

CUX-1 和 XRCC3 在胶质瘤中的表达及其与预后的关系

赵宗清^{1,2}, 赵志明^{1,2}, 陈海欣^{1,2}, 冯帆², 衡雪源²

1. 潍坊医学院, 山东 潍坊 261041

2. 临沂市人民医院神经外科, 山东 临沂 276000

摘要:目的 探讨同源框 CUT 样蛋白 1 (CUX-1) 及 X 射线交错互补修复基因 3 (XRCC3) 在组织中的表达水平, 及与胶质瘤患者病理指标及预后的关系。方法 采用免疫组织化学染色及蛋白质印迹法检测 66 例胶质瘤组织以及 10 例正常脑组织 CUX-1 及 XRCC3 的表达水平, 分析它们之间的关系及其与患者临床病理指标和预后的关系。结果 CUX-1 和 XRCC3 表达水平随肿瘤 WHO 分级的升高而上调 ($P < 0.01$), 且两者的表达与胶质瘤 WHO 分级及增殖指标 Ki67、P53mut 相关 ($P < 0.01$)。CUX-1 与 XRCC3 之间的表达呈正相关 ($r_s = 0.773, P = 0.006$)。Kaplan-Meier 生存曲线表明 CUX-1 及 XRCC3 高表达患者生存时间缩短 ($P < 0.05$)。结论 CUX-1 及 XRCC3 两者之间的表达呈正相关, 并在胶质瘤中表达上调, 且与不良预后相关。

关键词: 神经胶质瘤; CUX-1; XRCC3; 临床病理; 预后

中图分类号: R739.41

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2020.05.001

Expression of homeobox protein cut-like 1 and X-ray repair cross-complementing group 3 in glioma and its association with prognosis

ZHAO Zong-Qing^{1,2}, ZHAO Zhi-Ming^{1,2}, CHEN Hai-Xin^{1,2}, FENG Fan², HENG Xue-Yuan². 1. Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261041, China; 2. Department of Neurosurgery, Linyi People's Hospital, Linyi, Shandong 276000, China

Corresponding author: HENG Xue-Yuan, Email: hengxuey001@163.com

Abstract: Objective To investigate the expression levels of homeobox protein cut-like 1 (CUX-1) and X-ray repair cross-complementing group 3 (XRCC3) in glioma and their association with clinicopathological parameters and prognosis. **Methods** Immunohistochemistry and Western blotting were used to measure the expression levels of CUX-1 and XRCC3 in 66 glioma tissue samples and 10 normal brain tissue samples, and their association with clinicopathological parameters and prognosis was analyzed. **Results** The expression levels of CUX-1 and XRCC3 increased with the increase in glioma WHO grade ($P < 0.01$) and were correlated with glioma WHO grade and the proliferation indices Ki67 and P53mut ($P < 0.01$). The expression of CUX-1 was positively correlated with that of XRCC3 ($r_s = 0.773, P = 0.006$). The Kaplan-Meier survival curve analysis showed that patients with high expression of CUX-1 and XRCC3 had a significantly shortened overall survival time than those with low expression ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression of CUX-1 is positively correlated with that of XRCC3, and both of them are upregulated in glioma, which is associated with poor prognosis.

Key words: glioma; homeobox protein cut-like 1; X-ray repair cross-complementing group 3; clinicopathology; prognosis

胶质瘤是常见的颅内原发恶性肿瘤之一, 约占成人颅内肿瘤的 46.6%, 且具有高侵袭特性^[1-2]。胶质瘤患者尤其是胶质母细胞瘤 (GBM, 按 WHO 中胶质瘤的分级标准 IV 级) 患者的中位生存期仅为 14.6 个月^[3-4]。转录调节因子 CUX-1 为同

源异型盒 (homeobox) 家族成员之一^[5-6]。已有文献证明 CUX-1 通过调节纺锤体装配检测点在 DNA 复制过程中发挥了重要的调控作用, 同时其还参与了细胞在应激条件下发生的 DNA 损伤修复过程^[7]。XRCC3 作为同源重组修复基因 RAD51 类似物, 已

