

# 细胞红蛋白在脑胶质瘤的表达和临床意义

许宏武 谢泽宇 林岚 郭燕春 林欣鹏 周文 李沐 黄钦国

**【摘要】** 目的 探讨细胞红蛋白(Cygb)在不同级别脑胶质瘤的表达及其在预后判断等方面的意义。方法 采用免疫组织化学方法检测 88 例脑胶质瘤组织标本(WHO I 级 10 例, II 级 37 例, III 级 26 例, IV 级 15 例) Cygb 的表达情况, 并分析其与临床病理、肿瘤复发和预后的关系。结果 在低级别胶质瘤(I~II 级)中 Cygb 呈高表达, 在高级别胶质瘤(III~IV 级)中 Cygb 呈低表达。Kruskal-Wallis test 分析 Cygb 的表达程度与胶质瘤的病理级别呈高度负相关( $P < 0.01$ ); Mann-Whitney  $U$  test 分析 Cygb 与胶质瘤术后是否复发也呈高度负相关( $P < 0.01$ )。Cygb 低表达组患者的生存率低于 Cygb 高表达组。Cox 回归分析 Cygb 低表达为脑胶质瘤高风险因素之一。结论 Cygb 的表达水平能作为判断脑胶质瘤恶性程度的另一个指标, Cygb 的表达水平还可以作为判断脑胶质瘤患者的预后和是否复发指标之一。

**【关键词】** 神经胶质瘤; 细胞红蛋白; 免疫组织化学

**The expression and clinic significance of Cytoglobin in gliomas** XU Hong-wu, XIE Ze-yu, LIN Lan, GUO Yan-chun, LIN Xin-peng, ZHOU Wen, LI Mu, HUANG Qin-guo. Department of Neurosurgery, Research Center for Translational Medicine, The Second Affiliated Hospital, Medical College, Shantou University, Shantou 515041, China

Corresponding author: XU Hong-wu, Email: hwxu@qq.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the expression and significance of Cygb in human gliomas. **Methods** The expression of Cygb was detected by immunohistochemical methods in 88 cases of human glioma (10 cases of WHO grade I, 37 cases of WHO grade II, 26 cases of WHO grade III, 15 cases of WHO grade IV). Analyzed the relationships of the expression of Cygb with histological grades, tumor recurrence and the prognosis of the patients. **Results** High expression of Cygb was significantly associated with the lower histological grading (WHO grade I-II), low expression of Cygb was significantly associated with the higher histological grading (WHO grade III-IV). The expression of Cygb had highly correlation with histological grades ( $P < 0.01$ ) and tumor recurrence ( $P < 0.01$ ), respectively. Decreased Cygb expression affected survival in all cases ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Cygb may be another indicator for the estimation of glioma malignant degree and predicting the prognosis and recurrence of glioma.

**【Key words】** Glioma; Cytoglobin; Immunohistochemistry

胶质瘤是最常见的颅内原发性肿瘤, 约占所有颅内肿瘤的 45% 左右。近年来以手术治疗为主, 辅以放疗的综合治疗方案得到越来越多的关注, 然而治疗效果仍不理想。脑胶质瘤的术后复发率高, 生存时间短。低级别胶质瘤手术全切除后是否有必要行放疗以利于降低复发率并提高生存率仍不明确<sup>[1]</sup>。细胞红蛋白(Cytoglobin, Cygb)是近十年来新发现的一种携氧珠蛋白。细胞红蛋白能表达于正常神经元细胞的胞浆和胞核中, 也能表达于胶质瘤细胞中。越来越多的研

究表明在多种恶性肿瘤细胞中 Cygb 呈低表达<sup>[2-3]</sup>, 较多研究者认为细胞红蛋白基因发挥类似于抑癌基因的作用。国内外目前对于细胞红蛋白在人胶质瘤组织的表达的研究罕见报道。本研究采用免疫组化法, 探讨细胞红蛋白在不同级别脑胶质瘤的表达及其在预后判断等方面的意义。

## 资料与方法

1. 一般资料: 收集 2002 年 1 月至 2011 年 12 月期间汕大医学院第二附属医院神经外科手术切除并经病理确诊为脑胶质瘤病例共 88 例, 其中男 51 例, 女 37 例, 年龄 18~74 岁, 平均 41 岁。所有病例均为首次手术, 术中达到肿瘤全切; 术前均未做放疗、化疗和免疫治疗; 无其他肿瘤病史; 无其他高血压、心脏病、

