

TM4SF1 与脑胶质瘤病理分级及预后的相关性

霍宏志 梁 金 柴尔青

【摘要】目的 探讨跨膜四蛋白超家族成员 1(TM4SF1)与脑胶质瘤病理分级及预后的相关性。方法 应用生信分析方法,计算机检索 TCGA 数据库,采用 GEPIA 分析 TM4SF1 表达胶质瘤病理分级及生存预后的关系。收集 2014 年 3 月至 2017 年 4 月手术切除的脑胶质瘤 83 例[低级别胶质瘤(LGG)35 例和高级别胶质瘤(HGG)48 例]和 23 例颅脑损伤内减压术切除的非肿瘤脑组织为对照,采用免疫组化染色法检测组织 TM4SF1 表达情况,术后随访 4 年,记录无进展生存期(PFS)和总生存期(OS)。结果 生信分析显示:胶质瘤组织 TM4SF1 mRNA 表达量明显高于正常脑组织($P<0.05$);而且,HGG 组织 TM4SF1 mRNA 表达量明显高于 LGG 组织($P<0.05$)。TM4SF1 高表达 HGG 病人 OS 较低表达病人明显缩短($P<0.05$);TM4SF1 高表达 LGG 病人 PFS、OS 较低表达病人均明显缩短($P<0.05$)。临床病例分析显示:胶质瘤 TM4SF1 高表达率[50.60%(42/83)]明显高于非肿瘤脑组织[13.04%(3/23); $P<0.01$];HGG 组织 TM4SF1 高表达率[60.42%(29/48)]明显高于 LGG 组织[37.14%(13/35); $P<0.05$];多因素 Cox 比例回归风险模型分析显示,TM4SF1 高表达是胶质瘤病人生存预后不良的独立危险因素($P<0.05$);生存曲线分析显示,TM4SF1 高表达病人中位 PFS 和 OS 较低表达病人明显缩短($P<0.05$)。结论 脑胶质瘤 TM4SF1 呈高表达,与肿瘤病理分级、不良生存预后有关。

【关键词】脑胶质瘤;跨膜四蛋白超家族成员 1(TM4SF1);病理分级;生存预后

【文章编号】1009-153X(2022)06-0447-05 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41; Q 786

Relationship between expression of TM4SF1 in glioma tissues and malignancy and prognosis of gliomas

HUO Hong-zhi, LIANG Jin, CHAI Er-qing. Department of Neurosurgery, Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou 730000, China

【Abstract】Objective To investigate the relationship between the expression of transmembrane-4-L-six-family-1 (TM4SF1) in glioma tissues and the malignancy and prognosis of gliomas. Methods The TCGA database was searched by computer to analyze the relationship between TM4SF1 expression and pathological grade and survival prognosis of glioma patients using bioinformatics analysis method GEPIA. The expressions of TM4SF1 were detected using immunohistochemical staining in glioma tissues obtained from 83 glioma patients [35 low-grade glioma (LGG) and 48 high-grade glioma (HGG)] who underwent surgery from March 2014 to April 2017 and in non-tumor tissues obtained from 23 patients with traumatic brain injury who underwent decompression. These 83 glioma patients were followed up for 4 years, and the progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were recorded. Results Bioinformatics analysis showed that the expression of TM4SF1 mRNA in glioma tissues was significantly higher than that in normal brain tissue ($P<0.05$); the expression of TM4SF1 mRNA in HGG tissues was significantly higher than that in LGG tissues ($P<0.05$); the OS of HGG patients with high expression of TM4SF1 was significantly shorter than that of HGG patients with low expression of TM4SF1 ($P<0.05$); the PFS and OS of LGG patients with high expression of TM4SF1 were significantly shorter than that of LGG patients with low expression of TM4SF1 ($P<0.05$). Analysis of clinical cases showed that the high expression rate of TM4SF1 in glioma tissues [50.60% (42/83)] was significantly higher than that in non-tumor brain tissues [13.04% (3/23); $P<0.01$]; the high expression rate of TM4SF1 in HGG tissues [60.42% (29/48)] was significantly higher than that of LGG tissue [37.14% (13/35); $P<0.05$]; multivariate Cox proportional regression hazard model analysis showed that high expression of TM4SF1 was an independent risk factor of poor survival prognosis in glioma patients ($P<0.05$); survival curve analysis showed that the median PFS and OS of patients with high TM4SF1 expression were significantly shorter than those of patients with low TM4SF1 expression ($P<0.05$). Conclusions The expression of TM4SF1 in gliomas is up-regulated, which is related to the pathological grade and poor survival prognosis.

