

AEBP1 在胶质母细胞瘤中的表达及临床意义

茹晓宇 程传东, 计颖

摘要 目的 探究脂肪细胞增强结合蛋白 1 (AEBP1) 在胶质母细胞瘤 (GBM) 中的表达及对患者预后等影响。方法 通过 Oncomine 数据库和 GEPIA 网站分析 AEBP1 mRNA 在 GBM 中表达水平; 应用 GEPIA 网站及下载的 TCGA 数据分析 AEBP1 mRNA 表达水平与各临床病理特征的相关性及对患者预后等影响; 在人类蛋白质图谱 (HPA) 数据库进一步分析 AEBP1 蛋白在胶质瘤表达情况; 最后应用 WebGestalt 网站对 AEBP1 及其共表达基因行 GO 和 KEGG 富集分析。结果 Oncomine 数据库筛选出的 7 项数据集和 GEPIA 网站分析均显示 AEBP1 mRNA 在 GBM 组织中表达较正常脑组织上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); GEPIA 网站生存分析显示 AEBP1 mRNA 高表达的患者整体生存期 (OS) 较低表达患者降低, 差异有统计学意义 ($P = 3.9 \times 10^{-5}$); 进一步 TCGA 数据库分析示 AEBP1 mRNA 表达水平与异柠檬酸脱氢酶 1 (IDH1) 突变与否相关 ($P = 0.005$), 且是 GBM 患者 OS 的独立影响因素 ($HR = 0.563$, 95% $CI(0.390, 2.08127)$, $P = 2.16 \times 10^{-3}$); HPA 数据库同样证实 AEBP1 蛋白在胶质瘤组织中阳性表达; 最后 KEGG 通路富集分析显示 AEBP1 及其共表达基因主要富集的通路包括 Hippo、NF- κ B、TNF 等信号通路。结论 AEBP1 在 GBM 中高表达, 且 AEBP1 mRNA 高表达是 GBM 患者的独立预后因素; Hippo、NF- κ B、TNF 等信号通路可能是 AEBP1 过表达促进 GBM 发生发展的重要通路。AEBP1 是 GBM 患者治疗的潜在靶点。

关键词 AEBP1; 胶质母细胞瘤; 表达; 临床意义

中图分类号 R 651.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)08-1284-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.08.027

胶质瘤起源于脑神经胶质细胞, 是成人中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤, 世界卫生组织将胶质瘤分为 I ~ II 级的低级别胶质瘤和 III ~ IV 的高级别胶质瘤, 其中高级别胶质瘤占成人原发脑肿瘤

75%^[1], 胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 属于恶性程度极高的 IV 级胶质瘤, 仅 0.71% 患者生存超过 10 年^[2], 其致死率一直以来居中枢神经系统恶性肿瘤之首, 中位生存期在 15 个月左右, 预后差^[3]。脂肪细胞增强结合蛋白 1 (adipocyte enhancer-binding protein 1, AEBP1) 最初被认为是负性调节脂肪生成的转录抑制剂, 是一新型炎症调控因子。越来越多研究发现 AEBP1 在肿瘤的发生发展中也发挥重要作用。如在胃癌、膀胱癌中 AEBP1 高表达且降低患者预后^[4-6]。近期在结直肠癌组织中也发现 AEBP1 表达水平与肿瘤分期、转移、复发及预后相关, 同时认为 AEBP1 可能成为具有化疗耐药性的结直肠癌患者的一种新治疗方法^[7]。AEBP1 在 GBM 中研究甚少, 仅一篇 2012 年发表研究认为在胶质瘤细胞株中 AEBP1 基因抑制后, 细胞增殖及存活能力受到影响, 但 AEBP1 在 GBM 组织中表达水平、对患者预后等影响尚未有研究报道^[8]。该研究拟通过对各类数据库综合挖掘, 探究 AEBP1 在 GBM 中的表达水平及与各临床病理特征的相关性, 分析对患者预后的影响, 并对 AEBP1 在 GBM 中可能的功能和作用信号通路进行预测, 以期从新的视角进一步阐明 GBM 发生发展过程中的可能机制, 为寻求 GBM 治疗潜在的有效靶点, 延长患者生存期提供依据。

