

NDUFA4L2 在胶质瘤组织中的表达及意义

李春芽, 陈远兵, 梁银华, 唐 森, 曹武阳

作者单位: 410008 长沙,中南大学湘雅医院临床护理学教研室(李春芽),神经外科(陈远兵,唐 森),手术室(梁银华);
415000 湖南,常德市第一人民医院神经外科(曹武阳)
作者简介: 李春芽(1989-),女,硕士,护师,研究方向:神经外科研究。E-mail:634580454@qq.com
通信作者: 曹武阳(1986-),男,医学硕士,主治医师,研究方向:神经外科基础与临床研究。E-mail:283203058@qq.com

[摘要] **目的** 探讨乳酸脱氢酶 A 的 α 复合体 4-L2(NDUFA4L2)在胶质瘤中的表达情况及临床意义。
方法 利用癌症基因组图谱(TCGA)、中国胶质瘤基因组图谱(CGGA)数据库分析 NDUFA4L2 在胶质瘤中的 mRNA 表达情况,分析其与患者临床病理分级和预后的关系。进一步收集不同级别的胶质瘤组织标本行免疫组化检测,验证 NDUFA4L2 在不同级别胶质瘤中蛋白表达的差异。收集 62 例胶质瘤患者的组织标本和随访资料,采用 RT-PCR 法检测 NDUFA4L2 在胶质瘤中的表达并分析其与预后的关系。**结果** 通过分析 TCGA、CGGA 数据库,发现胶质瘤组织中 NDUFA4L2 的表达随着肿瘤分级的增高而增高($P<0.05$),高表达 NDUFA4L2 预示着患者生存期较短。在临床标本验证中的结果与上述生物信息学分析相一致。**结论** NDUFA4L2 在胶质瘤组织中的表达与病理分期和预后有关,可能是胶质瘤的一个潜在肿瘤标志物。

[关键词] 胶质瘤; 乳酸脱氢酶 A 的 α 复合体 4-L2; 预后
[中图分类号] R 739.41 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2021)11-1127-04
doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2021.11.15

Expression of NDUFA4L2 in glioma tissues and its significance *Li Chun-ya, CHEN Yuan-bing, LIANG Yin-hua, et al. Teaching and Research Section of Clinical Nursing, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China*

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of NADH dehydrogenase(ubiquinone) 1 alpha subcomplex 4-like 2(NDUFA4L2) in gliomas and its clinical significance. **Methods** The Cancer Genome Atlas(TCGA) and Chinese Glioma Genome Atlas(CGGA) databases were used to analyze the mRNA expression of NDUFA4L2 in glioma and its relationship with the clinical pathological grade and prognosis of the patients. The glioma tissue specimens of different grades were further collected for immunohistochemical detection to verify the difference of protein expression of NDUFA4L2 in different grades of gliomas. The tissue specimens and follow-up data of 62 patients with glioma were collected. Real-time quantitative polymerase chain reaction(RT-PCR) method was used to detect the expression of NDUFA4L2 in glioma and its relationship with prognosis was analyzed. **Results** By analyzing the TCGA and CGGA databases, it was found that the expression of NDUFA4L2 in glioma tissues increased with the increase of the tumor grade($P<0.05$). High expression of NDUFA4L2 indicated a shorter survival period for the patients. The results in the clinical specimen verification were consistent with the above-mentioned bioinformatic analysis. **Conclusion** The expression of NDUFA4L2 in glioma tissues is related to the pathological stage and prognosis, and NDUFA4L2 may be a potential tumor marker of glioma.

[Key words] Glioma; NADH dehydrogenase(ubiquinone) 1 alpha subcomplex 4-like 2(NDUFA4L2); Prognosis

胶质瘤是中枢神经系统常见的原发性恶性肿瘤,占中枢神经系统恶性肿瘤的 80%,年发病率约为 6.6/10 万^[1-2]。目前,最大安全范围内的手术切除肿块是胶质瘤最有效的治疗方式。而胶质瘤位于中枢神经系统,具有局部侵袭和破坏神经功能区的特点,手术全切困难且易复发,使其具有较高的致残性和致

