

文章编号 1006-8147(2015)05-0397-04

论著

Girdin 蛋白在脑胶质瘤组织中的表达及其与临床病理特征和预后的关系

林宪仁¹, 何佳¹, 巴一¹, 马勇杰²

(1.天津医科大学肿瘤医院, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津 300060; 2.天津医科大学肿瘤医院肿瘤研究所细胞生物学实验室, 天津 300060)

摘要 目的:研究 Girdin 在人脑胶质瘤组织中表达的特点及其与病理特征和预后的关系。方法:应用 SP 免疫组化技术测定 100 例脑胶质瘤组织中 Girdin 的表达情况,分析 Girdin 表达与患者临床病理特征的关系,Kaplan-Meier 生存曲线分析 Girdin 表达与预后的关系,用 Cox 比例风险分析影响生存结果的独立预后因素。结果:Girdin 在各病理级别脑胶质瘤中均有表达,Girdin 在 III~IV 级脑胶质瘤表达高于 I~II 级脑胶质瘤,差异具有统计学意义。Girdin 表达与脑胶质瘤恶性程度、肿瘤大小呈正相关,Girdin 高表达组患者的预后比低表达组患者差,Cox 比例风险分析提示 Girdin、年龄、病理学分级及肿瘤大小是脑胶质瘤患者预后影响因素。结论:Girdin 可能在促进恶性脑胶质瘤发生发展中起重要作用。

关键词 Girdin 蛋白;脑胶质瘤;免疫组化;预后

中图分类号 R739.4

文献标志码 A

Expression of Girdin in glioma tissues and its relationship with pathological clinical characteristics and prognosis of the patients

LIN Hsien-jen¹, HE Jia¹, BA Yi¹, MA Yong-jie²

(1.Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China; 2. Laboratory of Cancer Cell Biology, Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China)

Abstract Objective: To investigate the characteristics of Girdin expression and its expression in glioma patients with malignancy grade in the prognosis of these patients. **Methods:** Girdin expression was investigated using the SP method in glioma tissues in 100 specimens. Kaplan-Meier survival was constructed to assess Girdin expression and living status. Cox Proportional hazard analysis was used to analyze the factors affecting survival prognosis. **Results:** Protein expression level and pathological grade of glioma were both increased accordingly, patients with high and low protein expressions had a significantly different survival times, where patients with low Girdin expression had higher survival times as compared to patients with high Girdin expression. Cox Proportional Hazard analysis found that Girdin expression, age, pathology grade, and size of glioma were all factors affecting the prognosis of glioma patients. **Conclusion:** Expression of the protein Girdin is positively correlated with pathological grade of gliomas, and patients with high Girdin expression have poorer prognosis, suggesting that Girdin may play a role in tumor genesis and progression of gliomas.

Key words protein Girdin; glioma; immunohistochemistry; prognosis

恶性脑胶质瘤是最常见的原发中枢神经系统恶性肿瘤,恶性程度高、术后易复发、对放疗及化疗药物不敏感、预后差,是神经外科领域的难治性疾病^[1]。恶性脑胶质瘤的发生、发展和浸润过程的分子机制尚未完全揭晓,因此明确其分子机制有利于临床治疗和改善患者预后。研究发现,Girdin 在多种恶性肿瘤组织中表达上调^[2-5],这提示 Girdin 与恶性肿瘤的

发生有密切关系。Girdin 蛋白具有募集并联结、调控细胞内微丝的作用,参与调节细胞生长、迁移以及血管生成及自噬等功能^[6]。我们采用免疫组化 SP 方法观察 100 例脑胶质瘤中 Girdin 的表达,探讨 Girdin 蛋白在脑胶质瘤发生发展中的作用及其与临床病理特征的相关性和预后的关系。

1 资料与方法

1.1 病例资料 选用来自天津医科大学肿瘤医院 2004 年至 2012 年脑胶质瘤组织标本 60 例及天津市环湖医院 2011 年至 2012 年间脑胶质瘤组织标

作者简介 林宪仁(1986—),男,硕士在读,研究方向:神经肿瘤中胶质瘤的基础与临床研究;通信作者:马勇杰,E-mail:yongjiemagu@aliyun.com。