1 材料与方法

1.1 Oncomine 数据库分析 Oncomine 数据库 (<https://www.oncomine.org/>) 是世界上目前最大的肿瘤基因芯片数据库和整合数据挖掘平台, 通过 Oncomine 数据库, 可比较肿瘤组织和其正常组织中 mRNA 的差异表达。设定的主要筛选条件为: ① 基因: AEBP1; ② 分析类型: 肿瘤 vs 正常组织; ③ 肿瘤类型: 中枢神经系统肿瘤; ④ 数据类型: mRNA。以 $P \leq 0.05$, 差异倍数 ≥ 1.5 , 排名 $\geq 10\%$ 为阈值。

1.2 GEPIA 网站分析 GEPIA 数据库 (<http://gepia.cancer-pku.cn>) 是由北京大学开发研究, 整合 TCGA、GTEX 等数据库信息的可视化网站^[9]。通过该网站设置 $|\log_2FC|$ 截断值为 1, P 截断值为 0.01,

2020-04-25 接收

基金项目: 安徽省公益性研究联动计划项目 (编号: 15011d04033); 安徽省自然科学基金 (编号: 1508085QH184); “科大新医学”联合基金项目编号 (编号: WK911000032)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院神经外科, 合肥 230001

作者简介: 茹晓宇, 男, 硕士研究生;

计颖, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: ah-slyyjy@163.com

再次分析 AEBP1 mRNA 在 GBM 中表达水平,进一步利用该数据库生存分析功能探究 AEBP1 表达水平对 GBM 患者整体生存期(overall survival, OS)和无进展生存期(disease free survival, DFS)的影响。分组截断值选择中位数。

1.3 TCGA 分析 从 TCGA 数据库(<https://www.cancer.gov/>)中下载 GBM 患者的 mRNA 测序和临床信息数据,异柠檬酸脱氢酶 1(isocitrate dehydrogenase, IDH1) 基因突变信息从 cBioPortal 数据库下载。在 R 中使用 edge R 包对原始数据进行归一化处理及筛选在 GBM 中差异表达的基因,以 $|\log_2 FC| > 1$ 且调整后 $P < 0.05$ 为筛选阈值。以 AEBP1 mRNA 表达水平的中位值为界,将 GBM 患者分为高表达和低表达组,分析 AEBP1 mRNA 表达水平与各临床病理特征相关性,最后行 Cox 比例风险回归分析,探究影响 GBM 患者生存的独立危险因素。

1.4 人类蛋白图谱分析 人类蛋白质图谱(the human protein atlas, HPA) 主要是基于免疫组化分析的大型蛋白组数据库(<https://www.proteinatlas.org/>),可提供约 26 000 种人蛋白质的在组织及细胞中的分布信息^[10]。选择数据库中 AEBP1 抗体(CAB009966)对正常大脑组织和胶质瘤组织免疫组化检测结果进行分析,共包括 3 例正常脑组织和 12 例胶质瘤组织。

1.5 AEBP1 及其共表达基因的 GO 和 KEGG 通路富集分析 cBioPortal 数据库(<http://www.cbioportal.org/>)是一个开放的分析癌症基因数据的可视化工具,可进行多维度癌症基因集数据的探索。利用 cBioPortal 数据库 Co-expression 模块在“Glioblastoma TCGA cell 2013”数据集中找出与 AEBP1 共表达的 817 个基因(Spearman 相关系数绝对值 ≥ 0.4)。随后将 AEBP1 及其共表达 817 个基因上传至 WebGestalt 网站(<http://www.webgestalt.org/option.php>)行 GO 与 KEGG 通路富集分析,WebGestalt 网站是 GO 功能注释及 KEGG 通路富集分析—在线工具,更新及时,包涵较为全面的功能注释数据库。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 24.0 进行统计分析,Oncomine 数据库和 GEPIA 网站分析中的两组间比较采用 t 检验。AEBP1 表达水平对 OS 和 DFS 影响采用 Kaplan-Meier(K-M)生存曲线进行分析, χ^2 检验或 Fisher 精确检验分析 AEBP1 表达水平与 GBM 各临床病理特征相关性,在 R 中利用 Survival 包行多因素 Cox 回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AEBP1 mRNA 在 GBM 组织中表达水平 根据设定条件,共筛选出 11 项数据集,排除非 GBM 的数据集,最终纳入 7 项数据集包含 AEBP1 mRNA 在 GBM 中表达。结果 7 项数据集中均显示 AEBP1 mRNA 在 GBM 组织中高表达,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 1A~G。进一步在 GEPIA 网站分析显示,GBM 组($n = 163$)较正常组($n = 207$)高表达,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 1H。

