

· 论 著 ·

Cullin7 蛋白在人脑胶质瘤中的表达及临床意义

向旭 谢腾 牟宇 丁锐 许强华 罗小程 胡航 陈治军

【摘要】目的 探讨 Cullin7 蛋白在人脑胶质瘤中的表达及临床意义。**方法** 选取 2013 年 1 月至 2018 年 12 月手术切除脑胶质瘤标本 60 例,其中 WHO 分级 I 级 12 例,II 级 18 例,III 级 14 例,IV 级 16 例。另选取重型颅脑损伤行内减压术切除正常脑组织 10 例作为对照组。采用免疫组化染色、免疫印迹法检测 Cullin7 蛋白表达情况。51 例随访 46 个月,9 例失访;采用 Kaplan-Meier 法分析和 Log-rank 检验分析生存曲线。**结果** 高级别胶质瘤 Cullin7 蛋白阳性表达率(66.7%)明显高于低级别胶质瘤(36.7%; $P<0.05$),而低级别胶质瘤 Cullin7 蛋白阳性表达率明显高于对照组(0%; $P<0.05$)。Cullin7 高表达病人生存期较低表达病人明显缩短($P<0.05$)。**结论** Cullin7 蛋白在脑胶质瘤中的表达与肿瘤恶性程度呈正相关,与病人生存期呈负相关。

【关键词】 胶质瘤;Cullin7 蛋白;基因表达;临床意义

【文章编号】 1009-153X(2019)12-0746-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Expression and significance of Cullin7 protein in human gliomas

XIANG Xu, XIE Teng, MOU Yu, DING Rui, XU Qiang-hua, LUO Xiao-cheng, HU Hang, CHEN Zhi-jun. Jingmen Clinical Medical College, Hubei Minzu University/Department of Neurosurgery, Jingmen Municipal First People's Hospital, Jingmen 448000, China

【Abstract】Objective To investigate the expression and significance of Cullin7 in human brain gliomas. **Methods** The expression of Cullin7 protein was determined by immunohistochemical technique and Western blot in 60 samples of gliomas, of which, 12 belonged in WHO grade I, 18 grade II, 14 grade III and 16 grade IV gained from the patients with gliomas undergoing neurosurgery in our hospital from 2013 to 2018, and 10 normal cerebral tissues gained from patients with severe traumatic brain injury undergoing internal decompression. The relationship of the survival time with the expression of Cullin7 in the gliomas tissues was analyzed in the patients with different WHO grades of gliomas. **Results** The level of Cullin7 protein expression was significantly higher in the gliomas tissues than that in normal brain tissues ($P<0.05$), and the level of Cullin7 protein expression was significantly higher in the high-grade gliomas (WHO grades III~IV) tissues than that in the low-grade gliomas (WHO grades I~II) tissues ($P<0.05$). The Survival time of patients with high expression of Cullin7 was significantly shorter than those with low expression of Cullin7 ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of Cullin7 protein in the gliomas tissues was positively correlated with tumor malignancy and negatively correlated with the survival time in the patients with brain gliomas.

【Key words】 Human brain gliomas; Cullin7 protein; Expression; Clinical significance

脑胶质瘤是最常见的中枢神经系统肿瘤,占原发性颅内肿瘤的 50%以上,预后较差,高级别胶质瘤即使采用手术联合放、化疗等综合治疗,生存期也只有 1~2 年^[1]。研究发现 Cullin7 蛋白在细胞转化^[2]、抑制细胞凋亡促进细胞生长^[3]、细胞衰老过程^[4]、细胞基因组稳定性、促进肿瘤转移^[5]等方面有着重要的作用。本文探讨 Cullin7 蛋白在人脑胶质瘤中的表达及临床意义。

1 资料与方法

1.1 标本来源 选取 2013 年 1 月至 2018 年 12 月手术切除脑胶质瘤标本 60 例,其中男 28 例,女 32 例;年龄 12~70 岁,平均(52.5±6.5)岁;WHO I 级 12 例,II 级 18 例,III 级 14 例,IV 级 16 例。对照组标本取自重型颅脑损伤行内减压切除的正常脑组织 10 例,其中男 6 例,女 4 例;年龄 35~65 岁,平均(56.4±4.5)岁。所有病人术前均未接受过放、化疗及免疫抑制治疗。