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.23.008

基金项目: 国家自然科学基金(31140016); 广东省医学科研基金项目(A2012396)

作者单位: 515041 广东省, 汕头大学医学院第二附属医院神经外科  
通讯作者: 许宏武, Email: hwxu@qq.com

糖尿病等基础疾病。根据《WHO(2000)中枢神经系统肿瘤分类》标准,WHO I级10例,II级37例,III级26例,IV级15例。低级别(I~II级)胶质瘤共47例,高级别(III~IV级)胶质瘤共41例。高级别胶质瘤术后行替莫唑胺标准化疗,低级别胶质瘤未行化疗。上述入组病例所有病理标本均经常规蜡块包埋,由汕头大学医学院第二附属医院病理科收集存档。所有标本的病理诊断均经2位病理医师检查证实。

2. 主要试剂:羊抗人Cygb多克隆抗体为Bioss公司生产(bs-0590R, Bioss),免疫组化试剂盒SP Kit为丹麦DAKO公司生产,兔抗羊多克隆抗体购自中国北京Biosynthesis公司。

3. 免疫组织化学染色方法:全部蜡块采用4 μm连续切片进行免疫组织化学染色。免疫组织化学染色采用SP法,Cygb一抗稀释浓度为1:300。使用PBS代替一抗进行阴性对照。实验严格按试剂盒说明书操作进行。

4. 结果判定: Cygb蛋白阳性着色主要定位于胞浆及胞核表面,棕黄色颗粒为阳性着色。判断标准:每例均在光镜下随机观察3个高倍视野,每个高倍视野计数至少500个细胞并计算每个高倍视野Cygb阳性细胞百分比,三个高倍视野的Cygb阳性细胞百分比的平均值为该病例的Cygb阳性细胞比例。每个病例Cygb阳性细胞比例高于所有病例Cygb阳性细胞比例的中位数39%(10%~86%)则记录为Cygb高表达,低于所有病例Cygb阳性细胞比例的中位数则记录为Cygb低表达。

5. 统计学分析:所有数据使用SPSS 17.0软件处理。将Cygb表达作为连续变量进行基础统计分析。Cygb与年龄和临床病理特征的相关分析分别使用Spearman相关分析和Kruskal-Wallis test。低级别胶质瘤Cygb低表达和高表达者术后复发率分析卡方检验。Cygb与肿瘤复发的相关分析使用Mann-Whitney U test。年龄、性别、病理级别、肿瘤是否复发以及Cygb表达程度等各因素与肿瘤预后的关系使用Cox回归分析。以P<0.05为差异有统计学意义。

### 结 果

1. Cygb蛋白的表达情况: Cygb蛋白主要表达于胶质瘤细胞的胞浆内和胞核表面,低级别和高级别胶质瘤在阴性对照染色中未见任何阳性细胞(图1)。本实验中,经Spearman相关分析可见,Cygb蛋白表达与年龄无相关性( $r = -0.083, P = 0.439$ );经Mann-Whitney U test分析可见,Cygb蛋白表达与性别无明显相关( $P = 0.051$ ) (表1)。

表1 Cygb蛋白表达与脑胶质瘤患者其他临床指标的相关分析

项目	Cygb 表达(%)		P 值
	中位数	范围	
年龄	39	10~86	0.439( $r = -0.083$ ) <sup>a</sup>
性别			
男(n=51)	30	11~85	0.051 <sup>b</sup>
女(n=37)	52	10~86	
组织分级			
I (n=10)	56.5	20~86	<0.01 <sup>c</sup>
II (n=37)	66	12~85	
III (n=26)	31.5	18~52	
IV (n=15)	14	10~20	
复发			
无(n=31)	64	25~86	<0.01 <sup>b</sup>
有(n=57)	22	10~85	

注: <sup>a</sup>Spearman's correlation coefficient; <sup>b</sup>Mann-Whitney U test; <sup>c</sup>Kruskal-Wallis ANOVA