【Key words】Glioma; Transmembrane-4-L-six-family-1 (TM4SF1); Pathological grade; Prognosis; Risk factor

胶质瘤是成人最常见、最具侵袭性的原发性颅内肿瘤^[1]。目前,胶质瘤的治疗方法包括手术、化疗和放疗^[2],但是效果仍不理想,脑胶质瘤的治疗仍然是一个严重的临床和科学问题。研究发现,一些分子与脑胶质瘤的个体化预后密切相关。跨膜四蛋白超家族成员 1(transmembrane 4 super family 1, TM4SF1)是一种四联体跨膜结构域表面蛋白,属于

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2022.06.005
作者单位:730000 兰州,甘肃省人民医院神经外科(霍宏志、梁 金、柴尔青)
通讯作者:柴尔青,E-mail:gyj-123@163.com

L6 四聚糖超家族成员,由于含有 4 个跨膜结构域,可与多种蛋白(如整合素、受体酪氨酸激酶、免疫蛋白等)形成复合物,参与多种细胞生物学过程,如细胞的运动、粘附、增殖、迁移和侵袭^[3]。本文探讨 TM4SF1 与脑胶质瘤病理分级及预后的关系。

1 资料与方法

1.1 生信分析 从公开的肿瘤基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA) (<https://cancergenome.nih.gov/>)筛选脑胶质瘤病人数据集,包括基因表达谱和临床信息,共获得 5 个正常脑组织、529 个低级别脑胶质瘤(low grade glioma, LGG)组织和 169 个胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)组织,后续处理排除年龄、总生存时间数据不足或缺失的病例。首先转换 RNA 测序数据,将计数数据转换为与微阵列结果更相似的值。为了研究 TM4SF1 表达对预后的影响,根据 TM4SF1 的表达将肿瘤组织分为高表达和低表达两组。利用基因表达谱交互分析(Gene Expression Profiling Interactive Analysis GEPIA)在线数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>)确认 TM4SF1 表达与临床病理信息之间的相关性。从 RNA 测序表达数据中分析 9 736 个肿瘤组织样本,并从 GTEx 和 TCGA 项目中分析 8 587 个正常组织样本。GEPIA 分析 TM4SF1 差异表达的生存曲线,以发现该基因表达与病人预后的相关性。同时,以疾病状态(肿瘤或正常)为变量绘制箱线图,以计算 TM4SF1 基因的差异表达。

1.2 临床病例分析

1.2.1 标本来源 收集 2014 年 3 月至 2017 年 4 月手术切除的 83 例脑胶质瘤标本,其中男 52 例,女 31 例;中位年龄 54.0 岁。LGG 共 35 例,其中弥漫性星形胶

质细胞瘤 12 例,少突胶质细胞瘤 13 例,少突星形胶质细胞瘤 10 例。高级别胶质瘤(high grade glioma, HGG)48 例,其中间变性星形细胞瘤 18 例,间变性少突胶质细胞瘤 13 例,GBM 有 13 例,弥漫性中线胶质瘤 4 例。排除复发性胶质瘤、合并其他部位原发性恶性肿瘤、合并严重的基础性疾病。同时,收集颅脑损伤内减压术切除的非肿瘤脑组织标本 23 例为对照组,其中男 14 例,女 9 例;中位年龄 52.0 岁。

