

H3K27me3 与高级别胶质瘤生存预后的关系

陈智超 薛奥诺 时金昭

【摘要】目的 探讨组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸三甲基化(H3K27me3)与高级别胶质瘤生存预后的关系。**方法** 选取 2015 年 6 月至 2017 年 9 月手术切除的 64 例高级别胶质瘤标本,另选取颅脑损伤内减压术中切除的非肿瘤脑组织 10 例为对照,免疫组织化学染色法检测组织 H3K27me3 表达,根据染色评分分为高表达和低表达。随机选取 3 例非肿瘤脑组织、3 例 WHO 分级Ⅲ级胶质瘤组织、3 例 WHO 分级Ⅳ级胶质瘤组织,应用免疫印迹法检测 H3K27me3 的蛋白表达。胶质瘤病人随访截止 2022 年 10 月,记录总体生存期。**结果** 免疫组化染色检测结果显示,高级别胶质瘤组织 H3K27me3 高表达率(59.37%)明显高于非肿瘤脑组织(20.00%; $P<0.05$)。免疫印迹法检测结果显示,WHO 分级Ⅳ级胶质瘤组织 H3K27me3 蛋白表达水平明显高于 WHO 分级Ⅲ级胶质瘤组织和非肿瘤脑组织($P<0.05$)。64 例胶质瘤中位随访时间为 62.23 个月,5 年生存率为 37.5%。多因素 Cox 回归分析显示,H3K27me3 高表达是高级别胶质瘤不良生存预后的独立影响因素($P<0.05$)。生存曲线分析显示,H3K27me3 高表达高级别胶质瘤病人中位生存期(18 个月)明显低于低表达病人(33 个月; $P<0.05$)。**结论** H3K27me3 在高级别胶质瘤组织中高表达,与病人不良生存预后有关。

【关键词】 高级别胶质瘤;组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸三甲基化(H3K27me3);基因表达;生存预后

【文章编号】 1009-153X(2023)10-0635-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Relationship between H3K27me3 and survival prognosis of patients with high-grade gliomas

CHEN Zhi-chao, XUE Ao-nuo, SHI Jin-zhao. Department of Neurosurgery, Nanjing Medical University Affiliated Mingji Hospital, Nanjing 210000, China

【Abstract】Objective To investigate the relationship between expression of trimethylated histone H3 at lysine 27 (H3K27me3) in glioma tissues and survival prognosis of patients with high-grade gliomas. **Methods** The expressions of H3K27me3 were detected in glioma tissues obtained from 64 patients with high-grade gliomas who underwent surgery from June 2015 to September 2017, and in non-tumor brain tissues obtained from 10 patients with traumatic brain injury who underwent decompression using immunohistochemical staining. The protein expression of H3K27me3 was detected by western blotting in non-tumor brain tissues ($n=3$), WHO grade Ⅲ glioma tissues ($n=3$) and WHO grade Ⅳ glioma tissues ($n=3$). Patients with gliomas were followed up until October 2022 and their overall survival times were recorded. **Results** Immunohistochemical staining showed that the high expression rate of H3K27me3 in high-grade glioma tissues (59.37%) was significantly higher than that (20.00%) in non-tumor brain tissues ($P<0.05$). Western blotting showed that H3K27me3 protein expression level in WHO grade Ⅳ glioma tissues was significantly higher than those in WHO grade Ⅲ glioma tissues and non-tumor brain tissues ($P<0.05$). The median follow-up time of 64 patients with glioma was 62.23 months, and the 5-year survival rate was 37.5%. Multivariate Cox regression analysis showed that high expression of H3K27me3 was an independent risk factor for poor survival prognosis of patients with high-grade gliomas ($P<0.05$). Survival curve analysis showed that the median survival time (18 months) of patients with high H3K27me3 expression was significantly lower than that of patients with low H3K27ME3 expression (33 months; $P<0.05$). **Conclusions** H3K27me3 is highly expressed in high-grade gliomas, which is associated with poor survival prognosis of patients.