1.2 免疫组化染色定位定性检测 Cullin7 蛋白的表达 采用免疫组化 SP 法染色,采用二氨基联苯胺法显色,一抗为 Cullin7 兔多克隆抗体(美国 Abcam 公司,稀释至 1:400)。标本经脱蜡、抗原修复后,对各组进行免疫组化染色,苏木素复染,脱水、封片后显微镜下观察。用磷酸缓冲盐溶液替代一抗作为阴性

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2019.12.009

基金项目:湖北省自然科学基金(2018CFB784);湖北省卫生健康委员会面上项目(WJ2019M076);2019 年度荆门市科技计划重点项目
作者单位:448000 湖北,湖北民族大学医学部荆门临床医学院/荆门市第一人民医院神经外科(向旭、谢腾、牟宇、丁锐、许强华、罗小程、胡航、陈治军)

通讯作者:陈治军, E-mail:13807268870@163.com

对照。细胞核呈棕黄染为阳性细胞,每张切片高倍镜(×400)下选取取 5 个视野计数。评分标准:免疫组化评分=A×B(其中 A 代表阳性细胞染色强度,不着色记为阴性(-)=0 分、浅黄色记为弱阳性(+)=1 分、黄色记为中阳性(++)=2 分、棕黄色记为强阳性(+++)=3 分;B 代表阳性细胞的百分比,0~1%=0 分,1%~10%=1 分,11%~50%=2 分,51%~80%=3 分,81%~100%=4 分),≥4 分为高表达,<4 分为低表达^[6]。

1.3 免疫印迹法检测 Cullin7 蛋白的表达 提取蛋白,BCA 法测定总蛋白浓度。以 30 μg/孔上样,经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后,用电转移仪进行转膜。转至硝酸纤维素膜后经磷酸缓冲盐溶液封闭液漂洗 5 min 后脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入 Cullin7 一抗兔多克隆抗体一抗(1:400)和内参β-actin(1:1 000),4℃孵育过夜;随后加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔的二抗(1:3 000),室温下孵育 30 min。AlphaEase FC 图像分析软件分析目的蛋白灰度值。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 19.0 软件进行处理;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析;生存曲线采用 Kaplan-Meier 法分析和 Log-rank 检验;检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Cullin7 蛋白免疫组化染色结果 对照组脑组织 Cullin7 蛋白几乎不表达;脑胶质瘤组织 Cullin7 蛋白表达明显增加,级别越高,Cullin7 蛋白阳性表达率越高(图 1)。对照组 10 例均为阴性表达;低级别胶质瘤 30 例中,阳性表达 11 例,阴性表达 19 例;高级别胶质瘤 30 例中,阳性表达 20 例,阳性表达 10 例。高级别胶质瘤 Cullin7 蛋白阳性表达率(66.7%)明显高于低级别胶质瘤(36.7%; $P<0.05$),而低级别胶质瘤又明显高于对照组(0%; $P<0.05$)。

2.2 Cullin7 蛋白免疫印迹法检测结果 对照组脑组织及低级别胶质瘤组 Cullin7 蛋白的表达量较低,而高级别胶质瘤组可见 Cullin7 蛋白表达显著增高,主

要集中在相对分子质量 191 kD 处(图 2)。高级别组 Cullin7 蛋白表达水平明显高于低级别胶质瘤组和对照组($P<0.05$)。

2.3 Cullin7 蛋白表达水平与胶质瘤病人生存时间的关系 51 例随访 46 个月,9 例失访。Cullin7 低表达 18 例,高表达 42 例。生存曲线分析显示,Cullin7 高表达病人生存期较低表达病人明显缩短($P<0.05$;图 3)。

