doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.19.013

WBSCR22 在脑胶质瘤中的表达与临床病理特征及预后关系 *

黄 波 [1,2] 刘耀华 [1,2△] 金瑞日 [3] 李 森 [4] 李 勇 [4]

（1 南京医科大学附属上海一院临床医学院神经外科 上海 200080；2 上海市第一人民医院神经外科 上海 200080；
3 上海交通大学附属松江医院中心实验室 上海 201600；4 上海交通大学附属松江医院神经外科 上海 201600）

摘要 目的：探索 WBSCR22 在脑胶质瘤中的表达及与临床病理特征和预后的关系。**方法：**通过生物信息学数据库，分析 WBSCR22 表达与脑胶质瘤生存的关系、在不同种族脑胶质瘤表达差异。通过免疫组织化学法检测 WBSCR22 在 171 例脑胶质瘤组织芯片中的表达，分析其与脑胶质瘤患者临床病理特征及总生存期的关系。**结果：**生物信息学分析显示脑胶质瘤 WBSCR22 表达高的患者生存期较表达低的患者短（$P<0.05$）。亚洲人群脑胶质瘤中 WBSCR22 表达较高加索人、非洲人种表达升高（$P<0.05$）。组织芯片学结果显示：不同肿瘤分级、复发与否的脑胶质瘤患者 WBSCR22 的表达存在差异，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。不同性别、年龄患者脑胶质瘤细胞 WBSCR22 表达率比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）WBSCR22 高表达患者的总生存期明显短于 WBSCR22 低表达患者的总生存期（$P<0.01$）。**结论：**WBSCR22 在亚洲人群脑胶质瘤中表达较高，其表达水平与肿瘤分级相关，且脑胶质瘤细胞 WBSCR22 表达水平越高，总生存期越短。

关键词：WBSCR22；胶质瘤；临床；病理

中图分类号：R-33；R739.41 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273（2020）19-3668-05

Expression of WBSCR22 in Gliomas and Its Relationship with Clinicopathological Features and Prognosis*

HUANG Bo[1,2], LIU Yao-hua[1,2△], JIN Rui-ri[3], LI Sen[4], LI Yong[4]

(1 Department of Neurosurgery, Shanghai First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Shanghai, 200080, China;
2 Department of Neurosurgery, Shanghai first people's Hospital affiliated to Shanghai Jiao tong University, Shanghai, 200080, China;
3 Department of Central laboratory, Song Jiang Hospital affiliated to Shanghai Jiao tong University, Shanghai, 201600, China;
4 Department of Neurosurgery, Song Jiang Hospital affiliated to Shanghai Jiao tong University, Shanghai, 201600, China)

ABSTRACT Objective: To explore the expression of WBSCR22 in gliomas and its relationship with clinicopathological features and prognosis. **Methods:** Bioinformatics database was used to analyze the relationship between the expression of WBSCR22 and the survival of gliomas and the difference of expression in different races of gliomas. The expression of WBSCR22 in 171 cases of glioma tissue microarray was detected by immunohistochemical method, and its relationship with clinicopathological features and overall survival time of glioma patients was analyzed. **Results:** Bioinformatics analysis showed that the survival time of patients with high expression of WBSCR22 in gliomas was shorter than that of patients with low expression of Glioma（$P<0.05$）. The expression of WBSCR22 in Asian gliomas was higher than that in Caucasians and Africans. The results of histological chip showed that there were significant differences in the expression of WBSCR22 in glioma patients with different tumor grades and recurrent or not. There was no significant difference in the expression rate of cytoplasmic WBSCR22 in gliomas of different genders and ages（$P>0.05$）. The overall survival time of patients with high expression of WBSCR22 was significantly shorter than that of patients with low expression of WBSCR22 （$P<0.01$). **Conclusion:** The expression of WBSCR22 is higher in Asian gliomas, and its expression level is related to tumor grade, and the higher the expression level of WBSCR22 in glioma cells is, the shorter the overall survival time is.