2.2 GEPIA 网站分析 AEBP1 mRNA 表达水平对患者预后影响 利用 GEPIA 网站绘制 K-M 生存曲线显示,对 162 例 GBM 患者分析,AEBP1 mRNA 高表达患者($n = 81$)OS 低于低表达患者($n = 81$),差异有统计学意义($P = 3.9 \times 10^{-5}$),见图 2A,且高表达患者有降低 DFS 趋势,但差异无统计学意义($P = 0.086$)(图 2B)。

2.3 AEBP1 mRNA 表达水平与临床各病理特征的相关性 从 TCGA 数据库中下载了 588 例 GBM 患者的 mRNA 测序数据,根据设置条件通过 edge R 包得到了 236 个差异表达基因,其中 AEBP1 是 GBM 患者中上调基因($\log_2 FC = 2.813 076$, $P = 4.75 \times 10^{-5}$)。进一步筛选出同时有 AEBP1 mRNA 表达值和完整临床信息的病例总计 160 例,对 AEBP1 mRNA 表达与 GBM 各临床病理特征的相关性进行分析,结果表明 AEBP1 mRNA 表达在不同性别、年龄、种族、术后是否行放疗或化疗以及 KPS 评分高低组中均无统计学差异(均 $P > 0.05$),但 AEBP1 mRNA 的表达与患者是否存在 IDH1 突变相关($P = 0.005$),见表 1。

2.4 AEBP1 mRNA 表达水平是 GBM 患者的独立预后因素 单因素分析发现 AEBP1 mRNA 的高表达($P = 1.99 \times 10^{-4}$)、术后未行放疗($P = 4.5 \times 10^{-7}$)、术后未行化疗($P = 1.35 \times 10^{-4}$)以及 IDH1 基因野生型($P = 8.73 \times 10^{-3}$)降低患者 OS,差异均有统计学意义,年龄、性别、种族和 KPS 评分与患者预后无相关性($P > 0.05$)。随后将上述 $P < 0.05$ 的因素纳入多因素的 Cox 回归模型中行进一步分析,结果显示 AEBP1 mRNA 的高表达($HR = 0.563 1$ (0.390 2, 0.812 7), $P = 2.16 \times 10^{-3}$)和放疗($HR = 3.925 5$ (1.559 6, 9.880 6), $P = 3.69 \times 10^{-3}$)均是患者 OS 的独立影响因素,见表 2。