收稿日期: 2020-07-10; 修回日期: 2020-08-25

通信作者: 衡雪源, Email: hengxuey001@163.com。

有体内实验证明其介导的同源重组修复(HHR)过程在修复放疗诱导的肿瘤细胞DNA双链损伤(DS-Bs)中至关重要^[8,9]。然而,目前关于CUX-1与XRCC3在胶质瘤增殖方面的作用并无相关报道,鉴于CUX-1与XRCC3所介导相似的DNA损伤修复功能,笔者推测两者在胶质瘤的发生及增殖方面发挥了协同作用。故本研究检测不同级别胶质瘤标本中CUX-1与XRCC3的表达情况及其与患者病理指标及预后的关系。

1 资料和方法

1.1 一般资料

随机收取2014年6月—2016年12月临沂市人民医院神经外科接受外科手术切除的66例胶质瘤组织标本(病理检查确诊)为实验组。10例正常脑组织标本由颅脑外伤患者额叶减压手术中获取的,设为对照组。纳入的样本随访资料完整。标本切片由2名病理诊断师按照《中国中枢神经系统胶质瘤诊断与治疗指南2015版》^[10]标准进行再次确诊。研究获得患者与其家属知情同意,已签署知情同意书。本研究得到了我院医学伦理委员会的批准。

1.2 Western-blotting检测CUX-1和XRCC3含量

取实验组及对照组组织匀浆后提取总蛋白,使用二喹啉甲酸(BCA)法测定其蛋白浓度。常规电泳,转膜,封闭后加入CUX-1一抗抗体(1:2000;武汉三鹰公司)。4℃静置过夜。洗膜,辣根酶标二抗(1:2500;美国Cell signaling公司)置室温1h,PBST洗膜3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。XRCC3实验步骤同CUX-1,XRCC3一抗抗体(1:2000;武汉三鹰公司)。分别以CUX-1/XRCC3与GAPDH的比值作为该标本的相对表达量。

1.3 免疫组织化学(以下简称免疫组化)检测CUX-1、XRCC3、P53、Ki67的相对表达量

我们对实验组及对照组标本分别进行CUX-1、XRCC3、P53、Ki67免疫组化染色。将实验组及对照组组织石蜡包埋,切片(4 μm),70℃烘干45 min,常规水化后,进行抗原修复。滴加过氧化物酶阻断剂(中国中杉金桥公司),PBS冲洗,5%正常山羊血清静置10 min,一抗(CUX-1,1:400,美国Abcam公司;XRCC3,1:400,美国Cellsignaling公

司;P53、Ki67,1:500,中国中杉金桥公司),4℃孵育过夜后PBS冲洗,滴二抗(1:2500,美国Affinity公司)1h。加入新鲜配制DAB进行显色。苏木素染色20 s,盐酸分化后冲洗,氨水返蓝,依次使用酒精梯度脱水,透明标本后进行封片处理。设立阴性对照组,使用同等剂量的PBS替代一抗进行实验,实验步骤同上。免疫组化分析和评分由2名病理诊断师独立完成,以细胞质和/或细胞核中呈现棕黄色颗粒物作为诊断标准。最终分数由染色强度(+ ~ +++)及阳性细胞数(0% ~ 100%)综合评定。结合国际期刊相关文献引用的评分方法^[5],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/XRCC3表达组,而评分>4分作为高CUX-1/XRCC3表达组。

1.4 随访

采用电话及门诊复查等方式进行随访,随访截止时间2019年6月30日。总生存期(overall survival, OS)为手术时间至最后随访日或死亡时间,以月份为单位计算。

1.5 统计学方法

数据采用SPSS 19.0及GraphPad Prism 7软件分析。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用 t 检验;计数资料采用例(%)表示,比较采用 χ^2 检验或秩和检验;采用Kaplan-Meier法评估生存率,组间生存率曲线分布检验采用Log-Rank法。相关性检验采用Spearman等级进行相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CUX-1与XRCC3在胶质瘤组织中的表达情况