Key words: WBSCR22; Glioma; Clinical; Pathology

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R739.41 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2020)19-3668-05

前言

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见、最致命的原发性肿瘤，具有生长迅速、瘤内异质性、浸润性生长和肿瘤复发等特点[1]。

* 基金项目：国家自然科学基金项目（81372701）

作者简介：黄波（1984-），男，本科，主要研究方向：颅脑肿瘤与脑血管疾病，E-mail: 18918288993@163.com

△ 通讯作者：刘耀华（1979-），男，博士生导师，教授，主要研究方向：颅脑肿瘤与脑血管疾病，
E-mail: liuyaohua@163.com，电话：15317235176

（收稿日期：2020-03-28 接受日期：2020-04-23）

目前脑胶质瘤发病机制、化疗耐药机制等仍不明确，患者生存期仍较短，胶质母细胞瘤从确诊之日起的中位生存期不到 15 个月[2,3]。因此进一步揭示胶质瘤生物学潜在分子机制，寻找有价值的干预及评估疗效及预后的分子生物靶标具有重要意义[4,5]。WBSCR22 是一种 rRNA 甲基化转移酶和促进核糖体成熟的调节因子[6]，在全身各组织广泛表达[7]。近年来发现其在骨髓瘤、乳腺癌等肿瘤组织中高表达，同时相关研究显示，过表达 WBSCR22 可以抑制肿瘤细胞凋亡[8,9]，在肝癌细胞的研究中发现其与肝癌细胞的增殖、侵袭相关[10]，在肠癌的研究中发现其与肠癌患者预后密切相关[11]。故 WBSCR22 可能是一个重要肿瘤分子生物学靶标且广泛参与肿瘤增殖、侵袭等病理过程。到目前为止，WBSCR22 在脑胶质瘤中的研究较少，国内外仅有 1 篇文献在生物信息学和细胞学层面提示 WBSCR22 与脑胶质瘤预后相关[12]，为了更好地了解其在胶质瘤中的表达水平以及是否具有临床病理意义，我们进行生物信息学与组织芯片分析，结合国外生物学信息和我国人群病理样本及临床资料，初步探索 WBSCR22 在中国人群胶质瘤表达的临床病理意义及评估其预后价值。

1 材料和方法

1.1 生物系信息学材料及方法

在线数据分析 WBSCR22 在脑胶质瘤患者中的表达，使用 UALCAN（http://ualcan.path.uab.edu/）在线分析工具，分析公开数据库中 WBSCR22 在低分化脑胶质细胞瘤患者中的表达，并从 TCGA 数据库中下载相关数据进行生存分析。

1.2 组织芯片材料和方法

1.2.1 材料与试剂 人脑胶质瘤组织芯片购自上海芯超生物科技有限公司，共 171 例脑胶质瘤组织。其中，男性 108 例，女性 63 例；年龄 2～80 岁。所有标本按世界卫生组织（WHO）（2007）神经上皮肿瘤分级标准进行分级：Ⅰ级 20 例，Ⅱ级 79 例，Ⅲ级 51 例，Ⅳ级 21 例。

WBSCR22 兔多克隆抗体购自英国 abcam 公司（货号：ab97911），免疫组织化学试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司，苏木精购自美国 Sigma 公司。

