

复发性脑胶质瘤患者磷脂酰乙醇胺结合蛋白 4 表达情况及其临床意义研究

张涛¹, 王辉¹, 杨晓文², 胡钧涛¹, 汪超甲¹, 李安荣¹, 周一¹

【摘要】 背景 磷脂酰乙醇胺结合蛋白 4 (PEBP4) 在多种恶性肿瘤侵袭、增殖过程中发挥着重要作用, 与部分肿瘤患者生存时间呈负相关, 但其与复发性脑胶质瘤的关系目前尚不完全清楚。**目的** 分析复发性脑胶质瘤患者 PEBP4 表达情况及其临床意义。**方法** 选取 2012 年 8 月—2017 年 12 月十堰市太和医院收治的复发性脑胶质瘤患者 40 例, 同期因脑出血或脑创伤而行颅内减压术的患者 40 例, 收集其脑组织标本, 比较复发性脑胶质瘤标本与正常脑组织标本 PEBP4 mRNA 相对表达量、PEBP4 蛋白相对表达量及 PEBP4 阳性表达情况, 并分析复发性脑胶质瘤患者 PEBP4 阳性表达的相关因素。**结果** 复发性脑胶质瘤标本 PEBP4 mRNA 相对表达量、蛋白相对表达量及阳性表达率高于正常脑组织标本 ($P<0.05$)。不同性别、年龄、肿瘤直径复发性脑胶质瘤标本 PEBP4 阳性表达率比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 不同临床分级、KPS 评分、分化程度复发性脑胶质瘤标本 PEBP4 阳性表达率比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。**结论** 复发性脑胶质瘤患者 PEBP4 呈高表达, 其表达可能与临床分级、KPS 评分、分化程度有关, 有可能成为判断复发性脑胶质瘤的重要标志物。

【关键词】 神经胶质瘤; 肿瘤复发, 局部; 磷脂酰乙醇胺结合蛋白质; 肿瘤标记, 生物学

【中图分类号】 R 730.264 **【文献标识码】** A DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2019.05.009

张涛, 王辉, 杨晓文, 等. 复发性脑胶质瘤患者磷脂酰乙醇胺结合蛋白 4 表达情况及其临床意义研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2019, 27 (5): 36-39, 49. [www.syxnf.net]

ZHANG T, WANG H, YANG X W, et al. Expression and clinical significance of PEBP4 in patients with recurrent glioma [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2019, 27 (5): 36-39, 49.

Expression and Clinical Significance of PEBP4 in Patients with Recurrent Glioma ZHANG Tao¹, WANG Hui¹, YANG Xiaowen², HU Juntao¹, WANG Chaojia¹, LI Anrong¹, ZHOU Yi¹

1. Department of Neurosurgery, Taihe Hospital of Shiyan (the Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine), Shiyan 442000, China

2. Department of Clinical Laboratory, Taihe Hospital of Shiyan (the Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine), Shiyan 442000, China

Corresponding author: WANG Hui, E-mail: wangahui1021@163.com

【Abstract】 **Background** PEBP4 plays an important role in the invasion and proliferation of multiple malignancies, and it is negatively correlated with survival time in some cancer patients, but its relation with recurrent glioma is still not very clear so far. **Objective** To analyze the expression and clinical significance of PEBP4 in patients with recurrent glioma. **Methods** From August 2012 to December 2017 in Taihe Hospital of Shiyan, 40 patients with recurrent glioma and 40 patients underwent intracranial decompression due to cerebral hemorrhage or cerebral trauma were enrolled, and their brain tissue specimens were collect to compare the relative expression quantity of PEBP4 mRNA and PEBP4 protein, and positive rate of PEBP4, meanwhile related factors of positive expression of PEBP4 were analyzed. **Results** Relative expression quantity of PEBP4 mRNA and PEBP4 protein, and positive rate of PEBP4 in recurrent glioma specimens was statistically significantly higher than that in normal brain tissue specimens, respectively ($P<0.05$). No statistically significant difference of positive rate of PEBP4 was found in recurrent glioma patients with different gender, age or diameter of tumor ($P>0.05$), while there was statistically significant difference of positive rate of PEBP4 in recurrent glioma patients with different clinical classification, KPS score and differentiated degree, respectively ($P<0.05$). **Conclusion** Expression of PEBP4 is relatively high in patients with recurrent

基金项目: 湖北省自然科学基金项目 (2013CFB225): 胶质瘤放疗后复发的分子机制研究

1.442000 湖北省十堰市太和医院(湖北医药学院附属医院)神经外科 2.442000 湖北省十堰市太和医院(湖北医药学院附属医院)检验部

通信作者: 王辉, E-mail: wanghui1021@163.com

glioma, and it is likely to correlated with clinical classification, KPS score and differentiated degree, may be an important tumor marker of recurrent glioma.