分析免疫组织化学染色结果,发现CUX1及XRCC3在实验组标本表达存在差异,在高级别胶质瘤(WHO III、IV)组中的表达高于低级别胶质瘤(WHO I、II)组,且在对照组中CUX-1及XRCC3阳性细胞数最少(图1A、B)。Western-blotting检测结果,进一步验证了免疫组化结果(图1C、D)。CUX-1高表达占正常脑组织样本的10.0%,XRCC3高表达占20.0%;CUX-1高表达占低级别胶质瘤组(WHO I、II)样本的33.3%,XRCC3高表达占27.2%;而CUX-1高表达占高级别胶质瘤组(WHO III、IV)样本的63.6%,XRCC3高表达占

75.8%。高级别胶质瘤组中 CUX-1 与 XRCC3 的表达高于低级别胶质瘤组及正常脑组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

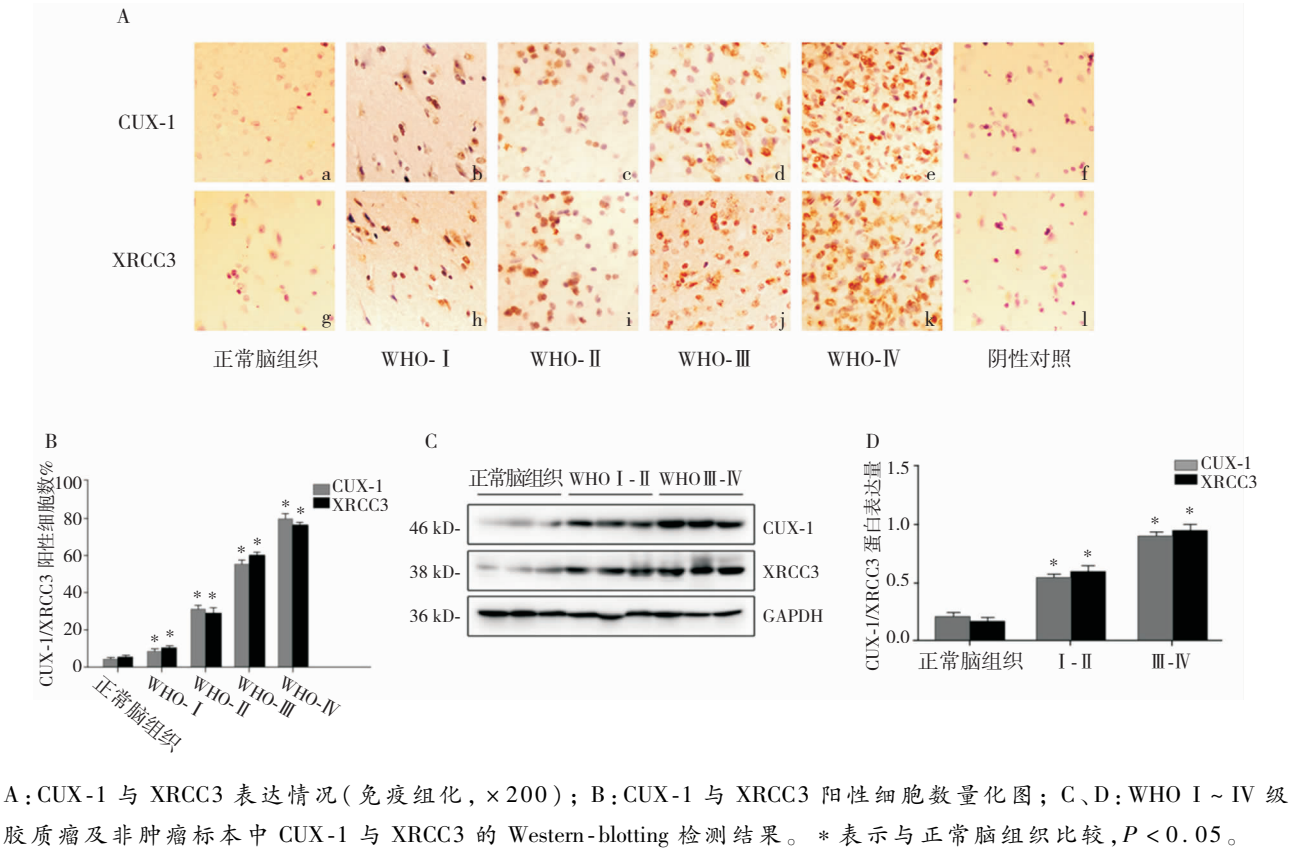


图 1 CUX-1 与 XRCC3 在不同级别胶质瘤组织中的表达情况