1.2.2 方法 采用免疫组织化学法检测 WBSCR22 的表达。脑胶质瘤组织芯片经二甲苯、梯度乙醇依次浸泡、脱蜡。在柠檬酸盐抗原修复液中高压修复，经 PBS 缓冲液清洗后，加入 1∶50 稀释的兔抗 WBSCR22 抗体 4℃ 孵育过夜。玻片室温下复温 >30 min，经 PBS 缓冲液冲洗后滴加二抗，室温孵育 30 min。使用 DAB 试剂盒显色，冲洗后苏木精复染，盐酸乙醇分化，自来水冲洗，室温晾干后用中性树胶封片。结果的判读采用双盲法。聘请 2 位病理学专家对组织芯片的免疫组织化学结果进行评分。① 根据细胞染色强度进行评分：无着色为 0 分，淡黄色为 1 分，棕黄色为 2 分，棕褐色为 3 分；② 根据细胞染色阳性率进行评分：0%为 0 分，>0%～25%为 1 分，>25%～50%为 2 分，>50%～75%为 3 分，>75%～100%为 4 分；最终总评分为染色强度评分与染色阳性率评分的乘积[13]。总评分≤ 3 分为 WBSCR22 低表达，总评分 >3 分为 WBSCR22 高表达。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS22 统计软件。计数资料以率（%）表示，比较用 x^2 检验；采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线，比较用 Log-rank x^2 检验；影响因素的分析采用 Cox 比例风险回归模型，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学结果

应用 UALCAN 在线工具对 TCGA 数据中低分化脑胶质瘤 WBSCR22 表达水平进行比较，并下载 TCGA 部分转录组表达、病理及临床数据进行生存分析，发现 WBSCR22 在亚洲人群表达显著升高，WBSCR22 表达与低分化脑胶质瘤患者生存率相关（见图 1、图 2）。

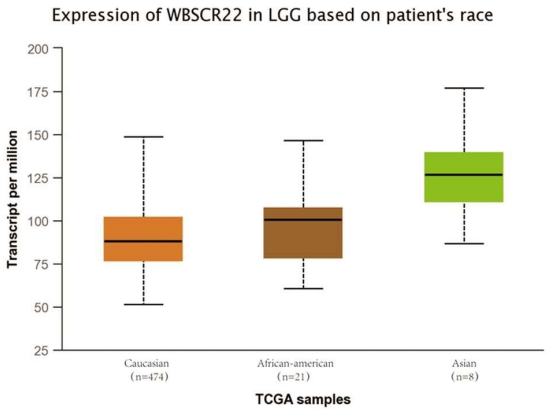

图 1 TCGA 转录组测序数据分析结果

Fig.1 Analysis results of TCGA transcriptome sequencing data

注：亚洲种族人群低分化脑胶质瘤 WBSCR22 表达明显高于白种人、非洲人。

Note: the expression of WBSCR22 in poorly differentiated gliomas of Asian ethnic group is significantly higher than that of Caucasian and African people.

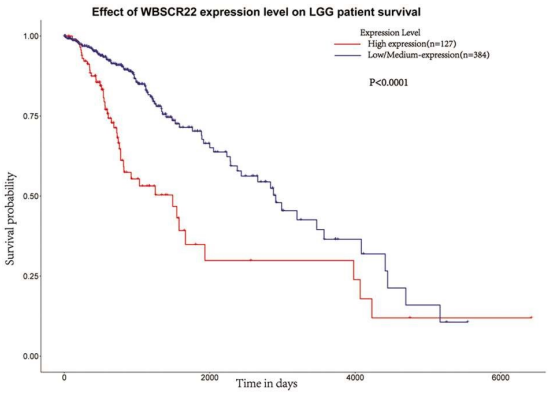

图 2 TCGA 转录组测序数据分析结果

Fig.2 Analysis results of TCGA transcriptome sequencing data

注：在低分化脑胶质瘤中 WBSCR22 表达与总生存期相关（K-M 分析）

Note: WBSCR22 expression is associated with overall survival in poorly differentiated gliomas (Kmurm analysis)

2.2 组织芯片分析结果

2.2.1 一般资料 为了研究 WBSCR22 在脑胶质瘤中的表达及临床病理意义，我们使用免疫组织化学方法检查了含 171 例石蜡包埋的组织芯片，并结合分析了其临床病理资料，其中 60 岁以上有 29 例，女性 63 例，肿瘤分级：I 级 20 例、II 级 79 例、

