

CUX-1 在胶质瘤中的表达及其对临床病理和预后的意义

冯帆^{1,2}, 王帅², 王亚雨², 赵宗清², 张墨轩², 张健², 衡雪源^{2*}

1. 青岛大学医学部, 山东省青岛市 266071

2. 临沂市人民医院神经外科, 山东省临沂市 276000

摘要: **目的** 探究转录因子 CUX-1 在胶质瘤中的表达及其对临床病理和患者预后的意义。 **方法** 在 TCGA 数据库中对 CUX-1 在肿瘤和正常脑组织中的差异性表达及其对患者总体生存期的影响进行生物信息学分析。运用蛋白印迹、免疫组化实验检测 CUX-1 在不同级别胶质瘤中的表达, 同时分析其与临床病理指标及患者预后的关系。 **结果** 生信分析结果表明 CUX-1 在胶质瘤中表达显著上调, 且 CUX-1 高表达明显缩短患者生存期。蛋白印迹、免疫组化结果证明 CUX-1 随肿瘤 WHO 分级的升高而上调 ($P < 0.05$), 且 CUX-1 与胶质瘤 WHO 分级及增殖指标 Ki67、P53mut 显著相关 ($P < 0.05$)。Kaplan-Meier 分析示 CUX-1 低表达患者生存期显著长于高表达者 ($P < 0.01$)。 **结论** CUX-1 在胶质瘤中显著上调, 且与肿瘤增殖密切相关, 同时 CUX-1 高表达提示患者预后较差。综上, CUX-1 有望作为胶质瘤预后的分子标志物和治疗潜在靶点。

关键词: 胶质瘤; CUX-1; 增殖; 临床病理; 预后

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2019.04.011

Expression of CUX-1 in glioma and its significance for the clinicopathological features and prognosis of patients

FENG Fan^{1,2}, WANG Shuai², WANG Ya-Yu², ZHAO Zong-Qing², ZHANG Mo-Xuan², ZHANG Jian², HENG Xue-Yuan^{2*}. 1. Medical Department of Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong, China; 2. Department of Neurosurgery, Linyi People's Hospital, Linyi, 276000, Shandong, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression of the transcription factor CUX-1 in glioma and its significance for the clinicopathological parameters and prognosis of patients. **Methods** TCGA database was used to perform a bioinformatic analysis on the differential expression of CUX-1 in tumor and normal brain tissue and its effect on the overall survival (OS) of patients. Western blot and immunohistochemistry were used to determine CUX-1 expression in different grades of gliomas and analyze its effects on the clinicopathological parameters and prognosis of patients. **Results** The bioinformatic analysis indicated that CUX-1 expression was significantly increased in glioma and high CUX-1 expression significantly shortened the survival of patients. The results of Western blot and immunohistochemistry indicated that CUX-1 expression was up-regulated with increasing WHO grade of tumor ($P < 0.05$) and was significantly correlated with the WHO grade of glioma and the levels of proliferation indices (Ki67 and P53mut) ($P < 0.05$). The Kaplan-Meier analysis suggested that patients with low CUX-1 expression had significantly longer overall survival than those with high CUX-1 expression ($P < 0.01$). **Conclusions** CUX-1 expression is significantly up-regulated in glioma and is closely associated with tumor proliferation. Meanwhile, high CUX-1 expression suggests poor prognosis of the patient. In summary, CUX-1 holds promise as a prognostic molecular biomarker and potential therapeutic target for glioma.

Key words: glioma; CUX-1; proliferation; clinicopathology; prognosis

胶质瘤, 尤其是胶质母细胞瘤, 是一种侵袭性 极高的中枢神经系统原发恶性肿瘤, 目前治疗手段

基金项目: 山东省自然科学基金 (编号: ZR2015HL044)

收稿日期: 2019-02-24; 修回日期: 2019-07-01

作者简介: 冯帆 (1993-), 男, 硕士研究生, 从事脑肿瘤、颅脑损伤的临床与基础研究。

通信作者: 衡雪源 (1962-), 男, 博士生导师, 主任医师, 教授, 院长, 主要研究方向: 脑肿瘤、颅脑损伤临床与基础研究。E-mail: 278344614@qq.com。