表 1 CUX-1 与 XRCC3 在对照组及不同级别胶质瘤中的表达 例

组别	例数	CUX1 表达			Z/P 值	XRCC3 表达			Z/P 值
		阴性	低表达	高表达		阴性	低表达	高表达	
对照组	10	4	5	1	30.814/0.001	3	5	2	34.894/0.001
低级别胶质瘤组 (Grade I、II)	33	5	17	11		5	19	9	
高级别胶质瘤组 (Grade III、IV)	33	6	6	21		2	6	25	

2.2 CUX-1 与 XRCC3 与临床病理参数的相关性分析

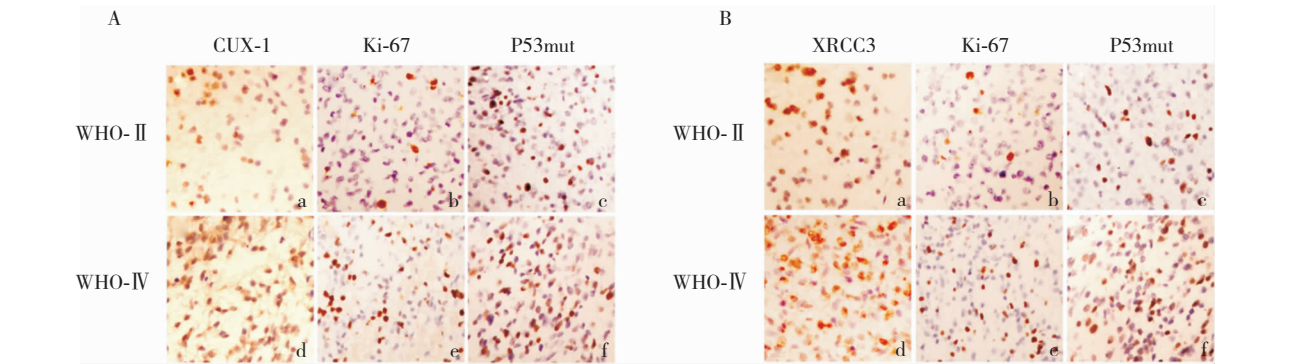
高表达的 CUX-1 及 XRCC3 均与胶质瘤 WHO 分

级、肿瘤增殖指标 Ki67 及 P53mut 相关($P < 0.01$) , 而与患者年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤位置及 KPS 评分之间均无相关($P > 0.05$)。见表 2,图 2。