2.5 AEBP1 蛋白在胶质瘤组织中的表达水平 为了进一步在蛋白水平证实 AEBP1 在胶质瘤组织中

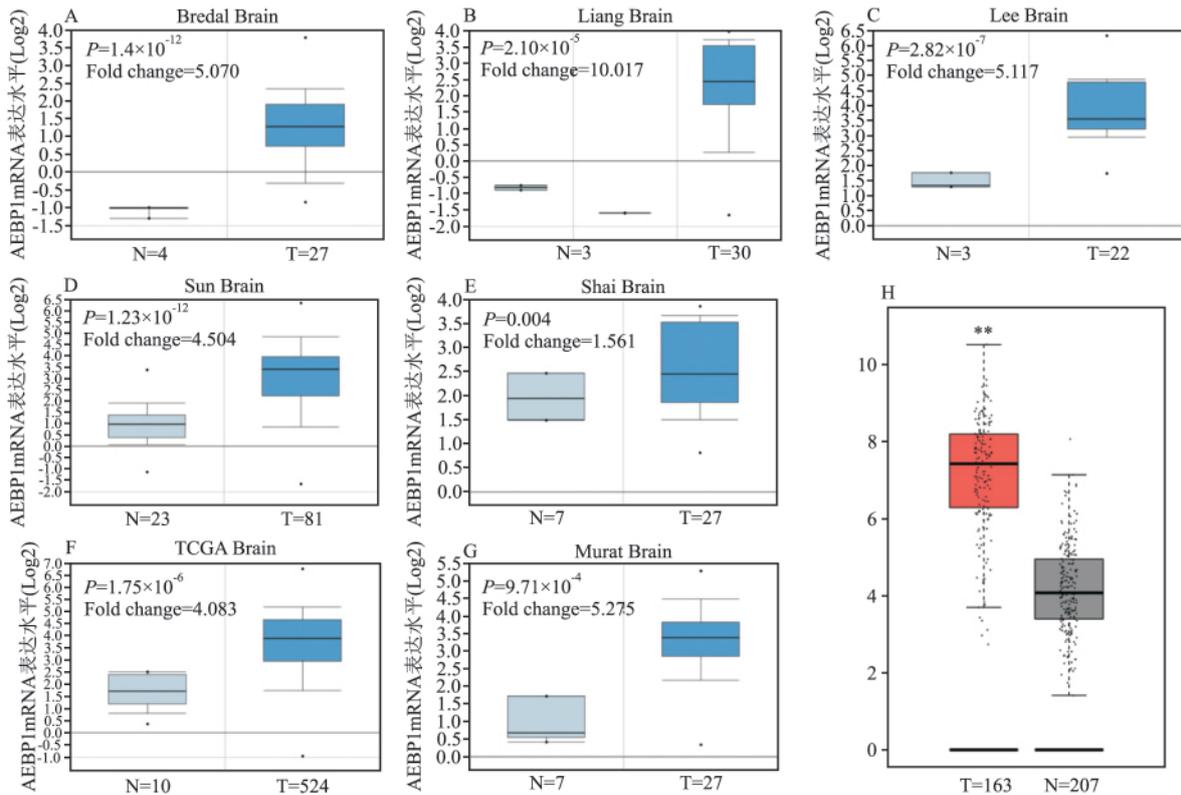


图1 AEBP1 mRNA 在 GBM 患者中表达上调

A ~ G: Oncomine 数据库中筛选的 7 项数据集 AEBP1 mRNA 表达均上调; H: GEPIA 网站分析 AEBP1 mRNA 在 GBM 中表达上调; T = GBM 组织; N = 正常脑组织; 与 N 比较: ** P < 0. 01

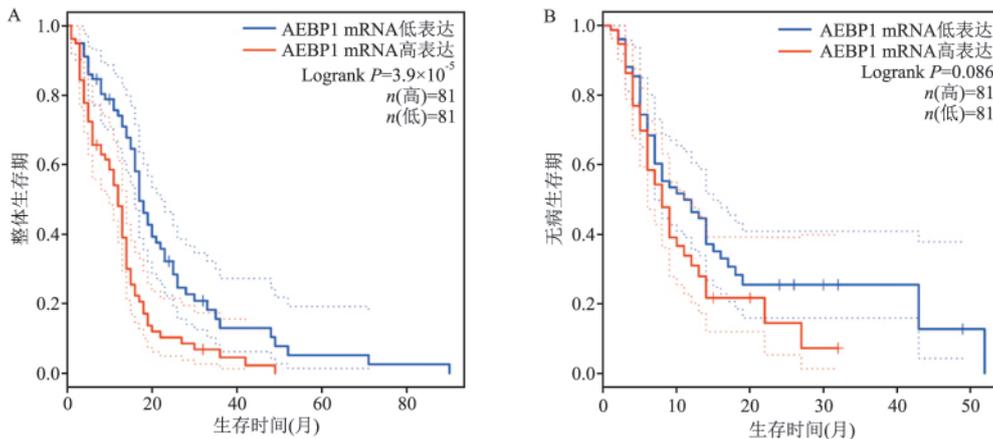


图2 AEBP1 mRNA 表达水平对 GBM 患者 OS (A) 和 DFS (B) 影响

表达,在 HPA 数据库中 IHC 信息发现在 3 例正常脑组织神经胶质细胞中均未见表达,见图 3A,12 例胶质瘤中有 4 例显示 AEBP1 蛋白阳性表达,其中高级别胶质瘤阳性 3 例,低级别胶质瘤阳性 1 例(图 3B)。此结果进一步证实 AEBP1 蛋白在胶质瘤组织中阳性表达。