死性,整体 5 年存活率约为 35%^[3]。迄今为止,虽然有部分分子能够有效预测患者的预后^[2,4-6],但胶质瘤仍缺乏特异性的分子标志物用于准确判断患者预后以及作为靶向治疗的有效分子靶点^[7]。因此,进一步探索胶质瘤预后的分子标志物及潜在的分子治疗靶点具有重要的临床意义。脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic

acid, DNA) 损伤在肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用,且在相关研究中均提示 DNA 损伤的调控也参与肿瘤的治疗抵抗,故有必要针对参与 DNA 损伤的分子进行研究^[8-10]。而乳酸脱氢酶 A 的 α 复合体 4-L2 [NADH dehydrogenase(ubiquinone) 1 alpha subcomplex 4-like 2, NDUFA4L2] 是线粒体中电子传输链 (electron-transport chain, ETC) 复合物 I 亚基的一个组成部分,在缺氧环境中高度表达,同时也是缺氧诱导因子的下游靶基^[11]。且 NDUFA4L2 可以介导线粒体中的氧化磷酸化和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生,并且 NDUFA4L2 蛋白能够抑制癌细胞中 ROS 的生成,从而发挥抗氧化应激的作用,进而保护由 ROS 诱导的 DNA 损伤^[8,12]。目前,在骨肉瘤、肺癌、肾细胞癌、结肠癌、肝癌等恶性肿瘤的研究中,均发现 NDUFA4L2 发挥癌基因的功能作用^[8,12-16]。然而,目前鲜见 NDUFA4L2 在胶质瘤中的相关研究。因此,为明确 NDUFA4L2 在胶质瘤中的作用,本研究通过癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 和中国胶质瘤基因组图谱 (Chinese Glioma Genome Atlas, CGGA) 数据库分析胶质瘤组织中 NDUFA4L2 的表达,探讨 NDUFA4L2 与患者临床病理分级的相关性,并通过收集临床资料进行验证,从而探讨其临床诊断及预后判断价值。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 2017 年 1 月至 2019 年 6 月在中南大学湘雅医院神经外科手术切除并经术后病理组织学检查确诊为胶质瘤的脑胶质瘤组织标本 62 例,在组织获取后立即冻存于 -80°C 冰箱备检。同时收集相应患者的临床资料,并开展临床随访。本研究获得了所有患者的书面知情同意及中南大学湘雅医院伦理委员会的批准。

1.2 生物信息学分析 本研究中生物信息学分析的相关数据均来自以下公共数据库网站:TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 和 CGGA (<http://www.cgga.org.cn/>)。通过下载数据,然后将基因表达量与对应的临床信息进行匹配。根据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 病理分级系统可将其分成 II、III、IV 级,然后提取相对应患者的 NDUFA4L2 表达量进行统计分析,同时分析 NDUFA4L2 表达量对患者生存期的预测价值。

1.3 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测 将胶质瘤组织、切碎、研磨,加入 1 ml Trizol 裂解组织,并按 Trizol 抽提总 RNA 的试剂盒 (Invitrogen 公司)

说明书提取总 RNA。使用反转录试剂盒 (TaKaRa) 将总 RNA 反转录为 cDNA。再使用 RT-PCR 仪进行检测,设定 RT-PCR 的运行程序: 50°C 2 min, 95°C 10 min, 95°C 30 s, 60°C 1 min 35 个循环,以 β -actin 作为内照。RT-PCR 引物序列:NDUFA4L2 正向引物: 5'-CTGGGACAGAAAGAACAACCCG-3',反向引物: 5'-CAGCCTGGCTTAGAAGTCTGGC-3'; β -actin 正向引物: 5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3',反向引物: 5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'。

1.4 免疫组织化学法检测 切取脑胶质瘤组织的石蜡包块制备病理切片,并进行烤片,后置于枸缘酸钠缓冲液中加热行抗原修复,加入 3% 过氧化氢溶液中以灭活内源性过氧化物酶,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 冲洗 3 次。然后孵育 NDUFA4L2 一抗 (Proteintech 公司;兔源性,1:400 稀释), 4°C 孵育过夜;PBS 冲洗 3 次,加入二抗,室温反应 90 min,再以 PBS 冲洗 3 遍,最后进行染色、脱水、封片。