1.2.2 免疫组化染色法检测 TM4SF1 蛋白表达 采用 SP 法进行免疫组化染色。组织石蜡包埋后切片(4 μm)。二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,10 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)煮沸修复抗原。用含 0.3% H₂O₂ 的甲醇溶液孵育 30 min 抑制内源性过氧化物酶活性,用 2% 正常山羊血清封闭 30 min。加入兔抗人 TM4SF1 单克隆抗体(1:500,美国 Abgent 公司)4 °C 孵育过夜。PBS 洗涤后,用兔生物素化二抗室温孵育 30 min。用 DAB 显色后,用苏木精复染,显微镜下观察。根据染色强度评分和阳性染色细胞比例评估 TM4SF1 的表达(图 1)^[4]。染色强度:无染色计 0 分,淡黄色计 1 分,棕黄色计 2 分,棕色或棕褐色计 3 分。阳性染色细胞的百分比:<5%计 0 分;5%~25%计 1 分,26%~50%计 2 分,51%~75%计 3 分,>75%计 4 分。染色强度与染色细胞百分比乘积≥3 分为高表达。

1.2.3 随访 至少随访 5 年。无进展生存期(progression-free survival, PFS)定义为初次手术到肿瘤进展的时间;影像学检查如 CT、MRI 和 PET 证实复发。总生存期(overall survival, OS)从初次手术到死亡或最后随访的日期。

1.2.4 统计学处理 使用 SPSS 17.0 软件分析;定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验;定性资料采用 χ^2 检验;多