【Key words】 High grade gliomas; Trimethylated histone H3 at lysine 27 (H3K27me3); Prognosis

根据 WHO 分级,胶质瘤分为 I~Ⅳ级,其中Ⅲ~Ⅳ级为高级别胶质瘤^[1]。高级别胶质瘤的恶性程度较高,具有侵袭性高、术后易复发等特点^[1]。研究显

示,胶质母细胞瘤(WHO 分级Ⅳ级)的中位生存时间约 12 个月^[2]。寻找高级别胶质瘤的生物学标志物具有重要意义。组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸三甲基化(trimethylated histone H3 at lysine 27, H3K27me3)是最常见的组蛋白甲基化修饰之一,调节基因表达和染色质功能^[3]。研究发现,H3K27me3 参与细胞增殖、分化,与乳腺癌^[4]、非小细胞肺癌^[5]、胶质瘤^[6]等发生、发展有关。本文分析 H3K27me3 与高级别胶质

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2023.10.008
基金项目:南京市医学科技发展资金(QRX21099)
作者单位:210000 南京,南京医科大学附属明基医院神经外科(陈智超、薛奥诺、时金昭)

瘤生存预后的关系。

1 资料与方法

1.1 病例选择标准 纳入标准:①年龄 ≥ 18 岁;②病理学检查证实为高级别胶质瘤(WHO 分级Ⅲ~Ⅳ级);③术前未接受放疗或化疗。排除标准:①复发性胶质瘤;②合并其他类型肿瘤;③随访资料不全。

1.2 标本来源 选取 2015 年 6 月至 2017 年 9 月手术切除的 64 例高级别胶质瘤标本,其中男 35 例,女 29 例;年龄 29~67 岁,平均 (48.24 ± 10.21) 岁;WHO 分级Ⅲ级 45 例(间变性弥漫性星形细胞瘤 34 例,间变性弥漫性少枝胶质细胞瘤 11 例),Ⅳ级 19 例(胶质母细胞瘤)。另选取颅脑损伤内减压术中切除的非肿瘤脑组织 10 例为对照,其中男 6 例,女 4 例;年龄 27~62 岁,平均 (47.12 ± 3.29) 岁。

1.3 免疫组化染色检测 H3K27me3 的表达 高级别胶质瘤组织和非肿瘤脑组织经 10%中性福尔马林(湖北康迪斯化工有限公司)固定,随后梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋。切片由本院病理科制备(厚度为 4 μm)。免疫组化检测前进行抗原修复,随后按照免疫组化检测试剂盒(EnVision 两步法,北京中杉金桥生物技术有限公司)说明书操作,加入兔抗人 H3K27me3 多克隆抗体(1:1 000,武汉康义盛生物科技有限公司)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日滴加酶标羊抗兔抗体(1:1 000,武汉康义盛生物科技有限公司),DAB 显色,苏木精染色,最后中性树胶封闭,显微镜观察。H3K27me3 表达评分为染色强度评分和阳性细胞比例评分相乘, ≥ 4 分为高表达(图 1)。染色强度评分:未着色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;阳性细胞比例评分:低于 5%为 0 分,6%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,高于 75%为 4 分^[7]。

1.4 免疫印迹法检测 H3K27me3 的表达 随机选取 6 例高级别胶质瘤组织(WHO 分级Ⅲ、Ⅳ级各 3 例)和 3 例非肿瘤脑组织,加入细胞裂解液和蛋白酶抑制剂(上海嵎崑达实业有限公司),冰上裂解 30 min 后离心 10 min,用 BCA 试剂盒(上海康朗生物科技有限公司)进行蛋白定量。随后加入上样缓冲液,并煮沸 5 min,用 SDS-PAGE(上海康朗生物科技有限公司)分离蛋白并将其转移至 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶封闭 1 h。加入 H3K27me3 抗体(1:1 000,美国 Sigma 公司)孵育过夜。洗膜 3 次后,加入羊抗兔 IgG 抗体(1:5 000,美国 Sigma 公司),孵育 1 h 后洗膜 3 次,最后进行 ECL 显色,采用 Image J 软件分析条带灰度值。

