

文章编号:1003-2754(2024)02-0148-04

doi:10.19845/j.cnki.zfysjbbzz.2024.0028

CYB561D2 基因在神经胶质瘤组织中的表达及临床意义

黄 纯¹, 周和平¹, 查正江¹, 朱克帅¹, 宣兰兰², 刘雅玲²

摘要: **目的** 基于生物信息学分析,检测 CYB561D2 基因对于神经胶质瘤的患者的预后评估和意义。**方法** 选取 2018 年 10 月—2022 年 12 月安庆市立医院神经外科接受手术治疗的神经胶质瘤患者的手术病理标本,共 78 例进行研究。手术路径过程中必须切除的正常脑组织作为对照组,共 32 例。采用荧光实时定量 PCR 和免疫组化分别对实验组与对照组的 CYB561D2 基因 mRNA 和蛋白浓度进行检测。**结果** 实验组患者的肿瘤组织中 CYB561D2 基因的表达程度均较高,肿瘤组织病理级别越高,具有越显著的表达,而对照组中并无明显的 CYB561D2 基因 mRNA ($\chi^2=2.75$) 和蛋白表达 ($\chi^2=2.19$), $P<0.05$,有统计学差异。**结论** 神经胶质瘤中 CYB561D2 基因 mRNA 和蛋白表达明显增高,提示 CYB561D2 与神经胶质瘤的发生、发展及恶性程度有一定相关。

关键词: 神经胶质瘤; CYB561D2 基因; 手术切除; 实时定量 PCR

中图分类号: R739.4 **文献标识码:** A

Expression of the CYB561D2 gene in glioma tissue and its clinical significance HUANG Chun, ZHOU Heping, ZHA Zhengjiang, et al. (Department of Neurosurgery, Anqing municipal Hospital, Anqing 246003, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression and significance of the CYB561D2 gene in the prognostic evaluation of patients with glioma based on bioinformatics analysis. **Methods** A total of 78 pathological specimens were collected from the patients with glioma who received surgical treatment in Department of Neurosurgery, Anqing Municipal Hospital, from October 2018 to December 2022 and were enrolled as experimental group, and 32 specimens of normal brain tissue that must be removed during the surgical pathway were enrolled as control group. Quantitative real-time PCR and immunohistochemistry were used to measure the mRNA and protein expression levels of the CYB561D2 gene in both groups. **Results** The CYB561D2 gene was highly expressed in the glioma tissue of the patients in the experimental group, and the pathological grade of the tumor increased with the increase in the expression of the CYB561D2 gene, while there were no significant mRNA and protein expression levels of the CYB561D2 gene in the control group, with significant differences between the two groups ($\chi^2=2.75$ and 2.19 , $P<0.05$). **Conclusion** There are significant increases in the mRNA and protein expression levels of the CYB561D2 gene in glioma, suggesting that CYB561D2 is associated with the development, progression, and malignancy of glioma.

Key words: Glioma; CYB561D2 gene; Surgical resection; Quantitative real-time PCR

神经胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤,具体的发病机制仍不清楚,预后不佳,尤其高级别恶性胶质瘤^[1,2]。本课题组前期通过对 TCGA、GSE 及 REMBRANDT 3 个基因数据库进行统计学生物信息技术分析,发现细胞色素 B561 家族成员 D2(Cytochrome B561 family member D2, CYB561D2) 基因过表达与胶质瘤生存期可能有一定关系。CYB561D2 是一种重要的编码基因,在人体染色体的 3p. 21. 3 的 630kb 区域,参与体内氧化还原、电子转移、生化代谢,维持抗坏血酸的平衡^[3]。本课题组前期细胞培养实验发现, CYB561D2 基因的过表达可诱导免疫抑制,促进胶质瘤细胞的增殖、迁移^[4]。因此,本研究纳入 2018 年 10 月—2022 年 12 月在安庆市立医院神经外科接受治疗的 78 例神经胶质瘤患者资料,选取手术切除的胶质瘤组织和对应的瘤旁正常脑组织对照分析,寻找胶质瘤细胞凋亡、迁移等基因分析,从分子学角度寻找胶质瘤靶向治

