

## • 论著 •

## 胶质瘤患者转移相关蛋白的表达情况和生存分析研究

刘楚伟

西安市大兴医院神经外科 陕西 西安 710015

**摘要:**目的 探讨胶质瘤患者转移相关蛋白 (Metastasis-associated protein, MTA) 的表达情况和对患者生存时间的影响。方法 收集 67 例胶质瘤患者的肿瘤组织和 18 例取自脑外伤患者的正常脑组织,应用免疫组织化学方法检测所有组织 MTA-1、MTA-2 和 MTA-3 的表达情况,比较胶质瘤组织和正常脑组织中三种 MTA 的表达情况,并结合相关临床资料分析 MTA 表达情况的临床病理特征。采用 Kaplan-Meier 生存分析法对 MTA 及相关参数进行单因素分析,并对单因素分析  $p < 0.05$  的参数采用 Cox 比例风险模型进行多因素回归分析。结果 胶质瘤组织的 MTA-1 和 MTA-2 阳性表达率明显高于正常脑组织 ( $p = 0.012$ ;  $p = 0.001$ ),而 MTA-3 阳性表达率明显低于正常脑组织 ( $p = 0.001$ )。MTA-1 阳性组和 MTA-2 阳性组患者 WHO 分型高等级肿瘤均多于阴性组,KPS 评分均显著低于阴性组。而 MTA-3 阳性组患者高等级肿瘤少于阴性组,KPS 评分高于阴性组。生存分析结果显示 MTA-1、MTA-2、MTA-3、WHO 分型、KPS 得分及发病年龄均是胶质瘤患者生存时间的影响因素,Cox 回归多因素模型分析结果提示 WHO 分型和肿瘤 MTA-3 的表达情况是患者生存时间的独立影响因素。结论 三种 MTA 均对胶质瘤患者的生存时间有重要影响作用,MTA-1 和 MTA-2 的表达与患者生存时间负相关而 MTA-3 表达与胶质瘤生存时间正相关。

**关键词:** 胶质瘤; 转移相关蛋白; 生存分析

## Expression of metastasis-associated proteins in glioma patients and survival analysis

Liu ChuWei, Department of Neurosurgery, Da Xing Hospital of XiAn city. ShanXi, XiAn, 710015

**Abstract: Objective** To investigate the expression of metastasis-associated proteins (MTAs) in glioma patients and its influence on survival time. **Methods** Tumor tissues from 67 glioma patients and normal brain tissues from 18 patients with brain injury were collected. The expression of MTA-1, MTA-2, and MTA-3 in all the tissue samples was measured by immunohistochemistry and compared between glioma tissues and normal brain tissues; the clinicopathological features of MTA expression were analyzed with reference to related clinical data. The Kaplan-Meier survival analysis was applied for univariate analysis of MTA and related parameters, and the Cox proportional hazards model was applied for multivariate regression analysis of the parameters with  $P < 0.05$  determined by the univariate analysis. **Results** Compared with the normal brain tissues, the glioma tissues had significantly higher positive rates of MTA-1 and MTA-2 and a significantly lower positive rate of MTA-3 ( $P = 0.012$ ,  $0.001$ , and  $0.001$ , respectively). Compared with the corresponding negative groups, the MTA-1 positive group and the MTA-2 positive group had significantly higher numbers of the patients with high-grade tumors according to the WHO classification, as well as significantly lower Karnofsky Performance Scale (KPS) scores, while the MTA-3 group had a lower number of the patients with high-grade tumors and a higher KPS score. The results of univariate analysis showed that MTA-1, MTA-2, MTA-3, WHO classification, KPS score, and age of onset were the influencing factors for survival time in glioma patients, and the results of Cox multivariate regression analysis showed that WHO classification and MTA-3 expression were the independent influencing factors for survival time. **Conclusions** All three MTAs greatly influence the survival time in glioma patients, but with different mechanisms of action. Expressions of MTA-1 and MTA-2 may be negatively related with the survival time of patients, whereas MTA-3 may be positively related.