1.5 随访 术后门诊或电话随访,截止 2022 年 10 月。记录总体生存时间,定义为手术当日至因任何原因引起死亡的时间。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件分析;正态分布计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 t 检验;计数资料用 χ^2 检验;用多因素 Cox 比例回归风险模型分析预后影响因素;Kaplan-Meier 法制作生存曲线分析 H3K27me3 表达水平与生存预后的关系; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高级别胶质瘤组织 H3K27me3 的表达水平 免疫组化染色检测结果显示,高级别胶质瘤组织 H3K27me3 高表达 38 例(59.37%),其中 WHO 分级Ⅲ级组织 27 例,Ⅳ级组织 11 例;非肿瘤脑组织 H3K27me3 高表达 2 例(20.00%)。高级别胶质瘤组织 H3K27me3 高表达率明显高于非肿瘤脑组织($P < 0.05$)。免疫印迹法检测结果显示,WHO 分级Ⅳ级胶质瘤组织 H3K27me3 蛋白表达水平明显高于 WHO 分级Ⅲ级胶质瘤组织和非肿瘤脑组织($P < 0.05$,图 1)。

2.2 随访结果 中位随访时间为 62.23 个月,5 年生存率为 37.5%。

2.3 总体生存期的影响因素 多因素 Cox 回归分析显示,H3K27me3 高表达是高级别胶质瘤不良生存预后的独立影响因素($P < 0.05$,表 1)。

2.4 H3K27me3 表达水平与高级别胶质瘤生存预后的关系 生存曲线分析显示,H3K27me3 高表达高级别胶质瘤病人中位生存期(18 个月)明显低于低表达病人(33 个月; $P < 0.05$;图 2)。

3 讨论

高级别胶质瘤的生存预后较差^[8],一直是临床关注的重点。虽然近年来放化疗技术有了明显提高,但是高级别胶质瘤总体生存预后仍未见明显提高^[9]。表观遗传学修饰如 DNA 甲基化、组蛋白甲基化等,与高级别胶质瘤发生、发展密切相关^[10,11]。表观遗传学修饰可能是高级别胶质瘤的诊治靶点,需要深入探讨。

组蛋白甲基化是一种非常重要的组蛋白修饰,在维持 DNA 结构、保护遗传学信息和基因表达调控中起到关键作用^[12]。组蛋白 H3 是发生修饰最多的亚基,其中第 27 位赖氨酸残基是甲基化修饰的研究热点。H3K27me3 是组蛋白 H3 亚基最为稳定的修

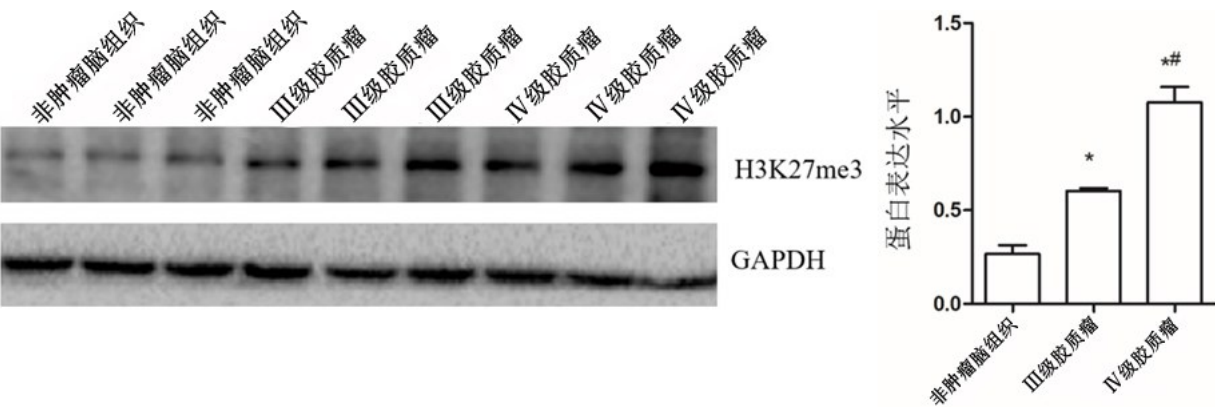


图1 免疫印迹法检测组织 H3K27me3 表达
与非肿瘤脑组织比较,* $P<0.05$;与 WHO 分级Ⅲ级胶质瘤组织比较,# $P<0.05$

表1 高级别胶质瘤生存预后影响因素的Cox比例回归风险模型分析

危险因素	单因素			多因素		
	风险比值	95%可信区间	P 值	风险比值	95%可信区间	P 值
年龄(≥50 岁/<50 岁)	1.339	0.675~2.165	0.178			
性别(男/女)	1.001	0.712~1.254	0.401			
WHO 分级(Ⅳ级/Ⅲ级)	1.675	0.894~3.001	0.101			
肿瘤最大径(≥3.5 cm/<3.5 cm)	1.000	0.901~1.671	0.190			
切除程度(部分切除/全切除)	1.676	1.183~3.892	0.046			
H3K27me3(高表达/低表达)	3.897	1.203~6.002	0.000	1.362	1.109~3.176	0.010