本 40 例,全部病例按世界卫生组织(WHO)2007 年神经系统肿瘤分级标准诊断, I 级 12 例, II 级 35 例, III 级 17 例, IV 级 36 例,其中男 63 例,女 37 例。年龄 9~79 岁,中位年龄 52 岁。所有患者术前均未接受放疗、化疗。随访选用天津医科大学肿瘤医院脑胶质瘤组织标本 60 例,自病理确诊日开始,至 2013 年 9 月截止。

1.2 免疫组织化学法 采用免疫组化(SP)法染色,每例标本经 4 μm 厚连续切片,脱蜡入水,3%过氧化氢 30 min 阻断内源性过氧化物酶,经 EDTA 高压抗原修复 2 min 15 s, 2%正常山羊血清封闭 30 min,加一抗(稀释浓度为 1:60)后 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,生物素标记的二抗孵育 25 min,链霉素亲和素-过氧化物酶孵育 20 min,二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,梯度酒精分化,常规脱水,干燥,封片。Girdin 抗体购自日本 IBL 公司。

1.3 免疫组化结果判断标准 由两位专业病理科医师盲法阅片,对免疫组化检测结果进行评估。采用双盲法统计实验结果,每张切片随机选取 10 个高倍视野($\times 400$),计算每个高倍视野中阳性细胞数占肿瘤细胞总数的百分比,最后计算此 10 个视野阳性细胞的平均百分比。Girdin 阳性主要定位于胞浆,根据染色强度评分:无棕色颗粒为 0 分,黄色为 1 分,

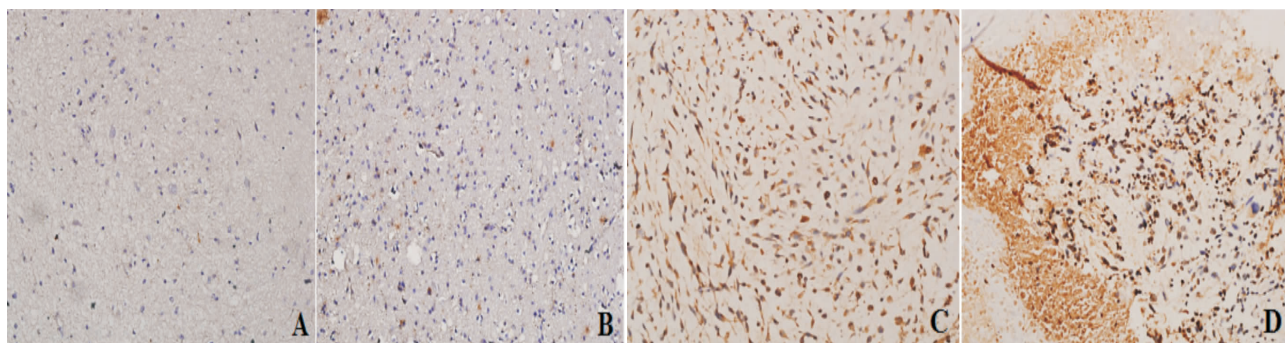
棕色为 2 分,深棕色为 3 分。阳性细胞百分比:1%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,>50%为 3 分。将细胞染色程度计分与阳性百分数计分相乘即为综合评分,积分 0 分为无表达,1~3 分为低表达,4~6 分为中表达,7~9 分为高表达。生存分析:积分 0~3 分为低表达组,4~9 分为高表达组。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件分析,Girdin 与临床病理参数的关系使用方差分析和 Spearman's Rank 等级相关分析。总生存(OS)和无进展生存(PFS)使用 Kaplan-Meier 分析,使用 log-rank 检验。采用多因素 Cox 比例风险分析患者的生存预后,并用危险比(HR)和 95%可信区间(CI)表示。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Girdin 蛋白在不同级别脑胶质瘤组织的表达

Girdin 主要表达在胞浆中(图 1)。在不同级别的脑胶质瘤组织中 Girdin 表达的程度不同, I 级脑胶质瘤 Girdin 的表达强度最低,阳性细胞数最少(图 1A),胞浆着色浅; II 级脑胶质瘤 Girdin 表达较 I 级强,胞浆有较深的着色(图 1B); III 级脑胶质瘤中 Girdin 表达强度高于 I 级和 II 级,胞浆着色深(图 1C); IV 级脑胶质瘤中 Girdin 表达强度最高,胞浆深染(图 1D)。



A: Girdin 在 I 级脑胶质瘤中的表达; B: Girdin 在 II 级脑胶质瘤中的表达; C: Girdin 在 III 级脑胶质瘤中的表达; D: Girdin 在 IV 级脑胶质瘤中的表达

