

网络出版时间: 2016-8-10 11:04:49 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160810.1104.028.html

TPD52 在胶质瘤中的表达水平及临床意义

高兵兵¹, 秦浩¹, 秦家振², 孙移坤², 张昊驹¹, 刘晨², 侯江雷², 黄佛宝², 罗丹², 戴宜武¹

摘要 目的 探究 TPD52 在胶质瘤及正常脑组织中的表达及其临床意义。方法 收集 46 例胶质瘤患者病例标本及瘤旁正常脑组织,应用荧光定量 PCR、Western blot、免疫组织化学染色方法检测 TPD52 mRNA、蛋白的表达量,并分析临床指标与 TPD52 表达量之间的关系。结果 荧光定量 PCR 及 Western blot 结果具有一致性,均提示 TPD52 的表达量随胶质瘤病理分级升高,Ⅲ、Ⅳ级胶质瘤 TPD52 表达量明显高于正常脑组织、Ⅰ、Ⅱ级胶质瘤,差异有统计学意义($P < 0.05$)。免疫组织化学染色显示 TPD52 蛋白定位在胶质瘤细胞质中,67.4% 病理标本高表达 TPD52(++或+++)。结论 TPD52 mRNA 与蛋白在胶质瘤细胞中高表达,其蛋白表达量与胶质瘤病理分级呈正相关性,与生存期呈负相关性,其可能是胶质瘤临床治疗的一个潜在基因靶点。

关键词 胶质瘤; TPD52; 病理分级; 生存期

中图分类号 R 730.26

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)10-1521-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.028

脑胶质瘤是发病率最高的颅内恶性肿瘤,约占中枢神经系统肿瘤的一半^[1],平均生存期仅为 9~12 个月^[2]。虽然临床上“手术+放疗+化疗”^[3]为主的综合治疗发挥到极致,但由于胶质瘤的浸润性、放疗的低敏感性、血脑屏障对化疗药物的阻隔性,患者预后仍未明显改善。因此,研究者把目光转向基因治疗,经过多年的探索,基因治疗有望成为人类战胜肿瘤的手段之一,而靶基因的筛选是基因治疗的核心。TPD52 是近年来发现的一种原癌基因,其位于 8q12 染色体上,由 200 余个氨基酸组成^[4]。TPD52 基因被发现已有二十年,但对其作用的研究仍刚刚起步。目前为止,TPD52 在胶质瘤的作用仍未被报道。该研究通过检测 TPD52 在原发恶性胶质瘤以及瘤旁正常脑组织中的表达水平,分析其在

胶质瘤中的临床意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 胶质瘤标本来源于 2007 年 1 月~2012 年 1 月北京军区总医院附属八一脑科医院胶质瘤患者 46 例,其中男 20 例,女 26 例;年龄 37~75 (62.3±3.2) 岁。按照 WHO 病理分级标准,经术后病理证实,其中Ⅰ级 4 例,Ⅱ级 15 例,Ⅲ级 14 例,Ⅳ级 13 例。随访时间为 3 年。病例纳入标准:①患者均为原发胶质瘤且第一次行胶质瘤全切术;②术后行规范化放疗加替莫唑胺化疗;③患者无其他恶性肿瘤、全身系统性疾病及免疫性疾病。病例排除标准:①患者术后复发,再次手术;②非正常死亡患者。

1.2 实验材料与试剂 一抗:人 TPD52 抗体购自英国 Abcam 公司(ab132140);BCA 蛋白分析试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司);逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒(北京天根生物有限公司);引物由生工生物(北京)工程有限公司合成。

1.3 免疫组化 胶质瘤标本用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋、切片、脱蜡、水化,PBS 冲洗 3 遍,3% H₂O₂ 阻断,PBS 再次冲洗 3 遍,抗原修复,山羊血清封闭,加一抗(1:1 000 稀释)后 4℃ 过夜,PBS 冲洗 3 遍,滴加二抗后 37℃ 孵育 1 h,PBS 冲洗 3 遍,加 SP 后 37℃ 孵育 30 min,DAB 显色 5 min,苏木精复染、脱水、透明、封片。通过阳性细胞染色率与染色浓度方式评估 TPD52 蛋白表达量。阳性细胞染色率得分:0(<5%,阴性),1(5%~25%,弱阳性),2(25%~50%,阳性),3(>50%,强阳性)。细胞染色浓度得分:0(未染色),1(淡黄色),2(棕黄色),3(棕褐色)。免疫组化最终得分等于阳性细胞染色率×细胞染色浓度,为 0~9 分。TPD52 表达水平分为:-(0~1 分),+(2~3 分),++(4~6 分),+++ (7~9 分)。病理样本分为:TPD52 低表达组(TPD52-或 TPD52+),TPD52 高表达组(TPD52++或 TPD52+++)。

