proteasome PSMB4 subunit may play an important role in the development of gliomas through gene chips and siRNA method. In this study, we will develop a human brain GBM orthotopic transplantation model in the nude mice expressing green fluorescent protein (GFP), which will provide a more suitable animal model for glioma treatment. At the same time, we will also preliminarily study the expression and distribution proteasome PSMB4 subunit in glioma tumors using immunohistochemistry, RT-PCR and other experimental methods, which provide a basis for whether the PSMB4 could become a molecular marker for glioma diagnosis and target therapy.

Our results show that we have successfully develop the nude mice with GFP

protein expression, and the orthotopic GBM model in GFP nude mice with high EGFR expression, invasion and rich vascularization, which provide a more useful

GBM orthotopic transplantation model in dynamic and in vivo observation of glioma treatment. Compared with the control group, PSMB4 expression and distribution in human glioma tissues were significantly higher( $P < 0.05$ ).

**Key Word :** GFP nude mice; Glioblastoma multiforme; Orthotopic model; Fluorescence imaging; Invasive growth; EGFR; PSMB4; immunohistochemistry

# 目 录

<b>摘 要</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>III</b>
<b>1 前言</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 研究背景</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 胶质瘤概述.....	1
1.1.2 胶质瘤分类.....	1
1.1.3 常见胶质瘤.....	5
1.1.4 治疗策略.....	8
<b>1.2 胶质瘤相关分子标志物</b> .....	<b>10</b>
1.2.1 概述.....	10
1.2.2 表皮生长因子受体 (EGFR) .....	10
1.2.3 血管内皮生长因子 (VEGF) .....	12
1.2.4 血小板源性生长因子 (PDGF) .....	15
<b>1.3 胶质瘤相关研究进展</b> .....	<b>16</b>
<b>1.4 中国脑胶质瘤基因组图谱计划</b> .....	<b>18</b>
<b>1.5 胶质瘤研究常用实验动物模型的建立</b> .....	<b>18</b>
1.5.1 胶质瘤动物模型研究历史回顾.....	18
1.5.2 荧光裸小鼠在人肿瘤移植中的应用.....	22
<b>1.6 PSMB4 蛋白亚基</b> .....	<b>23</b>
<b>1.7 本课题研究的的目的和意义</b> .....	<b>27</b>
<b>2 实验材料和方法</b> .....	<b>30</b>
<b>2.1 荧光裸小鼠实验</b> .....	<b>30</b>
2.1.1 实验材料和试剂.....	30
2.1.2 实验方法和步骤.....	33
<b>2.2 PSMB4 相关研究</b> .....	<b>38</b>

2.2.1 实验材料和试剂.....	38
2.2.2 实验方法.....	43
<b>3 实验结果 .....</b>	<b>49</b>
<b>3.1 荧光裸小鼠实验结果.....</b>	<b>49</b>
3.1.1 Balb/c nu/nu 裸小鼠 GBM 原位模型.....	49
3.1.2 移植瘤的形态学特征.....	49
3.1.2 荧光裸小鼠 GBM 原位移植模型 .....	51
<b>3.2 PSMB4 在胶质瘤的表达及其分布 .....</b>	<b>55</b>
3.2.1 PSMB4 免疫组化结果判定.....	55
3.2.2 PSMB4 在不同级别胶质瘤组织中的表达情况.....	56
3.2.3 逆转录 PCR 分析 PSMB4 基因在各级别脑胶质瘤组织中的表达.....	75
<b>4 讨 论 .....</b>	<b>77</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>84</b>
<b>致 谢.....</b>	<b>97</b>