**Key words:** Glioma; Metastasis-associated protein; Survival analysis

收稿日期: 2015-10-23; 修回日期: 2015-12-14

作者简介: 刘楚伟 (1970-) 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 神经胶质瘤的治疗。

胶质瘤是神经系统最常见的恶性肿瘤,侵袭能力强,易转移,治疗效果较差<sup>[1-2]</sup>。MTA 家族包括 MTA-1、MTA-2 和 MTA-3 三种蛋白,MTA-1 和 MTA-2 具有高度同源性,目前研究发现二者均与多种人类肿瘤细胞的侵袭能力和转移能力相关,MTA-1 与 MTA-2 在肿瘤中含量越高,肿瘤的侵袭和转移能力越强,其恶性程度越高,预后越差<sup>[3-7]</sup>。近年来,MTA-3 被发现具有和 MTA-1、MTA-2 不同的表达模式和功能,在多种肿瘤的研究中均发现 MTA-3 具有抑制肿瘤侵袭转移的能力<sup>[8-9]</sup>。目前,关于 MTA-1 和 MTA-2 对人胶质瘤影响的研究多认为两者可能参与促进胶质瘤细胞的侵袭和转移<sup>[10-11]</sup>,而 MTA-3 对胶质瘤作用的研究却鲜有报道。本研究收集 67 例胶质瘤组织,探讨三种 MTA 在人胶质瘤组织中的表达情况及对患者生存率的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床标本

通过本院伦理委员会审核批准,并经患者及家属充分知情同意,67 例胶质瘤标本取自于 2012 年 1 月-2015 年 1 月在我院神经外科脑胶质瘤手术切除的脑胶质瘤组织,所有患者胶质瘤均为手术全切或次全切,排除肿瘤部分切除患者,术后所有患者按当前胶质瘤治疗指南进行放、化疗治疗;18 例正常脑组织为该科室在脑外伤等手术时取得的正常脑组织。所有标本均经过我院病理科检验确认。

### 1.2 临床资料

统计所有胶质瘤患者性别,发病年龄,KPS 评分和 WHO 分级等资料。所有胶质瘤患者每三个月通过电话或门诊随访一次,总生存时间计算按从首次治疗日开始至死亡或最后随访截止日,随访截止时间 2015 年 6 月 30 日。

### 1.3 免疫组织化学法检测组织中 MTA 的表达

组织切片脱蜡入水,进行微波辐射抗原修复,3%过氧化氢去离子水孵育 10 min,血清封闭 15 min,加一抗(兔抗人 MTA-1 抗体,工作浓度为 1:100;兔抗人 MTA-2 抗体,工作浓度为 1:75;兔抗人 MTA-3 抗体,工作浓度为 1:100;) ,4℃过夜,二抗 37℃孵育 30 min,滴加辣根酶标记链霉素卵白素工作液,37℃孵育 15 min,DAB 显色 5 min,脱水、透明、封片。光镜下( $\times 40$ )选取细胞数较为恒定的区域拍照,每张切片选取 3 个不重叠的视野,计数每高倍镜视野下阳性细胞数目,并取平均值。阳性细胞占所有细胞总数 $\geq 5\%$  定义为阳性, $<5\%$

定义为阴性<sup>[12]</sup>。

## 1.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件分析处理,计数资料结果以构成百分比表示,组间比较采用卡方检验;采用 Kaplan-Meier 生存分析法观察 MTA 及相关参数对患者生存时间的影响,差异显著性采用 Log-Rank 检验;对单因素分析  $p < 0.05$  的参数采用 Cox 比例风险模型按逐步后退(Wald)进行多因素回归分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MTA 检测结果

67 例胶质瘤组织 MTA-1 和 MTA-2 的阳性表达率均显著高于正常脑组织,而 MTA-3 的阳性表达率明显低于正常脑组织,见表 1。

表 1 三种 MTA 在胶质瘤和正常脑组织中的表达情况[n(%)]

	胶质瘤组织	正常脑组织	$\chi^2$ 值	P 值
MTA-1 阳性	41(61.19)	5(27.78)	6.38	0.012
MTA-2 阳性	43(64.18)	4(22.22)	10.10	0.001
MTA-3 阳性	25(37.31)	15(83.33)	12.06	0.001

### 2.2 MTA 与 WHO 分型、KPS 评分的关系

按 WHO 分型,MTA-1 阳性组和 MTA-2 阳性组患者高级别胶质瘤比例均高于阴性组,而 MTA-3 阳性组高级别胶质瘤比例低于阴性组,如表 2。MTA-1 阳性组和 MTA-2 阳性组患者 KPS 评分均明显低于阴性组,MTA-3 阳性组患者 KPS 评分高于阴性组,见表 3。