包括最大限度的肿瘤切除辅以放疗及烷化剂化疗^[1,2]。尽管积极给予上述相关治疗,但由于肿瘤的快速增殖,高频复发的特性,目前胶质瘤患者预后极差,平均中位生存期仅为12~15个月^[2,3]。因此找到一种新的分子靶点并在其基础上研究出新的治疗方案,改善患者预后,是目前胶质瘤治疗领域中的重中之重。

转录调节因子 CUX-1 为同源异型盒 (homeobox) 家族成员之一,包括3个CUT结构域以及1个CUT同源结构域,富集于大脑皮质上板层,并参与多种疾病的发生及发展。CUX-1 的活性和表达主要受 caspase 样蛋白酶及核组织蛋白酶 L 介导的蛋白水解过程调节^[4]。最近的研究表明,p110 CUX-1 (CUX-1 的一种亚型) 过表达可加速胚胎成纤维细胞的细胞周期向 S 期转化,从而刺激细胞增殖^[5]。在肿瘤增殖方面,大量研究表明 CUX-1 在乳腺癌,肝细胞癌,导管型胰腺癌以及黑色素瘤中起到明显的促瘤作用^[6-8]。近来,一项基因组拷贝分析 (genome-wide copy number analysis) 证明染色体 CUX-1 位点 (7q22) 在胶质母细胞瘤 (GBM) 细胞中明显扩增,也为本课题提供了理论依据^[9]。本研究通过检测 CUX-1 在胶质瘤组织中的表达,分析其与临床病理特征及患者预后的关系,以探究 CUX-1 在胶质瘤增殖中的作用,并探讨其作为胶质瘤治疗靶点的可行性。

1 材料和方法

1.1 一般资料

收集 2015 年 6 月 ~ 2018 年 6 月期间在临沂市人民医院神经外科接受外科手术切除并经术后病理组织学检查确诊为胶质瘤的 66 例脑胶质瘤组织标本,以及从颅脑外伤患者额叶减压手术中获取的 10 例正常脑组织标本,组织获取后立即存于 -80℃ 冰箱保存。性别、年龄、随访和预后等临床数据均从病例记录中获得。本研究获得了所有患者的书面知情同意书及临沂市人民医院伦理委员会的批准。

1.2 Westernblot 检测

组织匀浆后提取总蛋白,二喹啉甲酸 (BCA) 法测定蛋白浓度。常规电泳,转膜,封闭后加入 CUX-1 一抗抗体 (1:2 000; Proteintech, China), 4℃ 静置过夜,洗膜,加入辣根过氧化物酶标记二抗 (1:2 500; Cell signaling, USA), PBST 洗膜三次,吸取等量 ECL 超灵敏型检测试剂盒 A 液、B

液,均匀滴于 PVDF 膜上进行化学发光显影,用 Quantity One (version 4.6) 分析软件计算 CUX-1 蛋白的表达水平。

1.3 免疫组织化学检测

将胶质瘤组织石蜡包埋,切片 (4 μm), 70℃ 烘干 45 分钟,石蜡切片常规脱蜡水化后,抗原修复,滴加过氧化物酶阻断剂, PBS 冲洗, 5% 正常山羊血清封闭,滴加一抗 (CUX-1, 1:400; Abcam, USA), 4℃ 孵育过夜后 PBS 冲洗,滴加二抗, DAB 显色,苏木素复染,盐酸分化后水洗,氨水返蓝,梯度酒精脱水,透明,封片。免疫组学分析和评分由 2 名病理诊断师独立完成,阳性染色以细胞质和 / 或细胞核中出现棕黄色颗粒为准。最终分数由染色强度 (+~++) 及阳性细胞数 (0~100%) 综合评定。综合评分标准如下: 评分 0 分 (阴性), 评分 2 分 (++, <10%), 评分 3 分 (+, >50%), 评分 4 分 (++, <50%), 评分 5 分 (++, >50%), 评分 6 分 (++++, 100%)。我们将评分 ≤4 分定义为低 CUX-1 表达组,而评分 >4 分作为高 CUX-1 表达组。