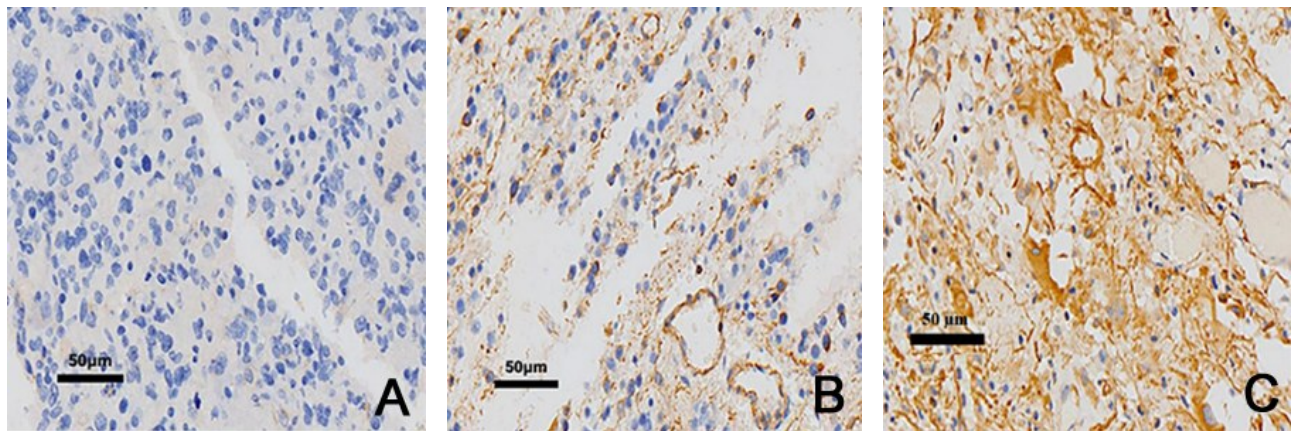


图 1 免疫组化染色检测 TM4SF1 表达情况(SP 法, ×200)
A. 非肿瘤脑组织; B. 低级别胶质瘤; C. 高级别胶质瘤

因素 Cox 比例回归风险模型分析 PFS 和 OS 的影响因素;Kaplan-Meier 生存曲线分析 TM4SF1 表达水平与 PFS 和 OS 的关系; $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学分析结果 GEPIA 分析显示,包括 GBM 在内的多种肿瘤 TM4SF1 表达上调(图 2A)。相较于正常脑组织,LGG 和 GBM 组织 TM4SF1 mRNA 表达量均明显升高($P<0.05$;图 2B);而且 GBM 组织 TM4SF1 mRNA 表达量明显高于 LGG 组织($P<0.05$;图 2B)。TM4SF1 高表达 GBM 病人 OS 较低表达病人明显缩短($P<0.05$;图 2C)。TM4SF1 高表达 LGG 病人 PFS、OS 较低表达病人均明显缩短($P<0.05$;图 2C)。

2.2 临床标本分析结果

2.2.1 胶质瘤 TM4SF1 表达 胶质瘤 TM4SF1 高表达率[50.60%(42/83)]明显高于非肿瘤脑组织[13.04%

(3/23); $P<0.01$]。HGG 组织 TM4SF1 高表达率[60.42%(29/48)]明显高于 LGG 组织[37.14%(13/35); $P<0.05$]。

2.2.2 胶质瘤生存预后影响因素 随访期间,26 例(31.33%)肿瘤进展/复发,41 例(49.40%)死亡。多因素 Cox 比例回归风险模型分析显示,TM4SF1 高表达是胶质瘤病人生存预后不良的独立危险因素($P<0.05$;表 1、2)。

2.2.3 TM4SF1 表达水平与脑胶质瘤病人 PFS 和 OS 的关系 Kaplan-Meier 生存曲线分析显示,TM4SF1 高表达病人中位 PFS 和 OS 较低表达病人明显缩短($P<0.05$;图 3)。

3 讨论

脑胶质瘤现已成为仅次于脑卒中的中枢神经系统疾病的第二大致死原因。2016 年,WHO 对中枢神经系统肿瘤分类进行了修订,将分子生物标志物与

表 1 本文 83 例胶质瘤无进展生存期影响因素的 Cox 比例回归风险模型分析

危险因素	单因素		多因素	
	风险比(95%置信区间)	P 值	风险比(95%置信区间)	P 值
年龄≥60 岁	1.387(0.555~3.466)	0.484		
男性	0.884(0.355~2.204)	0.791		
WHO 分级Ⅲ~Ⅳ级	3.212(1.241~9.047)	0.024	1.885(1.294~4.005)	0.003
肿瘤直径≥2.5 cm	1.416(0.356~2.612)	0.131		
术前 KPS 评分≥70 分	0.789(0.631~1.850)	0.251		
IDH1 突变型	0.679(0.443~1.705)	0.121		
染色体 1p/19q 共缺失	0.556(0.125~1.371)	0.212		
肿瘤全切除	0.630(0.549~0.828)	0.005	0.776(0.650~0.910)	0.004
术后同步放化疗	0.702(0.618~0.881)	0.009	0.867(0.773~0.955)	0.004
TM4SF1 阳性表达	2.681(1.744~4.566)	0.012	1.435(1.036~3.607)	0.025

表 2 本文 83 例胶质瘤总生存期影响因素的 Cox 比例回归风险模型分析

危险因素	单因素		多因素	
	风险比(95%置信区间)	P 值	风险比(95%置信区间)	P 值
年龄≥60 岁	1.487(1.155~3.466)	0.024	1.254(1.125~3.856)	0.031
男性	1.884(0.655~3.104)	0.291		
WHO 分级Ⅲ~Ⅳ级	2.315(1.125~4.123)	0.014	2.105(1.895~4.265)	0.013
肿瘤直径≥2.5 cm	1.125(0.523~3.542)	0.231		
术前 KPS 评分≥70 分	0.889(0.731~0.950)	0.012	0.852(0.786~0.924)	0.008
IDH1 突变型	0.875(0.812~0.965)	0.005	0.825(0.786~0.924)	0.009
染色体 1p/19q 共缺失	0.956(0.875~0.982)	0.002	0.924(0.882~0.995)	0.005
肿瘤全切除	0.860(0.799~0.958)	0.005	0.876(0.820~0.960)	0.003
术后同步放化疗	0.802(0.768~0.875)	0.008	0.807(0.776~0.905)	0.006
TM4SF1 阳性表达	1.854(1.544~3.526)	0.015	1.485(1.106~3.457)	0.018

