

## . 论 著 .

## 弥漫性胶质瘤周水肿组织 BMAL1 的表达及其临床意义

郭迎春 王 宇 张志欣 王 磊

【摘要】目的 探讨弥漫性胶质瘤周水肿组织脑和肌肉 ARNT 样蛋白 1(BMAL1)的表达及其临床意义。方法 选取 2021 年 6 月至 2023 年 1 月手术切除的 64 例弥漫性胶质瘤周水肿组织,免疫组化法检测瘤周水肿组织 BMAL1 表达;术前进行脑 MRI 检查,计算水肿指数评估瘤周水肿程度。结果 64 例均伴有瘤周水肿,其中轻度水肿 20 例,中度水肿 9 例,重度水肿 35 例;瘤周水肿组织 BMAL1 高表达 39 例,低表达 25 例。瘤周水肿组织 BMAL1 免疫组化染色评分与水肿指数呈明显正相关( $r=0.408$ ;95% CI 0.179~0.594; $P<0.001$ )。多因素 logistic 回归分析显示,BMAL1 高表达是弥漫性胶质瘤并发重度瘤周水肿的独立影响因素(OR=5.558;95% CI 1.897~8.467; $P<0.001$ )。结论 弥漫性胶质瘤周水肿组织 BMAL1 表达水平与瘤周水肿程度呈正相关,提示 BMAL1 可能参与弥漫性胶质瘤周水肿的发生、进展。

【关键词】弥漫性胶质瘤;脑和肌肉 ARNT 样蛋白 1(BMAL1);瘤周水肿;影响因素

【文章编号】1009-153X(2024)04-0218-04 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41; Q 786

## Expression of BMAL1 in peritumoral edema tissues of diffuse gliomas and its clinical implications

GUO Ying-chun, WANG Yu, ZHANG Zhi-xin, WANG Lei. Department of Neurosurgery, Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100070, China

【Abstract】Objective To investigate the expression of brain and muscle ARNT-like 1 (BMAL1) in the peritumoral edema tissues of diffuse gliomas and its clinical significance. Methods The BMAL1 expression levels were detected by immunohistochemical staining in the peritumoral edema tissues obtained from 64 patients with diffuse gliomas who underwent surgical resections between June 2021 and January 2023. Preoperative brain MRI was conducted, and the edema index was calculated to assess the severity of peritumoral edema. Results All 64 cases presented peritumoral edema, with 20 mild, 9 moderate, and 35 severe edema. High BMAL1 expression was observed in 39 patients, and low expression in 25. The immunohistochemical staining score for BMAL1 in the peritumoral edema tissues showed a significant positive correlation with the edema index ( $r=0.408$ ; 95% CI 0.179~0.594;  $P<0.001$ ). Multivariate logistic regression analysis revealed that high BMAL1 expression independently predicted severe peritumoral edema (OR=5.558; 95% CI 1.897~8.467;  $P<0.001$ ). Conclusions The level of BMAL1 expression in peritumoral edema tissues is positively correlated with the degree of peritumoral edema in diffuse gliomas, suggesting potential involvement of BMAL1 in the occurrence and progression of peritumoral edema.

【Key words】Diffuse gliomas; Peritumoral edema; Brain and muscle ARNT-like 1 (BMAL1); Risk factors

弥漫性胶质瘤(diffuse glioma, DG)是成年人常见的原发性脑肿瘤,包括星形细胞瘤[异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH)突变型]、少突胶质细胞瘤(IDH 突变型)、胶质母细胞瘤(IDH 野生型)。DG 的肿瘤异质性强,术后易复发,预后较差<sup>[1]</sup>。既往研究认为,瘤周水肿是脑胶质瘤的重要生物学特征,与肿瘤侵袭过程中血脑屏障破坏、非成熟血管形成及微循环障碍等有关<sup>[2]</sup>。瘤周水肿与 DG 的不良预后有关,因此研究其发生机制有重要意义<sup>[3,4]</sup>。

