

脑胶质瘤组织中 Tip60 蛋白表达与预后关系

蔡建勇 巴华君 陆 川 陈献东 陈茂华 孙 军

摘 要 **目的** 揭示脑胶质瘤组织中 Tip60 蛋白表达与临床病理特征及长期预后的关系。**方法** 收集 108 例脑胶质瘤肿瘤标本,采用免疫组织化学方法检测神经胶质瘤组织 Tip60 蛋白表达,统计分析 Tip60 蛋白表达与患者性别、年龄、组织学分级、肿瘤部位、肿瘤类型、肿瘤直径和 KPS 评分等临床病理特征及 5 年总生存时间的关系。**结果** 脑胶质瘤组织中 Tip60 蛋白表达与肿瘤级别密切相关,高级别胶质瘤比低级别胶质瘤 Tip60 蛋白表达显著减少 ($P < 0.001$)。Tip60 蛋白低表达组患者平均 5 年总生存时间 25.3 个月 (95% CI: 20.9 ~ 29.8), Tip60 蛋白高表达组患者平均 5 年总生存时间 38.9 个月 (95% CI: 32.9 ~ 45.0); 经 *Log-rank* 检验,低表达组平均 5 年总生存时间显著短于高表达组 ($P = 0.001$)。多因素 *COX* 回归分析显示,Tip60 蛋白低表达是 5 年总生存时间缩短的独立危险因素 ($HR = 1.762$, 95% CI: 1.028 ~ 3.020, $P = 0.039$)。**结论** Tip60 蛋白与神经胶质瘤恶性程度密切相关,Tip60 蛋白低表达是神经胶质瘤长期预后不良的独立危险因素。

关键词 胶质细胞瘤 Tip60 蛋白 生存分析 临床病理特征

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.05.024

Relationship between Expression of Tip60 Protein in Glioma Tissue and Prognosis. Cai Jianyong, Ba Huajun, Lu Chuan, et al. Department of Neurosurgery, The Central Hospital of Wenzhou City, Zhejiang 325000, China

Abstract **Objective** To investigate the relationships between expression of Tip60 protein in glioma tissue and clinicopathological characteristics and long-term prognosis. **Methods** Totally 108 brain glioma specimens were collected. Expressions of Tip60 protein in glioma tissue were determined using immunohistochemistry. Relationships between expression of Tip60 protein and clinicopathological characteristics of human brain glioma (such as gender, age, histological grade, tumor location, tumor type, tumor size and KPS score) and 5-year overall survival were analyzed statistically. **Results** Expressions of Tip60 protein in glioma tissue were closely correlated with histological grade. Expressions of Tip60 protein were markedly lower in high grade glioma than in low grade glioma ($P < 0.001$). Mean 5-year overall survival time of patients with high and low expression of Tip60 protein were 38.9 months (95% CI: 32.9 ~ 45.0) and 25.3 months (95% CI: 20.9 ~ 29.8) respectively and intergroup difference was statistically significant using *Log-rank* test ($P = 0.001$). Multivariate *COX* regression analysis showed that low expression of Tip60 protein was an independent risk factor for short 5-year overall survival time ($HR = 1.762$, 95% CI: 1.028 ~ 3.020, $P = 0.039$). **Conclusion** Tip60 protein is closely correlated with malignant behaviors of glioma and low expression of Tip60 protein emerges as an independent risk factor for long-term poor prognosis of glioma.

Key words Glioma; Tip60 protein; Survival analysis; Clinicopathological characteristics

Tip60 蛋白是 MYST 家族成员之一,具有乙酰基转移酶活性^[1-3]。Tip60 介导的核心组蛋白乙酰化修饰与分子磷酸化、泛素化及甲基化等过程密切相关,可以调节基因转录、细胞凋亡、DNA 损伤修复、染色质改造等众多重要的细胞生理活动^[4-6]。最近研究显示,Tip60 基因低表达与人类胃癌高度恶性密切相关,而 Tip60 蛋白低表达与人类黑色素瘤不良预后显著相关^[7,8]。本研究检测脑胶质瘤组织 Tip60 蛋白的表达情况,分析其与患者临床病理特征及长期预后之