## Table of contents

<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>Preface</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Background</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Glioma overview .....	1
1.1.2 Glioma classification .....	1
1.1.3 Common glioma .....	5
1.1.4 Treatment strategies .....	8
<b>1.2 Glioma-associated molecular markers</b> .....	<b>10</b>
1.2.1 Overview .....	10
1.2.2 Epidermal growth factor receptor .....	10
1.2.3 Vascular endothelial growth factor .....	12
1.2.4 Platelet-derived growth factor .....	15
<b>1.3 Glioma-related research progress</b> .....	<b>16</b>
<b>1.4 Glioma genome profile plan</b> .....	<b>18</b>
<b>1.5 Glioma-related common animal model</b> .....	<b>18</b>
1.5.1 Review of glioma animal models .....	18
1.5.2 GFP-nude mouse in human tumor xenografts .....	22
<b>1.6 PSMB4 and ubiquitin-proteasome system</b> .....	<b>23</b>
<b>1.7 The purpose and significance of this research</b> .....	<b>27</b>
<b>2 Materials and Methods</b> .....	<b>30</b>
<b>2.1 GFP-nude mouse experiment</b> .....	<b>30</b>
2.1.1 Materials and reagents .....	30
2.1.2 Methods .....	33
<b>2.2 PSMB4 –related study</b> .....	<b>38</b>
2.2.1 Materials and reagents .....	38

---

2.2.2 Methods	43
<b>3 Results</b>	<b>49</b>
<b>3.1 Balb/c nu/nu nude mouse model</b>	<b>49</b>
3.1.1 GBM orthotopic model	49
3.1.2 GFP nude mouse model	51
<b>3.2 Expression of PSMB4 subunit in various gliomas</b>	<b>55</b>
3.2.1 Standard of judgement	55
3.2.2 PSMB4 expression in glioma tissues of different grade	56
3.2.3 PSMB4 expression in various grade glioma by RT-PCR	75
<b>4 Discussion</b>	<b>77</b>
<b>References</b>	<b>84</b>
<b>Acknowledgements</b>	<b>97</b>

# 1 前言

## 1.1 研究背景

### 1.1.1 胶质瘤概述

神经胶质瘤 (Gliomas) 是指发生于神经外胚层的肿瘤,故又称之为神经外胚层肿瘤、神经上皮肿瘤或胶质细胞瘤,简称胶质瘤。肿瘤起源于神经间质细胞,大多数肿瘤起源于不同类型的神经胶质细胞,但由于各类神经胶质细胞组织发生学来源及生物学特征类似,对发生于神经外胚层的各种肿瘤,一般都称为神经胶质瘤<sup>[1]</sup>。脑胶质瘤约占颅内肿瘤的40%~45%,来源于各型胶质细胞,这是组织病理学中狭义的概念;从广义上来说,脑胶质瘤应包括整个神经上皮组织来源的各型胶质细胞和神经元的肿瘤。

神经胶质瘤是中枢神经系统中最常见的肿瘤。在神经胶质瘤中又以星形细胞瘤为最常见,其次为多形性胶质母细胞瘤,室管膜瘤占第三位。好发部位以额、颞、顶叶居多,性别方面男性多于女性,好发年龄大多见于20~50岁间,其中以30~40岁为最高峰。另外在10岁左右儿童亦较多见,为另一个小高峰。各类型神经胶质瘤有其好发年龄,如星形细胞瘤多见于壮年,多形性胶质母细胞瘤多见于中年,室管膜瘤多见于儿童及青年,髓母细胞瘤大多发生在儿童。各类型神经胶质瘤的好发部位也不同,如星形细胞瘤多发生在成人大脑半球,在儿童则多发生在小脑;多形性胶质母细胞瘤几乎均发生于大脑半球;室管膜瘤多见于第四脑室;少突胶质细胞瘤绝大多数发生于大脑半球;髓母细胞瘤几乎均发生于小脑蚓部。

### 1.1.2 胶质瘤分类

中枢神经系统肿瘤最早分类系统是上世纪初 Bailey 和 Cushing (1926) 以肿瘤发生的胚胎残留细胞学说为基础,同时结合他们自己的临床经验和病理学研究,依据神经系统的组织发生,提出了神经外科初期胶质瘤比较系统的完整分类。后来 Kernohan 与 Sayra 则根据肿瘤细胞分化程度,以间变学说为基础,提出了胶质瘤 I~IV 级分类法。目前,胶质瘤的分类方法很多,主要利用免疫组