节律基因与各种肿瘤的发生、发展有关<sup>[5,6]</sup>。作为节律基因的核心基因,脑和肌肉 ARNT 样蛋白 1(brain and muscle Arnt-like protein-1, BMAL1)是维持正常细胞和组织稳态的重要调节因子,可以调节细胞增殖和凋亡、DNA 修复、代谢和血管再生等多种病理生理行为,在肿瘤进展过程中起重要作用<sup>[7,8]</sup>。有研究发现,BMAL1 可以调节胶质瘤组织血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和血管生成素 2(angiopoietin 2, ANG2)的表达<sup>[9]</sup>。BMAL1 与 DG 瘤周水肿的关系既往鲜有报道。本文分析 DG 瘤周水肿组织 BMAL1 表达及其临床意义。

## 1 资料与方法

1.1 病例选择标准 纳入标准:年龄 $\geq 18$ 岁;符合欧洲神经肿瘤学协会制定的《成人弥漫性胶质瘤诊断和

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2024.04.006

基金项目:国家自然科学基金(U21A20386)

作者单位:100070 北京,首都医科大学附属北京天坛医院国际医疗部(郭迎春、王 宇、张志欣、王 磊)

通信作者:王 磊,Email:wanglei\_tiantan@163.com

治疗指南(2020 版)》<sup>[10]</sup>;临床资料完整。排除标准:术前接受放疗或化疗;术前接受抗脑水肿药物治疗;合并颅脑损伤;复发性胶质瘤;合并其他类型肿瘤;合并免疫系统疾病。

1.2 标本来源 选取 2021 年 6 月至 2023 年 1 月手术切除的 64 例 DG 的瘤周水肿组织,其中男 38 例,26 例;年龄 34~69 岁,平均(47.78±6.90)岁;星形细胞瘤(IDH 突变型)24 例,少突胶质细胞瘤(IDH 突变型)13 例,胶质母细胞瘤(IDH 野生型)27 例。

1.3 瘤周水肿程度的评估 术前进行 3.0T MRI 检查,通过 T<sub>1</sub>增强快速自旋回波序列测量肿瘤体积(V<sub>肿瘤</sub>),用 T<sub>2</sub>加权加权成像和液体衰减反转恢复序列测量瘤周水肿体积(V<sub>水肿</sub>)。参考既往研究<sup>[11]</sup>计算水肿指数评估瘤周水肿程度。水肿指数=(V<sub>肿瘤</sub>+V<sub>水肿</sub>)/V<sub>肿瘤</sub>。水肿指数=1 为无水肿;1~1.5 为轻度水肿;1.5~3 为中度水肿;>3 为重度水肿。

1.4 免疫组化染色检测瘤周水肿组织 BMAL1 的表达 瘤周水肿组织经过 10%中性福尔马林固定液(上海雅吉生物科技有限公司)固定,随后梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋。用组织切片机进行切片,切片厚度为 4 μm。免疫组化检测前,先用柠檬酸钠抗原修复液(上海雅吉生物科技有限公司)进行抗原修复。按照免疫组化 SP 法检测试剂盒(上海彩佑实业有限公司)说明书,加入兔抗人 BMAL1 多克隆抗体(1:500;苏州瑞诺德生物科技有限公司)4 ℃ 孵育过夜。次日,滴加酶标羊抗兔抗体(苏州瑞诺德生物科技有限公司)室温孵育 1 h。DAB 显色,苏木精染色,中性树胶封片,显微镜下观察(图 1)。BMAL1 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。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<5%为 0 分,6%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,>75%为 4 分<sup>[12]</sup>。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件分析;计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,用 *t* 检验和单因素方差分析;计数资料用  $\chi^2$  检验;用 Pearson 相关系数分析相关性;用多因素 logistic 回归模型分析瘤周重度水肿的影响因素;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 瘤周水肿情况 64 例均伴有瘤周水肿,其中轻度水肿 20 例,中度水肿 9 例,重度水肿 35 例。

2.2 瘤周水肿组织 BMAL1 的表达情况 64 例中,BMAL1 高表达 39 例,低表达 25 例。BMAL1 表达水

平与病人性别和年龄、肿瘤 WHO 分级、肿瘤直径和 IDH 状态无明显关系(*P*>0.05,表 1)。BMAL1 高表达组重度瘤周水肿占比明显增高(*P*<0.05,表 1)。瘤周水肿组织 BMAL1 免疫组化染色评分与水肿指数呈明显正相关(*r*=0.408;95% CI 0.179~0.594;*P*<0.001)。