3 讨论

目前已经发现 8 种人类 Cullin 蛋白,Cullin7 蛋白作为支架蛋白构成泛素连接酶复合物从而参与生物过程中的蛋白的降解。研究发现 Cullin7 在肺癌^[7]、乳腺癌^[8]、肝癌^[9]等恶性肿瘤中均存在着高表达,主要通过影响相关底物蛋白稳定性来调控细胞内复杂的信号通路,进而促进肿瘤的发生发展。虽然 Cullin7 蛋白在上述多种恶性肿瘤中存在着异常表达,但其

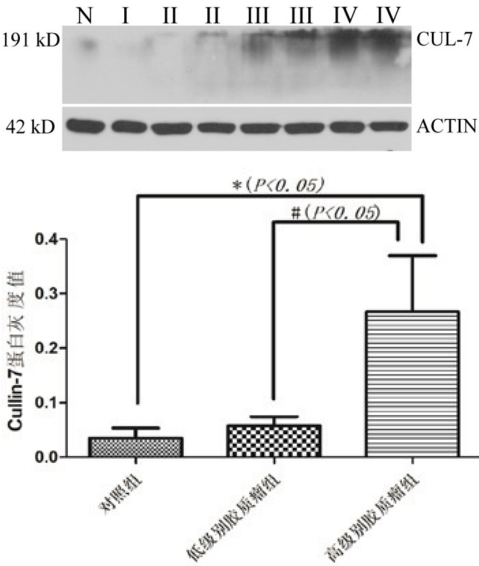


图 2 免疫印迹法检测 Cullin7 蛋白表达水平比较

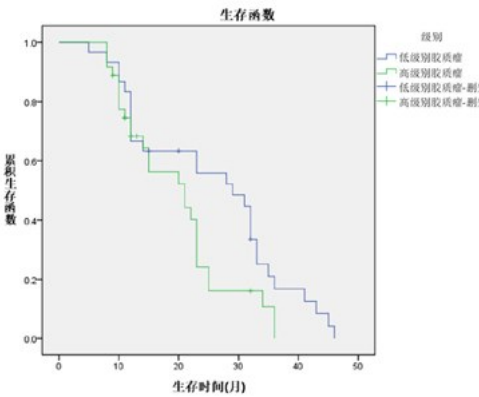
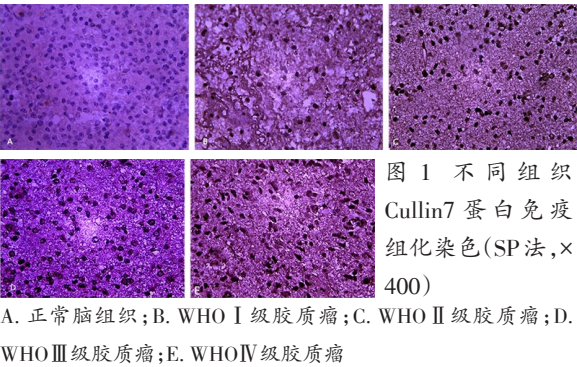


图 3 Cullin7 蛋白高表达组与低表达组胶质瘤病人生存曲线分析



在人脑胶质瘤中的表达情况尚不清楚。

本文结果发现 Cullin7 蛋白在正常脑组织以及不同级别胶质瘤组织中的表达存在着明显差异,其表达水平与胶质瘤恶性程度及病人预后密切相关;免疫组化和免疫印迹法分析结果均显示,正常脑组织 Cullin7 蛋白几乎不表达,而脑胶质瘤组织 Cullin7 蛋白表达水平明显增高,且胶质瘤级别越高,Cullin7 蛋白阳性表达率越高;生存曲线分析显示,Cullin7 蛋白表达水平越高,病人的生存期越短($P<0.05$)。

综上所述,本文结果显示 Cullin7 蛋白在脑胶质瘤细胞中呈高表达,而且 Cullin7 蛋白的表达水平与脑胶质瘤恶性程度呈正相关,与病人的生存期呈负相关,提示 Cullin7 蛋白在脑胶质瘤的发生、增殖、凋亡、侵袭、转移等过程中可能扮演着重要作用。我们将进一步深入研究并验证脑胶质瘤 Cullin7 蛋白的相关调控机制及信号通路,以期将 Cullin7 作为人脑胶质瘤的分子治疗靶点,为胶质瘤的诊断及治疗探索出新的、有效的方法。

【参考文献】

[1] 徐国政,袁先厚. 脑胶质瘤靶向治疗新进展[J]. 中国临床神经外科杂志, 2011,16(9):568-572.