织化学染色的手段基于肿瘤的表型特征进行的，但有研究显示有望通过利用 cDNA 微阵列技术鉴别不同肿瘤的基因表达图谱在分子水平上进行分类<sup>[2-4]</sup>。当今临床上常用的神经胶质瘤分类系统有两种，即世界卫生组织（WHO 2007版）分类系统（表1.1）和 Kernohan 分类系统（表1.2），美国神经外科学会还有自己的分类系统（表1.3），其中以 WHO 分类系统应用更广泛。2007新版的 WHO 脑肿瘤分类标准就结合了免疫组织化学染色和 cDNA 微阵列技术这两种技术对肿瘤进行更加粗细明确的分类。虽然上述分类方法都能够简单明了的理解胶质瘤的恶性程度高低，但是根据这些分类方法仍然不能准确判断胶质瘤患者的预后，因此，迄今为止还没有一个完善的胶质瘤分类系统，上述分类方法均不能适应目前临床治疗的需要。随着分子病理学研究的不断深入，分子病理学诊断对临床治疗的指导作用日益显现，但是基于分子病理基础的新的胶质瘤分类尚未制定，目前仍然还是参照旧的分类法。

表1.1 世界卫生组织中枢神经系统肿瘤的分类（2007年版）

Table 1.1 The tumor classification of central nervous system of the world health organization the in 2007

肿瘤分类	WHO分级
I Tumours of neuroepithelial tissue 神经上皮组织肿瘤	
1. Astrocytic tumours 星形细胞肿瘤	
Pilocytic astrocytoma 毛细胞型星形细胞瘤	I
Pilomyxoid astrocytoma 毛细胞黏液型星形细胞瘤	II
Subependymal giant cell astrocytoma 室管膜下巨细胞型星形细胞瘤	I
Pleomorphic xanthoastrocytoma 多形性黄色瘤型星形细胞瘤	II
Diffuse astrocytoma 弥漫性星形细胞瘤	II
Fibrillary 纤维型	II
Gemistocytic 肥胖细胞型	II
Protoplasmic 原浆型	II
Anaplastic astrocytoma 间变性星形细胞瘤	III
Glioblastoma 胶质母细胞瘤	IV
Giant cell glioblastoma 巨细胞型胶质母细胞瘤	IV
Gliosarcoma 胶质肉瘤	IV

Gliomatosis cerebri 大脑胶质瘤病	IV
2. Oligodendroglial tumours 少突胶质细胞肿瘤	
Oligodendroglioma 少突胶质细胞瘤	II
Anaplastic oligodendroglioma 间变性少突胶质细胞瘤	III
3. Oligoastrocytic tumours 少突星形细胞肿瘤	
Oligoastrocytoma 少突-星形细胞瘤	II
Anaplastic oligoastrocytoma 间变性少突-星形细胞瘤	III
4. Ependymal tumours 室管膜肿瘤	
Subependymoma 室管膜下室管膜瘤	I
Myxopapillary ependymoma 粘液乳头状型室管膜瘤	I
Ependymoma 室管膜瘤	II
Cellular 细胞型	II
Papillary 乳头状型	II
Clear cell 透明细胞型	II
Tanycytic 伸长细胞型	II
Anaplastic ependymoma 间变性室管膜瘤	III
5. Choroid plexus tumours 脉络丛肿瘤	
Choroid plexus papilloma 脉络丛乳头状瘤	I
Atypical choroid plexus papilloma 非典型性脉络丛乳头状瘤	II
Choroid plexus carcinoma 脉络丛癌	III
6. Other neuroepithelial tumours 其他神经上皮肿瘤	
Astroblastoma 星形母细胞瘤	
Chordoid glioma of the third ventricle 第三脑室的脊索瘤样胶质瘤	II
Angiocentric glioma 血管中心型胶质瘤	I

表1.2 神经胶质瘤的 Kernohan 分类

Table 1.2 The tumor classification of central nervous system of Kernohan

1. Astrocytic tumors	星形细胞瘤	I ~IV级
2. Ependymoma	室管膜瘤	I ~IV级
3. Oligodendroglioma	少突胶质瘤	I ~IV级
4. Neurons-Astrocytomas	神经元-星形细胞瘤	I ~IV级
5. Medulloblastoma	髓母细胞瘤	I ~IV级

表1.3 美国神经外科协会胶质瘤分类

Table 1.3 The tumor classification of central nervous system of the United States neurosurgery association