2.3 重度瘤周水肿的影响因素分析 单因素分析结果显示,年龄、性别、肿瘤直径、IDH 突变与重度瘤周水肿无明显关系(*P*>0.05,表 2),而 WHO 分级和 BMAL1 表达与重度瘤周水肿有关(*P*<0.05,表 2)。多因素 logistic 回归分析显示,WHO 分级Ⅲ~Ⅳ级、BMAL1 高表达是重度瘤周水肿的独立影响因素(*P*<0.05,表 2)。

3 讨论

瘤周水肿是指肿瘤周围脑组织和脑间质水分的异常增多,一方面增加肿瘤的占位效应,另一方面给肿瘤侵袭提供了营养微环境,会加重临床症状并增加肿瘤的手术难度<sup>[13,14]</sup>。胶质瘤常伴有瘤周水肿,瘤周水肿程度是判断胶质瘤预后的独立指标<sup>[14]</sup>。探讨 DG 瘤周水肿的发生机制具有重要意义。既往研究发现,多种生物活性因子与瘤周水肿的进展有关,例

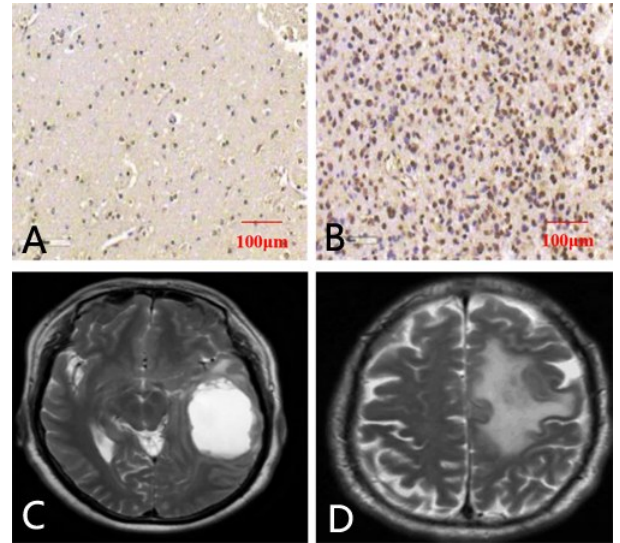


图 1 免疫组化染色检测弥漫性胶质瘤瘤周水肿组织 BMAL1 表达  
A、C. WHO 分级Ⅱ级胶质瘤;B、D. WHO 分级Ⅳ级胶质瘤;A. BMAL1 低表达;B. BMAL1 高表达;C. 轻度瘤周水肿;D. 重度瘤周水肿

Figure 1 Immunohistochemical staining for BMAL1 expression in peritumoral edema tissues of diffuse gliomas  
A–C: WHO grade II glioma. B–D: WHO grade IV glioma. A: Low BMAL1 expression. B: High BMAL1 expression. C: Mild peritumoral edema. D: Severe peritumoral edema.

表 1 弥漫性胶质瘤周水肿组织 BMAL1 表达水平与病人临床特征的关系

Table 1 Association of BMAL1 expression levels in peritumoral edema tissues with clinical characteristics of patients with diffuse gliomas

临床特征	瘤周水肿组织 BMAL1 表达水平		统计值	P 值
	高表达组(n=39)	低表达组(n=25)		
性别(例)			$\chi^2=0.925$	0.336
男	25(64.10%)	13(52.00%)		
女	14(35.90%)	12(48.00%)		
年龄(岁)	49.01±8.23	46.93±7.10	$t=1.074$	0.287
WHO 分级(例)			$\chi^2=1.891$	0.169
I~II 级	15(38.46%)	14(56.00%)		
III~IV 级	24(61.54%)	11(44.00%)		
肿瘤直径(cm)	3.99±1.23	3.80±1.40	$t=0.555$	0.581
瘤周水肿程度(例)			$\chi^2=11.791$	0.001
轻度	7(17.95%)	13(52.00%)		
中度	4(10.26%)	5(20.00%)		
重度	28(71.79%)	7(28.00%)		
IDH 状态(例)			$\chi^2=0.568$	0.451
突变型	24(61.54%)	13(52.00%)		
野生型	15(38.46%)	12(48.00%)		