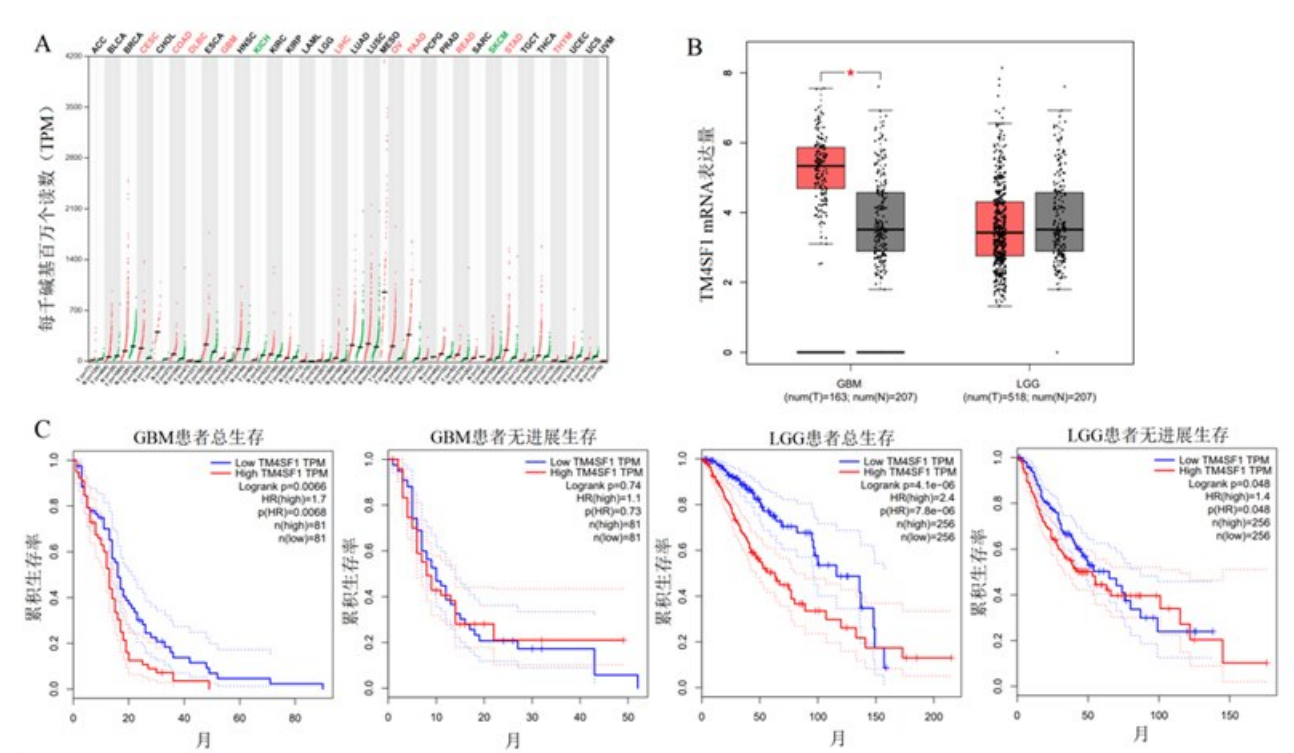


图2 GEPIA 分析脑胶质瘤TM4SF1 mRNA 表达及与病人预后的关系

A. 各种肿瘤组织和相应的正常组织TM4SF1 mRNA 表达情况;B. 不同病理级别胶质瘤TM4SF1 mRNA 表达;C. TM4SF1 mRNA 表达与胶质瘤病人总生存期、无病生存期的关系;LGG. 低级别胶质瘤;GBM. 胶质母细胞瘤