1.4 生物信息学分析

本研究中,所有数据均来自以下公共数据库网站: 癌症基因组图谱 (TCGA, <https://cancer.genome.nih.gov/>); 基因型组织表达 (GTEx, <https://gtexportal.org/>); UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>); STRING (<https://string.db.org/>)。利用 UALCAN 和 STRING 在线工具从数据库中获得基因差异性分析和 Kaplan-Meier 生存曲线。

1.5 统计学方法

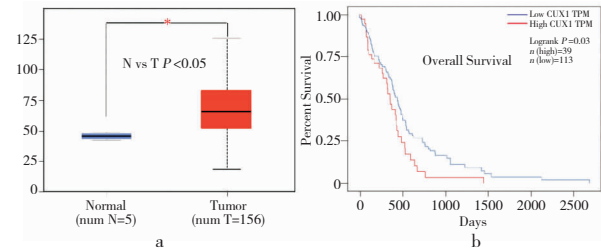
所有统计数据均采用 SPSS 19.0 及 GraphPad Prism 5 统计分析软件进行处理。各组间差异比较采用 *t* 检验, CUX-1 表达水平与各临床病理参数分析采用 χ^2 检验; CUX-1 表达情况与胶质瘤患者生存时间的关系用 Kaplan-Meier 法做生存分析, 生存期差异比较采用 Log-Rank 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CUX-1 相关生物信息学分析

为了明确 CUX-1 与肿瘤发生的关系,我们首先利用 UALCAN 在线工具,通过生物信息学分析,检测 CUX-1 在胶质瘤中的表达。结果表明,与正常组织相比,胶质瘤组织中 CUX-1 水平明显升高,提示 CUX-1 表达增加与肿瘤发生有关 (图 1a)。此外,在胶质瘤患者中,低 CUX-1 表达可显著延长胶质瘤患者的总体生存期 (OS) (图 1b, $P = 0.03$)。综上,生物信息学分析表明,较高的

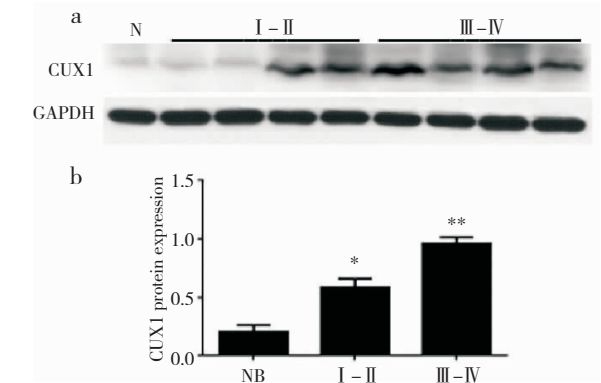
CUX1 表达水平可能与胶质瘤患者的肿瘤发生及不良预后有关。



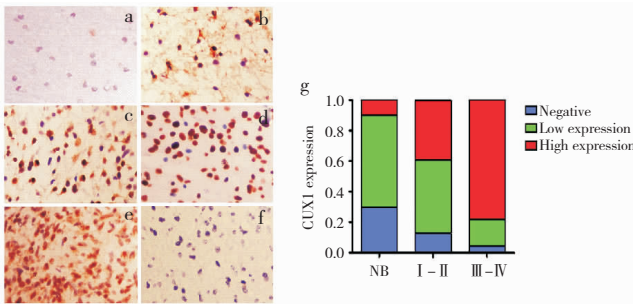
a:不同胶质瘤组织中 CUX-1 的差异表达分析; b:Kaplan-Meier 生存曲线 (低表达, N = 113; 高表达, N = 39, P = 0.03)。上述数据均来自 TCGA 数据库及 GTEx 数据库。
图 1 生物信息学分析 CUX-1 在数据库中的表达及生存分析