表2 CUX-1 与 XRCC3 水平与临床病理指标的相关性分析 例

临床病理指标	CUX1 表达			χ^2/P 值	XRCC3 表达			χ^2/P 值
	例数	低表达	高表达		例数	低表达	高表达	
性别				1.460/0.227				0.095/0.758
男	34	22	12		35	16	19	
女	32	16	16		31	13	18	
年龄				0.203/0.652				0.790/0.374
<44 岁	35	20	15		30	17	13	
≥44 岁	31	16	15		33	15	18	
肿瘤直径				0.088/0.767				0.335/0.563
<4 cm	16	9	7		19	11	8	
≥4 cm	50	26	24		47	21	26	
肿瘤位置				0.708/0.702				0.076/0.963
额叶	30	19	11		31	15	16	
颞叶	22	11	11		28	13	15	
其他	14	5	9		7	3	4	
KPS				2.184/0.139				3.229/0.072
<80 分	33	13	20		30	12	18	
≥80 分	33	19	14		36	23	13	
WHO 分级				7.279/0.007				12.737/0.001
WHO I、II	33	20	13		28	22	6	
WHO III、IV	33	11	22		38	13	25	
Ki67				11.438/0.001				8.629/0.003
低表达	25	18	7		27	15	12	
高表达	41	12	29		39	8	31	
P53 mut				12.649/0.001				6.873/0.009
高表达	41	23	18		36	27	9	
低表达	25	3	22		30	13	17	

KPS:功能状态评分,Ki67/P53mut:胶质瘤增殖指标



A: CUX-1 和增殖指标 Ki67、P53mut 在低级别胶质瘤 (a ~ c) 及高级别胶质瘤中 (d ~ f) 的表达 (×200); B: XRCC3、增殖指标 Ki67、P53mut 在低级别胶质瘤 (a ~ c) 及高级别胶质瘤中 (d ~ f) 的表达 (×200)。

图2 CUX-1、XRCC3 与增殖指标 Ki67、P53mut 的表达

2.3 CUX-1 与 XRCC3 在胶质瘤中表达的相关性

胶质瘤组织中 CUX-1 与 XRCC3 蛋白表达呈正相关 ($r_s = 0.773, P = 0.002$)。见图 3。

2.4 CUX-1 与 XRCC3 与胶质瘤患者预后的关系

XRCC3 高表达组患者生存时间短于低表达组 ($\text{Log Rank } \chi^2 = 7.005, P = 0.008$)；CUX-1 高表达组患者生存时间短于低表达组 ($\text{Log Rank } \chi^2 = 4.981, P = 0.026$)。见图 4。

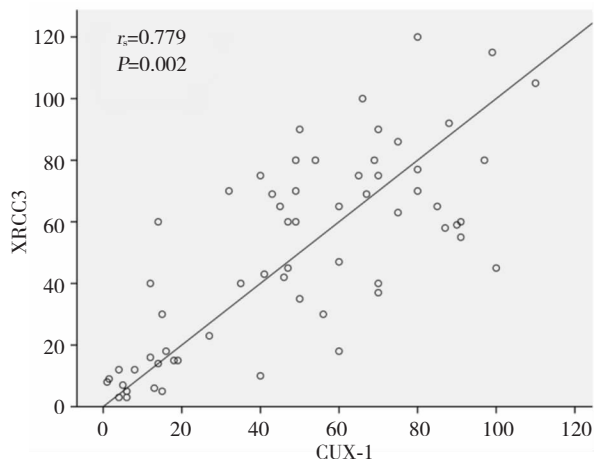
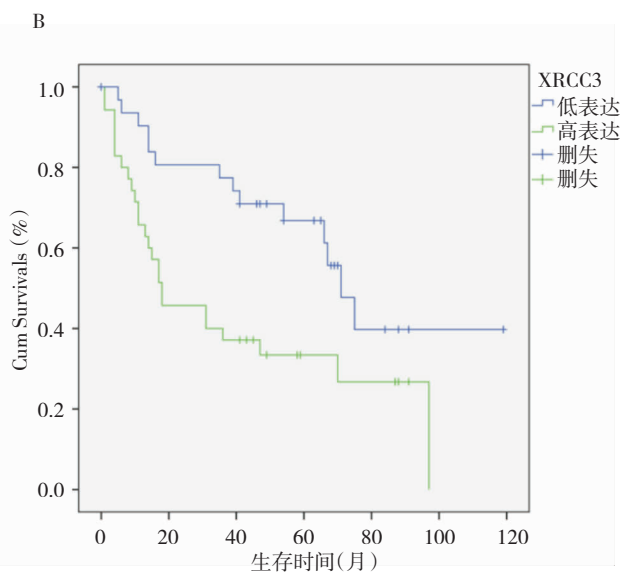
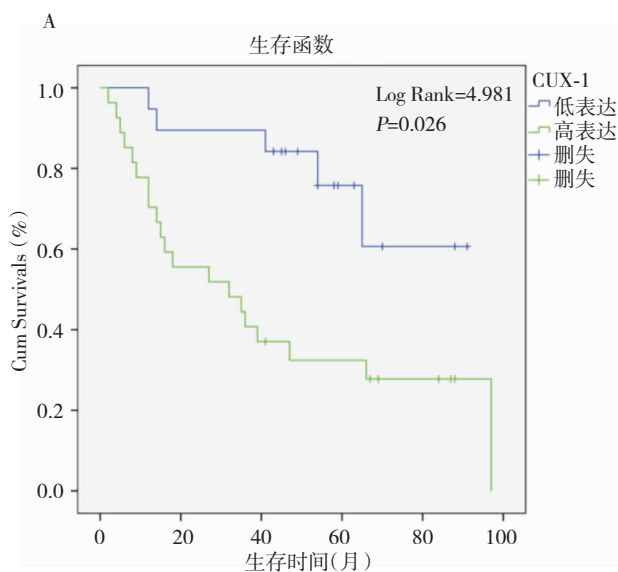