表 2 MTA 与 WHO 分型的关系

	I 型 + II 型	III 型 + IV 型	$\chi^2$ 值	P 值
MTA-1 阳性	9	32	17.10	0.001
MTA-2 阳性	11	32	12.97	0.001
MTA-3 阳性	15	10	5.44	0.020

表 3 MTA 与 KPS 评分的关系

	KPS < 80 分	KPS $\geq$ 80 分	$\chi^2$ 值	P 值
MTA-1 阳性	30	11	9.72	0.002
MTA-2 阳性	29	14	4.21	0.040
MTA-3 阳性	12	16	4.66	0.031

### 2.3 MTA 与生存时间的关系

如图 1,Kaplan-Meier 生存分析法作单因素分析结果提示三种 MTA 蛋白均对胶质瘤患者生存时间有重要影响作用,MTA-1 和 MTA-2 阳性患者中位

生存时间较阴性患者显著缩短,而 MTA-3 阳性患者较阴性患者中位生存时间则明显延长。另外,患者发病年龄、肿瘤的 WHO 分型和患者 KPS 评分也同患者生存时间密切相关,年龄越小、肿瘤 WHO 等级越低、KPS 评分越高,患者中位生存时间相应

增长。而性别在本研究中未发现与患者生存时间相关。进一步采用 Cox 比例风险模型对单因素分析  $p < 0.05$  的参数进行多因素分析,结果示本组患者低等级的 WHO 分型和 MTA-3 阳性是患者生存时间的独立影响因素,见表 4。

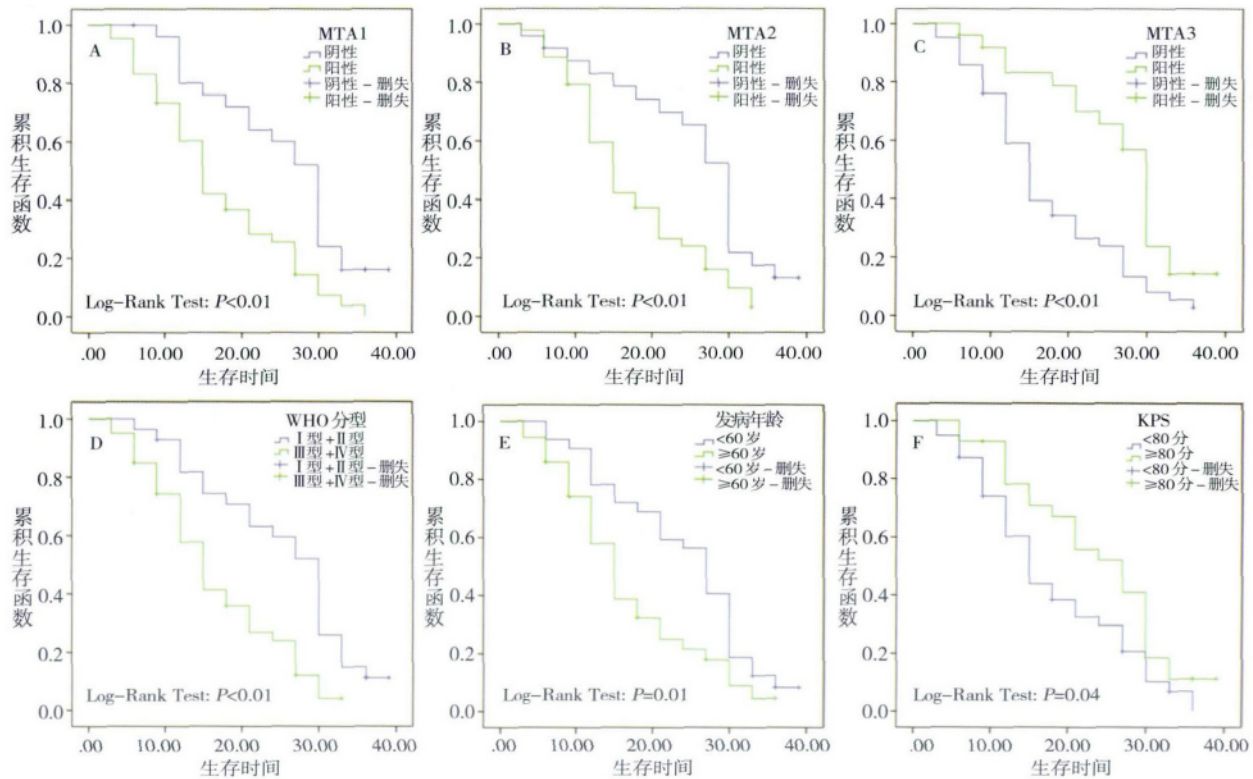


图 1 相关参数的生存曲线( A ,MTA-1; B ,MTA-2; C ,MTA-3; D ,肿瘤 WHO 分型; E ,患者发病年龄; F ,患者 KPS 评分)