2.6 AEBP1 及其共表达基因的 GO 和 KEGG 通路富集分析 对 AEBP1 及其共表达的 817 个基因进行 GO 功能富集分析,包括分子功能(molecular

function ,MF) ,生物过程(biological process ,BP) 和细胞组成(cellular component ,CC) 三个部分。结果显示这些基因涉及的生物学过程主要为生物调节、代谢过程以及细胞增殖、繁殖、生长等;细胞组分分类中主要集中在细胞膜、细胞核等;涉及的分子功能主要包括蛋白质结合、离子结合、核酸结合转录因子活性等功能,见图 4A。对 AEBP1 及其共表达的 817 个基因进行 KEGG 通路富集分析,以直方展示了富集的前 10 条通路,可见富集比最高的通路为 Hippo

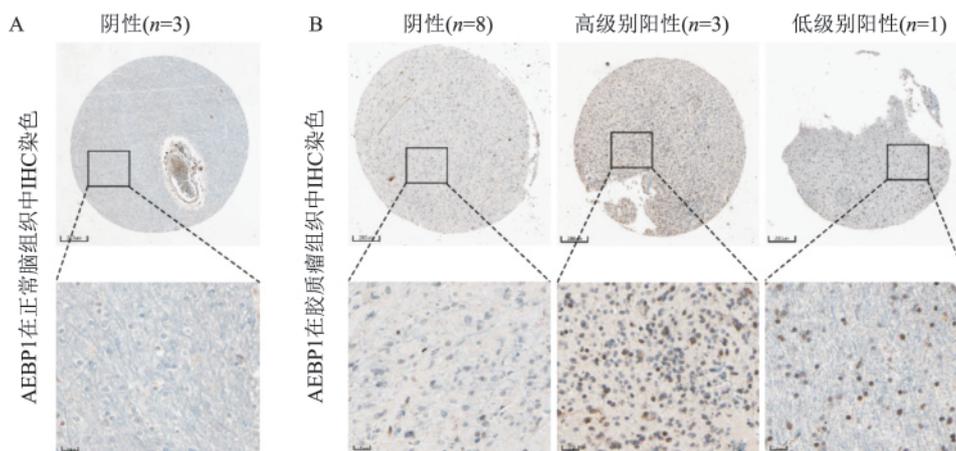


图3 AEBP1 蛋白在正常脑组织 (A) 和胶质瘤 (B) 中表达的 IHC 染色代表性图片
图片下载自 HPA 数据库 ,比例尺分别为 200、25 μm

表 1 GBM 患者 AEBP1 表达水平与各临床参数的相关性 (n)

参数	n	AEBP1 mRNA		χ ² 值	P 值
		高	低		
性别					
女	56	26	30	0.607	0.436
男	104	55	49		
年龄 (岁)					
≥60	84	45	39	0.614	0.433
<60	76	36	40		
种族					
白种人	144	74	70	0.336	0.562
其他	16	7	9		
术后放疗					
是	136	66	70	1.593	0.207
否	24	15	9		
术后化疗					
是	132	63	69	2.534	0.111
否	28	18	10		
KPS 评分 (分)					
≥80	86	41	45	0.264	0.607
<80	33	14	19		
NA	41	-	-		
IDH1 突变					
是	9	0	9	0.775	0.005
否	151	81	70		

NA: 数据缺失; - : 未涉及

信号通路 ,其次是 NF-κB 、TNF 信号通路等 ,见图 4B。

3 讨论

GBM 是中枢神经系统恶性肿瘤 ,标准的一线治疗方式主要为手术切除 ,缓解颅内高压和压迫引起症状 ,术后放疗同步联合替莫唑胺辅助化疗。有限的治疗手段目前不能满足临床治疗的需求 ,GBM 的发生发展机制仍尚不清楚 ,故对关键肿瘤标志物的识别可助于胶质瘤的诊断及个性化治疗。本研究拟通过生物信息分析探究 AEBP1 在 GBM 患者中的表达及对预后等影响 ,并预测 AEBP1 发挥作用的可能机制。