间的关系,从而探讨其临床价值。

对象和方法

1. 研究对象:本研究病例来源于 2006 年 5 月 ~ 2009 年 6 月笔者医院手术治疗的初发脑胶质瘤,共 108 例。其中男性 66 例,女性 42 例;患者年龄:≤60 岁 70 例, >60 岁 38 例;WHO 分级: I ~ II 级 51 例, III ~ IV 级 57 例;肿瘤全部切除 76 例;术后化疗 57 例;术后放疗 79 例;肿瘤部位:幕上 90 例,幕下 18 例;肿瘤类型:星形细胞瘤 74 例,其他 34 例;肿瘤直径:≤5cm 者 74 例, >5cm 者 34 例;术前 KPS 评分: ≥80 分 46 例, <80 分 62 例。

2. 免疫组织化学染色:肿瘤标本经固定、包埋、切片后,采用 En-Vision 法(试剂盒购自北京中杉生物

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2014KYA203)

作者单位:325200 温州市中心医院神经外科

通讯作者:蔡建勇,副主任医师,电子信箱:cjy19761976@126.com

技术有限公司)检测胶质瘤组织 Tip60 蛋白的表达。具体如下:组织经脱蜡和水化,在室温下使用 3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶 5min,在 100℃ 高温下使用 pH 6.0 柠檬酸修复 15min;滴加鼠抗人多克隆抗体(抗体稀释度 1:100)和 PV6001 试剂,DAB 显色;复染后脱水、透明和封片。采用试剂盒的阳性对照作为阳性对照,PBS 液代替一抗作为阴性对照。

3. 染色结果判定标准:Tip60 蛋白主要定位于细胞质,根据染色强度和阳性染色细胞百分比进行评分,染色强度计为 0(无色)、1(淡黄色)、2(棕黄色)、3(棕黑色),阳性染色细胞百分比计为 1(0~25%)、2(26%~50%)、3(51%~75%)、4(76%~100%)。Tip60 蛋白染色的最终评分由染色强度和阳性染色细胞百分比相乘获得,即免疫反应分数,分阴性染色(0)、轻度染色(1~3)、中度染色(4~6)和强度染色(8~12),定义阴性染色和轻度染色为低表达,中度染色和强度染色为高表达。

4. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 统计软件,计数资料组间比较采用卡方检验,采用 Kaplan-Meier 法计算 5 年总生存时间,采用 Log-rank 检验分析 Tip60 蛋白表达对 5 年总生存时间的影响,构建多因素 Cox 回归模型分析影响 5 年总生存时间的危险因素,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Tip60 蛋白表达与患者临床特征的关系:神经胶质组织中 Tip60 蛋白高表达 48 例,低表达 60 例。从表 1 可知,神经胶质组织中 Tip60 蛋白表达与患者年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤类型、肿瘤是否全部切除、术后是否化疗和放疗、肿瘤直径及 KPS 评分无关,而与肿瘤级别密切相关;从图 1 可知,高级别(Ⅲ~Ⅳ级)比低级别(Ⅰ~Ⅱ级)Tip60 蛋白表达显著减少。

表 1 神经胶质瘤组织中 Tip60 蛋白表达与肿瘤患者临床特征的关系

项目	Tip60 蛋白表达		卡方值	P
	高表达	低表达		
性别(男性/女性)	30/18	36/24	0.070	0.791
年龄(>60岁/≤60岁)	15/33	23/37	0.587	0.444
肿瘤部位(幕上/幕下)	42/6	48/12	1.080	0.299
肿瘤类型(星形细胞瘤/其他)	32/16	42/18	0.137	0.711
肿瘤直径(>5cm/≤5cm)	14/34	20/40	0.215	0.643
KPS 评分(<80分/≥80分)	25/23	37/23	1.002	0.317
WHO 分级(Ⅲ~Ⅳ级/Ⅰ~Ⅱ级)	15/33	42/18	16.066	0.000
肿瘤全部切除[n(%)]	37 (77.1)	39 (65.0)	1.867	0.172
术后放疗[n(%)]	34 (70.8)	45 (75.0)	0.236	0.627
术后化疗[n(%)]	24 (50.0)	33 (55.0)	0.267	0.605

组间比较采用 χ^2 检验

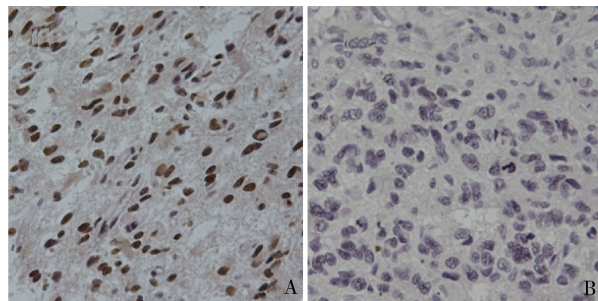


图 1 Tip60 蛋白在Ⅰ~Ⅱ级(A)和Ⅲ~Ⅳ级(B)神经胶质瘤组织中的表达(×400)