疗新思路,对神经胶质瘤病理组织中的 CYB561D2 基因的表达做进一步探讨和验证。

1 资料与方法

1.1 临床病例及组织标本取材 选取 2018 年 10 月—2022 年 12 月安庆市立医院神经外科接受治疗的 78 例神经胶质瘤患者资料,包括 36 例男性与 42 例女性,年龄均在 28~75 岁范围内,平均年龄为 (41.5±3.6) 岁,所有病例术后病理证实为神经胶质瘤,患者术前均未经任何相关的肿瘤治疗,并进行定期随访。收集神经胶质瘤组织标本 78 例,为实验组。肿瘤手术路径过程中必须切除的正常脑组织标

收稿日期:2023-12-20;修订日期:2024-01-18

基金项目:安徽省重点研究与开发计划(2022e07020052)

作者单位:(1. 安徽省安庆市立医院神经外科,安徽 安庆 246003;

2. 安徽省安庆市立医院病理科,安徽 安庆 246003)

通信作者:周和平, E-mail:zhouhpingaq@126.com

本 32 例,设为对照组。所有肿瘤标本均从肿瘤非坏死区收集,快速冷冻保存于 -80°C 冰箱中。采用荧光实时定量 PCR 实验(Real-time PCR)与免疫组织化学染色(S-P)研究分别检测实验组及对照组中 *CYB561D2* 基因的 mRNA 及蛋白的表达水平。本研究通过医院医学伦理委员会审批。

1.2 免疫组织化学染色 使用 10% 中性福尔马林对组织标本进行固定,并用常规石蜡进行包埋,制备 $4\text{ }\mu\text{m}$ 厚的切片。免疫组织化学采用 S-P 法检测实验组与对照组组织病理中 *CYB561D2* 基因的蛋白表达,用磷酸盐缓冲液(PBS)对一抗进行替代进行阴性对照。兔抗人 *CYB561D2* 多克隆抗体与 S-P 免疫组化试剂盒都产自上海迈克生物科技有限公司,是美国 Abcam 公司产品。将组织切片在 4°C 下与 *CYB561D2* 兔多克隆抗体培养过夜后在室温下进行染色实验;使用二级抗体生物素化牛抗鼠血清 IgG (常州志远生物技术有限公司)在 37°C 下孵育 30 min,再冲洗、复染、脱水、透明及封片。

1.3 免疫组化结果判定 *CYB561D2* 基因在组织中的蛋白表达由 2 名高年资病理医生进行阅片和评分,取平均值。参照半定量积分法,按照阳性反应强弱与阳性细胞占比打分。其中前者按照无色、淡黄、棕黄和棕褐分别对应 0~3 分;着色阳性面积按无着色、着色 0%~30%、30%~60%、60%~100% 分别打 0、1、2、3 分。两项打分之和判断其结果:0 分为(-),1~2 分为(+),3~4 分为(++),5~6 分为(+++)。

1.4 荧光实时定量 PCR(real-time PCR) 将 78 例实验组和 32 例对照组新鲜组织标本进行 RNA 逆转聚合酶链反应实验。运用 Trizol 试剂(Sigma 公司,美国)从提取组织细胞里面的总 RNA,通过琼脂糖凝胶电泳对 RNA 纯度进行鉴定符合纯度要求。使用 TriZol 逆转录试剂盒(Sigma 公司,美国)建立反转录反应体系,逆转录合成 cDNA。在 NCBI GeneBank 中查找胶质瘤相关的 *CYB561D2* 引物信息。通过 Primer v7.0 引物软件完成设计工序。运用美国应用生物系统公司(ABI)的 SYBR Green Master Mix 展开荧光实时定量 PCR 实验对 *CYB561D2* 基因的表达进行评价。

