

# 人脑胶质瘤组织中神经前体细胞表达发育下调蛋白 8 的表达及其意义<sup>\*</sup>

曾凡涛,王新军<sup>△</sup>,杨卓,王修成,杨如意,周少龙,张旭阳,袁小威  
(郑州大学第五附属医院神经外科,郑州 450052)

**[摘要]** **目的** 探讨神经前体细胞表达发育下调蛋白 8(NEDD8)在胶质瘤组织中的表达情况及其与临床病理参数间的关系。**方法** 选取 2012 年 3 月至 2015 年 3 月于该院神经外科手术治疗的 89 例胶质瘤患者的胶质瘤组织及瘤周组织,通过免疫组织化学法、Western blot 检测不同级别胶质瘤患者肿瘤组织和瘤周组织中 NEDD8 的表达与分布,分析 NEDD8 水平与临床病理参数之间的关系。**结果** 胶质瘤组织中 NEDD8 的表达明显高于瘤周组织( $t=-9.801, P=0.001$ ),WHO 高级别胶质瘤组织中 NEDD8 的表达明显高于 WHO 低级别胶质瘤组织( $t=-6.684, P=0.003$ )。NEDD8 的表达与肿瘤直径、WHO 分级有关( $\chi^2=5.381, 10.186, P<0.05$ )。**结论** NEDD8 在人脑胶质瘤组织中呈高表达,且与肿瘤 WHO 病理分级相关。

**[关键词]** 神经胶质瘤;类泛素蛋白;神经前体细胞表达发育下调蛋白 8;病理参数

**[中图法分类号]** R739.41

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2019)12-2023-04

## Expression and significance of neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8 in human glioma tissues<sup>\*</sup>

ZENG Fantao, WANG Xinjun<sup>△</sup>, YANG Zhuo, WANG Xiucheng, YANG Ruyi, ZHOU Shaolong, ZHANG Xuyang, YUAN Xiaowei  
(Department of Neurosurgery, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression of neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8 (NEDD8) in glioma tissues and the relationship with clinicopathological parameters. **Methods** The glioma tissues and peritumoral tissues of 89 glioma patients who received neurosurgical treatment in our hospital from March 2012 to March 2015 were selected. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expression and distribution of NEDD8 in tumor tissues and peritumoral tissues of glioma patients with different grades. The relationships between NEDD8 level and clinicopathological parameters were analyzed. **Results** The expression of NEDD8 in glioma tissues was significantly higher than that in peritumoral tissues ( $t=-9.801, P=0.001$ ). The expression of NEDD8 in high-grade WHO glioma tissues was significantly higher than that in low-grade WHO glioma tissues ( $t=-6.684, P=0.003$ ). The expression of NEDD8 was associated with glioma diameter and WHO classification ( $\chi^2=5.381, 10.186, P<0.05$ ). **Conclusion** NEDD8 is highly expressed in human glioma tissues and closely related to tumor WHO grading.

**[Key words]** glioma; ubiquitin-like protein; NEDD8; pathological parameters

胶质瘤是神经系统中最常见的恶性肿瘤,患者生存期短、病死率高、预后差<sup>[1]</sup>。神经前体细胞表达发育下调蛋白 8(NEDD8)是一种类泛素蛋白,与泛素约有 60%的氨基酸序列相同,80%同源,主要在心肌和骨骼肌中特异性表达<sup>[2]</sup>。NEDD8 和底物相结合,参与翻译后可逆性修饰的过程称为 Neddylation,即 NEDD 化。该修饰可调控细胞内的多种代谢途径,其异常将导致人类神经退行性疾病和肿瘤的发生<sup>[3-4]</sup>。

目前已有相关研究报道 NEDD8 蛋白在肺癌<sup>[5]</sup>、肝内胆管癌<sup>[6]</sup>及结肠癌<sup>[7]</sup>中异常高表达,但其在人脑胶质瘤中的表达情况却较少报道。本研究通过免疫组织化学法和 Western blot 检测胶质瘤组织中 NEDD8 的表达及分布,并初步探讨 NEDD8 的表达与临床参数的关系。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2012 年 3 月至 2015 年 3 月于