III 级 51 例、IV 级 21 例。68 例为 WBSCR22 基因高表达患者。有 92 例患者为胶质瘤复发患者。在随访过程中 57 例死亡。

2.2.2 **不同临床病理特征患者脑胶质瘤 WBSCR22 的表达** WBSCR22 在脑胶质瘤肿瘤分级高的患者及复发患者中表达显著高于肿瘤分级低的患者及未出现复发的患者，差异具有统计学意义（P<0.05）。不同性别、年龄患者脑胶质瘤细胞 WBSCR22 表达率比较，差异无统计学意义（P＞0.05），见图 3、表 1。

表 1 脑胶质瘤患者 WBSCR22 的表达与临床病理特征的相关性

Table 1 Correlation between expression of wbscr22 and clinicopathological Features in patients with gliomas

Expression of wbscr22 gene	Low expression	High expression	*P*
Age (years)			
≥ 60 years old	15	14	0.3
＜60 years old	88	54	
Gender	63	45	0.51
MaleFemale	40	23	
Tumor grading			
Level I	20	2	<0.01
Level II	74	5	
Level III	9	42	
Level IV	0	21	
Tumor recurrence			
Yes	35	57	<0.01
No	68	11	

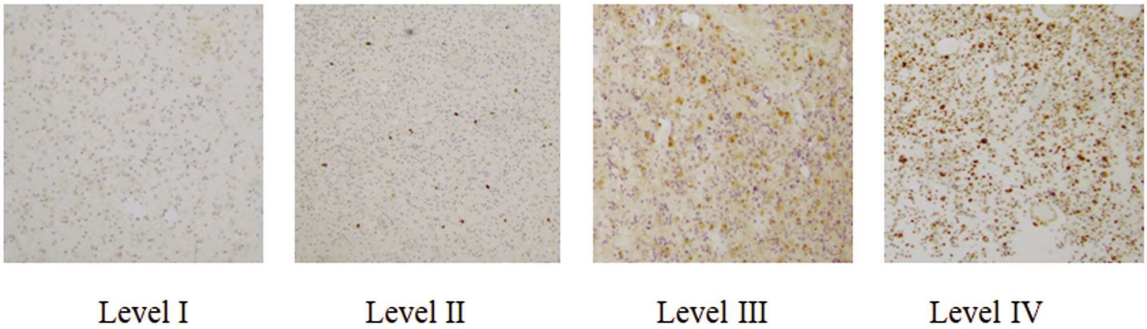

图 3 WBSCR22 在不同肿瘤分级患者脑胶质瘤中的表达

Fig.3 Expression of wbscr22 in gliomas of different tumor grades

2.3 WBSCR22 与脑胶质瘤患者生存预后的关系

Kaplan-Meier 生存曲线表明，WBSCR22 高表达患者的总生存期明显短于 WBSCR22 低表达患者的总生存期（图 4，P <0.01）。总的来说，这些结果表明在脑胶质瘤者中 WBSCR22 的过表达与不良的生存率相关。（见图 4）。

COX 回归分析对不同性别患者的总生存期比较，经 Log-rank x^2 检验，差异无统计学意义（P>0.05）。不同 WBSCR22 表达、肿瘤分级、年龄、肿瘤复发患者的总生存期比较，差异有统计学意义（P<0.05），以是否死亡为因变量，以其他参数为自变量，逐步多因素 Cox 回归分析结果显示，年龄 >60 岁、肿瘤分级是决定患者预后的重要因素（P<0.05），见表 2。