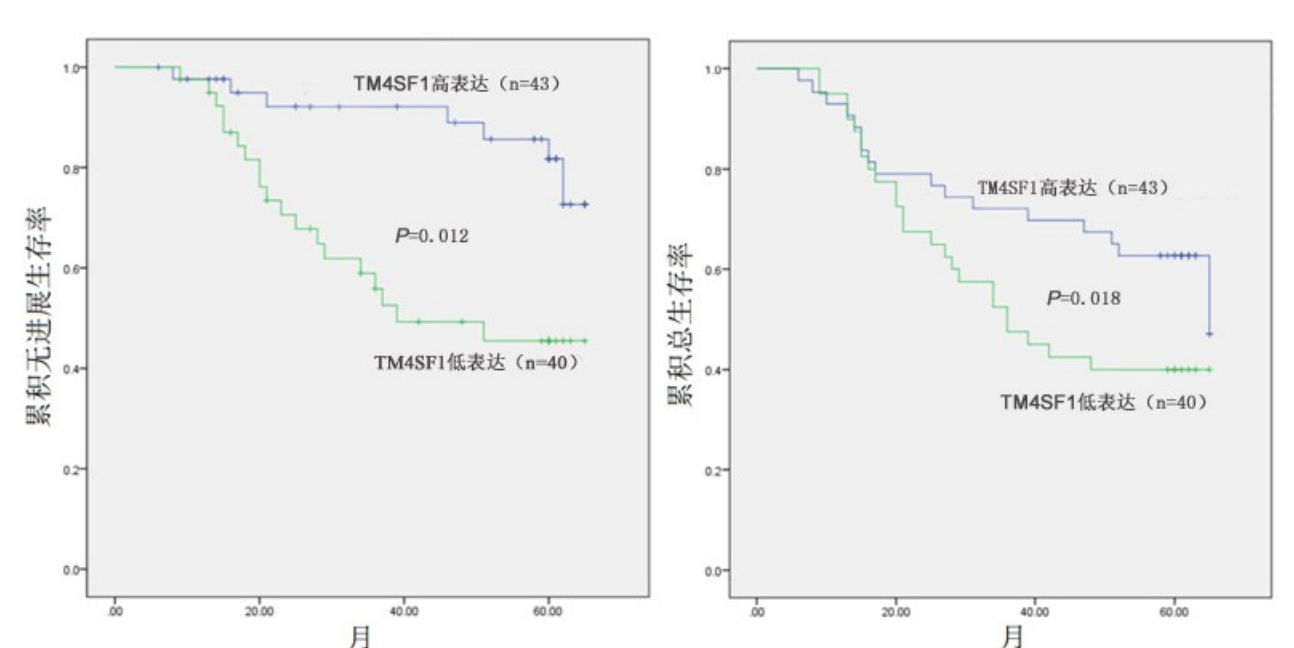


图3 Kaplan-Meier 生存曲线分析TM4SF1 表达与胶质瘤病人无进展生存期、总生存期的关系

经典组织学特征纳入综合分析,以便尽可能精确地定义不同的胶质瘤^[5]。这种模式的转变显著地改变了胶质瘤的诊治方式。

我们通过 GEPIA 分析发现,LGG 和 GBM 组织 TM4SF1 mRNA 表达均明显上调;同时,我院临床标本分析显示,TM4SF1 高表达脑胶质瘤病人术后复发或死亡的风险更高。研究表明,TM4SF1 在促进肿瘤细胞增殖和迁移方面发挥着不可或缺的作用^[6]。TM4SF1 能够通过 JAK2/STAT3 信号通路和 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进人肝癌细胞增殖和存活^[7]。TM4SF1 还可以通过 PAR γ -SIRT1 反馈环路调节膀胱癌细胞的凋亡和细胞周期^[8]。另外,TM4SF1 作为一些 miRNAs (miR-141、miR-9、miR-203) 的直接靶点,能够促进食管癌和乳腺癌细胞的自我更新、侵袭和迁移^[9]。这些研究结果显示 TM4SF1 具有促癌基因的活性。然而,也有学者持不同意见。Peng 等^[10]发现 TM4SF1 在胃癌组织中表达下调,TM4SF1 低表达与胃癌的发生、发展、肿瘤的进展和侵袭以及胃癌病人的总体生存率降低有关。此外,Xu 等^[11]认为 TM4SF1 高表达与胰腺癌病人生存预后良好有关;体外实验发现,转化生长因子 β 1 可下调 TM4SF1 表达并诱导胰腺癌细胞发生上皮间质转化,促进细胞的迁移和侵袭。这说明 TM4SF1 表达和功能具有一定的组织特异性,其原因可能是 TM4SF1 受不同的信号通路调节,不同的亚细胞位置在不同恶性肿瘤的发生发展中起着不同的作用,因而导致不同的临床预后。脑胶质瘤病人的预后与病理分级密切相关,例如 GBM 是一种高度血管化的肿瘤,病人的 5 年生存率大约为 10%^[12]。然而,本文纳入的 GBM 较少,各亚型脑胶质瘤病人纳入不均衡可能也影响了最后的多因素分析。但是,不能忽视 TM4SF1 在脑胶质瘤进展过程中的作用。

总之,脑胶质瘤组织 TM4SF1 呈高表达,与肿瘤病理分级、不良生存预后有关。

【参考文献】

[1] Chen R, Smith-Cohn M, Cohen AL, *et al.* Glioma subclassifications and their clinical significance [J]. *Neurotherapeutics*, 2017, 14(2): 284-297.

[2] Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, *et al.* The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review [J]. *Neuro Oncol*, 2014, 16(7): 896-913.

[3] 姚红羽,阳志军. TM4SF1 在恶性肿瘤研究中的进展[J]. *医学与哲学(B)*, 2018, 13(3): 60-63.

[4] 刘佳艺,邵梦楠,檀燕君,等. 口腔鳞状细胞癌组织中 TM4SF1 mRNA 的筛选及其蛋白的表达变化观察[J]. *山东医药*, 2020, 60(6): 55-57.