注:BMAL1. 脑和肌肉 ARNT 样蛋白 1;WHO. 世界卫生组织;IDH. 异柠檬酸脱氢酶

表 2 弥漫性胶质瘤发生重度瘤周水肿危险因素的 logistic 回归分析

Table 2 Logistic regression analysis of risk factors for severe peritumoral edema in diffuse gliomas

危险因素	单因素分析			多因素分析		
	优势比	95%置信区间	P 值	优势比	95%置信区间	P 值
性别(男/女)	1.034	0.901~1.221	0.509			
年龄(≥45 岁/ <45 岁)	1.300	0.934~1.673	0.104			
WHO 分级(III~IV 级/ I~II 级)	10.004	2.671~18.906	<0.001	6.243	1.467~9.231	<0.001
肿瘤直径(≥4cm/ <4cm)	1.378	0.682~2.113	0.230			
IDH 突变(是/否)	1.128	0.903~1.463	0.306			
BMAL1 表达(高表达/低表达)	11.003	4.712~20.895	<0.001	5.558	1.897~8.467	<0.001

如 VEGF、ANG、趋化因子和水通道蛋白等<sup>[15-17]</sup>。节律基因 BMAL1 也称为 Arntl 基因,位于 11 号染色体短臂。BMAL1 与细胞增殖和凋亡、DNA 修复、代谢和血管再生等有关<sup>[7,8]</sup>。BMAL1 在脑胶质瘤中高表达,并且与免疫抑制、细胞侵袭、化疗抵抗等有关<sup>[17,18]</sup>。有研究发现,BMAL1 表达水平与胶质瘤组织微血管密度呈正相关,BMAL1 过表达促进瘤周水肿进展;下调 BMAL1 基因表达有利于缓解瘤周水肿<sup>[9]</sup>。

本研究发现,瘤周水肿组织 BMAL1 高表达的水肿程度高于低表达病人,瘤周水肿程度与 BMAL1 表达水平呈正相关;并且瘤周水肿组织 BMAL1 高表达是重度水肿的独立危险因素。这提示 BMAL1 可能促进 DG 瘤周水肿进展。BMAL1 参与瘤周水肿进展

的机制可能为:①BMAL1 与高微血管密度有关<sup>[9]</sup>,增加血管通透性,造成血管源性水肿;②BMAL1 破坏血脑屏障完整性,并可导致血管内皮功能障碍,造成组织水肿<sup>[19]</sup>;③BMAL1 促进 DG 细胞增殖的过程中会产生肿瘤特异性细胞外基质,增加细胞外间隙渗透压,同时 DG 瘤体积增大会加重静脉回流障碍,引起组织水肿<sup>[9]</sup>。

本研究也存在一些局限性,例如仅纳入成人 DG,样本量相对较小;未进行机制研究;未分析 BMAL1 的调控机制。未来需要开展细胞和动物研究,进一步探讨 BMAL1 在 DG 瘤周水肿中的作用机制。

总之,DG 瘤周水肿组织 BMAL1 表达水平与瘤

周水肿程度呈正相关,提示 BMAL1 可能参与 DG 瘤周水肿的发生、进展。

**【伦理学声明】:**本研究遵循《赫尔辛基宣言》,所有病人和/或家属均签署知情同意书。本研究方案于 2021 年 5 月 11 日经首都医科大学附属北京天坛医院伦理委员会审批,批号为 2021-0031。

**【利益冲突声明】:**本文不存在任何利益冲突。

**【作者贡献声明】:**郭迎春负责收集数据、资料分析、撰写论文及修改论文;王宇、张志欣负责收集数据、资料分析;王磊参与修改论文及最后定稿。

【参考文献】

[1] YANG Y, SCHUBERT MC, KUNER T, *et al.* Brain tumor networks in diffuse glioma [J]. *Neurotherapeutics*, 2022, 19(6): 1832-1843.