1.5 随访 采用电话沟通的方式进行随访。总生存期 (overall survival, OS) 为手术时间至最后随访日或死亡时间。

1.6 统计学方法 应用 SPSS21.0 及 GraphPad Prism 7 统计分析软件进行数据分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 F 检验。以 NDUFA4L2 mRNA 表达量的中位数为界分为高表达组和低表达组,采用 Kaplan-Meier 法进行生存分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NDUFA4L2 在胶质瘤中的表达水平 在 TCGA 和 CGGA 数据库中,胶质瘤组织中 NDUFA4L2 mRNA 的表达水平随着 WHO 分级的增高而明显升高 (图 1a①b)。62 例胶质瘤组织样本 (包括 WHO II ~ IV 级) 的 RT-PCR 检测结果也显示,NDUFA4L2 mRNA 也随着胶质瘤 WHO 分级的升高而上调 (图 1c)。应用免疫组织化学法检测不同级别胶质瘤样本 (II、III、IV 级) 中的 NDUFA4L2 蛋白表达情况,发现 NDUFA4L2 蛋白的表达随着胶质瘤 WHO 分级的升高而上调 (图 2)。

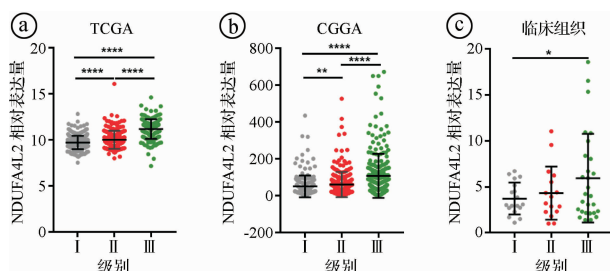


图1 NDUFA4L2 mRNA 在各级别胶质瘤中的表达水平比较图

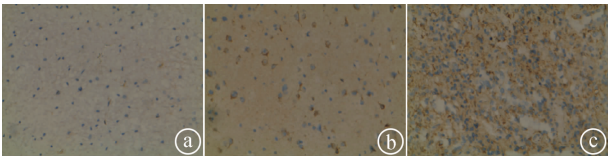


图 2 NDUFA4L2 蛋白在各级别胶质瘤中的表达水平比较图

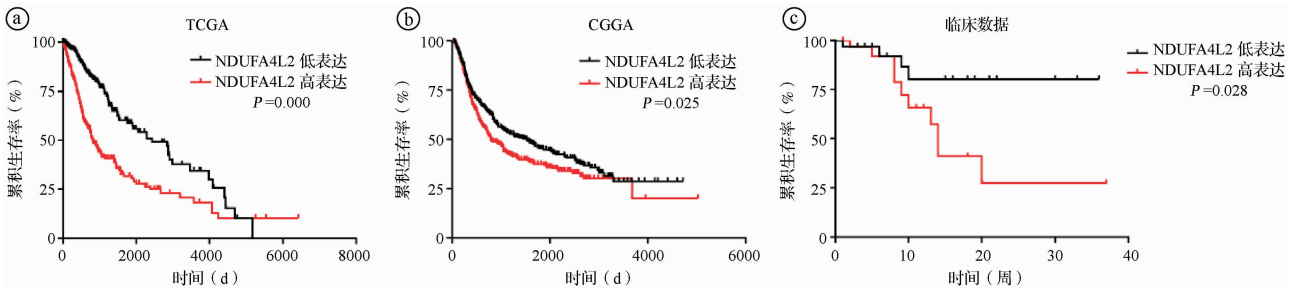


图 3 高、低 NDUFA4L2 mRNA 表达水平胶质瘤患者的生存曲线图

3 讨论

3.1 胶质瘤是中枢神经系统肿瘤,具有侵袭性生长的特点,从而破坏或影响神经系统功能,有较高的致死性和致残性^[17]。从恶性程度来分析,胶质瘤作为脑肿瘤中恶性程度高、侵袭能力强的中枢系统肿瘤,具有高浸润性、瘤内异质性、增殖速度快及易复发等特点^[18]。WHO 分级系统是目前胶质瘤恶性程度以及预后判断的经典方法,但是仍有一定的局限性^[19]。近年来,分子靶向治疗在癌症治疗中越来越重要,尤其在肺癌的分子靶向治疗中^[20]。因此,为胶质瘤的诊疗及预后判断寻找新的分子治疗靶点具有重要的临床意义。本研究发现 NDUFA4L2 的表达量与胶质瘤的恶性程度及预后相关。