图 1 Girdin 在各级神经胶质瘤组织中的表达(SP, $\times 200$)

Fig 1 Girdin expression demonstrated in glioma tissues (SP, $\times 200$)

2.2 100 例病例中 Girdin 蛋白不同级别脑胶质瘤中的表达 I~II 级脑胶质瘤中 Girdin 表达阳性率为 51%(24/47), 低于 III~IV 级脑胶质瘤的表达阳性率 71.7%(40/53), Girdin 在脑胶质瘤各级别中的表达强度差异具有统计学意义($P=0.041$), Girdin 蛋白的表达与性别无显著的相关性,差异无统计学意义($P>0.05$)(表 1)。

2.3 随访数据完整的 60 例 Girdin 蛋白在不同级别脑胶质瘤中的表达 在 I~II 级脑胶质瘤中 Girdin

表达阳性率为 39.3%(11/28) 低于 III~IV 级脑胶质瘤的表达阳性率 78.1%(25/32), Girdin 在脑胶质瘤各级别中的表达强度差异具有统计学意义($P=0.006$)。Girdin 蛋白的表达在不同年龄组、性别、病理类型、肿瘤定位之间的差异无统计学意义($P>0.05$), 而与肿瘤大小的差异具有统计学意义($P=0.024$)(表 2)。

2.4 60 例脑胶质瘤患者 Girdin 蛋白的表达与生存时间的关系 Kaplan-Meier 法分析表明,在 60 例脑胶质瘤患者中, Girdin 低表达组的患者中位总生存

表 1 100 例脑胶质瘤病例中 Girdin 表达和病理参数的关系(*n*)

Tab 1 Girdin expression and pathological parameters in 100 cases of glioma patients(*n*)

病理特征	<i>n</i>	Girdin				<i>r_s</i>	<i>P</i>
		无表达	低表达	中表达	高表达		
性别						0.000	0.997*
男	63	22	26	12	3		
女	37	14	13	9	1		
病理学分级						0.204	0.041*
I 级	12	3	8	1	0		
II 级	35	20	9	5	1		
III 级	17	5	7	3	2		
IV 级	36	8	15	12	1		

**P* 值通过 Spearman's rank 等级相关分析获得

表 2 随访 60 例脑胶质瘤病例中 Girdin 表达和病理参数的关系(*n*)

Tab 2 Complete follow up of 60 glioma cases to show the relationship between pathological parameters and Girdin expression (*n*)

病理特征	<i>n</i>	Girdin				<i>r_s</i>	<i>P</i>
		无表达	低表达	中表达	高表达		
年龄 [#]	60						0.573
肿瘤大小 [♀]	60						0.024
性别						0.009	0.947*
男	49	20	16	12	1		
女	11	4	2	5	0		
病理学分级						0.348	0.006*
I~II 级	28	17	8	3	0		
III~IV 级	32	7	10	14	1		
病理类型						0.045	0.733*
星形胶质细胞瘤	40	16	14	9	1		
少突胶质细胞瘤	7	3	2	2	0		
少突星形细胞瘤	13	5	2	6	0		
肿瘤定位						-0.202	0.121*
额叶	20	7	3	9	1		
颞叶	18	6	8	4	0		
顶叶	2	0	2	0	0		
枕叶	2	2	1	0	0		
小脑	2	1	1	0	0		
多个脑叶	15	8	3	4	0		

**P* 值通过 Spearman's rank 等级相关分析获得。[#]年龄:52(9~79)岁, $F=0.671$, $P=0.573$ (方差分析)。[♀]肿瘤大小:(4.77 ± 1.76) cm, $F=3.380$, $P=0.024$ (方差分析)

时间为 60 个月,明显长于 Girdin 高表达组患者的平均总生存时间(20 个月),差异具有统计学意义($P=0.040$,图 2)。Girdin 低表达组和高表达组的中位无进展生存时间分别为 48 个月和 26 个月,Girdin 低表达组的患者无进展生存明显长于高表达组,差异具有统计学意义($P=0.038$,图 3)。在多因素分析中,Girdin、病理学分级、肿瘤大小、年龄为影响患者总生存和无进展生存的独立预后因素(表 3)。