<sup>\*</sup> 基金项目:河南省教育厅科学技术研究重点项目(14A320078);郑州市科技攻关项目(20150390)。 作者简介:曾凡涛(1993-),在读硕士,主要从事脑胶质瘤的临床与基础方面的研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: wangxj@zzu.edu.cn。

本院神经外科手术治疗的 89 例胶质瘤患者的胶质瘤组织及瘤周组织,获取标本后保存于-80℃冰箱内。其中,WHO 分级Ⅰ级 16 例,Ⅱ级 39 例(少突胶质细胞瘤 14 例),Ⅲ级 20 例(少突胶质细胞瘤 10 例),Ⅳ级 14 例。纳入标准:首发病例;镜下手术全切除;术前未接受放、化疗及其他治疗。本研究均已获得患者家属同意及本院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂和仪器 兔抗人 NEDD8 单克隆抗体购自北京索莱宝科技有限公司;二抗反应增强液、二抗增强酶标山羊抗小鼠/兔免疫球蛋白 G(IgG)聚合物及二氨基联苯胺(DAB)显色液购自北京中杉金桥生物技术有限公司;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜购自美国 Milipore 公司;荧光显微镜购自日本 Nikon 公司。

1.2.2 免疫组织化学检测 NEDD8 表达 89 例标本在离体后经 10%甲醛固定,行常规石蜡包埋等处理,将包埋标本以 3 μm 厚度连续切片,置于防脱剂预处理后的载玻片上。滴加 NEDD8 抗体(稀释比为 1:100)于 4℃冰箱中孵育过夜;磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后添加反应增强液、增强酶标山羊抗小鼠/兔 IgG 复合物,DAB 显色液镜下显色观察;苏木素复染,清水返蓝后中性树胶封片,于镜下观察。以 PBS 液代替一抗作阴性对照。

1.2.3 Western blot 检测 取冰冻组织标本 250 mg,剪碎后放入匀浆器中,加入预冷的蛋白裂解液 1 mL,在冰上匀浆 30 min,使蛋白质充分裂解;将匀浆后的液体倒入 1.5 mL EP 管中,煮沸 5 min 后 10 000 r/min 离心。将离心后的上清液析出,在冰上分装至 200 μL 的 EP 管中,置于-70℃冰箱保存。二喹啉甲酸(BCA)法进行蛋白定量,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳分离样品后电转移至 PVDF 膜。5%脱脂奶粉 4℃封闭过夜。加入兔抗人 NEDD8 抗体(1:1 000)4℃孵育过夜,加入羊抗兔二抗(1:10 000)37℃孵育 1 h。采用凝胶成像系统进行分析,测定各条带的吸光度值。将每个标本测得的 NEDD8 条带吸光度值与内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)条带吸光度值相比,所得比值代表该标本中 NEDD8 蛋白的表达水平。