2.2 CUX-1 在胶质瘤组织中的表达情况

我们通过 Westernblot 方法检测了正常脑组织 (n = 1) 及不同级别胶质瘤样本 (n = 8) 中的 CUX-1 表达情况,结果表明 CUX-1 的表达随着胶质瘤 WHO 分级的升高而上调(图 2)。为了进一步验证上述结果,我们对 10 例正常脑组织样本及 66 例胶质瘤组织样本(包括 WHO I ~ IV 级)进行了 CUX-1 免疫组化染色,结果表明 CUX-1 在高级别胶质瘤(HGG)中的表达显著高于低级别胶质瘤(LGG),在正常脑组织中 CUX-1 阳性细胞数最少(图 3a-f)。CUX-1 高表达占正常脑组织样本的 10.0% (1/10);占毛细胞性星形细胞瘤(PA,WHO I)和弥漫性星形细胞瘤(WHO II)样本的 39.4% (13/33);占间变性星形细胞瘤(WHO III)和胶质母细胞瘤(GBM,WHO IV)样本的 78.8% (26/33)(图 3g,表 1)。



a,b:WHO I ~ IV 级胶质瘤及非肿瘤标本中 CUX-1 蛋白的 Westernblot 分析; *, ** 分别表示 P < 0.05、P < 0.01。
图 2 CUX-1 在胶质瘤组织中高表达



a:WHO I ~ IV 级胶质瘤; b-e:及阴性对照; f:无 CUX-1 抗体的免疫组化图像及分析。(×200)。正常脑组织和胶质瘤标本 CUX-1 染色的统计分析。

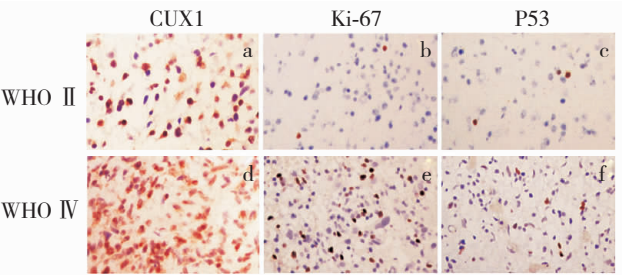
图 3 正常脑组织

表 1 CUX-1 在正常脑组织及不同级别胶质瘤组织中的表达

组别	例数	CUX-1 表达评分		
		阴性	低表达	高表达
正常脑组织	10	3	6	1
WHO I - II 级	33	4	16	13
WHO III-IV 级	33	1	6	26

2.3 CUX-1 与胶质瘤患者临床病理参数的相关性分析

根据 CUX-1 的表达水平,将 66 例胶质瘤样本分为两组:CUX-1 高表达组 (n = 39), CUX-1 低表达组 (n = 27)。相关性分析结果表明,高水平的 CUX-1 与胶质瘤 WHO 分级 (P = 0.001) 及肿瘤增殖指标 Ki67 (P = 0.002)、P53 mut (P = 0.002) 显著相关,而与患者年龄,性别,肿瘤大小,肿瘤位置,KPS 评分之间均无统计学意义(图 4,表 2)。



CUX-1 与 p53、Ki-67 两种临床病理参数的免疫组化分析。(×200)。

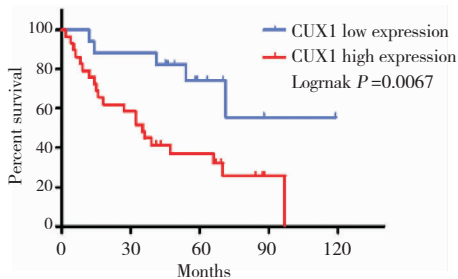
图 4 CUX-1 表达与临床病理参数的关系

表 2 CUX-1 与胶质瘤患者临床病理参数的相关性分析

临床病理参数	CUX-1 表达水平			χ^2	P 值
	例数	低表达	高表达		
性别					
男	33(50.0)	16(48.5)	17(51.5)	0.002	0.964
女	33(50.0)	11(33.3)	22(66.7)		
年龄					
<44	42(63.6)	19(45.2)	23(54.8)	0.895	0.344
≥44	24(36.4)	8(33.3)	16(66.7)		
肿瘤直径					
<4 cm	17(25.7)	7(41.2)	10(58.8)	0.001	0.975
≥4 cm	49(74.3)	20(40.8)	29(59.2)		
肿瘤位置					
额叶	39(59.1)	19(48.7)	20(51.3)	5.364	0.068
颞叶	20(30.3)	4(20.0)	16(80.0)		
其他	7(10.6)	4(57.1)	3(42.9)		
KPS 评分					
<80	34(51.5)	11(32.4)	23(66.6)	2.124	0.145
≥80	32(48.5)	16(50.0)	16(50.0)		
WHO 分级					
I - II	33(50.0)	20(60.6)	13(39.4)	10.593	0.001 *
III - IV	33(50.0)	7(21.2)	26(78.8)		
P53 表达					
野生型	42(63.6)	23(61.9)	19(38.1)	9.169	0.002 *
突变型	24(36.4)	4(16.7)	20(83.3)		
Ki-67 表达					
低表达	30(45.5)	19(63.3)	11(36.7)	9.844	0.002 *
高表达	36(54.5)	9(25.0)	27(75.0)		