2. Tip60 蛋白不同表达水平对脑胶质瘤患者生存时间的影响:经过 5 年的随访,本组脑胶质瘤患者平均 5 年总生存时间 31.4 个月(95% CI:27.5~35.2)。Tip60 蛋白低表达组患者平均 5 年总生存时间 25.3 个月(95% CI:20.9~29.8),Tip60 蛋白高表达组患者平均 5 年总生存时间 38.9 个月(95% CI:32.9~45.0);经 Log-rank 检验,低表达组平均 5 年总生存时间显著短于高表达组($\chi^2 = 11.614, P = 0.000$)。详见图 2。

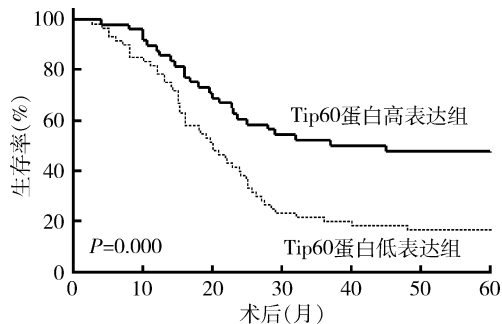


图 2 Tip60 蛋白不同表达水平对脑胶质瘤患者 5 年总生存时间的影响

3. 脑胶质瘤患者 5 年总生存时间的相关因素分析:单因素 COX 回归分析显示,肿瘤直径、术前 KPS 评分、WHO 分级、肿瘤全切、术前化疗、术前放疗和 Tip60 蛋白表达与脑胶质瘤患者 5 年总生存时间显著相关(P 均 < 0.05 , 表 2)。经多因素 COX 回归分析,肿瘤全部切除($HR = 0.568, 95\% CI: 0.325 \sim 0.993, P = 0.047$)、肿瘤直径($HR = 1.740, 95\% CI: 1.015 \sim 2.985, P = 0.044$)、肿瘤级别($HR = 2.120, 95\% CI: 1.215 \sim 3.700, P = 0.008$)和 Tip60 蛋白表达($HR = 1.762, 95\% CI: 1.028 \sim 3.020, P = 0.039$)是脑胶质瘤患者 5 年总生存时间的独立危险因素。

表 2 脑胶质瘤患者 5 年总生存时间的相关因素分析

项目	HR	95% CI	P
性别(男性/女性)	1.429	0.883 ~ 2.311	0.146
年龄(>60 岁/≤60 岁)	1.368	0.856 ~ 2.187	0.191
肿瘤部位(幕上/幕下)	0.589	0.334 ~ 1.039	0.067
肿瘤类型(星形细胞瘤/其他)	1.019	0.627 ~ 1.656	0.939
肿瘤直径(>5cm/≤5cm)	2.000	1.251 ~ 3.197	0.004
KPS 评分(<80 分/≥80 分)	2.114	1.297 ~ 3.446	0.003
WHO 分级(Ⅲ~Ⅳ级/Ⅰ~Ⅱ级)	2.652	1.632 ~ 4.310	0.000
肿瘤全部切除	0.567	0.355 ~ 0.905	0.017
术后放疗	0.608	0.375 ~ 0.989	0.045
术后化疗	0.611	0.387 ~ 0.964	0.034
Tip60 蛋白(低表达/高表达)	2.260	1.392 ~ 3.669	0.001

讨 论

乙酰化是真核细胞蛋白质最普遍的一种修饰方式,乙酰转移酶是一类能够催化乙酰基从乙酰辅酶 A 转移到蛋白氨基端 α-氨基或赖氨酸 ε-氨基的酶类。HMG 蛋白、组蛋白、核受体、α 微管蛋白和转录因子等都能发生赖氨酸位点的乙酰化修饰。乙酰化修饰可以影响蛋白的酶活性和稳定性、蛋白质之间的相互作用和 DNA 结合能力等^[9-12]。

Tip60 蛋白最早被发现是与 HIV 调节因子 Tat 相互作用的蛋白,其分子质量为 60kDa,所以命名为 Tip60。Tip60 是乙酰转移酶 MYST 家族中的一员,介导核心组蛋白、ATM 和 p53 等众多蛋白的乙酰化修饰,能与不同的蛋白质分子相互作用参与细胞内多条信号转导通路的活化,参与调控细胞凋亡、周期阻滞、DNA 损伤修复和细胞衰老等多种重要细胞生理活动,也是一个重要的肿瘤抑制因子^[13-19]。