1.4 TPD52 mRNA 提取、逆转录与荧光定量 PCR 取约 60 g 冻存脑组织研磨成粉,总 RNA 的提取

2016-05-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81271391)

作者单位:¹安徽医科大学北京军区总医院附属八一脑科医院,北京 100000

²北京军区总医院附属八一医院脑科医院,北京 100000

作者简介:高兵兵,男,硕士研究生;

戴宜武,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: dddyyywww@163.com

采用 TRIzol 法,分光光度计测量总 RNA 在 260/280 下的浓度及纯度。然后,取 1 μg 总 RNA,行逆转录得到 cDNA。最后将 cDNA 适当稀释后行荧光定量 PCR 扩增评估 TPD52 表达水平,以 β -actin 作为内参基因。反应体系 20 μl ,包括 2 μl cDNA、2 $\times$ SYBR Premix Ex Taq II、0.4 μl 50 $\times$ ROX Reference Dye、各 0.8 μl 上下游引物、6 μl 无菌离子水。循环参数设置如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,总共 40 个循环。引物序列如下:TPD52 上游引物:5'-TTCACAGGCAGGACAGAAAGA-3',下游引物:5'-TTGAAGGTTCGACAGTTCCT-3'; β -actin 上游引物:5'-GTGGACATCCGCAAAGAC-3',下游引物:5'-AAAGGGTGTAAACGCAACTA-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法分析结果。

1.5 Western blot 法检测蛋白表达量 从液氮中取出冰冻的组织标本,提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。8% SDS-PAGE 胶电泳分离含 25 μg 的蛋白样品,将分离后的蛋白转移到 PVDF 膜,脱脂奶粉室温封闭 1 h,加一抗 TPD52(1:1 000)、GAPDH(1:2 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 洗 PVDF 膜 3 遍,加二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,再次 TBSA 洗 PVDF 膜 3 遍,显色。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件进行分析,组间、组内比较采用 t 检验,TPD52 蛋白表达量与患者年龄、性别的关系采用 Spearman 法分析,TPD52 蛋白表达量与患者生存期的关系采用 Kaplan-Meier 方法。

2 结果

2.1 TPD52 mRNA 在胶质瘤和正常脑组织中的表达水平 由于执行 PCR 扩增需要约 60 g 组织提取总 mRNA,部分病理标本体积较小,无法从瘤旁正常脑组织提取足够的总 mRNA,因此,选择其中 35 例来执行荧光定量 PCR 分析。经过对数据进行 ΔCt 值计算分析,瘤旁正常脑组织、胶质瘤组织 ΔCt

值分别为 5.02 ± 0.34 、 1.14 ± 0.20 ,采用配对 t 检验方法,结果显示与瘤旁正常脑组织比较,TPD52 mRNA 表达量在胶质瘤细胞中显著增高($P < 0.01$)。而且 TPD52 mRNA 表达量随胶质瘤病理分级升高而升高(图 1),I ~ II、III ~ IV 的 ΔCt 值分别为 1.45 ± 0.31 、 0.73 ± 0.47 ,在 III、IV 级胶质瘤中的表达量明显高于 I、II 级,表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。