Oncomine 数据库筛选出的 7 项数据集均显示相对正常的脑组织 ,GBM 组织中 AEBP1 mRNA 过表达 ,且基因差异倍数均大于 1.5 ,其中 liang 数据集差异倍数高达 10.017 ,进一步 GEPIA 网站分析再次证实 AEBP1 的高表达。该结果是基于 Oncomine 这一大型综合数据库和 GEPIA 网站分析所得结论 ,

表 2 影响 GBM 患者 OS 的单因素和多因素 Cox 回归分析

变量	单因素分析		多因素分析	
	HR(95% CI)	P 值	HR(95% CI)	P 值
AEBP1 mRNA (高 vs 低)	0.507 4(0.354 9 0.725 4)	1.99 × 10 ⁻⁴	0.563 1(0.390 2 0.812 7)	2.16 × 10 ⁻³
年龄 (≥60 岁 vs <60 岁)	0.749 3(0.528 1 1.063)	0.106	-	-
性别 (女性 vs 男性)	0.962 3(0.666 5 1.389)	0.837	-	-
种族 (白种人 vs 其他)	1.168 (0.6093 2.237)	0.641	-	-
术后放疗 (是 vs 否)	3.361(2.099 5.381)	4.5 × 10 ⁻⁷	3.925 5(1.559 6 9.880 6)	3.69 × 10 ⁻³
术后化疗 (是 vs 否)	2.416(1.536 3.799)	1.35 × 10 ⁻⁴	0.775 8(0.319 5 1.883 9)	0.574 94
KPS 评分 (≥80 vs <80)	1.345(0.849 6 2.130)	0.206	-	-
IDH1 突变 (否 vs 是)	0.300 3(0.122 2 0.737 9)	8.73 × 10 ⁻³	0.441 8(0.175 1 1.114 6)	0.083 61