[5] Wesseling P, Capper D. WHO 2016 classification of gliomas [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2018, 44(2): 139-150.

[6] Gao C, Yao H, Liu H, *et al.* TM4SF1 is a potential target for anti-invasion and metastasis in ovarian cancer [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 237-248.

[7] Huang YK, Fan XG, Qiu F. TM4SF1 promotes proliferation, invasion, and metastasis in human liver cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5): 661-679.

[8] Cao R, Wang G, Qian K, *et al.* TM4SF1 regulates apoptosis, cell cycle and ROS metabolism via the PPAR γ -SIRT1 feedback loop in human bladder cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2018, 414: 278-293.

[9] Park YR, Kim SL, Lee MR, *et al.* MicroRNA-30a-5p (miR-30a) regulates cell motility and EMT by directly targeting oncogenic TM4SF1 in colorectal cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017, 143(10): 1915-1927.

[10] Peng XC, Zeng Z, Huang YN, *et al.* Clinical significance of TM4SF1 as a tumor suppressor gene in gastric cancer [J]. *Int J Colorectal Dis*, 1997, 12(1): 19-23.

[11] Xu D, Yang F, Wu K, *et al.* Lost miR-141 and upregulated TM4SF1 expressions associate with poor prognosis of pancreatic cancer: regulation of EMT and angiogenesis by miR-141 and TM4SF1 via AKT [J]. *Cancer Biol Ther*, 2020, 21(4): 354-363.

[12] Reifenberger G, Wirsching HG, Knobbe-Thomsen CB, *et al.* Advances in the molecular genetics of gliomas--implications for classification and therapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(7): 434-452.

(2022-03-16 收稿, 2022-04-25 修回)