2. Cygb蛋白表达与胶质瘤病理级别、肿瘤复发的关系(图1):在低级别胶质瘤中Cygb蛋白呈高表达,在高级别胶质瘤中Cygb蛋白呈低表达,在阴性对照中未见Cygb阳性染色。Kruskal-Wallis test分析Cygb的表达程度与胶质瘤的病理级别呈高度负相关( $P < 0.01$ );Mann-Whitney U test分析Cygb与胶质瘤术后是否复发也呈高度负相关( $P < 0.01$ ) (表1)。31例低级别胶质瘤中Cygb低表达4例(复发率50%),Cygb高表达27例(复发率7.41%),卡方检验分析 $\chi^2 = 5.624, P = 0.018$ ,差异有统计学意义(表2)。多因素Cox回归分析提示年龄和性别与预后无相关性( $P > 0.05$ ),病理级别与预后有高度相关性( $P < 0.01$ ),Cygb低表达和肿瘤复发均与预后有相关性( $P < 0.05$ ) (表3)。

表2 胶质瘤Cygb表达程度与复发的关系

组别	例数	复发(例)	无复发(例)	复发率(%)
Cygb低表达	4	2	2	50.00
Cygb高表达	27	2	25	7.41
合计		4	27	12.90

注:  $\chi^2 = 5.624, P = 0.018$

3. Cygb蛋白表达和生存率的关系:在生存分析曲线上可见,Cygb低表达组患者的生存率低于Cygb高表达组(图2)。

### 讨 论

传统理论认为Cygb是一种与血红蛋白功能相似的、与携氧和抗氧化应激有关的蛋白。还有研究证明Cygb具有一定的神经细胞保护作用<sup>[4]</sup>。近几年Cygb基因开始被应用于多种恶性肿瘤的研究中,并普遍认

表3 脑胶质瘤患者累计风险率的Cox回归多因素分析

变量	Wald	Hazard ratio	95% CI	P 值
年龄 (>41岁 vs. <41岁)	0.898	0.716	0.359~1.429	0.343
性别 (男 vs. 女)	0.074	0.909	0.456~1.811	0.786
组织分级 (低级别 vs. 高级别)	13.834	13.539	3.430~53.442	0.000
肿瘤复发 (无 vs. 有)	4.019	8.011	1.048~61.270	0.045
Cygb 表达 (低 vs. 高)	4.869	0.320	0.116~0.880	0.027

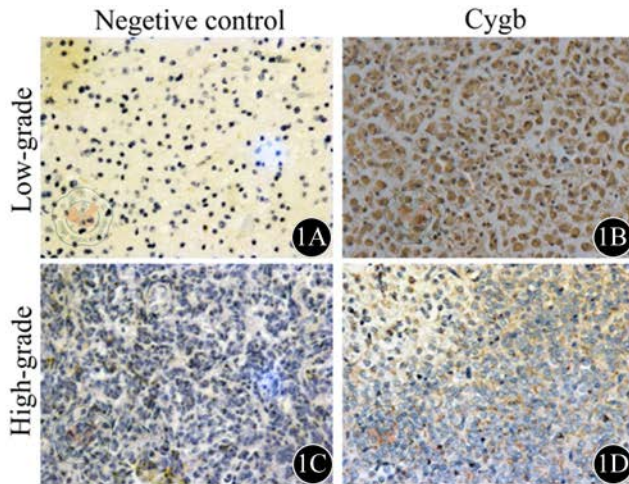


图1 高级别和低级别胶质瘤Cygb免疫组化染色(×400)

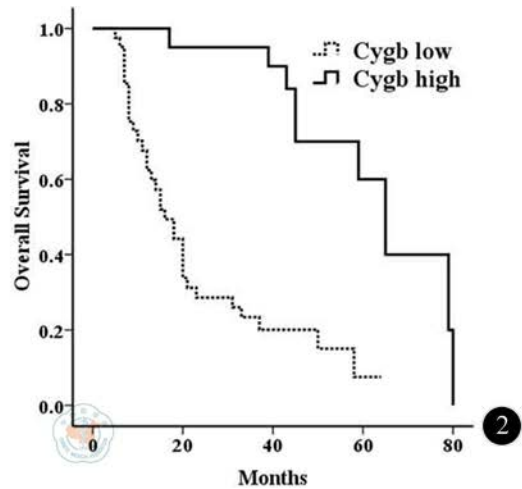


图2 Kaplan-Meier生存曲线显示Cygb表达与生存率的关系

为 Cygb 基因是一种特定的抑癌基因<sup>[2-3,5]</sup>。众多研究者报道了 Cygb 在多种人类肿瘤细胞中表达,包括脑胶质瘤细胞。有研究发现 Cygb 基因敲除能显著减少胶质瘤细胞的倍增时间,胶质瘤细胞的增殖更快<sup>[6]</sup>,该研究发现支持 Cygb 可能在胶质瘤发生发展中起抑癌基因作用的观点。