3.2 已有研究证实,NDUFA4L2 在相关肿瘤中呈高表达,其表达与肿瘤的进展和预后相关,提示 NDUFA4L2 可能是一种有应用前景的肿瘤标志物^[8,14-16]。本研究发现 NDUFA4L2 表达水平随着胶质瘤 WHO 病理分级的增高而升高,表明 NDUFA4L2 的表达与胶质瘤的恶性程度呈正相关。提示 NDUFA4L2 表达水平与胶质瘤的恶性进展有关,故有望通过检测胶质瘤中 NDUFA4L2 的水平来协助评估胶质瘤的恶性程度。本研究的免疫组织化学检测结果显示 NDUFA4L2 主要分布在胞浆中,而相关研究显示 NDUFA4L2 主要位于线粒体并影响细胞的氧化磷酸化和 ROS 的产生^[11-13],也进一步证实 NDUFA4L2 在胶质瘤中也可能通过影响线粒体电子传递进而影响能量转化以及抗氧化应激,最终影响胶质瘤的发生发展。因此,有可能通过靶向 NDUFA4L2 来影响胶质瘤的能量代谢及抗氧化应激能力,从而抑制胶质瘤的进展。

2.2 NDUFA4L2 在胶质瘤中的表达水平与预后的关联性 对 TCGA 和 CGGA 数据库所获取数据进行分析,结果显示,高 NDUFA4L2 mRNA 表达的胶质瘤患者其 OS 较短($P<0.05$) (图 3(a)(b))。同样的,针对临床数据分析发现,NDUFA4L2 mRNA 低表达者其 OS 更长($P<0.05$) (图 3(c))。

3.3 本研究发现 NDUFA4L2 不但与胶质瘤的病理分级相关,还与患者预后相关。NDUFA4L2 的表达量越高,则胶质瘤患者的预后越差,这可能与 NDUFA4L2 影响胶质瘤能量代谢和抗氧化应激能力相关。当 NDUFA4L2 改变胶质瘤细胞的能量代谢,同时提高胶质瘤的氧化应激能力后,就会促进胶质瘤的快速生长,从而增加患者的瘤负荷压力,最终影响胶质瘤患者的生存期。因此,NDUFA4L2 有望作为胶质瘤患者预后的分子标志物,可通过检测 NDUFA4L2 的表达量来协助预测胶质瘤患者的生存期。

综上所述,NDUFA4L2 有望成为胶质瘤分级及预后判断的肿瘤标志物,在后续研究可以进一步针对 NDUFA4L2 展开深入的研究,并设计靶向药物进行临床应用。

参考文献

[1] Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014[J]. Neuro Oncol, 2017,19(Suppl 5): v1-v88.

[2] Lapointe S, Perry A, Butowski NA. Primary brain tumours in adults [J]. Lancet, 2018, 392(10145):432-446.

[3] Weller M, Wick W, Aldape K, et al. Glioma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2015,1:15017.

[4] Chen Q, Cai J, Wang Q, et al. Long noncoding RNA NEAT1, regulated by the EGFR pathway, contributes to glioblastoma progression through the WNT/ β -catenin pathway by scaffolding EZH2[J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(3):684-695.

[5] Tang J, Yu B, Li Y, et al. TGF- β -activated lncRNA LINC00115 is a critical regulator of glioma stem-like cell tumorigenicity[J]. EMBO Rep, 2019, 20(12):e48170.