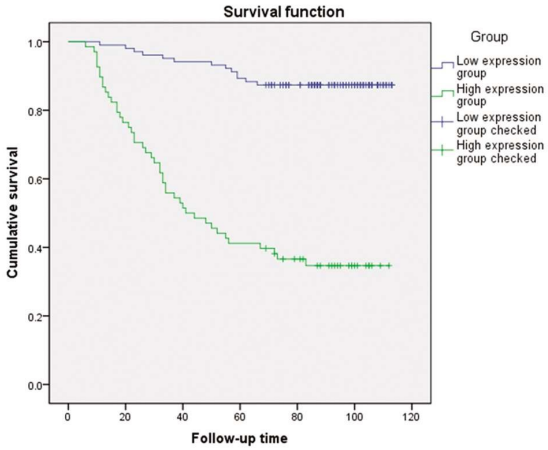

图 4 脑胶质瘤不同 WBSCR22 表达水平患者的生存曲线

Fig.4 Survival curve of glioma patients with different wbscr22 expression levels

3 讨论

脑胶质瘤是神经系统最常见的原发性恶性肿瘤，起源于脑部神经外胚层，其恶性程度高、正常脑组织无明显界限且伴有

丰富的血管,是神经系统预后较差的肿瘤[14,15]。在脑胶质瘤的治疗过程中,寻找合适的生物分子对其预后及治疗疗效进行预测和评价十分重要[16,17]。但当前仍缺乏理想的生物分子靶标预测患者预后情况及评估治疗疗效以有助于进一步提供有价值的干预靶点。

表 2 影响脑胶质瘤预后的多因素分析

Table 2 Multivariate analysis of prognostic factors of gliomas

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	P	Hazard Ratio	95% confidence interval	*P*	Hazard Ratio	95% confidence interval
Expression of wbscr22	<0.01	7.938	4.259-14.794	0.781	1.117	0.511-2.441
Tumor grading	<0.01	7.36	4.853-11.162	<0.01	4.478	2.645-7.583
Tumor recurrence	<0.01	88.89	10.181-776.079	0.847	80498.462	.000-5.431E+54
Age	<0.01	1.036	1.019-1.054	0.017	2.06	1.139-3.724
Gender	0.174	0.674	0.382-1.190	0.637	0.869	0.487-1.553

在本研究中我们发现,WBSCR22 的表达与脑胶质瘤的预后显著相关,高表达 WBSCR22 的患者生存时间相较于低表达 WBSCR22 生存时间更短,且肿瘤分级往往更高,肿瘤复发概率更大,提示 WBSCR22 是反映脑胶质瘤预后不良指标。在生物信息学分析中,TCGA 为目前世界肿瘤数据收集最为全面和规范的数据库,应用方便、可信度高,为临床科研人员提供了巨大的信息便利[18,19]。本研究依据 TCGA 数据库的数据,显示高表达的 WBSCR22 患者生存期更短,提示 WBSCR22 为脑胶质瘤的不良预后因子。但 TCGA 数据库的数据来源以美国人群数据为主,其结果是否可应用于我国人群,需要进一步探索验证。同时本研究在 TCGA 数据库种族学分析中发现 WBSCR22 在亚洲人种中表达高于白种人和非洲人群，差异具有统计学意义，进一步提示了 WBSCR22 可能在不同种族表达及作用差异,故应用我国人群病理标本、临床资料进一步探索验证具有重要意义。组织芯片通过规范化临床资料收集、随访和妥善的标本处理,形成一套便捷高效的病理、临床资料集合,是目前临床病理研究较为可靠的途径。本研究通过组织芯片病理和临床资料分析确认了在我国人群中 WBSCR22 与脑胶质瘤不良预后相关，与生物信息学分析结果一致，进一步验证了 WBSCR22 为脑胶质瘤的不良预后指标。