1.5 统计学分析 通过 SPSS 20.0 软件完成数据的分析处理,计量数据执行正态性检验,符合正态性分布的数据用($\bar{x}\pm s$)表示,计数资料采用卡方检验进行两组间比较(必要时辅以精确概率 Fisher 法计算 P 值)并记录 χ^2 值;符合正态分布的计量资料采用 t 检验进行两组间比较,记录 t 值; $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

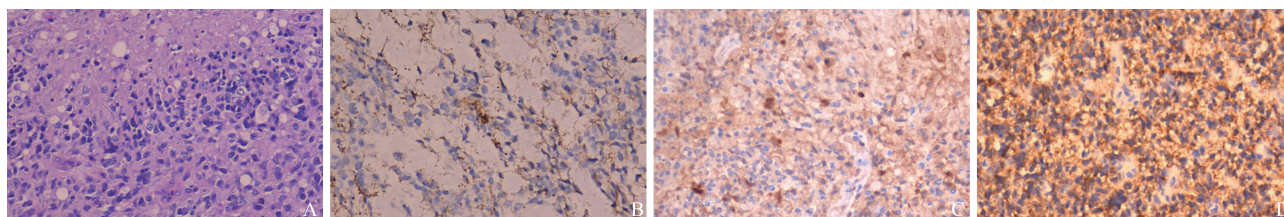
2 结果

2.1 术后常规病理结果 按照 2021 年第 5 版 WHO 中枢神经系统肿瘤分类临床指南对标本病理进行分级统计,其中 12 例为 I 级,15 例为 II 级,19 例为 III 级,32 例为 IV 级。III、IV 级属于高级别胶质瘤,共有 51 例;I 级与 II 级属于低级别胶质瘤,共 27 例。

2.2 胶质瘤组织和肿瘤周围正常脑组织中 *CYB561D2* 蛋白免疫组化的表达情况 *CYB561D2* 在各种类型胶质瘤中都有不同程度的表达,大部分定位于细胞浆内,尤以近核旁区明显,呈棕黄色或棕褐色颗粒,少部分位于胞核内。实验组中,高级别胶质瘤组 *CYB561D2* 蛋白呈高表达,低级别胶质瘤组中 *CYB561D2* 蛋白呈中低表达。对照组瘤旁组织中 *CYB561D2* 蛋白基本不表达。按免疫组化评分,高级别胶质瘤组中 *CYB561D2* 蛋白表达值为(4.86 ± 0.32);低级别胶质瘤组中 *CYB561D2* 蛋白表达值为(2.16 ± 0.13),对照组中 *CYB561D2* 蛋白表达值为(0.53 ± 0.12),各组间有统计学差异($P<0.05$)(见表 1、图 1)。

表 1 实验组、对照组 *CYB561D2* 蛋白免疫组化表达情况

组别	例数	<i>CYB561D2</i> 蛋白表达评分	χ^2 值	P 值
实验组			2.19	0.024
高级别胶质瘤	51	4.86 ± 0.32		
低级别胶质瘤	27	2.16 ± 0.13		
对照组	32	0.53 ± 0.12		



A:高级别胶质瘤 HE 病理染色($\times 200$);B:对照组 *CYB561D2* 免疫组化呈阴性表达($\times 200$);C:实验组低级别胶质瘤 *CYB561D2* 免疫组化呈阳性表达,细胞质内呈淡黄色染色($\times 200$);D:实验组高级别胶质瘤 *CYB561D2* 免疫组化为强阳性,细胞质内为棕黄色染色($\times 200$)。

图 1 不同组织 HE 病理染色结果

2.3 Real-time PCR 检测胶质瘤组织(实验组)与正常脑组织(对照组)中 *CYB561D2* 基因 mRNA 的转录情况 利用 RT-PCR 技术对组织标本里面 *CYB561D2* 基因转录 mRNA 相对表达量进行检测,结果显示各组表达水平不一致,高级别胶质瘤组里面 mRNA 的表达量为(0.736±0.032),低级别胶质瘤组里面 mRNA 的表达量为(0.428±0.045);对照组正常脑组织中基因转录 mRNA 表达量为(0.152±0.028)。差异具有统计学意义($\chi^2=2.75, P<0.05$) (见图2)。