- : 未涉及

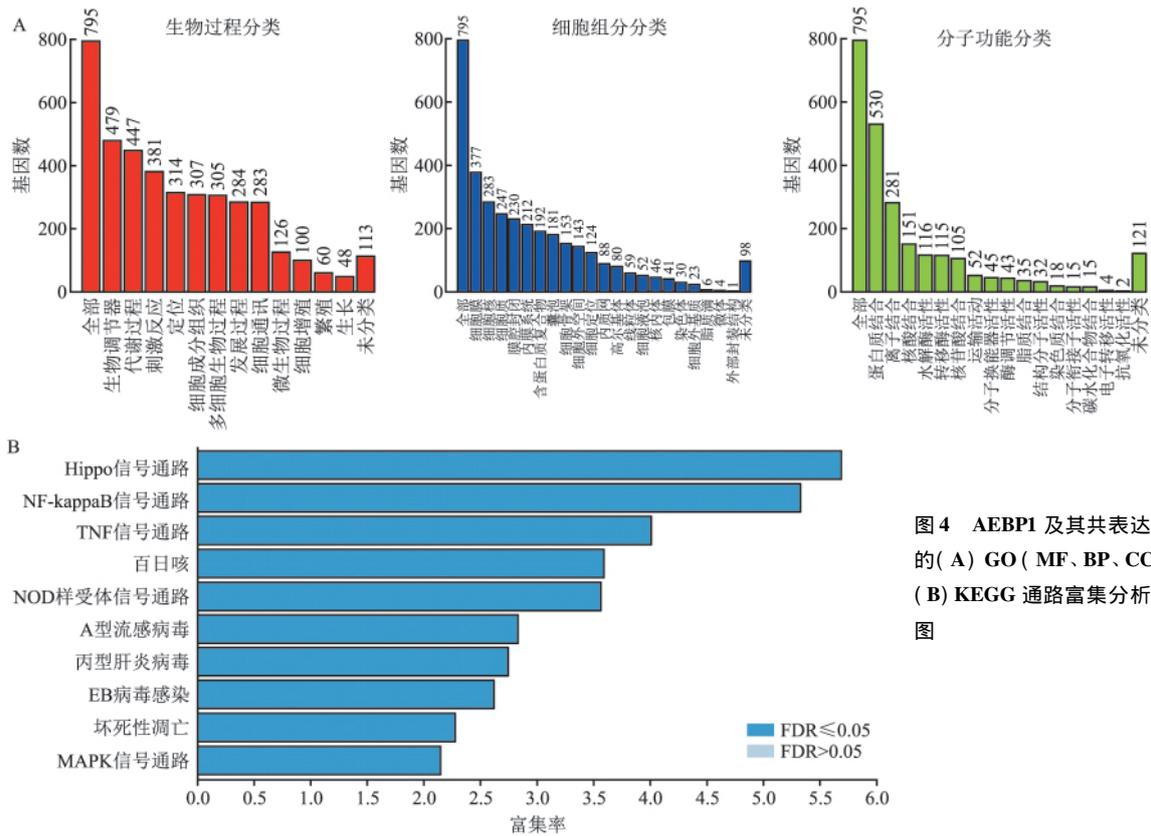


图4 AEBP1及其共表达基因的(A)GO(MF、BP、CC)和(B)KEGG通路富集分析直方图

结果可信度高,对后续的研究验证具有重要的参考意义。利用HPA数据库进一步证实AEBP1蛋白在胶质瘤中阳性表达,且随着胶质瘤病理级别的提高,AEBP1的阳性率也随之提高,但所纳入样本量较少。下一步研究拟对大样本GBM患者组织行IHC染色,进一步研究AEBP1蛋白在GBM中表达及临床意义。

GEPIA网站进行生存分析发现AEBP1 mRNA过表达降低GBM患者OS,其DFS也有降低的趋势。为进一步探究AEBP1 mRNA高表达在GBM中的临床意义,下载了TCGA数据库中160例GBM患者AEBP1 mRNA表达值及对应临床资料,分析发现AEBP1 mRNA表达在不同性别、年龄、种族、术后是否行放疗或化疗以及KPS评分高低组中均未见统计学差异,但却发现与患者是否存在IDH1突变有统计学相关性。这一结论值得进一步深入探讨分析。随后行Cox生存回归分析,单因素分析发现AEBP1 mRNA的表达水平、术后是否行放疗或化疗以及IDH1基因突变与否影响患者OS,多因素分析显示AEBP1 mRNA表达水平及术后是否行放疗是独立的预后影响因素。这是目前首次报道AEBP1表达是GBM患者的独立预后因子。该结果提示

AEBP1参与了GBM的疾病进展的过程,对于发现新的GBM标志物,验证疾病的相关机制和提出新的假设提供了新的机会。类似的,近期在结肠腺癌一项研究,单因素与多因素Cox回归分析也发现AEBP1高表达降低患者OS^[11]。多项研究已证实IDH1突变可见于GBM,可明显改善患者预后,是更有利生存结局的重要预测因子^[12]。本研究单因素分析同样证实IDH1突变患者OS增加,但多因素未证实IDH1突变状态是GBM的独立预后因子,可能与本研究纳入Cox回归模型分析的因素有关。