WBSCR22 蛋白是一种参与前 rRNA 加工和核糖体成熟的 rRNA 甲基转移酶,与 18S rRNA 生物功能密切相关,在表观遗传学中发挥了重要的作用 [20-22]。在本研究中，我们发现 WBSCR22 与脑胶质瘤的分级、复发相关,同时 WBSCR22 表达较高的患者生存期更短。肿瘤细胞的增殖、转移、侵袭、凋亡与化疗耐药,是影响脑胶质瘤肿瘤分级、复发和预后的关键机制[23-26]。既往的研究发现 WBSCR22 可以通过甲基化核心组蛋白 H3 启动子区域的赖氨酸 9,抑制 Zac1/Lot1/Plagl1 的转录,促进癌细胞转移[9]。敲减 WBSCR22 可以减少 AKT 和 Gsk3β 通路磷酸化,降低β-catemin 和 cyclinD1 的表达[27],来减弱肿瘤细胞的侵袭能力和增殖能力 [28,29]，同时在结肠癌细胞中敲减 WBSCR22 表达,可以增加细胞内活性氧,从而改善奥沙利铂耐药情况。这些研究支持我们相信 WBSCR22 在胶质瘤中表达具有促肿瘤的作用,并导致预后不良,同时指引探索胶质瘤治疗新的干预靶标。对其上下游调控研究显示 WBSCR22 为 microRNA-146b-5p 的靶基因，我们可以通过提高 microRNA-146b-5p 的表达,降低 WBSCR22 的表达,从而可能改善脑胶质瘤的预后[30],但目前对其上下游信号通路、基因表达调控等具体机制仍未完全明确,需在脑胶质瘤研究中进一步探索明确。

本文通过 UALCAN 在线工具对 TCGA 数据进行检测分析,其临床资料数据较为完整可靠。通过对组织芯片进一步验证,其标本误差较小,同时随访时间长、临床资料完整可靠。但总体研究标本仍较少,缺乏细胞、分子生物学、动物实验等需将来扩充资料进一步验证。

综上所述,WBSCR22 是脑胶质瘤的预后因子，与脑胶质瘤的分级、生存密切相关。同时可能深度参与脑胶质瘤增殖、侵袭、凋亡、化疗耐药等多个病理生理过程,进一步探索、明确其生物学机制,围绕 WBSCR22 探索新的干预靶点改善脑胶质瘤预后具有重要意义。

参 考 文 献(References)

[1] Tomiyama A, Ichimura K. Signal transduction pathways and resistance to targeted therapies in glioma [J]. Semin Cancer Biol, 2019, 58: 118-129

[2] Guo R M, Zhao C B, Li P, et al. Overexpression of CLEC18B Associates With the Proliferation, Migration, and Prognosis of Glioblastoma [J]. ASN Neuro, 2018, 10: 1663359229

[3] Nalkiran H S, Mcdonald K L. Is neuroglial antigen 2 a potential contributor to cilengitide response in glioblastoma? [J]. J Cancer Res Ther, 2017, 13(2): 329-336

[4] Huse J T, Aldape K D. The evolving role of molecular markers in the diagnosis and management of diffuse glioma [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(22): 5601-5611

[5] Li W, Graeber M B. The molecular profile of microglia under the influence of glioma[J]. Neuro Oncol, 2012, 14(8): 958-978

[6] Yan D, Zheng X, Tu L, et al. Knockdown of Merm1/Wbscr22 attenuates sensitivity of H460 non-small cell lung cancer cells to SN-38 and 5-FU without alteration to p53 expression levels [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(1): 295-302

[7] Doll A, Grzeschik K H. Characterization of two novel genes, WBSCR20 and WBSCR22, deleted in Williams-Beuren syndrome[J]. Cy-

togenet Cell Genet, 2001, 95(1-2): 20-27

[8] Tiedemann R E, Zhu Y X, Schmidt J, et al. Identification of molecular vulnerabilities in human multiple myeloma cells by RNA interference lethality screening of the druggable genome[J]. Cancer Res, 2012, 72 (3): 757-768

[9] Nakazawa Y, Arai H, Fujita N. The novel metastasis promoter Merm1/Wbscr22 enhances tumor cell survival in the vasculature by suppressing Zac1/p53-dependent apoptosis [J]. Cancer Res, 2011, 71 (3): 1146-1155

[10] Stefanska B, Cheishvili D, Suderman M, et al. Genome-wide study of hypomethylated and induced genes in patients with liver cancer unravels novel anticancer targets [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(12): 3118-3132