2.4 CUX-1 与胶质瘤患者生存时间及预后的关系

此外,我们对 66 例胶质瘤患者进行了生存分析。根据 Kaplan-Meier 曲线,CUX-1 低表达可显著延长胶质瘤患者的总体生存期(OS)(图 5)。上述结果也与生物信息学分析结果相一致,进一步证明 CUX1 与胶质瘤的恶性程度及肿瘤增殖密切相关。



(低: n = 33 ; 高: n = 33)

图 5 低表达及高表达 CUX-1 的胶质瘤患者的 Kaplan-Meier 生存曲线

3 讨论

CUX1 属于同源域转录因子家族,位于染色体 7q22 位点,主要表达于迁移、增殖的中枢神经系统

(CNS) 颗粒细胞中^[10]。之前已有大量研究证明 CUX1 在多种肿瘤中可作为侵袭及增殖的生物标志物,包括白血病、乳腺癌、胰腺癌和黑色素瘤等^[11]。目前 CUX-1 在胶质瘤中发挥的功能及作用仍不清楚。近来有研究发现胶质母细胞瘤患者的染色体 CUX-1 位点出现明显扩增及突变,同时转录因子 CUX-1 在替莫唑胺(TMZ)诱导的 DNA 双链损伤(DSBs)中起着重要的修复作用,从而介导胶质瘤的化疗耐药^[9]。因此,我们认为 CUX-1 在胶质瘤的发生及进展过程中发挥了重要的促瘤作用。为了验证上述假说,我们首先在 TCGA 公共数据库中进行生物信息学分析证明 CUX-1 在胶质瘤中的表达显著上调,且 CUX-1 的高表达可明显缩短胶质瘤患者的总体生存期。之后我们通过 westernblot 及免疫组化实验在组织层面上证明了 CUX-1 的表达随肿瘤 WHO 级别的升高而显著上调,同时我们对 66 例胶质瘤样本的免疫组化结果进行分析,发现 CUX-1 的表达与肿瘤增殖指标 Ki67 及突变型 P53 的水平明显相关,进一步论证了 CUX-1 在胶质瘤中介导的促瘤作用^[12-14]。最后 Kaplan-Meier 生存曲线也证明 CUX-1 高表达的胶质瘤患者生存时间明显缩短(P < 0.05),该结果也与之前的生物信息学分析结果相吻合。

本实验证明了在胶质瘤中 CUX-1 的表达与肿瘤恶性程度密切相关,同时 CUX-1 可能在胶质瘤的增殖、侵袭方面发挥重要作用,其中的具体分子作用机制有待于下一步的体内实验进一步证明。综上,转录因子 CUX-1 在胶质瘤中可作为一个新的分子标志物及治疗靶点,并且有望基于该靶点产生新的胶质瘤治疗方案,从而改善胶质瘤患者的生存预后。

参 考 文 献

[1] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary [J]. Acta Neuropathol, 2016, 131(6): 803-820.

[2] 李欣龙, 陈礼刚. 脑胶质瘤的微环境. 国际神经病学神经外科学杂志[J]. 2018, 45(5): 503-506.

[3] Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009-2013 [J]. Neuro Oncol, 2016, 18: v1-v75.