[2] WU Y, PENG Z, WANG H, *et al.* Identifying the hub genes of glioma peritumoral brain edema using bioinformatical methods [J]. *Brain Sci*, 2022, 12(6): 805.

[3] MALIK N, GERAGHTY B, DASGUPTA A, *et al.* MRI radiomics to differentiate between low grade glioma and glioblastoma peritumoral region [J]. *J Neurooncol*, 2021, 155(2): 181-191.

[4] CHEN KY, JIANG PC. Correlation between peritumoral edema of high-grade glioma and patients' prognoses [J]. *Chin J Clin Neurosurg*, 2021, 26(5): 352-353, 359.

陈科宇,江普查. 瘤周水肿与人脑高级别胶质瘤预后的相关性 [J]. *中国临床神经外科杂志*, 2021, 26(5): 352-353, 359.

[5] SANCAR A, VAN GELDER RN. Clocks, cancer, and chronochemotherapy [J]. *Science*, 2021, 371(6524): eabb0738.

[6] RAY I, GOSWAMI S. Circadian rhythm genes in cancer: insight into their functions and regulation involving noncoding RNAs [J]. *Chronobiol Int*, 2021, 38(9): 1231-1243.

[7] MA TJ, ZHANG ZW, LU YL, *et al.* CLOCK and BMAL1 stabilize and activate RHOA to promote F-actin formation in cancer cells [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(10): 1-15.

[8] ZHENG Y, PAN L, WANG F, *et al.* Neural function of Bmal1: an overview [J]. *Cell Biosci*, 2023, 13(1): 1.

[9] WANG F, LI C, HAN F, *et al.* BMAL1 may be involved in angiogenesis and peritumoral cerebral edema of human glioma by regu-

lating VEGF and ANG2 [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(22): 24675-24685.

[10] WELLER M, VAN DEN BENT M, PREUSSER M, *et al.* EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(3): 170-186.

[11] GAWLITZA M, FIEDLER E, SCHOB S, *et al.* Peritumoral brain edema in meningiomas depends on aquaporin-4 expression and not on tumor grade, tumor volume, cell count, or Ki-67 labeling index [J]. *Mol Imaging Biol*, 2017, 19(2): 298-304.

[12] ZHANG H, MA Y, WANG H, *et al.* MMP-2 expression and correlation with pathology and MRI of glioma [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(2): 1826-1832.

[13] TANG W, CHEN Y, WANG X, *et al.* Expression of CXC-motif-chemokine 12 and the receptor C-X-C receptor 4 in glioma and the effect on peritumoral brain edema [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(2): 2501-2507.

[14] WU J, SU R, QIU D, *et al.* Analysis of DWI in the classification of glioma pathology and its therapeutic application in clinical surgery: a case-control study [J]. *Transl Cancer Res*, 2022, 11(4): 805-812.

[15] YOU HH, CHEN XY, CHEN JY, *et al.* The relationship between peritumoral brain edema and the expression of vascular endothelial growth factor in vestibular schwannoma [J]. *Front Neurol*, 2021, 12(8): 691378.

[16] TAMURA R, OHARA K, SASAKI H, *et al.* Difference in immunosuppressive cells between peritumoral area and tumor core in glioblastoma [J]. *World Neurosurg*, 2018, 120(12): e601-e610.

[17] LUO WY, WANG HC, LI XW, *et al.* Correlation between AQP4, VEGF and peritumoral edema in adult gliomas [J]. *J Clin Res*, 2022, 39(6): 917-920.

罗文颖,王虎成,李孝伟,等. AQP4、VEGF 与成年人脑胶质瘤的瘤周水肿程度的相关性[J]. *医学临床研究*, 2022, 39(6): 917-920.

[18] SLAT EA, SPONAGEL J, MARPEGAN L, *et al.* Cell-intrinsic, Bmal1-dependent circadian regulation of temozolomide sensitivity in glioblastoma [J]. *J Biol Rhythms*, 2017, 32(2): 121-129.

[19] NAKAZATO R, KAWABE K, YAMADA D, *et al.* Disruption of Bmal1 impairs blood-brain barrier integrity via pericyte dysfunction [J]. *J Neurosci*, 2017, 37(42): 10052-10062.

(2023-09-26 收稿, 2024-02-26 修回)