目前,与 Tip60 蛋白表达相关的人类肿瘤学研究较少。最近有研究显示,Tip60 基因低表达与人类胃癌浸润深度与淋巴结转移密切相关^[7]。至今,少有研究揭示神经胶质瘤组织中 Tip60 蛋白的表达情况。本研究采用免疫组织化学方法发现,Tip60 蛋白表达与脑胶质瘤患者年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤类型、肿瘤是否全部切除、术后是否化疗和放疗、肿瘤大小及 KPS 评分无显著相关性,但与肿瘤恶性程度密切相关,高级别(Ⅲ~Ⅳ级)比低级别(Ⅰ~Ⅱ级)Tip60 蛋白表达显著减少。核因子-Myc 和核因子-κB 是肿瘤发生、发展的重要两条信号通路。人类 Tip60-Gas41 复合物通过 Gas41 的 C 末端与核因子 Myc 结合形成 Tip60-Gas41-Myc 复合物,可以稳定 Myc 活性,调节下游基因表达,从而抑制胶质瘤细胞增殖,促进肿瘤细胞凋亡^[20]。Tip60 也可以通过抑制核因子-κB 信号通路,降低胶质母细胞瘤细胞的黏附性,

下调肿瘤细胞膜型基质金属蛋白酶 1 的表达,从而抑制胶质母细胞瘤的侵袭性。因此,笔者推测,Tip60 蛋白表达下调可能与神经胶质瘤发生、发展关系密切,而 Tip60 蛋白可能成为脑胶质瘤治疗的新靶点。

Tip60 蛋白低表达是黑色素瘤转移和预后不良的独立危险因素,也是局部浸润性膀胱癌 3 年疾病特异性生存时间缩短的独立危险因素^[8]。本研究发现,Tip60 蛋白低表达患者平均 5 年总生存时间显著短于高表达患者。采用多因素 COX 回归分析,包括肿瘤全部切除、肿瘤大小和肿瘤级别在内,Tip60 蛋白表达也成为脑胶质瘤患者 5 年总生存时间的独立危险因素。这些研究提示 Tip60 蛋白具有肿瘤标志物的潜能,而 Tip60 蛋白低表达可显著预测脑胶质瘤长期不良预后。

参考文献

- 1 Charvet C, Wissler M, Brauns-Schubert P, *et al.* Phosphorylation of Tip60 by GSK-3 determines the induction of PUMA and apoptosis by p53 [J]. *Mol Cell*, 2011, 42(5): 584-596
- 2 Sho T, Tsukiyama T, Sato T, *et al.* TRIM29 negatively regulates p53 via inhibition of Tip60 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(6): 1245-1253
- 3 Gehrking KM, Andresen JM, Duvick L, *et al.* Partial loss of Tip60 slows mid-stage neurodegeneration in a spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) mouse model [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(11): 2204-2212
- 4 Reitsma JM, Savaryn JP, Faust K, *et al.* Antiviral inhibition targeting the HCMV kinase pUL97 requires pUL27-dependent degradation of Tip60 acetyltransferase and cell-cycle arrest [J]. *Cell Host Microbe*, 2011, 9(2): 103-114
- 5 Wu J, Wang J, Li M, *et al.* Small molecule inhibitors of histone acetyltransferase Tip60 [J]. *Bioorg Chem*, 2011, 39(1): 53-58
- 6 Sun Y, Jiang X, Price BD. Tip60: connecting chromatin to DNA damage signaling [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(5): 930-936
- 7 Sakuraba K, Yokomizo K, Shirahata A, *et al.* TIP60 as a potential marker for the malignancy of gastric cancer [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(1): 77-80
- 8 Chen GD, Cheng YB, Tang Y, *et al.* Role of Tip60 in human melanoma cell migration, metastasis, and patient survival [J]. *J Invest Dermatol*, 2012, 132(2): 2632-2641
- 9 Choudhary C, Weinert BT, Nishida Y, *et al.* The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(8): 536-550
- 10 Webster BR, Scott I, Traba J, *et al.* Regulation of autophagy and mitophagy by nutrient availability and acetylation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1841(4): 525-534
- 11 Huang W, Wang Z, Lei QY. Acetylation control of metabolic enzymes in cancer: an updated version [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2014, 46(3): 204-213