1.2.4 结果判断 由本院两名经验丰富的病理医师采用双盲法阅片和双评分半定量法进行评分,光镜下观察 8 个高倍镜视野,计数 NEDD8 阳性细胞。其中以阳性细胞百分比小于或等于 25%为 1 分,>25%~50%为 2 分,>50%~75%为 3 分,>75%为 4 分。按染色程度评分:无染色者为 0 分,淡黄色者为 1 分,黄色或棕黄色者为 2 分,褐色者为 3 分。最后以两者评分总和为最终评分结果:0 分为阴性,1~7 分为阳性,其中 1~3 分为低表达,4~7 分为高表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS25.0 对数据进行处理与分析。运用 K-S 法对数据进行正态分布检验,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,肿瘤组织与瘤周组织,WHO 低病理级别与高病理级别组织中 NEDD8 的表达比较采用两独立样本 *t* 检验,NEDD8 的表达与临床病理参数间的关系采用  $\chi^2$  检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NEDD8 在脑组织中的表达和分布 NEDD8 在肿瘤组织细胞核中高度表达,而在细胞质中表达相对较弱,可见黄色或棕黄色的阳性颗粒物质(图 1)。NEDD8 蛋白水平在瘤周组织中为 0.11±0.02,在肿瘤组织中为 0.43±0.06,WHO 低病理级别(Ⅰ、Ⅱ)中为 0.32±0.14,高病理级别(Ⅲ、Ⅳ)中为 0.52±0.08,瘤周组织与肿瘤组织比较差异有统计学意义(*t*=-9.801,*P*=0.001),WHO 低病理级别与 WHO 高病理级别比较差异有统计学意义(*t*=-6.684,*P*=0.003),见图 2。NEDD8 表达分布情况见表 1。

| 表 1 NEDD8 在不同级别和不同组织中的表达( <i>n</i> ) |          |    |     |     |
|--------------------------------------|----------|----|-----|-----|
| 组织类型                                 | <i>n</i> | 阴性 | 低表达 | 高表达 |
| 瘤周组织                                 | 89       | 57 | 30  | 2   |
| 肿瘤组织                                 | 89       | 18 | 25  | 46  |
| 低级别                                  | 55       | 17 | 23  | 15  |
| 高级别                                  | 34       | 1  | 5   | 28  |

| 表 2 肿瘤组织中 NEDD8 蛋白的表达与临床病理因素的关系( <i>n</i> ) |          |    |    |          |                    |
|---------------------------------------------|----------|----|----|----------|--------------------|
| 项目                                          | <i>n</i> | 阴性 | 阳性 | $\chi^2$ | <i>P</i>           |
| 年龄(岁)                                       |          |    |    | 1.008    | 0.427              |
| <45                                         | 39       | 6  | 33 |          |                    |
| ≥45                                         | 50       | 12 | 38 |          |                    |
| 性别                                          |          |    |    | 0.633    | 0.443              |
| 男                                           | 47       | 8  | 39 |          |                    |
| 女                                           | 42       | 10 | 32 |          |                    |
| 肿瘤直径(cm)                                    |          |    |    | 6.785    | 0.016              |
| <3                                          | 40       | 13 | 27 |          |                    |
| ≥3                                          | 49       | 5  | 44 |          |                    |
| WHO 分级                                      |          |    |    | 10.186   | 0.001              |
| 低级别                                         | 55       | 17 | 38 |          |                    |
| 高级别                                         | 34       | 1  | 33 |          |                    |
| 胶质瘤成分                                       |          |    |    | 2.476    | 0.116 <sup>a</sup> |
| 少突细胞                                        | 24       | 8  | 16 |          |                    |
| 非少突细胞                                       | 65       | 10 | 55 |          |                    |
| 肿瘤部位                                        |          |    |    | 0.348    | 0.840              |
| 额叶                                          | 23       | 5  | 18 |          |                    |
| 颞叶                                          | 40       | 7  | 33 |          |                    |
| 顶叶                                          | 26       | 6  | 20 |          |                    |