【Key words】 Glioma; Neoplasm recurrence, local; Phosphatidylethanolamine binding protein; Tumor markers, biological

脑胶质瘤的临床特征、组织及基因均具有异质性,也是最常见的原发性中枢神经系统肿瘤。脑胶质瘤的预后较差,5年生幸存者较少超过10%^[1-3]。脑胶质瘤首选手术治疗,但因其具有侵袭性,无法将病灶完全切除,使术后复发率达100%^[4-5]。复发的脑胶质瘤会随着病情程度加重,其侵袭等生物学表现也加重,即便经综合治疗后病情也不断进展,导致了极高的病死率^[6-7]。近年来随着分子生物学研究不断深入,脑胶质瘤也开始从分子病理学展开研究^[8]。磷脂酰乙醇胺结合蛋白4(PEBP4)是一个结构上高度保守的胞质可溶性蛋白,可参与调节G蛋白耦联受体通路、ERK通路、核因子 κ B(NF- κ B)通路等多种重要信号通路转导^[9],在多种恶性肿瘤侵袭、增殖过程中发挥着重要作用^[10]。研究表明,PEBP4对前列腺癌等肿瘤的侵袭、迁移具有促进作用,且与部分肿瘤患者生存时间呈负相关^[11],但其与复发性脑胶质瘤的关系研究报道较为少见。本研究旨在分析复发性脑胶质瘤患者PEBP4表达情况及其临床意义,现报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取2012年8月—2017年12月十堰市太和医院收治的复发性脑胶质瘤患者40例,均符合复发性脑胶质瘤的诊断标准^[1-2],且经历两次手术。另选取本院同期收治的因脑出血或脑创伤而行颅内减压术的患者40例。纳入标准:(1)临床资料完整者;(2)年龄20~80岁;(3)术前经化疗、放疗等免疫性治疗者。排除标准:(1)妊娠期与哺乳期妇女;(2)合并其他颅内病变者。本研究经十堰市太和医院医学伦理委员会审核批准,患者均对本研究知情并签署知情同意书。

1.2 方法 所有患者在无菌环境中提取术后得到的复发性脑胶质瘤标本(复发性脑胶质瘤患者)与正常脑组织标本(脑出血或脑创伤患者),使用0.9%氯化钠溶液冲洗坏死组织、血块与电灼部分组织,并将每个标本分成两部分,其中一部分置于10%福尔马林液中浸泡,另一部分则放于5 ml EP冻存管并置于-80℃液氮中速冻。

1.2.1 聚合酶链反应(PCR) 采用PCR检测复发性脑胶质瘤标本与正常脑组织标本PEBP4 mRNA相对表达量,上游引物序列:5'-TCGGCCAGTGGAACTACACCT-3',下游引物序列:5'-TCCACCAAGAGCCAAGAGGATAGA-3'。 β -actin内参引物设计,上游引物序列:5'-CCTAGAAGCAnrTG

CGGTGCACGATG-3',下游引物序列:5'-TCATGAAGTGTGACGTGACATCCGT-3'。

1.2.2 Western blot法 采用Western blot法检测复发性脑胶质瘤标本与正常脑组织标本PEBP4蛋白相对表达量:研磨复发性脑胶质瘤标本与正常脑组织标本,3 000 r/min离心30 min(离心半径10 cm)后弃沉淀,采用考马斯亮蓝法检测上清液中蛋白浓度;以聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后,封闭1 h,加入山羊抗PEBP4多克隆抗体(1:1 000)、兔抗 β -actin多克隆抗体(1:5 000)并置于4℃环境中保存过夜,TBST洗涤后采用化学发光试剂进行自显影。