表 3 胶质瘤患者 Cox 多因素生存分析

Tab 3 Multivariate analyses for glioma patient survival

变量	总生存			无进展生存		
	HR	95%CI	<i>P</i>	HR	95%CI	<i>P</i>
病理学分级	3.453	1.376-8.665	0.008	3.113	1.369-7.081	0.007
I~II						
III~IV						
年龄	1.033	1.002-1.065	0.037	1.034	1.004-1.065	0.028
肿瘤大小/cm	0.765	0.606-0.966	0.024	0.818	0.676-0.990	0.040
性别	1.259	0.525-3.019	0.605	1.227	0.560-2.691	0.690
男						
女						
手术	0.288	0.074-1.117	0.072	0.299	0.074-1.207	0.090
部分切除						
全部切除						
病理类型	1.091	0.307-3.871	0.893	0.301	0.067-1.349	0.117
肿瘤定位	0.976	0.836-1.202	0.976	0.956	0.805-1.136	0.611
Girdin 评分	3.886	1.528-9.881	0.004	3.113	1.369-7.081	0.007
0~3						
4~9						

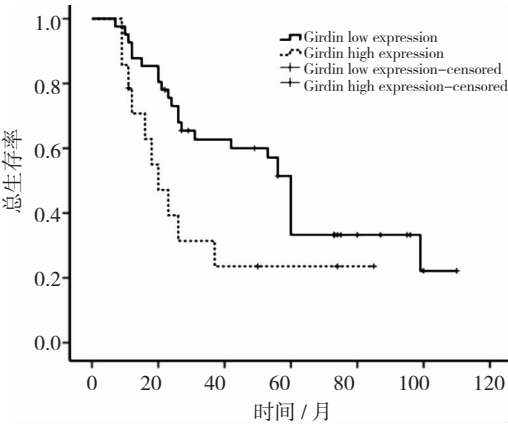


图 2 Girdin 低表达组与高表达组的总生存曲线

Fig 2 OS curve of low Girdin expression group and high Girdin expression group

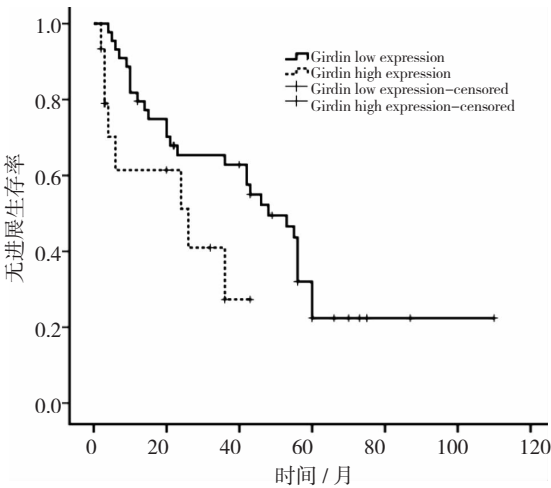


图 3 Girdin 低表达组与高表达组的无进展生存曲线

Fig 3 PFS curve of low Girdin expression group and high Girdin expression group

3 讨论

Girdin 是一种大分子肌动蛋白结合蛋白, 该蛋白具有调节肿瘤细胞的生长与凋亡^[7-10], 促进肿瘤细胞侵袭与转移以及促进肿瘤血管生成的作用^[8-11]。近年来有研究发现, Girdin 在许多人类恶性肿瘤细胞中呈现高表达, 包含乳腺癌、结直肠癌^[11-14]、消化道癌^[15]等, 在肿瘤的进展与转移中起着十分重要的作用, 并且与有些肿瘤细胞的分化程度及生存预后密切相关。Garcia-Marcos 等^[12]通过研究 Girdin 在多种肿瘤中的表达及作用机制, 发现 Girdin 特异性高表达主要在侵袭性强的肿瘤细胞中, 促进肿瘤细胞的远处转移能力, 以此证明 Girdin 与肿瘤转移有相关性。Girdin 的表达也与结直肠癌病患的生存预后相关。有研究说明 Girdin 可调节肌动蛋白细胞骨架的重组, 从而促使脑胶质瘤细胞侵袭与迁移^[16], 提示 Girdin 在脑胶质瘤的发展过程中起着重要作用。此外, Girdin 在调控恶性脑胶质瘤细胞增殖和凋亡的过程中也具有重要的作用。Natsume 等^[17]通过基因敲除实验研究发现, Girdin 在脑胶质母细胞瘤表达缺失时干细胞分化能力增强, 且细胞运动、侵袭与转移等能力受到抑制, 说明肿瘤干细胞侵袭与转移能力需 Girdin 的维持, 提示 Girdin 在促使脑胶质瘤的侵袭、转移、发生与发展中具有重要意义。