表 4 Cox 比例风险模型多因素回归分析

	回归系数	相对危险度	P 值
WHO 分型(I型+II型)	0.703	2.020(1.128-3.316)	0.018
MTA-3 阳性	0.686	0.503(0.281-0.901)	0.021

### 3 讨论

神经胶质瘤传统治疗方式包括手术切除、放射治疗和化疗等<sup>[13]</sup>。近年来,胶质瘤的分子诊断在其诊疗过程得到越来越多的肯定和关注,如异柠檬酸脱氢酶(Isocitrate Dehydrogenase, IDH)突变、O6-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶(O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase, MGMT)启动子甲基化和染色体 1p/19q 联合性缺失等<sup>[14-16]</sup>,不仅可用来指导胶质瘤的治疗,也是患者预后情况的重要评估指标。但目前胶质瘤患者的生存时间仍未有明显改善,更为敏感和关键的分子指标是胶质瘤治疗研究的关注热点。

MTA 家族在多种肿瘤中都被认为同肿瘤细胞

的侵袭和转移相关,MTA-1 和 MTA-2 两种蛋白先于 MTA-3 被发现,它们均是 Mi-2 核小体重组蛋白和脱乙酰酶(NuRD)蛋白复合体的组成成分,可通过改变染色体结构调节基因表达,同时还可以促进黏连蛋白和 DNA 结合<sup>[4,7,17]</sup>。MTA-1 和 MTA-2 在包括胶质瘤的多种肿瘤中被发现具有促进肿瘤细胞侵袭和转移的作用。MTA-3 是最新被发现的 MTA 家族成员,同样也是 Mi-2 核小体重组蛋白和脱乙酰酶(NuRD)蛋白复合体的组成成分<sup>[8]</sup>。但目前多项研究发现 MTA-3 不同于 MTA-1 和 MTA-2,在多种肿瘤组织中 MTA-3 表达量并非上升,反而下降<sup>[8,9,18]</sup>,提示 MTA-3 在肿瘤中的作用也不同于 MTA-1 和 MTA-2,但 MTA-3 在胶质瘤中的作用目前鲜有研究报告。

本研究中胶质瘤组织 MTA-1 和 MTA-2 阳性表达率明显高于正常脑组织,与以往研究相符。MTA-3 在胶质瘤组织中的表达量显著低于正常脑

组织,提示 MTA-3 阳性可能具有抑制胶质瘤发生的作用。本研究还观察了三种 MTA 与胶质瘤 WHO 等级和患者功能状态之间的关系,结果显示 MTA-1 与 MTA-2 具有相似结果,MTA-1 阳性和 MTA-2 阳性组患者多表现为 WHO 高等级胶质瘤和低 KPS 评分。而 MTA-3 与前两者结果相反,MTA-3 阳性组患者 WHO 分型低等级胶质瘤(I型+II型)明显多于 MTA-3 阴性组,患者 KPS 评分 $\geq 80$  分的例数显著多于阴性组。这样的结果再次说明 MTA-1 和 MTA-2 可促进胶质瘤细胞侵袭,是胶质瘤患者预后不佳的指标,而 MTA-3 不同于前两者,可能具有抑制胶质瘤迁移的作用,是胶质瘤患者预后良好的参考指标。