- [6] Schmitt AM, Chang HY. Long noncoding RNAs in cancer pathways [J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(4):452–463.
- [7] Kamiya-Matsuoka C, Gilbert MR. Treating recurrent glioblastoma: an update[J]. *CNS Oncol*, 2015, 4(2):91–104.
- [8] Xu WN, Yang RZ, Zheng HL, et al. NDUFA4L2 regulated by HIF-1 α promotes metastasis and epithelial-mesenchymal transition of osteosarcoma cells through inhibiting ROS production[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:515051.
- [9] Nakagawa M, Fujita S, Katsumoto T, et al. Dual inhibition of enhancer of zeste homolog 1/2 overactivates WNT signaling to deplete cancer stem cells in multiple myeloma[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(1):194–208.
- [10] Hua L, Wang Z, Zhao L, et al. Hypoxia-responsive lipid-poly-(hypoxic radiosensitized polyprodrug) nanoparticles for glioma chemo- and radiotherapy[J]. *Theranostics*, 2018, 8(18):5088–5105.
- [11] Tello D, Balsa E, Acosta-Iborra B, et al. Induction of the mitochondrial NDUFA4L2 protein by HIF-1 α decreases oxygen consumption by inhibiting complex I activity[J]. *Cell Metab*, 2011, 14(6):768–779.
- [12] Meng L, Yang X, Xie X, et al. Mitochondrial NDUFA4L2 protein promotes the vitality of lung cancer cells by repressing oxidative stress [J]. *Thoracic Cancer*, 2019, 10(4):676–685.
- [13] Lucarelli G, Rutigliano M, Sallustio F, et al. Integrated multi-omics characterization reveals a distinctive metabolic signature and the role of NDUFA4L2 in promoting angiogenesis, chemoresistance, and mitochondrial dysfunction in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Aging* (Albany NY), 2018, 10(12):3957–3985.
- [14] Wang L, Peng Z, Wang K, et al. NDUFA4L2 is associated with clear cell renal cell carcinoma malignancy and is regulated by ELK1[J]. *PeerJ*, 2017, 5:e4065.
- [15] Lv Y, Nie SL, Zhou JM, et al. Overexpression of NDUFA4L2 is associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer[J]. *ANZ J Surg*, 2017, 87(12):E251–E255.
- [16] Lai RK, Xu IM, Chiu DK, et al. NDUFA4L2 fine-tunes oxidative stress in hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(12):3105–3117.
- [17] Chen L, Zou X, Wang Y, et al. Central nervous system tumors: a single center pathology review of 34,140 cases over 60 years[J]. *BMC Clin Pathol*, 2013, 13(1):14.
- [18] Rajesh Y, Pal I, Banik P, et al. Insights into molecular therapy of glioma: current challenges and next generation blueprint[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(5):591–613.
- [19] Fan X, Salford LG, Widegren B. Glioma stem cells: evidence and limitation[J]. *Semin Cancer Biol*, 2007, 17(3):214–218.
- [20] Cortes J, Perez-Garcia JM, Llombart-Cussac A, et al. Enhancing global access to cancer medicines[J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(2):105–124.
- [收稿日期 2021-07-30][本文编辑 余军韦颖]

本文引用格式

李春芽,陈远兵,梁银华,等. NDUFA4L2 在胶质瘤组织中的表达及意义[J]. *中国临床新医学*, 2021, 14(11):1127–1130.

《中国临床新医学》杂志 2022 年征稿征订启事

《中国临床新医学》杂志是由国家卫生健康委员会主管,由中国医师协会和广西壮族自治区人民医院共同主办的国家级医学学术性科技期刊,中国标准连续出版物号:ISSN 1674–3806, CN 45–1365/R, 月刊,每期定价 16 元,全年 192.0 元,邮发代号:48–173,国内外公开发售,欢迎踊跃投稿和订阅。

栏目设置:专家述评、专家论坛、论著、博硕论坛、新技术新方法、病例报告、护理研讨、新进展综述等。

重点论文征稿及奖励:本刊重点诚征国家级、省部级基金课题论文和博士、硕士研究生毕业论文,并实行优先发表和奖励(国家级基金项目论著性论文奖励 2000 元;省、部级基金项目论著性论文奖励 1000 元)。

投稿方式:在线投稿:www.zglcxyxzz.com

邮箱投稿:zglcxyxzz@163.com

本刊地址:广西南宁市桃源路 6 号广西壮族自治区人民医院内

邮编:530021 E-mail:zglcxyxzz@163.com 电话:0771–2186013