<sup>a</sup>:采用连续性校正  $\chi^2$  检验



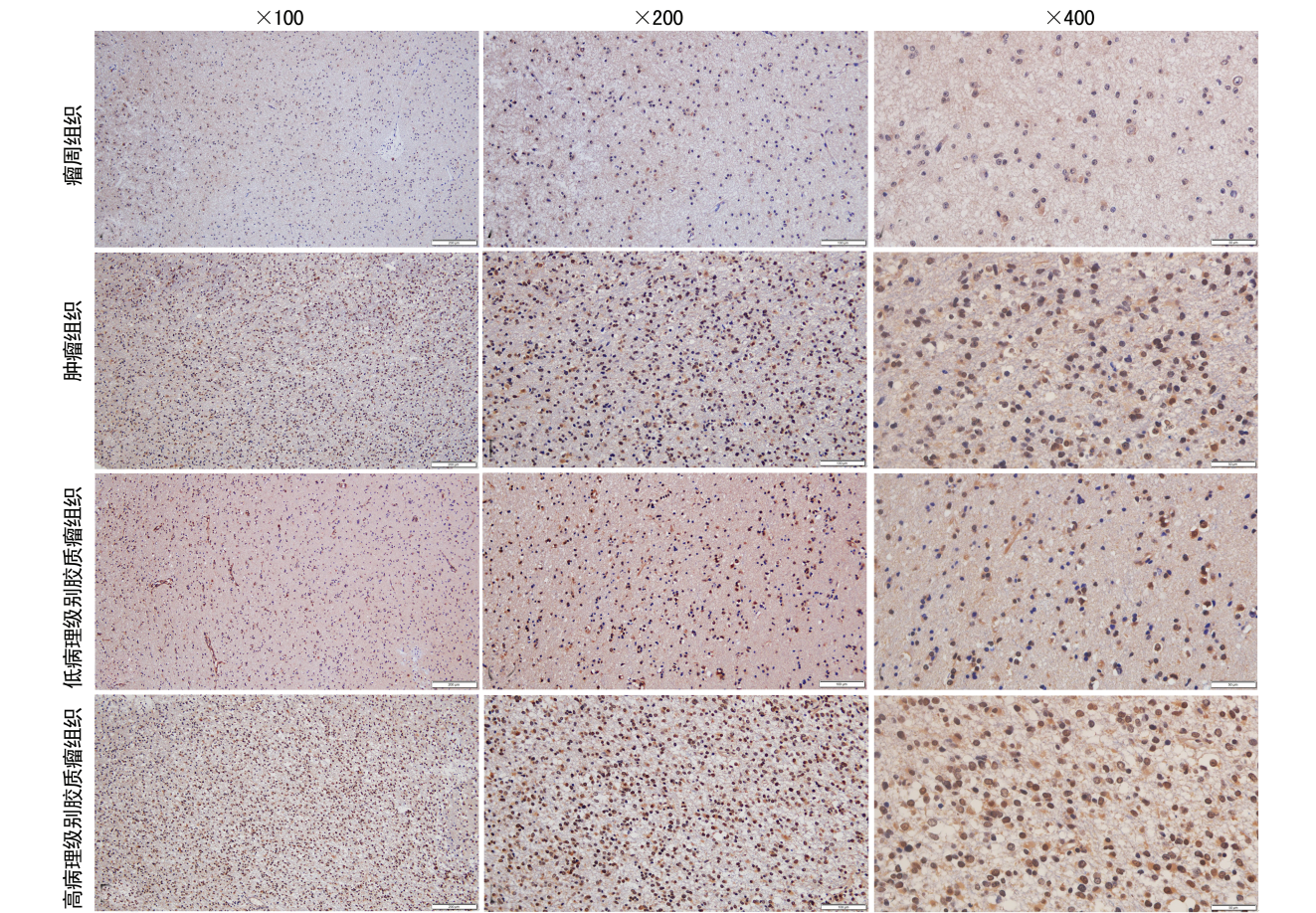
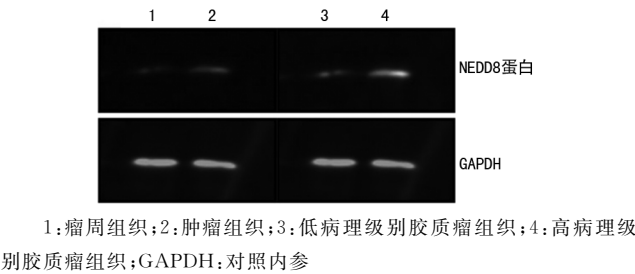