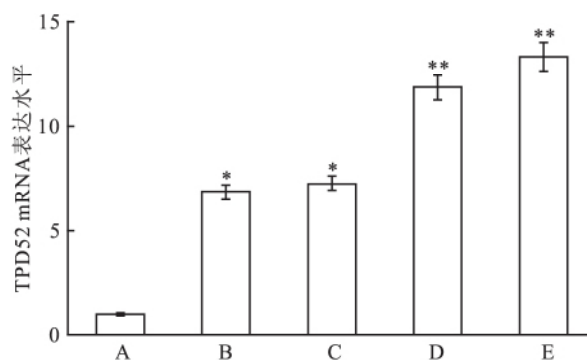


图 1 TPD52 mRNA 在不同级别胶质瘤与瘤旁正常脑组织中的表达量

A: 瘤旁正常脑组织; B: I 级胶质瘤; C: II 级胶质瘤; D: III 级胶质瘤; E: IV 级胶质瘤

2.2 免疫组化结果 通过免疫组织化学染色显示在胶质瘤标本中 TPD52 蛋白主要定位在细胞质中。在不同级别的胶质瘤中 TPD52 蛋白表达均为阳性,其中 31 例(67.4%)高表达 TPD52(++或+++),其余 15 例低表达 TPD52(-或+),而瘤旁正常脑组织中仅 5 例低表达 TPD52(-或+),表达阳性率为 10.8%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。TPD52 蛋白随胶质瘤病理分级升高而增高,I 级胶质瘤与 II 级胶质瘤、III 级胶质瘤与 IV 级胶质瘤 TPD52 蛋白表达差异无统计学意义,III ~ IV 级胶质瘤中 TPD52 蛋白的表达量明显高于 I ~ II 级胶质瘤中,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 2)。

2.3 Western blot 法检测蛋白量结果 TPD52 蛋

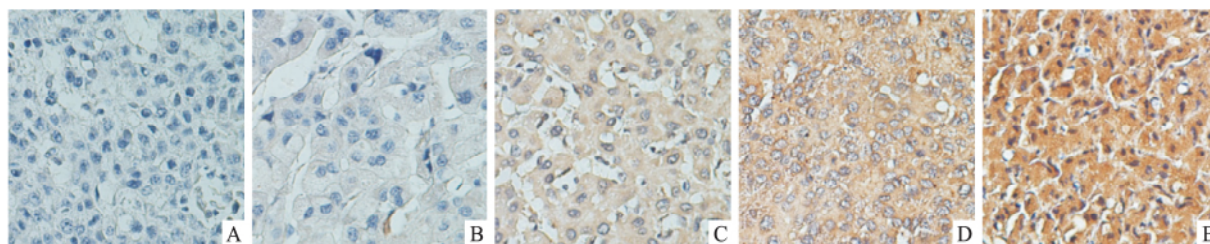


图 2 TPD52 蛋白在不同级别胶质瘤中的表达量 免疫组化 $\times 200$

A: 瘤旁正常脑组织; B: I 级胶质瘤; C: II 级胶质瘤; D: III 级胶质瘤; E: IV 级胶质瘤

白表达量与 TPD52 mRNA 表达量具有一致性。与瘤旁正常脑组织比较,胶质瘤明显高表达 TPD52 蛋白(图 3)。TPD52 蛋白表达量随胶质瘤级别升高而增加。在 IV 级胶质瘤中表达量最高,Western blot 条带灰度值最高,在正常脑组织中表达量最低,Western blot 条带灰度值最低,TPD52 蛋白在瘤旁正常脑组织、I ~ II 级胶质瘤、III ~ IV 级胶质瘤中表达量差异有统计学意义($P < 0.05$)。

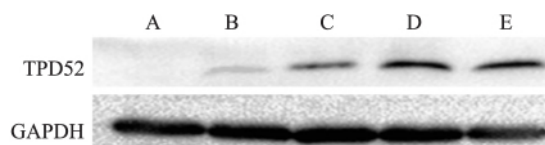


图 3 TPD52 蛋白在 4 组配对胶质瘤与瘤旁正常脑组织中的表达

A: 瘤旁正常脑组织; B: I 级胶质瘤; C: II 级胶质瘤; D: III 级胶质瘤; E: IV 级胶质瘤

2.4 TPD52 表达量与临床指标的关系 经对患者年龄、性别、WHO 病理分级、生存期临床指标与 TPD52 蛋白表达量进行统计分析(表 3),结果显示年龄、性别与 TPD52 蛋白表达量差异无统计学意义,而病理分级与 TPD52 蛋白表达量呈正相关性,生存期与 TPD52 蛋白表达量呈负相关性,高表达 TPD52 蛋白患者(中位生存期 11.74 个月)比低表达 TPD52 蛋白患者(中位生存期 23.32 个月)生存期短,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 4)。

表 3 胶质瘤中 TPD52 表达量与临床指标的关系(n)