Partial benign glioma 偏良性的胶质瘤

Pilocytic astrocytoma 毛细胞型星形细胞瘤

Subependymal giant cell astrocytoma 室管膜下巨细胞型星形细胞瘤

Protoplasmic astrocytoma 原浆型星形细胞瘤

xanthoastrocytoma 黄色瘤型星形细胞瘤

Subependymoma 室管膜下室管膜瘤

Low-grade malignant glioma 低度恶性的胶质瘤

Fibrillary gemistocytic astrocytoma 纤维型（肥胖型）星形细胞瘤

Ependymoma 室管膜瘤

Oligodendroglioma 少突胶质细胞瘤

Oligoastrocytoma 混合型少突-星形细胞瘤

Optic nerve glioma 视神经胶质瘤

Glioblastoma 恶性胶质瘤

Anaplastic astrocytoma 间变性星形细胞瘤

Anaplastic oligodendroglioma 间变性少突胶质细胞瘤

Anaplastic oligodendroglioma 间变性混合性胶质瘤

Highly malignant glioma 高度恶性的胶质瘤

glioblastoma multiforme,

Gliosarcoma 胶质肉瘤

Hemisphere glioma disease 大脑半球胶质瘤病

胶质瘤患者的预后与肿瘤的病理分级有密切关系，胶质瘤多呈浸润性生长，肿瘤的恶性程度愈高，其侵袭性愈强，边界愈不清楚，手术亦不易全切除，治疗效果越差。近10多年来，胶质瘤研究的重要进展之一是已知胶质瘤发生、发展的根本原因是无限增殖和凋亡抑制，对细胞增殖及凋亡调控紊乱的不断深入研究为进一步深入探讨胶质瘤发病的分子机制提供了重要启示。

### 1.1.3 常见胶质瘤

#### 1.1.3.1 星形细胞肿瘤

星形细胞肿瘤是最常见的神经上皮性肿瘤，占颅内原发性肿瘤的50%左右。男性与女性之比约为2:1。其发病年龄有两个高峰期，分别为11~20岁和31~40岁。星形细胞瘤可发生在中枢神经系统的任何部位，一般成人多见于幕上额颞叶。儿童则多发生于幕下小脑半球、第四脑室、小脑蚓部及脑干等部位。根据分化程度、侵袭性，2007版 WHO 分类法采用四级分类系统，脑胶质瘤包括低级别的弥漫性星形细胞瘤（WHO分类 I ~ II 级），间变性星形细胞瘤（WHO分类 III 级）和侵袭性更强的多形性胶质母细胞瘤（WHO分类 IV 级）。毛细胞型星形细胞瘤和室管膜下星形细胞瘤由于生长相对局限而归为 WHO I 级。毛细胞黏液型星形细胞瘤增加为毛细胞型星形细胞瘤的新亚型<sup>[5]</sup>；大脑胶质瘤病归入星形细胞肿瘤项下<sup>[6,7]</sup>。毛细胞性星形细胞瘤是恶性程度最低的星形细胞瘤，最常见于儿童，只有很少的病例会恶化成恶性程度更高的肿瘤。然而患有低程度的星形细胞瘤和间变性的星形细胞瘤的病人大多数会演变成恶性程度最高的胶质母细胞瘤<sup>[8]</sup>。对于低度恶性和间变性星形细胞瘤的区别依赖于肿瘤细胞密度及是否存在有丝分裂。而间变性星形细胞瘤和多形性胶质母细胞瘤的鉴别依赖于是否存在坏死和内皮细胞增生。

#### 1.1.3.2 分化良好的星形细胞瘤

分化良好的星形细胞瘤又称为低级别的星形细胞瘤，WHO分类 I ~ II 级，其中以毛细胞型星形细胞瘤为代表，占有所有原发颅内肿瘤的20%。组织学特征表现为，肿瘤组织内有大量增生的胶质纤维，罕见有丝分裂，轻度核异形。由于毛细胞型星形细胞瘤预后较好，从临床实际分类上常将其与低度恶性星形细胞瘤区分开来<sup>[9,10]</sup>。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库