图 1 免疫组织化学检测胶质瘤组织和瘤周组织中 NEDD8 的表达

**2.2 NEDD8 的表达与临床病理因素的关系**  
NEDD8 的表达与 WHO 分级、肿瘤直径有相关性 ( $P<0.05$ ), 与患者性别、年龄、胶质瘤成分及肿瘤部位无相关性 ( $P>0.05$ ), 见表 2。



1: 瘤周组织; 2: 肿瘤组织; 3: 低病理级别胶质瘤组织; 4: 高病理级别胶质瘤组织; GAPDH: 对照内参

3 讨 论

NEDD8 是由 NEDD8 基因编码的由 81 个氨基酸残基构成的多肽, 又称 Rub1, 在大多数真核生物中广泛表达, 高度保守, 在细胞功能的调控中发挥了重要作用<sup>[8]</sup>。NEDD 化是一种蛋白质翻译后修饰途径, 通过该途径, NEDD8 与底物蛋白结合可调节蛋白质的功能, 此过程中涉及 3 种酶: 激活酶 E1、结合酶 E2 及连接酶 E3<sup>[9]</sup>。目前已知 NEDD8 修饰的主要底物是 cullin 家族, 该蛋白家族可作为 cullin-RING 泛素连接酶(CRLs)的分子骨架<sup>[10]</sup>, 且在多种人类癌症中发现 CRLs 的亚基存在着过表达、突变或者扩增等现象。

已有研究表明, NEDD 化途径过度激活将会导致人类恶性实体瘤的进展<sup>[5-7]</sup>; 此外, NEDD8 通路的抑制因子 MLN4924 也已显示出了较好的抗肿瘤特性<sup>[11]</sup>。

人脑胶质瘤的发生和发展是一个多因素、多环节的病理性改变过程。由于内部分子结构异常复杂, 人脑胶质瘤在临床上的治疗效果不容乐观。在肿瘤细胞中, 蛋白质主要参与增殖、迁移等重要活动并为肿瘤的生长提供营养物质<sup>[12]</sup>。目前已有少量研究报道 NEDD 化过度激活有可能与胶质瘤(IV 级)组织的恶性程度相关<sup>[13]</sup>, 此外, 肿瘤组织中 NEDD8 蛋白的高表达也提示了患者预后不良。

本研究显示, NEDD8 在肿瘤组织中的阳性表达为 79.8% (71/89), 明显高于瘤周组织中的 35.9% (32/89), 这提示 NEDD8 可能在胶质瘤的发生和发展中起重要作用。NEDD8 在 WHO 高病理级别中的阳性表达为 97.1% (33/34), 明显高于 WHO 低病理级别中的 69.1% (38/55), 本研究还通过检测不同 WHO 病理级别中的蛋白水平, 更加明确了 NEDD8 蛋白在胶质瘤组织中表达上调, 且随着肿瘤 WHO 病理级别的升高而升高, 这与文献<sup>[13]</sup>报道情况基本一致, 这表明 NEDD8 可能在胶质瘤的进展过程中发挥重要作用。由于大多数胶质瘤与周围组织分界不明显, 术中难以保证对肿瘤做到全切除<sup>[14]</sup>, 这可能导致胶质瘤术

后复发,因此,NEDD8 蛋白的表达程度是否可作为快速判断肿瘤边界的定量指标,对临床一线医生后续手术全切胶质瘤有重要意义。此外,本课题组发现,胶质瘤组织中 NEDD8 的表达与患者 WHO 病理分级、肿瘤直径有关( $P<0.05$ ),而与年龄、性别、肿瘤细胞成分及肿瘤部位无明显相关性( $P>0.05$ )。NEDD8 的表达随着肿瘤直径的增大而增加,可能是肿瘤组织中 NEDD8 蛋白经 NEDD 化抑制 Cullins 与 CAND1 的相互作用,促进了 Cullin 与接头蛋白和底物识别亚基的结合,增强 CRLs 的生物活性,从而加速了肿瘤的生长和增殖<sup>[15]</sup>。据此,本研究假设 NEDD8 表达水平的增高促进了胶质瘤的病理级别及体积的改变,NEDD8 蛋白可能有望作为判断胶质瘤生物学特征的新靶点。