- 12 Zhuang S. Regulation of STAT signaling by acetylation [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(9):1924–1931
- 13 Hong S, Dutta A, Laimins LA. The acetyltransferase tip60 is a critical regulator of the differentiation – dependent amplification of human papillomaviruses [J]. *J Virol*, 2015, 89(8):4668–4675
- 14 Xu Y, Liao R, Li N, *et al.* Phosphorylation of Tip60 by p38 α regulates p53 – mediated PUMA induction and apoptosis in response to DNA damage [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(24):12555–12572
- 15 Yi J, Huang X, Yang Y, *et al.* Regulation of histone acetyltransferase TIP60 function by histone deacetylase 3 [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(49):33878–33886
- 16 Domingues SC, Konietzko U, Henriques AG, *et al.* RanBP9 modulates AICD localization and transcriptional activity via direct interaction with Tip60 [J]. *J Alzheimers Dis*, 2014, 42(4):1415–1433
- 17 Sánchez – Molina S, Estarás C, Oliva JL, *et al.* Regulation of CBP and Tip60 coordinates histone acetylation at local and global levels during Ras – induced transformation [J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(10):2194–2202
- 18 Xiao Y, Nagai Y, Deng G, *et al.* Dynamic interactions between TIP60 and p300 regulate FOXP3 function through a structural switch defined by a single lysine on TIP60 [J]. *Cell Rep*, 2014, 7(5):1471–1480
- 19 Dar A, Shibata E, Dutta A. Deubiquitination of Tip60 by USP7 determines the activity of the p53 – dependent apoptotic pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(16):3309–3320
- 20 Piccinni E, Chelstowska A, Hanus J, *et al.* Direct interaction of Gas41 and Myc encoded by amplified genes in nervous system tumours [J]. *Acta Biochim Pol*, 2011, 58(4):529–534

(收稿日期:2015–10–19)

(修回日期:2015–11–05)

促红细胞生成素对大鼠脊髓损伤后神经生长蛋白 43 和微管相关蛋白 – 2 表达的影响

王 宁 徐纪伟 刘红敏 华新宇

摘 要 目的 观察促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)对大鼠脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的保护作用及神经细胞神经生长蛋白 43(GAP – 43)、微管相关蛋白 – 2(MAP – 2)表达的影响。**方法** 制作 SCI 模型,分为假手术组、生理盐水组、EPO 治疗组。用免疫组织化学染色方法检测神经细胞内 GAP – 43 和 MAP – 2 的表达变化,同时通过 BBB 运动评分检测动物的运动功能。**结果** EPO 治疗组较生理盐水组 GAP – 43 和 MAP – 2 表达水平高,EPO 治疗组的 BBB 运动评分明显优于生理盐水组。**结论** EPO 能够通过增加 GAP – 43 和 MAP – 2 表达,促进神经细胞生长。

关键词 促红细胞生成素 脊髓损伤 神经细胞神经生长蛋白 43 微管相关蛋白 – 2

中图分类号 R338

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.05.025

Effect of Erythropoietin on GAP – 43 and MAP – 2 Expression After Spinal Cord Injury in Rats. Wang Ning, Xu Jiwei, Liu Hongmin, *et al.* Luohe Medical College, Henan 462002, China

Abstract Objective To investigate the effect of Erythropoietin on GAP – 43 and MAP – 2 expression after spinal cord injury in rats. **Methods** Rats were randomly divided into sham group, NS group and erythropoietin treated group. Immunohistochemistry staining was used to observe GAP – 43 and MAP – 2 expression. BBB test were used to observe motor function in rats. **Results** Curcumin treatment group compared with NS group, GAP – 43 and MAP – 2 expression were significantly increased. The score of BBB test Erythropoietin treatment group were significantly better than NS group. **Conclusion** Erythropoietin might promote neurons growth by GAP – 43 and MAP – 2.

Key words Erythropoietin; Spinal cord injury; GAP – 43; MAP – 2

促红细胞生成素(EPO)来源于肾脏,是一种含唾液酸糖蛋白,含有 193 个氨基酸,分子质量 34kDa。目前发现 EPO 作为神经系统内源性细胞因子可以发

挥神经发育、保护作用^[1–3]。EPO 作为一种很有前途的中枢神经系统保护剂,目前在临床治疗脑血管病中的应用日益受到关注。本研究拟在观察 EPO 对脊髓损伤后神经生长相关蛋白 – 43(growth – associated protein – 43, GAP – 43)、微管相关蛋白 – 2(microtubule associated protein – 2, MAP – 2)的表达和神经功

基金项目:河南省教育厅自然科学基金资助项目(13B310163)

作者单位:462002 漯河医学高等专科学校