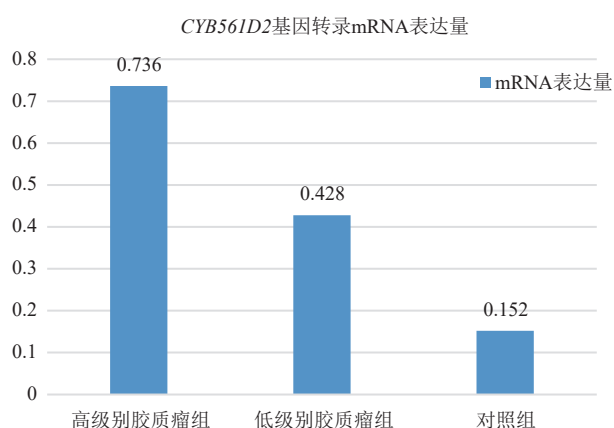


图2 各组组织中 *CYB561D2* 基因 mRNA 的转录水平($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

神经胶质瘤在中枢神经系统的原发性恶性肿瘤中较为多见,详细的发病机制仍不能明确,目前以手术切除联合放疗、化疗方法的临床疗效虽有一定提高,但患者预后仍然不够理想,平均生存时间仅有12~15个月^[5],新版中枢神经系统肿瘤分级标准在组织学特征的基础上增加分子参数,新版肿瘤分类为临床诊疗设定了新标准,分子检测不仅可以明确诊断,还可以进行分子分型、评估患者预后和预测患者肿瘤复发^[6]。因此,需要从分子学角度进行深入研究,研究神经胶质瘤发病的病理生理机制,从而为胶质瘤患者治疗提供新的思路及方法。

CYB561D2 基因是细胞色素 B 在选择性剪切后属于其中一种亚型,在人染色体 3p. 21. 3 的 630kb 区域,其表达蛋白定位于线粒体外膜,是一种分子质量为 28kDa 的疏水蛋白由 6 个 α 跨膜螺旋和 4 个内螺旋构成,这种较小且普遍存在的蛋白质作为电子转移成分广泛地参与了许多不同组织细胞的氧化还原、生长发育及生化代谢等^[3]。研究表明, *CYB561D2* 基因在调控多种肿瘤生长分化、浸润、侵

袭等过程中扮演了较为重要的促进作用^[7-9]。在黑色素瘤中, *CYB561D2* 基因异常表达可促进癌细胞增殖、迁移与侵袭^[10]。对肝细胞癌患者, *CYB561D2* 的表达与其生存期之间存在负相关的关系,可成为判断肝癌预后的评价指标^[11]。对于乳腺癌患者, *CYB561D2* 基因 mRNA 过表达与 ERBB2/HER2 与浸润性 CD4⁺T 细胞存在关联, *CYB561D2* 过度表达患者的总生存率显著降低,死亡风险增加^[12, 13]。

本课题组前期使用统计学生物信息学技术,通过对 TCGA、GSE112 及 REMBRANDT 3 个基因数据库 *CYB561D2* 基因表达与胶质瘤生存期分析发现,基因表达量越高患者肿瘤级别越高,预后越差,整体生存期也较短, *CYB561D2* 基因在胶质瘤发生中扮演着致癌基因的作用。Tao 等研究发现,在神经胶质瘤细胞系中, *CYB561D2* 及其功能产物抗坏血酸盐剂量依赖性激活 STAT3 蛋白磷酸化,并过表达增加了 PD-L1,诱导免疫抑制^[14]。Ruby 等对胶质母细胞瘤细胞系进行测序,发现 *CYB561D2* 多个基因融合,提示 *CYB561D2* 基因可能参与胶质瘤的发生、分化和进展^[15, 16]。