饰,与 DNA 修复和基因转录密切相关,可参与组织发育、细胞增殖、分化等^[13]。H3K27me3 由多梳抑制复合物 2 产生,而该物质由 Zeste 基因抑制子基因 12、胚胎外胚层发育蛋白 2 和 Zeste 基因增强子同源物 2 三部分组成,任何一种组分变化都可导致 H3K27me3 表达失调^[13]。在肿瘤发生、发展过程中,Zeste 基因增强子同源物 2 基因表达水平升高,进而导致 H3K27me3 表达异常^[4,5]。研究证实,H3K27me3 与肿瘤发生、发展有关,包括乳腺癌^[4]、非小细胞肺癌^[5]、脑胶质瘤^[6]等。Day 等^[14]发现弥漫性中线胶质瘤组织 H3K27me3 表达水平升高,并且与病人不良生存预后有关。宫睿等^[15]发现,H3K27M 及 H3K27me3 在弥漫性脊髓胶质瘤组织表达水平升高,且二者高表达均与病人不良生存预后有关。本文采用免疫组化和免疫印迹法检测高级别胶质瘤组织、非肿瘤脑组织 H3K27me3 的表达,结果显示胶质瘤组织 H3K27me3 表达水平明显升高,并且 WHO 分级Ⅳ级胶质瘤组织明显高于 WHO 分级Ⅲ级胶质瘤组织,提示 H3K27me3 参与高级别胶质瘤的发生、发展。

本研究还发现,H3K27me3 高表达是高级别胶质瘤不良生存预后的独立影响因素;并且,

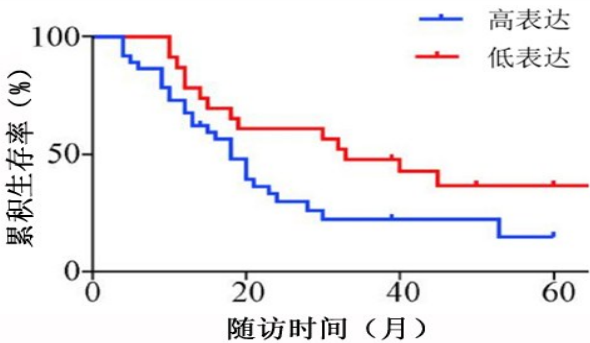


图2 生存曲线分析 H3K27me3 表达水平与高级别胶质瘤生存预后的关系

H3K27me3 高表达胶质瘤病人中位总生存期较低表达病人明显缩短($P<0.05$)。这提示 H3K27me3 可能成为评估高级别胶质瘤生存预后的标志物。

本研究也存在一些局限性,例如样本量较小,未纳入低级别胶质瘤样本,未分析 H3K27me3 的作用机制,未检测 H3K27 表达水平。未来需要开展细胞及动物实验,进一步探讨 H3K27me3 在高级别胶质瘤组织中的作用机制。

总之,高级别胶质瘤 H3K27me3 呈高表达,与病

人不良生存预后有关。

【参考文献】

[1] AGGARWAL P, LUO W, PEHLIVAN KC, *et al.* Pediatric versus adult high grade glioma: immunotherapeutic and genomic considerations [J]. *Front Immunol*, 2022, 13(5): 1038096.

[2] RODRÍGUEZ- CAMACHO A, FLORES- VÁZQUEZ JG, MOSCARDINIMARTELLI J, *et al.* Glioblastoma treatment: state-of-the-art and future perspectives [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 7207.

[3] RAAS MWD, ZIJLMANS DW, VERMEULEN M, *et al.* There is another: H3K27me3-mediated genomic imprinting [J]. *Trends Genet*, 2022, 38(1): 82-96.

[4] MARSOLIER J, PROMPSY P, DURAND A, *et al.* H3K27me3 conditions chemotolerance in triple-negative breast cancer [J]. *Nat Genet*, 2022, 54(4): 459-468.