综上所述,本研究初步分析了 NEDD8 蛋白在胶质瘤组织中的表达情况,为研究胶质瘤的生长机制、侵袭进展提供了理论依据和参考。然而,NEDD8 蛋白的异常表达是通过何种途径来增强胶质瘤的生物活性目前尚未明了。接下来本课题组将进行 NEDD8 参与胶质瘤发生、发展过程的机制研究,并对肿瘤患者术后进行随访,进一步探讨 NEDD8 与胶质瘤患者预后的关系。

## 参考文献

- [1] SATHORNSUMETEE S, RICH J N, REARDON D A. Diagnosis and treatment of high-grade astrocytoma[J]. *Neurol Clin*, 2007, 25(4): 1111-1139.
- [2] KAMITANI T, KITO K, NGUYEN H P, et al. Characterization of NEDD8, a developmentally down-regulated ubiquitin-like protein[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(45): 28557-28562.
- [3] MORI F, NISHIE M, PIAO Y S, et al. Accumulation of NEDD8 in neuronal and glial inclusions of neurodegenerative disorders[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2005, 31(1): 53-61.
- [4] 胡高磊, 刘英, 伍会健. NEDD 化修饰系统及其在肿瘤发展中的作用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014, 30(9): 843-847.
- [5] LI L, WANG M, YU G, et al. Overactivated neddylation pathway as a therapeutic target in lung cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106(6): 83.
- [6] GAO Q, YU G Y, SHI J Y, et al. Neddylation pathway is up-regulated in human intrahepatic cholangiocarcinoma and serves as a potential therapeutic target[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(17): 7820-7832.
- [7] XIE P, ZHANG M, HE S, et al. The covalent modifier Nedd8 is critical for the activation of Smurf1 ubiquitin ligase in tumorigenesis[J]. *Nat Commun*, 2014, 5(5): 3733.
- [8] BURROUGHS A M, BALAJI S, IYER L M, et al. Small but versatile: the extraordinary functional and structural diversity of the beta-grasp fold[J]. *Biol Direct*, 2007, 2(2): 18.
- [9] ZUO W, HUANG F, CHIANG Y J, et al. c-Cbl-Mediated neddylation antagonizes ubiquitination and degradation of the TGF-beta type II receptor[J]. *Mol Cell*, 2013, 49(3): 499-510.
- [10] BROWN J S, LUKASHCHUK N, SCZANIECKA-CLIFT M, et al. Neddylation promotes ubiquitylation and release of Ku from DNA-Damage sites[J]. *Cell Rep*, 2015, 11(5): 704-714.
- [11] SOUCY T A, SMITH P G, MILHOLLEN M A, et al. An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer[J]. *Nature*, 2009, 458(7239): U67-732.
- [12] BROWN P D, BALLMAN K V, RUMMANS T A, et al. Prospective study of quality of life in adults with newly diagnosed high-grade gliomas[J]. *J Neurooncol*, 2006, 76(3): 283-291.
- [13] HUA W, LI C J, YANG Z X, et al. Suppression of glioblastoma by targeting the overactivated protein neddylation pathway[J]. *Neuro Oncol*, 2015, 17(10): 1333-1343.
- [14] 白少聪, 陈晓雷, 耿杰峰, 等. 高场强术中磁共振成像及神经导航在累及视放射的颞叶胶质瘤手术中的应用[J]. *中华外科杂志*, 2015, 53(5): 340-344.
- [15] ZHENG J Y, YANG X M, HARRELL J M, et al. CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex[J]. *Mol Cell*, 2002, 10(6): 1519-1526.

(收稿日期: 2019-01-28 修回日期: 2019-04-04)