图 3 XRCC3 与 CUX-1 的相关性



A CUX-1; B XRCC3。

图 4 Kaplan-Meier 生存曲线分析

化细胞的增殖^[14]。另外,CUX-1 可在 RNA、蛋白质和启动子水平上转录上调 WNT5A,后者增强了胰腺癌细胞增殖和迁移的能力^[15]。笔者推测 CUX1 在胶质瘤中的高表达,提示其可能在胶质瘤细胞增殖过程中发挥重要的作用。另一方面,目前关于 XRCC3 的研究主要集中在其 DNA 损伤修复功能方面,Loignon 等的研究表明在乳腺癌 MCF7 细胞系中,XRCC3 敲低可积累 DNA 损伤,最终发生 P53 依赖的细胞死亡,同时其团队也发现 XRCC3 与 MCF7 乳腺癌细胞的增殖密切相关^[16]。因此,笔者推测 CUX-1 与 XRCC3 可通过 DNA 损伤修复途径参与胶质瘤的发生与发展。

已有文献证明 CUX-1 在多种肿瘤中可作为侵

3 讨论

胶质瘤是神经系统内最常见的恶性肿瘤,手术后的替莫唑胺(TMZ)辅助化疗已成为胶质母细胞瘤的标准治疗方案,但新确诊的 GBM 患者中位生存期仅 14.6 个月^[11]。如何鉴别高级别胶质瘤对不同化疗药物的反应性已成为胶质瘤治疗的研究热点。更加完善的分子标志物诊断标准对个体化治疗的选择及患者临床预后的判断具有重要价值^[10]。CUX1 属于同源域转录因子家族。CUX1 位于 7q22 区域,主要在成人的中枢神经系统(CNS)中表达^[12-13],研究表明,高表达的 CUX-1 通过直接刺激 OGG1 DNA 糖基化酶的活性增加了 DNA 损伤修复能力,并且在氧化应激条件下仍然可以促进 RAS 转

袭、增殖的生物标志物,如导管型胰腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、直肠及结肠肿瘤等^[17-18]。另外,关于 XRCC3 单核苷酸多态性 Meta 分析也表明 XRCC3 高表达可上调甲状腺癌、大肠癌的发病风险^[19-20]。XRCC3 基因的多态性可能与急性淋巴系白血病发病密切相关^[21]。目前 CUX-1 与 XRCC3 在胶质瘤增殖方面暂无相关报道。本研究发现 CUX-1 与 XRCC3 胶质瘤中的表达上调,且 CUX-1 与 XRCC3 表达均随 WHO 分级升高而上调。CUX-1 与 XRCC3 均与增殖性病理指标 Ki67、P53mut 相关($P < 0.01$),表明其可能参与了胶质瘤细胞的增殖。此外,还发现 CUX-1 与 XRCC3 在胶质瘤中的表达存在正相关,表明两者在胶质瘤增殖过程中可能存在