[5] CHEN X, DENG Y, HUANG C, *et al.* RUNX3/H3K27me3 Coexpression defines a better prognosis in surgically resected stage I and postoperative chemotherapy-naïve non-small-cell lung cancer [J]. *J Oncol*, 2022, 2022(3): 5752263.

[6] 司昊天,任虹宇,王晓斌,等. 脑膜瘤组织中 H3 K27 me3 的表达及临床意义[J]. *实用癌症杂志*, 2022, 37(12): 1939-1941.

[7] 张朋肖,吴红记,甘 宁,等. 人脑胶质瘤 FAM46A 表达与病人预后的关系[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2022, 27

(3):171-173.

[8] 朱 焱,王伊旻,徐晓婷. 成人高级别胶质瘤患者的预后影响因素分析[J]. *医学研究杂志*, 2022, 51(10): 156-160.

[9] RALLIS KS, GEORGE AM, WOZNIAK AM, *et al.* Molecular genetics and targeted therapies for paediatric high-grade glioma [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2022, 19(4): 390-414.

[10] UDDIN MS, MAMUN AA, ALGHAMDI BS, *et al.* Epigenetics of glioblastoma multiforme: from molecular mechanisms to therapeutic approaches [J]. *Se min Cancer Biol*, 2022, 83(8): 100-120.

[11] GUSYATINER O, HEGI ME. Glioma epigenetics: from sub-classification to novel treatment options [J]. *Se min Cancer Biol*, 2018, 51(8): 50-58.

[12] LI Y, GOLDBERG EM, CHEN X, *et al.* Histone methylation antagonism drives tumor immune evasion in squamous cell carcinomas [J]. *Mol Cell*, 2022, 82(20): 3901-3918.e3907.

[13] ZHANG H, LIU Y, XIE Y, *et al.* H3K27me3 shapes DNA methylome by inhibiting UHRF1-mediated H3 ubiquitination [J]. *Sci China Life Sci*, 2022, 65(9): 1685-1700.

[14] DAY CA, HINCHCLIFFE EH, ROBINSON JP. H3K27me3 in diffuse midline glioma and epithelial ovarian cancer: opposing epigenetic changes leading to the same poor outcomes [J]. *Cells*, 2022, 11(21): 3376.

[15] 宫 睿,刘 晔,陈劲草,等. H3K27M 及其甲基化在弥漫性脊髓胶质瘤中的表达及与预后的关系[J]. *中国癌症防治杂志*, 2022, 14(2): 167-170.

(2023-08-09 收稿, 2023-09-11 修回)

(上接第 634 页)

[16] LEE SH, PARK BJ, SHIN HS, *et al.* Prognostic ability of intraoperative electromyography monitoring during microvascular decompression for hemifacial spasm to predict lateral spread response outcome [J]. *J Neurosurg*, 2017, 126(2): 391-396.

[17] 中华医学会神经外科学分会功能神经外科学组, 中国医师协会神经外科医师分会功能神经外科专家委员会. 显微血管减压术围手术期电生理评估中国专家共识[J]. *中华外科杂志*, 2017, 55(10): 725-733.

[18] YANG M, ZHENG X, YING T, *et al.* Combined intraoperative monitoring of abnor mAl muscle response and Z-L response for hemifacial spasm with tandem compression type [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2014, 156: 1161-1166.

[19] YING TT, LI ST, ZHONG J, *et al.* The value of abnor mAl

muscle response monitoring during microvascular decompression surgery for hemifacial spasm [J]. *Int J Surg*, 2011, 9(4): 347 - 351.

[20] JIA G, ZHANG L, REN H, *et al.* What range of stimulus intensities should we apply to elicit abnor mAl muscle response in microvascular decompression for hemifacial spasm [J]? *Acta Neurochir (Wien)*, 2017, 159(2): 251-257.

[21] ZHAO H, ZHU J, ZHANG X, *et al.* Involved S mAl arteries in patients who underwent microvascular decompression for hemifacial spasm [J]. *World Neurosurg*, 2018, 118: 646-650.

[22] JUN Z, LEI XZ, SUN C, *et al.* AMR monitoring in microvascular decompression for hemifacial spasm: 115 cases report [J]. *Clin Neurosci*, 2020, 73: 187-194.

(2023-01-05 收稿, 2023-08-08 修回)