1.2.3 免疫组化分析 对复发性脑胶质瘤标本与正常脑组织标本实施包埋,以4 μ m的厚度进行切片并封存于山羊血清中,于室温下等待5 min,滴加(1:200)PEBP4一抗,置于4℃环境下12 h。PBS洗涤后采用室温孵育30 min,再次使用PBS清洗,采取二氨基联苯胺法进行染色;采用高倍显微镜随机选择5个视野进行观察,同时每个视野观察的肿瘤细胞为100个。根据阳性细胞染色强度以及染色阳性细胞数进行评分,阳性细胞率为0~5%记0分,6%~25%记1分,26%~50%记2分,>50%记3分;细胞不着色记0分,淡黄色记1分,棕黄色记2分,棕褐色记3分;将上述得分相加,0~1分为(-),2~5分为(+),6~8分为(++),9分为(+++)。阳性信号标准为棕黄色或黄色,其中(+)、(++)、(+++)为PEBP4阳性表达。

1.3 统计学方法 采用SPSS 19.00统计软件进行数据分析,计数资料分析采用 χ^2 检验;计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用两独立样本 t 检验。检验水准(双侧) $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 PEBP4 mRNA及蛋白相对表达量 复发性脑胶质瘤标本PEBP4 mRNA相对表达量为(8.24 \pm 1.56),高于正常脑组织标本的(1.87 \pm 0.22),差异有统计学意义($t=22.842$, $P<0.01$)。复发性脑胶质瘤标本PEBP4蛋白相对表达量为(9.28 \pm 1.22),高于正常脑组织标本的(1.83 \pm 1.32),差异有统计学意义($t=28.924$, $P<0.01$)。正常脑组织标本及不同临床分级复发性脑胶质瘤标本PEBP4电泳结果见图1。

2.2 PEBP4免疫组化结果 PEBP4阳性呈黄色、棕黄色颗粒状,主要见于胞膜或胞质。复发性脑胶质瘤标本PEBP4阳性表达率为80.0%,高于正常脑组织标本的

20.0%, 差异有统计学意义 ($\chi^2=28.800, P<0.05$, 见图 2)。

2.3 复发性脑胶质瘤标本 PEBP4 阳性表达的相关因素 不同性别、年龄、肿瘤直径复发性脑胶质瘤标本 PEBP4 阳性表达率比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 不同临床分级、KPS 评分、分化程度复发性脑胶质瘤标本 PEBP4 阳性表达率比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$, 见表 1)。

3 讨论

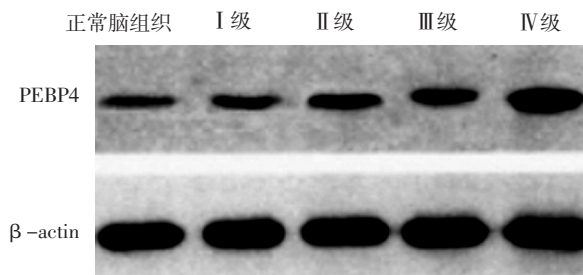
脑胶质瘤是最常见的原发性中枢神经系统肿瘤, 由于其具有高侵袭性常导致临床治疗较困难, 且患者的预后较差^[12-13]。脑胶质瘤各个分级的生物学行为均具有恶性表现, 虽然手术治疗有一定效果, 但因肿瘤组织和正常脑组织间界限不明显而使肿瘤清除不彻底, 导致极高的复发率^[14-16]。目前医学界普遍认为, 脑胶质瘤发生及复发过程是多因素、多基因共同参与的生物学过程^[17-18]。复发性脑胶质瘤患者平均生存时间为 15 个月左右, 传统化疗靶点缺乏特异性, 无法分辨正常脑组织和肿瘤组织, 易产生治疗耐药性^[19-20]。

PEBP4 作为具有磷脂酰乙醇胺 (PE) 结合能力的碱性家族蛋白, 其分子量为 21~23 kDa, 在多种肿瘤组织中的阳性检出率均较高。通过对骨髓基质细胞 cDNA

表 1 复发性脑胶质瘤标本 PEBP4 阳性表达的相关因素 [n (%)]
Table 1 Related factors of positive expression of PEBP4 in recurrent glioma specimens

临床病理特征	例数	PEBP4 阳性	χ^2 值	P 值
性别			0.101	0.751
男	22	18 (81.8)		
女	18	14 (77.8)		
年龄			0.625	0.429
≥ 60 岁	20	17 (85.0)		
<60 岁	20	15 (75.0)		
临床分级			10.000	0.019
I 级	20	12 (60.0)		
II 级	10	10 (100.0)		
III 级	5	5/5		
IV 级	5	5/5		
KPS 评分			20.833	<0.01
≥ 80 分	30	29 (96.7)		
<80 分	10	3 (30.0)		
分化程度			20.000	<0.01
高分化	5	1/5		
中分化	10	6 (60.0)		
低分化	25	25 (100.0)		
肿瘤直径			0.101	0.751
≥ 3 cm	18	14 (77.8)		
<3 cm	22	18 (81.8)		