本研究还采用 Kaplan-Meier 生存分析法考察了患者性别、发病年龄、肿瘤等级、KPS 评分和三种 MTA 等参数,结果显示三种 MTA 均对胶质瘤患者生存时间具有显著影响,但彼此作用方式却不同,MTA-1 阳性组患者一年生存率约 60%,明显低于阴性组的 80%,MTA-1 阳性组的中位生存时间为 12 个月,也明显小于阴性组的 27 个月。MTA-2 与 MTA-1 结果相似,阳性组 1 年生存率明显低于阴性组,中位生存时间明显小于阴性组,与之前研究相符。但 MTA-3 阳性组一年生存率约为 80%,明显高于阴性组的 60%,阳性组中位生存时间为 30 个月,也明显长于阴性组的 12 个月。另外,肿瘤 WHO 分型、患者发病年龄和 KPS 评分也对生存时间具有显著影响。而性别在本研究中未发现与患者生存时间相关。Cox 比例风险模型进行多因素分析,结果显示本组患者低等级的 WHO 分型和 MTA-3 阳性是患者生存时间的独立影响因素。生存分析结果提示 MTA 家族不仅与胶质瘤细胞侵袭、转移能力相关,且直接与患者预后生存时间相关,MTA-3 更是患者生存时间的独立影响因素,提示 MTA-3 可用于临床对患者预后情况的评估。

#### 参 考 文 献

- [1] Noll KR, Sullaway C, Ziu M, et al. Relationships between tumor grade and neurocognitive functioning in patients with glioma of the left temporal lobe prior to surgical resection. *Neuro Oncol*, 2015, 17(4): 580-587.
- [2] Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N, et al. An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science*, 2013, 340(6132): 626-630.
- [3] Liu J, Wang H, Huang C, et al. Subcellular localization of MTA proteins in normal and cancer cells. *Cancer Metastasis Rev*, 2014, 33(4): 843-856.
- [4] Toh Y, Ohga T, Endo K, et al. Expression of the metastasis-associated MTA1 protein and its relationship to deacetylation of the histone H4 in esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*, 2004, 110(3): 362-367.
- [5] Yoo Y, Na T H, Seong J, et al. Hepatitis B virus X protein induces the expression of MTA1 and HDAC1, which enhances hypoxia signaling in hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene*, 2008, 27(24): 3405-3413.
- [6] 宋永蔚,王丹,谢冬辉等. Mta-1 在甲状腺肿瘤中的表达及其与肿瘤血管生成的关系. *医学临床研究*, 2014, (8): 1534-1536.
- [7] Covington KR, Fuqua AW. Role of MTA2 in human cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2014, 33(4): 921-928.
- [8] Julien-Grille S, Bellacos A, Larue L. MTA3, a Mi-2 / NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer. *Cell*, 2003, 113(2): 207-219.
- [9] Dong H, Guo H, Xie L, et al. The metastasis-associated gene MTA3, a component of the Mi-2 / NuRD transcriptional repression complex, predicts prognosis of gastroesophageal junction adenocarcinoma. *Plos One*, 2013, 8(5): 65.
- [10] Huang Q, Zhang QB, Dong J, et al. Glioma stem cells are more aggressive in recurrent tumors with malignant progression than in the primary tumor, and both can be maintained long-term in vitro. *Bmc Cancer*, 2008, 8(5): 304.
- [11] Covington KR, Brusco L, Barone I, et al. Metastasis tumor-associated protein 2 enhances metastatic behavior and is associated with poor outcomes in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 141(3): 375-384.
- [12] Shan S, Hui G, Hou F, et al. Expression of metastasis-associated protein 3 in human brain glioma related to tumor prognosis. *Neurol Sci*, 2015: 1-6.
- [13] 《中国中枢神经系统胶质瘤诊断和治疗指南》编写组. 中国中枢神经系统胶质瘤诊断和治疗指南(2012). *中华医学杂志*, 2013, 93(31): 2418-2449.
- [14] 杨林,郑佳坤,杨立业. 分子标志物在胶质瘤诊断和治疗中的意义. *分子诊断与治疗杂志*, 2012, 04(2): 115-119.
- [15] Eberlin LS, Norton I, Orringer D, et al. Ambient Mass Spectrometry for the Intraoperative Molecular Diagnosis of Human Brain Tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 72(4): 1611-1616.
- [16] 丁建波,秦智勇. 神经胶质瘤的基因治疗. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(5): 418-422.
- [17] Chenfei Z, Jun J, Qu C, et al. MTA2 promotes gastric cancer cells invasion and is transcriptionally regulated by Sp1. *Mol Cancer*, 2013, 12(1): 3250-3263.
- [18] Mylonas I, Bruning A. The metastasis-associated gene iMTA3/i is an independent prognostic parameter in uterine non-endometrioid carcinomas. *Histopathology*, 2012, 60(4): 665-670.