本文研究证实,胶质瘤细胞株敲除 *CYB561D2* 基因的表达,结果表明胶质瘤细胞的克隆和增殖均明显减弱,这符合前期有关的研究结果^[17, 18]。本次实验中,我们利用免疫组化与 RT-PCR 对 *CYB561D2* 基因在神经胶质瘤中的蛋白与 mRNA 表达水平进行检测并分析, *CYB561D2* 在各种类型胶质瘤中都有不同程度的表达,大部分定位于细胞浆内,尤以近核旁区明显,呈棕黄色或棕褐色颗粒,少部分位于胞核内。实验组中,高级别胶质瘤组 *CYB561D2* 蛋白呈高表达,低级别胶质瘤组中 *CYB561D2* 蛋白呈中低表达,对照组瘤旁组织中 *CYB561D2* 蛋白基本不表达。神经胶质瘤中 *CYB561D2* 基因在蛋白和 mRNA 水平都有较高程度的表达,尤其在高级别恶性脑胶质瘤中,与对照组组织中 *CYB561D2* 基因表达相比有统计学差异($P<0.05$)。本研究认为 *CYB561D2* 上调与胶质瘤的分级及恶性程度有一定相关,随着肿瘤级别的升高, *CYB561D2* 表达的上调趋势越明显,进一步证实 *CYB561D2* 基因在胶质瘤形成、发展中有较大的促进作用。

同时本研究利用 RT-PCR 对组织里面 *CYB561D2* 基因转录 mRNA 相对表达量进行检测,结果显示各组表达水平不一致,高级别胶质瘤组里面 mRNA 的表达量明显高于对照组,因而,在临床诊疗方面, *CYB561D2* 基因利于明确胶质瘤的诊断,进一步完成

分子分型、评估患者预后和预测患者肿瘤复发^[19,20]；靶向抑制 *CYB561D2* 基因的表逤可能是治疗胶质瘤的一种新途径,*CYB561D2* 基因在胶质瘤细胞生成中发挥促进作用,抑制 *CYB561D2* 基因表逤从而起到抑制胶质瘤细胞增殖、迁移^[21]。

神经胶质瘤的发生、发展是多基因、多种信号通路共同调控的结果。*CYB561D2* 基因在神经胶质瘤中呈过表逤,极有可能参与了胶质瘤的形成和进展,与神经胶质瘤患者预后有一定相关性。结合前期研究结果,目前可能与 *CYB561D2* 上调激活 STAT3 诱导胶质瘤的免疫抑制相关,其具体调控机制仍需进一步研究证实。*CYB561D2* 基因目前在神经胶质瘤中初步证实为癌基因,可被当作神经胶质瘤的潜在靶点用于治疗中,给神经胶质瘤患者的临床治疗提供新依据和思路,当然这些还需要我们后期的进一步研究。

伦理学声明: 本研究方案经由安庆市立医院伦理委员会审批[医学伦理(2022)第 73 号],患者或授权家属均签署知情同意书。

利益冲突声明: 所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明: 黄纯负责设计论文框架、起草论文、论文修改;朱克帅、刘雅玲负责数据收集、统计学分析、绘制图表;周和平、查正江、宣兰兰负责拟定写作思路、指导撰写论文并最后定稿。

【参考文献】

- [1] 刘亚欧,李俊杰,武明豪.应用 MRI 预测成人型弥漫性脑胶质瘤分子病理的研究现状与进展[J].临床神经外科杂志,2022,19(6): 609-613, 619.
- [2] 付天娇,暴洪博,李晨龙,等. m6A 修饰在神经胶质瘤中的研究进展[J].现代肿瘤医学,2023, 31(17): 3296-3300.
- [3] Reed L, Mrizova I, Barta F, et al. Radek Indra Cytochrome b5 impacts on cytochrome P450-mediated metabolism of benzo pyrene and its DNA adduct formation: studies in hepatic cytochrome b5/P450 reductase null (HBRN) mice[J]. Arch Toxicol,2018,92(4):1625-1638.
- [4] Tao B, Shi J, Shuai S, et al. CYB561D2 up-regulation activates STAT3 to induce immunosuppression and aggression in gliomas[J]. J Transl Med, 2021, 19(1): 338.
- [5] 吴帅帅,乔小放,赵红梅,等. IL-2 激活的 NK 细胞对胶质瘤的杀伤作用[J]. 中馈与神经疾病杂志, 2018, 35(1): 18-21.
- [6] 方三高,陈真伟,魏建国. 2021 年第五版 WHO 中枢神经系统肿瘤分类[J]. 诊断病理学杂志, 2022, 29(10): 991-993.
- [7] 韩 震. 细胞色素 B5B 在肝细胞癌组织中表逤及对患者预后的