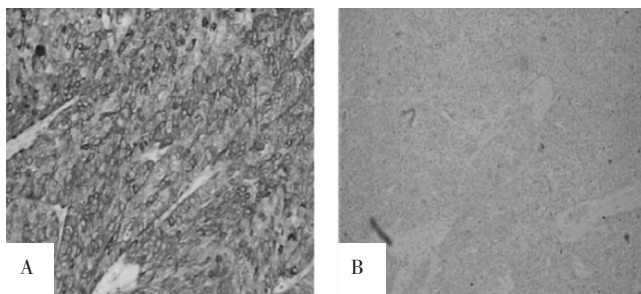
注: PEBP4= 磷脂酰乙醇胺结合蛋白 4



注: PEBP4= 磷脂酰乙醇胺结合蛋白 4

图 1 正常脑组织标本及不同临床分级复发性脑胶质瘤标本 PEBP4 电泳结果

Figure 1 Electrophoretogram of PEBP4 in normal brain tissue specimens and recurrent glioma specimens with different clinical classification



注: A 为复发性脑胶质瘤标本, B 为正常脑组织标本

图 2 复发性脑胶质瘤及正常脑组织标本染色结果 (二氨基联苯胺染色, ×400)

Figure 2 Coloration results of recurrent glioma specimens and normal brain tissue specimens

数据库进行分离及大规模筛选发现, PEBP4 主要编码在 901bp 中, mRNA 序列大多存在于染色体 8p21.3 上, 其可通过激活 ERK 信号通路而抑制肿瘤坏死因子 α 的诱导细胞凋亡, 进而在人体代谢中发挥重要的作用。PEBP 结构与 PE、核苷酸类、其他疏水配体有着较高亲和力, 且可分不同亚型, 其中 PEBP4、RKIP、MRPL38 亚型在总体上结构相似, 主要区别于 N- 末端片段序列^[21]。植物类 PEBP 其同源结构能够控制枝条生长、花朵结构形态, 哺乳动物体内 PEBP 能提高胆碱乙酰转移酶的合成, 参与调节多种疾病的发生发展。有研究发现, 高 PEBP4 能够激活血管内皮生长因子等诸多因子, 提高细胞运动性, 促进血管生成, 且对恶性肿瘤浸润有一定作用^[22-23]。PEBP4 生理功能主要是与 PE 结合构成细胞膜, 可维持胞膜流动性及功能结构的形成^[24]。本研究结果显示, 复发性脑胶质瘤标本 PEBP4 mRNA 及蛋白相对表达量高于正常脑组织标本, 表明复发性脑胶质瘤患者 PEBP4 呈高表达, 分析其可能机制为高

PEBP4 可减弱蛋白酶体对磷酸化雌激素受体的降解作用并增强其增殖功能、抑制 JNK 信号通路、激活 AKT 信号通路,继而通过影响 JNK 信号通路而发挥促肿瘤生长作用并维持上皮分化功能,最终导致脑胶质瘤复发^[25]。

既往研究表明,直肠癌中 PEBP4 蛋白相对表达量升高与肿瘤转移、侵袭等相关,并与患者放疗耐受、生存期呈正相关^[26]; PEBP4 高表达与脑胶质瘤 WHO 分级有关,而高表达 PEBP4 的脑胶质瘤患者病死率较高^[27]。本研究结果显示,不同临床分级、KPS 评分、分化程度复发性脑胶质瘤标本 PEBP4 阳性表达率有统计学差异,提示 PEBP4 表达可能与复发性脑胶质瘤患者临床分级、KPS 评分、分化程度有关。

综上所述,复发性脑胶质瘤患者 PEBP4 呈高表达,其表达可能与临床分级、KPS 评分、分化程度有关,有可能成为判断复发性脑胶质瘤的重要标志物;但本研究样本量较小且为单中心研究,相关因素的纳入尚不够全面,存在一定选择偏倚,结果结论仍有待进一步研究证实。