因素	n	TPD52 蛋白表达量		χ^2 值	P 值
		低表达	高表达		
年龄(岁)					
≤50	21	8	13	1.732	>0.05
>50	25	7	18		
性别					
男	29	9	20	1.642	>0.05
女	17	6	11		
病理级别(级)					
I	4	4	0	9.346	<0.05
II	15	9	6		
III	14	2	12		
IV	13	0	13		
生存时间(年)					
≤2	34	5	29	2.876	<0.05
>2	12	10	2		

3 讨论

脑胶质瘤的发生发展是涉及多种基因相互作用

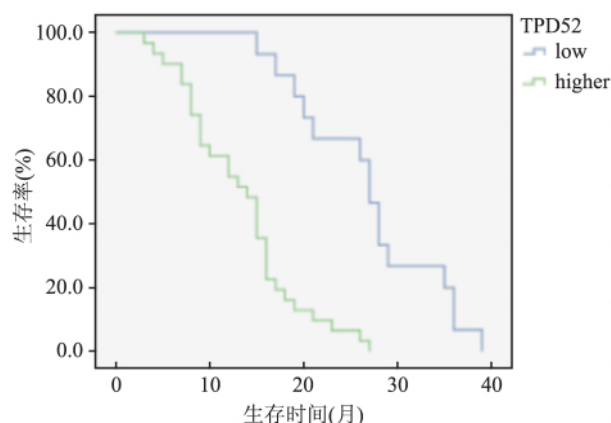


图 4 TPD52 表达量与患者生存期的关系

的复杂过程,包括一系列突变基因的积累、原癌基因的激活、抑癌基因的失活。因此,基因治疗成为人类战胜肿瘤的手段之一,而靶基因的筛选是基因治疗的核心。

TPD52 是一种原癌基因,由 200 余个氨基酸编码,位于 8q12 染色体上,这段区域在多种肿瘤中频繁扩增,与肿瘤的发生发展密切相关。TPD52 被首先报道在乳腺癌^[5]中过度表达。后续研究^[6]显示 TPD52 在肺癌、前列腺癌、卵巢癌、B 细胞淋巴瘤等恶性肿瘤中表达增高。

Chen et al^[7]发现肺癌组织比正常肺组织中的 TPD52 表达增高,Lewis et al^[8]进一步发现 TPD52 促进肺癌细胞的转化及转移。Wang et al^[9]发现在前列腺癌中 TPD52 表达量升高,前列腺癌病理分级越高其表达量越高,且预示着差的术后生存期。Byrne et al^[10]发现 TPD52 在卵巢癌中表达量同样升高,且与患者生存期呈负相关性。Ummanni et al^[11]报道 TPD52 在乳腺癌中的高表达与不良的预后有关,且促进乳腺癌细胞的扩增、侵袭。以上这些研究结果,说明 TPD52 是恶性肿瘤发生发展一种生物标志物,可能是基因治疗的靶点。研究^[7,9,11]表明 TPD52 在多种肿瘤组织中表达升高,与肿瘤分级、预后密切相关,参与肿瘤发生、扩增、浸润及转移等进程。Yang et al^[12]敲除乳腺癌中 TPD52 基因后,发现这可以抑制乳腺癌细胞的增殖及集落形成,使细胞周期停留在 G0/G1 期,促进 GSK3 β 磷酸化作用。Mirshahidi et al^[13]经过对 TPD52 基因研究,对乳腺癌小鼠模型采取 TPD52 基因治疗后,可明显延长模型鼠生存期。进一步证实了 TPD52 在恶性肿瘤治疗中拥有广泛的前景。

目前国际上关于 TPD52 在肿瘤中的表达水平、

临床意义及相关机制的报道仍很少,国内暂无此有关报道。本研究数据首次证实 TPD52 在胶质瘤组织中过度表达,瘤旁正常脑组织中不表达或少量表达。统计分析证实 TPD52 表达量与患者术后生存期呈负相关性。同时,本研究数据表明 TPD52 的表达量随病理分级升高而升高,这表明 TPD52 具有促进胶质瘤发生发展的作用。因此,TPD52 可能是胶质瘤分化程度及术后生存期的分子生物学指标。

综上所述,推测 TPD52 对胶质瘤的发生、发展具有一定的影响和促进作用,可能是反应胶质瘤恶性程度和预后的标志物,这提示 TPD52 是胶质瘤临床治疗的一个潜在基因靶点,为在胶质瘤治疗的研究中提供了新的思路和基因靶点。由于肿瘤的发生、发展是多种基因相互的结果,TPD52 在胶质瘤中具体机制尚不清楚,需要更深入的研究进行阐明。