本研究也对AEBP1在GBM中的功能及可能参与信号通路进行预测。通过GO功能注释发现AEBP1主要涉及生物调节、代谢过程以及肿瘤相关细胞增殖、繁殖、生长等生物学过程。KEGG通路富集分析排列前三位通路的分别是Hippo、NF-κB及TNF信号通路。其中NF-κB通路在GBM的重要作用近期发表在Cell上的一篇综述再次被强调^[13],AEBP1通过NF-κB信号通路在多种疾病中发挥作用已被研究报道,包括胃癌^[4]、结肠腺癌^[11]等肿瘤。在GBM中AEBP1是否通过NF-κB信号通路发挥作用及其具体的机制值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] Louis D N , Perry A , Reifenber G , et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary [J]. *Acta Neuropathol* , 2016 , 131(6) : 803 – 20.
- [2] Tykocki T , Eltayeb M. Ten-year survival in glioblastoma. A systematic review [J]. *J Clin Neurosci* 2018 , 54: 7 – 13.
- [3] Sasmita A O , Wong Y P , Ling A P K. Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme [J]. *Asia Pac J Clin Oncol* , 2018 , 14(1) : 40 – 51.
- [4] Liu J Y , Jiang L , Liu J J , et al. AEBP1 promotes epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer cells by activating the NF- κ B pathway and predicts poor outcome of the patients [J]. *Sci Rep* , 2018 , 8(1) : 11955.
- [5] Di Y , Chen D , Yu W , et al. Bladder cancer stage-associated hub genes revealed by WGCNA co-expression network analysis [J]. *Hereditas* , 2019 , 156: 7.
- [6] Li S , Liu X , Liu T , et al. Identification of biomarkers correlated with the TNM staging and overall survival of patients with bladder cancer [J]. *Front Physiol* , 2017 , 8: 947.
- [7] Li S , Li C , Fang Z. MicroRNA 214 inhibits adipocyte enhancer-binding protein 1 activity and increases the sensitivity of chemotherapy in colorectal cancer [J]. *Oncol Lett* , 2019 , 17(1) : 55 – 62.
- [8] Ladha J , Sinha S , Bhat V , et al. Identification of genomic targets of transcription factor AEBP1 and its role in survival of glioma cells [J]. *Mol Cancer Res* , 2012 , 10(8) : 1039 – 51.
- [9] Tang Z , Li C , Kang B , et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses [J]. *Nucleic Acids Res* , 2017 , 45(W1) : W98 – 102.
- [10] Uhlen M , Zhang C , Lee S , et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome [J]. *Science* , 2017 , 357(6352) : eaan2507.
- [11] Xin Y , Zhang Z , Chi F , et al. AEBP1 , a prognostic indicator , promotes colon adenocarcinoma cell growth and metastasis through the NF- κ B pathway [J]. *Mol Carcinog* , 2019 , 58(10) : 1795 – 808.
- [12] Marton E , Giordan E , Siddi F , et al. Over ten years overall survival in glioblastoma: A different disease? [J]. *J Neurol Sci* , 2019 , 408: 116518.
- [13] Yamini B. NF- κ B , mesenchymal differentiation and glioblastoma [J]. *Cells* , 2018 , 7(9) : 125.

Expression and clinical significance of AEBP1 in glioblastoma

Ru Xiaoyu , Cheng Chuandong , Ji Ying

(Dept of Neurosurgery , The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University , Heifei 230001)

Abstract Objective To explore the expression of adipocyte enhancer-binding protein 1(AEBP1) in glioblastoma (GBM) and its effect on the prognosis. **Methods** The expression of AEBP1 mRNA in GBM was analyzed by Onco-mine database and GEPIA website. The GEPIA website and TCGA data were used to analyze the correlation between the expression level of AEBP1 mRNA and various clinicopathological features , as well as its influence on the prognosis of GBM. The expression of AEBP1 protein in glioma was further analyzed in the human protein atlas (HPA) database. Finally , the GO and KEGG analysis of AEBP1 and its co-expression genes were performed in WebGestalt website. **Results** All 7 data sets selected from Oncomine database and GEPIA website analysis showed that AEBP1 mRNA expression was up-regulated in GBM tissues , and the difference was statistically significant($P < 0.01$) . The survival analysis of GEPIA website showed that the overall survival(OS) of patients with high AEBP1 mRNA expression reduced , and the difference was statistically significant($P = 3.9 \times 10^{-5}$) . Further TCGA database analysis showed that AEBP1 mRNA expression level was correlated with IDH1 mutation($P = 0.005$) , and it was an independent factor influencing the OS in patients with GBM($HR = 0.5631(0.3902, 0.8127)$, $P = 2.16 \times 10^{-3}$) . KEGG pathway enrichment analysis showed that AEBP1 and its co-expressed genes were mainly enriched in Hippo , NF- κ B , TNF and other signaling pathways. **Conclusion** AEBP1 is highly expressed in GBM , and the high expression of AEBP1 mRNA is an independent prognostic factor for patients with GBM. Hippo , NF- κ B , TNF and other signaling pathways may be the important pathway for AEBP1 overexpression to promote the occurrence and development of GBM. AEBP1 is a potential target for GBM patients.

Key words AEBP1; glioblastoma; expression; clinical significance