[4] Han S, Li Z, Master LM, et al. Exogenous IGFBP-2 promotes proliferation, invasion, and chemoresistance to temozolo-

- mid in glioma cells via the integrin beta1-ERK pathway [J]. Br J Cancer, 2014, 111(7):1400-1409.
- [5] Diodato A, Ruinat de Brimont M, Yim YS, et al. Molecular signatures of neural connectivity in the olfactory cortex [J]. Nat Commun, 2016, 7:12238.
- [6] Sansregret L, Gallo D, Santaguida M, et al. Hyperphosphorylation by cyclin B/CDK1 in mitosis resets CUX1 DNA binding clock at each cell cycle [J]. J Biol Chem, 2010, 285(43):32834-32843.
- [7] Vadnais C, Shooshtarizadeh P, Rajadurai CV, et al. Autocrine Activation of the Wnt/beta-Catenin Pathway by CUX1 and GLIS1 in Breast Cancers [J]. Biol Open, 2014, 3(10):937-946.
- [8] Ripka S, Neesse A, Riedel J, et al. CUX1: target of Akt signalling and mediator of resistance to apoptosis in pancreatic cancer [J]. Gut, 2010, 59:1101-1110.
- [9] Kojima K, Takata A, Vadnais C, et al. MicroRNA122 is a key regulator of alpha-fetoprotein expression and influences the aggressiveness of hepatocellular carcinoma [J]. Nat Commun, 2011, 2, 338.
- [10] Kaur S, Ramdzan ZM, Guiot MC, et al. CUX1 stimulates APE1 enzymatic activity and increases the resistance of glioblastoma cells to the mono-alkylating agent temozolomide [J]. Neuro Oncol, 2018, 20(4):484-493.
- [11] Xu J, Li P. Expression of EAP1 and CUX1 in the hypothalamus of female rats and relationship with KISS1 and GnRH [J]. Endocr J, 2016, 63(8):681-690.
- [12] Kuhnemuth B, Muhlberg L, Schipper M, et al. CUX1 modulates polarization of tumor-associated macrophages by antagonizing NF-kappaB signaling [J]. Oncogene, 2015, 34(2):177-187.
- [13] Zakraoui O, Marcinkiewicz C, Aloui Z, et al. Lebein, a snake venom disintegrin, suppresses human colon cancer cells proliferation and tumor-induced angiogenesis through cell cycle arrest, apoptosis induction and inhibition of VEGF expression [J]. Mol Carcinog, 2017, 56(1):18-35.
- [14] Yuan y, Xiang W, Yanhui L, et al. Ki-67 overexpression in WHO grade ii gliomas is associated with poor postoperative seizure control [J]. Seizure. 2013, 22(10):877-881.

《国际神经病学神经外科学杂志》征稿、征订启事

《国际神经病学神经外科学杂志》创刊于 1974 年,由教育部主管,中南大学和中南大学湘雅医院主办。是目前国内唯一一本同时涵盖神经病学和神经外科学两个相联学科的专业学术期刊。本刊被收录为“中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)”。

《国际神经病学神经外科学杂志》现主要栏目有论著、临床经验交流、疑难病例讨论、病例报道、专家论坛和综述等。杂志立足于国内神经病学、神经外科学领域的前沿研究,及时报道国内外神经科学领域最新的学术动态和信息。促进国内外学术的双向交流,为中国神经科学走向世界搭建新的平台。

我们热忱欢迎国内外神经科学工作者踊跃来稿,通过本刊介绍自己的研究成果和临床经验。对于论著、临床经验交流、疑难病例讨论、病例报道等类型的文章将优先发表。

《国际神经病学神经外科学杂志》刊号为 CN 43-1456/R,ISSN 1673-2642,邮发代号 42-11,全国公开发行。读者对象主要为国内外从事神经病学、神经外科专业及相关专业的医务人员。杂志为双月刊,每期定价 20 元,全年定价 120 元。欢迎各级医师到当地邮局订购。杂志社也可办理邮购。

为更好地筹集办刊资金,保证刊物的健康发展,本刊将竭诚为药品厂商、医疗器械厂商和广告公司提供优质服务,并长期向各级医疗单位征集协办单位,具体事宜请与本刊编辑部联系。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路 87 号(中南大学湘雅医院内)《国际神经病学神经外科学杂志》编辑部,邮编:410008,电话/传真:0731-84327401,E-mail 地址:jinn@vip.163.com,网址:http://www.jinn.org.cn/。