本研究结果提示 Cygb 在 88 例脑胶质瘤中的表达与脑胶质瘤病理级别呈负相关,在高级别胶质瘤中呈低表达,低级别胶质瘤中呈高表达; Cygb 低表达与患者生存时间短有密切的关系。本研究中 31 例低级别胶质瘤患者 Cygb 低表达者复发率显著高于 Cygb 高表达者。这样的研究结果与既往众多研究发现认为 Cygb 为抑癌基因的观点相符,也与认为 Cygb 可能在脑胶质瘤中发挥类似于抑癌基因的作用的观点相符。因此我们认为 Cygb 的表达水平能作为判断脑胶质瘤恶性程度的另一个指标。

脑胶质瘤在颅内呈侵袭性生长,没有包膜,即使是低级别胶质瘤也容易复发。众所周知,年龄、性别、肿瘤大小等临床资料均不能作为可靠的评估脑胶质瘤是否复发的指标。甚至根据脑胶质瘤的病理级别也不能准确预言脑胶质瘤是否复发,低级别脑胶质瘤(包括 WHO I 级)也屡见肿瘤全切术后复发的病例<sup>[7-8]</sup>。本研究发现 Cygb 的表达水平与脑胶质瘤术后是否复发有密切的关系。尤其是当低级别脑胶质瘤(WHO I~II 级)检测到 Cygb 低表达时,在随访期间该肿瘤

复发的可能性远大于 Cygb 高表达者。本研究还发现, Cygb 低表达与脑胶质瘤高病理分级、术后复发均为脑胶质瘤的高风险因素,患者预后更差。因此本研究的结果支持 Cygb 的表达水平可作为脑胶质瘤是否复发的预后指标之一。

但是由于本研究所的 Cygb 表达水平的高低,是针对本研究所有病例 Cygb 表达水平中位数而言,因此要推广到其他病例,需要确定一个 Cygb 表达的中等水平,这需要多研究中心、更多病例数的统计数据。这将是本课题组下一步工作的目标之一。

综上所述,本研究的结果提示 Cygb 能作为辅助判断脑胶质瘤恶性程度高低及肿瘤全切术后是否复发的另一个指标。脑胶质瘤的病理级别结合其 Cygb 的表达水平可能有助于判断脑胶质瘤患者的预后及指导手术后综合治疗方案的选择。

参 考 文 献

- [1] Levin N, Lavon I, Zelikovitch B, et al. Progressive low-grade oligodendrogliomas: response to temozolomide and correlation between genetic profile and O6-methylguanine DNA methyltransferase protein expression. *Cancer*, 2006, 106: 1759-1765.
- [2] Thi Thanh Thuy L, Morita T, Yoshida K, et al. Promotion of Liver and Lung Tumorigenesis in DEN-Treated Cytoglobin-Deficient Mice. *Am J Pathol*, 2011, 179: 1050-1060.
- [3] Gorr TA, Wichmann D, Pilarsky C, et al. Old proteins - new locations: myoglobin, haemoglobin, neuroglobin and cytoglobin in solid tumours and cancer cells. *Acta Physiol (Oxf)*, 2011, 202: 563-581.
- [4] Nikolos JH, Neal I, Subdha D, et al. Cellular protection from oxidative DNA damage by over-expression of the novel globin cytoglobin in vitro.

Mutagenesis, 2008, 23: 293-298.

- [5] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant Temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 2005, 352: 987-996.
- [6] Fang J, Ma I, Allalunis-Turner J. Knockdown of Cytoglobin Expression Sensitizes Human Glioma Cells to Radiation and Oxidative Stress. *Radiat*

*Res*, 2011, 176: 198-207.

- [7] 张懋植. 成人低级别胶质瘤的治疗进展. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2006, 1: 1-2.
- [8] 苏君, 张学新, 张锐, 等. VEGF在低级别胶质瘤复发、恶变过程中的表达及意义. *中国误诊学杂志*, 2012, 2: 329-330.

(收稿日期: 2013-06-06)

(本文编辑: 郝锐)

许宏武, 谢泽宇, 林岚, 等. 细胞红蛋白在脑胶质瘤的表达和临床意义 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(23): 10418-10421.