- 评估价值[D]. 大连: 大连医科大学, 2020.
- [8] 肖明松,胡庆森,赵 岩,等. 乌鳢线粒体 DNA 细胞色素 b 序列的研究[J]. 安徽科技学院学报, 2017, 31(2): 23-26.
- [9] 管雅琳,王新平. 富亮氨酸胶质瘤失活 1 蛋白抗体相关脑炎研究进展[J]. 中馈与神经疾病杂志,2021,38(7):665-668.
- [10] 孙志阳,冯 光,雷静静,等. 慢病毒介导 SHCBP1 低表逤对黑色素瘤 B16 细胞增殖的影响[J]. 生物学杂志, 2022, 39(1): 11-16.
- [11] Mayyas SJ, Mohamad EH, Fatina D, et al. Association between the single nucleotide variants of the mitochondrial cytochrome B gene (MT-CYB) and the male infertility [J]. Mol Biol Rep, 2022, 49 (76):3609-3616
- [12] Zhou X, Shen G, Ren D, et al. Expression and clinical prognostic value of CYB561 in breast cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2022, 148(8): 1879-1892.
- [13] 杨颖涛,段 奇,赤 更,等. 细胞色素 P4501B1 在乳腺纤维腺瘤组织的表逤及临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36 (7): 1290-1291.
- [14] 陈 翔. PCBP2 通过 cGAS/STING 信号通路对氧化应激诱导胶质瘤细胞凋亡的影响及其机制研究[D]. 南昌大学,2023.
- [15] 赵水强,孟大伟,陈国强,等. 环状 RNA circ_0006988 对胶质瘤细胞凋亡和迁移的影响[J]. 临床神经外科杂志, 2023, 20 (5): 524-530.
- [16] Lyu Y, Yang H, Chen L. Metabolic regulation on the immune environment of glioma through gut microbiota [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 86(Pt 2): 990-997.
- [17] 张 超,王 钰,邵 尉,等. ADAP2 在胶质瘤患者中的预后价值及功能研究[J]. 临床神经外科杂志, 2023, 20(5): 508-514.
- [18] Liljedahl E, Konradsson E, Gustafsson E, et al. PD-0483 Long-lasting anti-tumor immunity with conventional and FLASH radiotherapy of high grade glioma [J]. Radiother Oncol, 2022, 170: S434-S435.
- [19] 匡 澜,谢礼伟,王 静. 微小 RNA-643 靶向下调细胞色素 P450 家族成员 B1 促进小儿骨肉瘤增殖的临床分析及细胞与小鼠机制研究[J]. 中华实验外科杂志,2020,37(10):1922-1925.
- [20] Singh R, Purkait B, Abhishek K, et al. Retraction Note to: universal minicircle sequence binding protein of *Leishmania donovani* regulates pathogenicity by controlling expression of cytochrome-B [J]. Cell Biosci, 2022, 12(1): 137.
- [21] Bangbao Tao, Juanhong Shi, Shuai Shuai, et al. CYB561D2 up-regulation activates STAT3 to induce immunosuppression and aggression in gliomas[J]. Journal of Translational Medicine, 2021, 19(338):123-132.

引证本文:黄 纯,周和平,查正江,等. *CYB561D2* 基因在神经胶质瘤组织中的表逤及临床意义[J]. 中馈与神经疾病杂志,2024,41(2): 148-151.