[2] Kasper JS, Kuwabara H, Arai T, *et al.* Simian virus 40 large T antigen's association with the CUL7 SCF complex contributes to cellular transformation [J]. J Virol, 2005, 79(18): 11685-11692.

[3] Jung P, Verdoodt B, Bailey A, *et al.* Induction of cullin 7 by DNA damage attenuates p53 function [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(27): 11388-11393.

[4] Hartmann T, Xu X, Kronast M, *et al.* Inhibition of Cullin-RING E3 ubiquitin ligase 7 by simian virus 40 large T antigen [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(9): 3371-3376.

[5] Fu J, Lv X, Lin H, *et al.* Ubiquitin ligase cullin 7 induces epithelial-mesenchymal transition in human choriocarcinoma cells [J]. J Biol Chem, 2010, 285(14): 10870-10879.

[6] Zhou J, Jing Z, Ke S, *et al.* Accurate and economical detection of ALK positive lung adenocarcinoma with semiquantitative immunohistochemical screening [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92828.

[7] Kim SS, Shago M, Kaustov L, *et al.* CUL7 is a novel anti-apoptotic oncogene [J]. Cancer Res, 2007, 67(20): 9616-9622.

[8] Guo H, Wu F, Wang Y, *et al.* Overexpressed ubiquitin ligase Cullin7 in breast cancer promotes cell proliferation and invasion via down-regulating p53 [J]. Biochem Bioph Res Co, 2014, 450(4): 1370-1376.

[9] Zhang D, Yang G, Li X, *et al.* Inhibition of liver carcinoma cell invasion and metastasis by knockdown of cullin7 in vitro and in vivo [J]. Oncol Res, 2015, 23(4): 171-181.

(2019-05-29 收稿, 2019-08-03 修回)

~~~~~

(上接第 745 页)

[8] 廖旭兴,钟伟健,董安石,等. Willis 覆膜支架治疗颈内动脉海绵窦假性动脉瘤与瘘[J]. 中国临床神经外科杂志, 2018,23(12):769-771.

[9] Shi WY, Li MH, Yan L, *et al.* Application of dual Willis covered stents in the manangement of large fusiform carotid aneurysms in a canine model [J]. Vascular, 2014, 22(6): 432-438.

[10] Lai XB, Li MH, Tan HQ, *et al.* Predictors of in-stent stenosis and occlusion after endovascular treatment of intracranial vascular disease with the Willis covered stent [J]. J Clin Neurosci, 2013, 20(1): 122-127.

[11] 徐可,李辉,黄楚明,等. Willis 覆膜支架治疗颈内动脉病变的疗效分析[J]. 中国临床神经外科杂志, 2019,24(7):413-415.

[12] Puffer RC, Kallmes DF, Cloft HJ, *et al.* Patency of the ophthalmic artery after flow diversion treatment of paraclinoid

aneurysms [J]. J Neurosurg, 2012, 116(4): 892-896.

[13] Li MH, Zhu YQ, Fang C, *et al.* The feasibility and efficacy of treatment with a Willis covered stent in recurrent intracranial aneurysms after coiling [J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2008, 29(7): 1395-1400.

[14] Tan HQ, Li MH, Zhang PL, *et al.* Reconstructive endovascular treatment of intracranial aneurysms with the Willis covered stent: medium-term clinical and angiographic follow-up [J]. J Neurosurg, 2011, 114(4): 1014-1020.

[15] 宋雁冰,郑永涛,安庆祝,等. Willis 覆膜支架治疗颅内动脉复杂动脉瘤的疗效及短期随访[J]. 中国临床神经科学, 2018,26(6):608-617.

[16] Liu LX, Song MY, Xie XD. In-stent stenosis in the patient with internal carotid aneurysm after treated by the Willis covered stent Two case reports and literature review [J]. Medicine, 2017, 96(7): 1-4.

(2019-06-07 收稿, 2019-09-10 修回)