作者贡献:张涛、王辉进行试验设计与实施、资料收集整理、撰写论文并对文章负责;杨晓文、胡钧涛、汪超甲进行试验实施、评估、资料收集;李安荣、周一进行质量控制及审校。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] 易立,陶震楠,杨学军.胶质瘤免疫治疗新进展[J].中国肿瘤临床,2017,44(18):931-934.DOI:10.3969/j.issn.1000-8179.2017.18.281.
- [2] WANG S C, ZHOU F, ZHOU Z Y, et al. Knockdown of PEBP4 suppresses proliferation, migration and invasion of human breast cancer cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 659-664. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.03.098.
- [3] 白洁,高晨,何灵,等.高级别胶质瘤临床诊疗进展[J].医学综述,2017,23(15):2978-2982.DOI:10.3969/j.issn.1006-2084.2017.15.013.
- [4] WU Z J, LIU B, ZHENG X M, et al. Role of the PEBP4 protein in the development and metastasis of gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(11): 18177-18184. DOI: 10.18632/oncotarget.15255.
- [5] 张姗姗,于林.胶质瘤分级及分子遗传学标志物相关磁共振成像研究进展[J].中国现代神经疾病杂志,2017,17(1):69-73. DOI: 10.3969/j.issn.1672-6731.2017.01.013.
- [6] LI W P, DONG Y C, ZHANG B, et al. PEBP4 silencing inhibits hypoxia-induced epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 81: 1-6. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.03.030.
- [7] 陈照亮,刘红,杨会利,等.微小核糖核酸 592 调控神经胶质瘤细胞株 U251 细胞凋亡[J].中国神经精神疾病杂志,2017,43(4):234-238. DOI: 10.3969/j.issn.1002-0152.2017.04.009.
- [8] HUANG R Q, SHI D L, HUANG W, et al. Increased expression of phosphatidylethanolamine-binding protein 4 (PEBP4) strongly associates with human gliomas grade [J]. *J Neurooncol*, 2016, 127(2): 235-242. DOI: 10.1007/s11060-015-2040-6.
- [9] 朱莽,龙乾发,杨彦平,等.冬凌草甲素诱导胶质瘤 SHG44 细胞凋亡及其分子机制的研究[J].中国医科大学学报,2017,46(7):604-608. DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2017.06.007.
- [10] YU G, HUANG B, CHEN G, et al. Phosphatidylethanolamine-binding protein 4 promotes lung cancer cells proliferation and invasion via PI3K/Akt/mTOR axis [J]. *J Thorac Dis*, 2015, 7(10): 1806-1816. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.10.17.
- [11] ZHANG D, DAI Y, CAI Y, et al. PEBP4 promoted the growth and migration of cancer cells in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(2): 1699-1705. DOI: 10.1007/s13277-015-3906-0.
- [12] 陈杰.重视临床病理诊断中的分子检测[J].中华病理学杂志,2017,46(1):1. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2017.01.001.
- [13] 张惊宇,张力娜,郑永慧,等. β -连锁蛋白在脑胶质瘤中的表达及其与病理分级的关系研究[J].实用心脑血管病杂志,2016,24(4):53-56. DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2016.04.014.
- [14] ZHAO Z, ZHANG L, YAO Q, et al. MiR-15b regulates cisplatin resistance and metastasis by targeting PEBP4 in human lung adenocarcinoma cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2015, 22(3): 108-114. DOI: 10.1038/cgt.2014.73.
- [15] 刘义锋,张保朝,温昌明,等.miR-15b 通过靶向 ABCG2 信号通路抑制胶质瘤干细胞迁移及侵袭[J].中国组织工程研究,2017,21(33):5305-5312. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2017.33.010.
- [16] 刘湘.SOX2 在脑胶质瘤组织中的表达及其临床意义[J].实用心脑血管病杂志,2016,24(2):40-43. DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2016.02.011.
- [17] YU G, ZHONG N, CHEN G, et al. Downregulation of PEBP4, a target of miR-34a, sensitizes drug-resistant lung cancer cells [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(10): 10341-10349. DOI: 10.1007/s13277-014-2284-3.
- [18] YU G, SHEN Z, CHEN G, et al. PEBP4 enhanced HCC827 cell proliferation and invasion ability and inhibited apoptosis [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(1): 91-98. DOI: 10.1007/s13277-012-0514-0.
- [19] 姚晶晶,马东林,尹洪芳.胶质瘤诊治相关分子标志物研究进展[J].中华病理学杂志,2017,46(7):509-511. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2017.07.016.
- [20] 陈孟达,李强,王友良,等.正电子发射计算机断层显像与多模态磁共振成像鉴别脑胶质瘤术后肿瘤复发与放射性脑损伤的价值研究[J].中国全科医学,2019,22(11):1312-1318. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2018.00.451.

(下转第 49 页)