[11] Jiang T, Ye L, Han Z, et al. miR-19b-3p promotes colon cancer proliferation and oxaliplatin-based chemoresistance by targeting SMAD4: validation by bioinformatics and experimental analyses[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2017, 36(1): 131

[12] Chi Y, Liang Z, Guo Y, et al. WBSCR22 confers cell survival and predicts poor prognosis in glioma[J]. Brain Res Bull, 2020, 161: 1-12

[13] Lu H, Niu F, Liu F, et al. Elevated glypican-1 expression is associated with an unfavorable prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Cancer Med, 2017, 6(6): 1181-1191

[14] 刘秀芳,夏云飞,韩非,等. 164 例胶质瘤术后放射治疗疗效及预后[J].中华放射肿瘤学杂志, 2001, 10(2): 108-111

[15] 陈忠平,周旺宁. 我国胶质瘤诊断治疗现状和努力方向[J]. 中国肿瘤, 2005, 14(2): 78-81

[16] Zhang D, Guo S, Wang H, et al. SOX15 exerts antitumor function in glioma by inhibiting cell proliferation and invasion via downregulation of Wnt/beta-catenin signaling[J]. Life Sci, 2020, 255: 117792

[17] Sun H, Zou H Y, Cai X Y, et al. Network Analyses of the Differential Expression of Heat Shock Proteins in Glioma [J]. DNA Cell Biol, 2020, 39(7): 1228-1242

[18] Liu J, Lichtenberg T, Hoadley K A, et al. An Integrated TCGA Pan-Cancer Clinical Data Resource to Drive High-Quality Survival Outcome Analytics[J]. Cell, 2018, 173(2): 400-416

[19] Kim H S, Minna J D, White M A. GWAS meets TCGA to illuminate mechanisms of cancer predisposition[J]. Cell, 2013, 152(3): 387-389

[20] Tafforeau L, Zorbas C, Langhendries J L, et al. The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of Pre-rRNA processing factors[J]. Mol Cell, 2013, 51(4): 539-551

[21] Haag S, Kretschmer J, Bohnsack M T. WBSCR22/Merm1 is required for late nuclear pre-ribosomal RNA processing and mediates N7-methylation of G1639 in human 18S rRNA[J]. RNA, 2015, 21(2): 180-187

[22] Doll A, Grzeschik K H. Characterization of two novel genes, WBSCR20 and WBSCR22, deleted in Williams-Beuren syndrome[J]. Cytogenet Cell Genet, 2001, 95(1-2): 20-27

[23] Ferrer V P, Moura N V, Mentlein R. Glioma infiltration and extracellular matrix: key players and modulators [J]. Glia, 2018, 66(8): 1542-1565

[24] Cheng F, Guo D. MET in glioma: signaling pathways and targeted therapies[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 270

[25] Tomiyama A, Ichimura K. Signal transduction pathways and resistance to targeted therapies in glioma[J]. Semin Cancer Biol, 2019, 58: 118-129

[26] He L, Zhou H, Zeng Z, et al. Wnt/beta-catenin signaling cascade: A promising target for glioma therapy [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(3): 2217-2228

[27] Chi Y, Liang Z, Guo Y, et al. WBSCR22 confers cell survival and predicts poor prognosis in glioma[J]. Brain Res Bull, 2020, 161: 1-12

[28] Ounap K, Kasper L, Kurg A, et al. The human WBSCR22 protein is involved in the biogenesis of the 40S ribosomal subunits in mammalian cells[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e75686

[29] Stefanska B, Cheishvili D, Suderman M, et al. Genome-wide study of hypomethylated and induced genes in patients with liver cancer unravels novel anticancer targets [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(12): 3118-3132

[30] Zhao H, Su W, Kang Q, et al. Natural killer cells inhibit oxaliplatin-resistant colorectal cancer by repressing WBSCR22 via upregulating microRNA-146b-5p[J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(5): 824-834