直接或间接的协同作用。最后, Kaplan-Meier 生存曲线表明 CUX-1 高表达组及 XRCC3 高表达组的患者生存时间缩短。

因此, 笔者认为 CUX-1 与 XRCC3 在胶质瘤中的表达与患者预后呈负相关, 且在胶质瘤增殖过程中可能存在协同作用, CUX-1 与 XRCC3 之间具体的调节机制有待于在下一步体内实验中进一步验证。CUX-1 及 XRCC3 可作为潜在的胶质瘤预后标志物。

参 考 文 献

- [1] 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(suppl_5): v1-v75.
- [2] Xu K, Pei H, Zhang Z, et al. FoxO3a mediates glioma cell invasion by regulating MMP9 expression [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(5): 3044-3050.
- [3] 杨学军, 江涛. 解读《世界卫生组织中枢神经系统肿瘤分类(2016年)》[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2016, 42(6): 321-329.
- [4] Su C, Li H, Gao W. GLUT5 increases fructose utilization and promotes tumor progression in glioma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(2): 462-469.
- [5] Kaur S, Ramdhan 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.
- [6] Sansregret L, Vadnais C, Livingstone J, et al. Cut homeobox 1 causes chromosomal instability by promoting bipolar division after cytokinesis failure [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(5): 1949-1954.
- [7] Ramdhan ZM, Vadnais C, Pal R, et al. RAS transformation requires CUX1-dependent repair of oxidative DNA damage [J]. *PLoS Biol*, 2014, 12(3): e1001807.
- [8] Takata M, Sasaki MS, Tachiiri S, et al. Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(8): 2858-2866.
- [9] Pierce AJ, Johnson RD, Thompson LH, et al. XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(20): 2633-2638.
- [10] 《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与治疗指南(2015) [J]. *中华医学杂志*, 2016, 96(7): 485-509.
- [11] Hao Z, Hu S, Liu Z, et al. Circular RNAs: functions and prospects in glioma [J]. *J Mol Neurosci*, 2019, 67(1): 72-81.
- [12] Diodato A, Ruinart de Brimont M, Yim YS, et al. Molecular signatures of neural connectivity in the olfactory cortex [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12238.
- [13] 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.
- [14] Ramdhan ZM, Pal R, Kaur S, et al. The function of CUX1 in oxidative DNA damage repair is needed to prevent premature senescence of mouse embryo fibroblasts [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(6): 3613-3626.
- [15] Ripka S, Riedel J, Neesse A, et al. Glutamate receptor GRIA3—target of CUX1 and mediator of tumor progression in pancreatic cancer [J]. *Neoplasia*, 2010, 12(8): 659-667.
- [16] Loignon M, Amrein L, Dunn M, et al. XRCC3 depletion induces spontaneous DNA breaks and p53-dependent cell death [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(5): 606-611.
- [17] Dianov GL, Hübscher U. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(6): 3483-3490.
- [18] Cancer Genome Atlas Network, et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer [J]. *Nature*, 2012, 487(7407): 330-337.
- [19] Lu W, Wu G, Zhang B. Association between X-Ray cross-complementing group 3 (XRCC3) Thr241Met polymorphism and risk of thyroid cancer: a meta-analysis [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 3978-3985.
- [20] Namazi A, Abedinzadeh M, Nourbaksh P, et al. Association between the XRCC3 Thr241Met polymorphism and risk of colorectal cancer: a meta analysis of 5,193 cases and 6,645 controls [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(6): 2263-2268.
- [21] Pei JS, Chang WS, Hsu PC, et al. The contribution of XRCC3 genotypes to childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 5677-5684.