参考文献

- [1] 程毅飞,张晓东,万强等.影响神经胶质瘤术后生存的相关因素分析[J].安徽医科大学学报,2014,49(8):1171-2.
- [2] 马摇璐,余永强.T 磁共振弥散张量纤维束成像对 SD 大鼠 C6 胶质瘤模型肿瘤生长特点随时间变化的影像学分析[J].安徽医科大学学报,2014,49(9):1233-7.
- [3] Jackson M, Bydder S, Maujean E, et al. Radiotherapy in the management of high-grade gliomas diagnosed in Western Australia: a patterns of care study[J]. J Med Imaging Radiat Oncol, 2012, 56(1): 109-15.
- [4] Lewis J D, Payton L A, Whitford J G, et al. Induction of tumorigenesis and metastasis by the murine orthologue of tumor protein D52 [J]. Mol Cancer Res, 2007, 5(2): 133-44.
- [5] Alkatout I, Friemel J, Sitek B, et al. Novel prognostic markers revealed by a proteomic approach separating benign from malignant insulinomas[J]. Mod Pathol, 2015, 28(1): 69-79.
- [6] Tennstedt P, Böhlch C, Strobel G, et al. Patterns of TPD52 overexpression in multiple human solid tumor types analyzed by quantitative PCR[J]. Int J Oncol, 2014, 44(2): 609-15.
- [7] Chen S L, Zhang X K, Halverson D O, et al. Characterization of human N8 protein[J]. Oncogene, 1997, 15(21): 2577-88.
- [8] Lewis J D, Payton L A, Whitford J G, et al. Induction of tumorigenesis and metastasis by the murine orthologue of tumor protein D52 [J]. Mol Cancer Res, 2007, 5(2): 133-44.
- [9] Wang R, Xu J, Mabjeesh N, et al. PrLZ is expressed in normal prostate development and in human prostate cancer progression [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(20): 6040-8.
- [10] Byrne J A, Maleki S, Hardy J R, et al. MAL2 and tumor protein D52(TPD52) are frequently overexpressed in ovarian carcinoma, but differentially associated with histological subtype and patient outcome[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 497.
- [11] Ummanni R, Teller S, Junker H, et al. Altered expression of tumor protein D52 regulates apoptosis and migration of prostate cancer cells[J]. FEBS J, 2008, 275(22): 5703-13.
- [12] Yang M, Wang X, Jia J, et al. Tumor protein D52-like 2 contributes to proliferation of breast cancer cells[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2015, 30(1): 1-7.
- [13] Mirshahidi S, Kramer V G, Whitney J B, et al. Overlapping synthetic peptides encoding TPD52 as breast cancer vaccine in mice: prolonged survival[J]. Vaccine, 2009, 27(12): 1825-33.

Expression level of TPD52 in gliomas and its clinical significance

Gao Bingbing¹, Qin Hao¹, Qin Jiazhen², et al

(¹Affiliated Bayi Brain Hospital of General Hospital of Beijing Military Command, Anhui Medical University, Beijing 100000; ²Affiliated Bayi Brain Hospital of General Hospital of Beijing Military Command, Beijing 100000)

Abstract Objective To explore the expression of tumor protein D52(TPD52) in human glioma and normal brain tissue and its clinical significance. **Methods** Collecting specimens of 46 cases of gliomas and normal brain tissue adjacent to tumours. The expression of TPD52 was investigated by real-time quantitative PCR, Western blot and immunohistochemistry in gliomas. The relationships between TPD52 expression and clinical factors were analyzed. **Results**

The results of real-time quantitative PCR and Western blot showed that the expression of TPD52 mRNA and protein significantly increased in glioma tissues as compared with those in normal brain tissues. Immunohistochemistry displayed that 67.4% glioma tissues expressed higher TPD52 protein. **Conclusion** The expressions of TPD52 mRNA and protein are significantly higher in glioma than normal brain tissue, and the expression of TPD52 protein is positively associated with glioma WHO classification and negatively associated with patients lifetime. It may be a potential target genes to treat gliomas.

Key words glioma; TPD52; pathological grade; lifetime