我们通过免疫组化 SP 方法观察 Girdin 在各级别脑胶质瘤中均有表达。本研究结果显示, 在脑胶质瘤中 Girdin 的表达强度从 I 级到 IV 级总体呈现升高的趋势, 即随着脑胶质瘤的恶性程度级别增高而表达强度逐渐增强, 在恶性程度最高的 IV 级脑胶质瘤中 Girdin 表达显著高于其他级别, 提示 Girdin 在脑胶质瘤的恶性发展中起关键作用, Girdin 可能作为反映恶性脑胶质瘤程度的一个重要分子标志物。恶性脑胶质瘤的侵袭性生长是导致其预后差的首要因素, 本研究结果表明, Girdin 低表达组的脑胶质瘤患者生存期显著长于高表达组的患者。Cox 比例风险模型分析提示 Girdin、病理学分级、年龄及肿瘤大小是脑胶质瘤患者预后影响因素。Girdin 表达强度越强、年龄越大、病理级别越高及肿瘤越大患者预后越差, 进一步验证了前期的研究结论。

综上所述, Girdin 蛋白主要表达在脑胶质瘤胞浆中, Girdin 的表达与脑胶质瘤病理级别及大小相关, 且影响患者预后; 多因素生存分析表明 Girdin、病理学分级、年龄及肿瘤大小为脑胶质瘤患者判断预后的指标, 提示 Girdin 在促进脑胶质瘤侵袭、转移

等分子生物学过程中起到了一定的作用。

参考文献:

- [1] Zhao S, Tsuchida T, Kawakami K, et al. Effect of As₂O₃ on cell cycle progression and cyclins D1 and B1 expression in two glioblastoma cell lines differing in p53 status[J]. *Int J Oncol*, 2002, 21(1):49
- [2] Jiang P, Enomoto A, Jijiwa M, et al. An actin-binding protein Girdin regulates the motility of breast Cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(5):1310
- [3] Jun B Y, Kim S W, Jung C K, et al. Expression of girdin in human colorectal Cancer and its association with tumor progression[J]. *Dis Colon Rectum*, 2013, 56(1):51
- [4] Xu Y, Fu L, Gu F, et al. Expression and significance of phosphorylated Girdin in breast Cancer[J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2012, 34(3):205
- [5] Enomoto A, Murakami H, Asai N, et al. Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE[J]. *Dev Cell*, 2005, 9(3):389
- [6] Dunkel Y, Ong A, Notani D, et al. STAT3 protein up-regulates Gα-interacting vesicle-associated protein (GIV)/Girdin expression, and GIV enhances STAT3 activation in a positive feedback loop during wound healing and tumor invasion/metastasis[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(50):41667
- [7] Woodgett J R. Recent advances in the protein kinase B signaling path[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17(2):150
- [8] Vivanco I, Sawyers C L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(7):489
- [9] Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization[J]. *Cancer Sci*, 2005, 96(7):379
- [10] Kitamura T, Asai N, Enomoto A, et al. Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(3):329
- [11] Liu C, Zhang Y, Xu H, et al. Girdin protein: a new potential distant metastasis predictor of breast cancer[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(3):1554
- [12] Garcia-Marcos M, Jung B H, Ear J, et al. Expression of GIV/girdin, a metastasis-related protein, predicts patient survival in colon cancer[J]. *FASEB J*, 2011, 25(2):590
- [13] Ghosh P, Garcia-Marcos M, Bornheimer S J, et al. Activation of galphai3 triggers cell migration via regulation of GIV[J]. *J Cell Biol*, 2008, 182(2):381
- [14] Ling Y, Jiang P, Cui S P, et al. Clinical implications for girdin protein expression in breast cancer[J]. *Cancer Invest*, 2011, 29(6):405
- [15] 陈秀华, 林洁, 李璐蓉, 等. 消化系统肿瘤中 Girdin 基因的表达分析[J]. *医学信息:下旬刊*, 2013, 26(12):97
- [16] Zhang B, Gu F, She C, et al. Reduction of Akt2 inhibits migration and invasion of glioma cells[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(3):585
- [17] Natsume A, Kato T, Kinjo S, et al. Girdin maintains the stemness of glioblastoma stem cells[J]. *Oncogene*, 2012, 31(22):2715

(2015-01-07 收稿)