

# 脂肪酸结合蛋白5和细胞维甲酸结合蛋白2在脑胶质瘤中的表达

曾令成, 叶飞, 韩林, 郭东生, 雷霆

Expression of Fatty Acid-binding Protein 5 and Cellular Retinoic Acid-binding Protein 2 in Gliomas

ZENG Lingcheng, YE fei, HAN Lin, Guo Dongsheng, LEI Ting

Department of Neurosurgery, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China



**Abstract: Objective** To investigate the correlation between the expression of fatty acid-binding protein 5 (FABP5) cellular retinoic acid-binding protein 2 (CRABP2) and WHO grades as well as the retinoic acid resistance of glioma. **Methods** Immunohistochemistry staining was applied to detect FABP5 and CRABP2 protein expression in 125 brain astrocytoma samples. Brdu-ELISA was applied to detect the proliferation and real-time quantitative fluorescence PCR was performed to detect mRNA expression of the two proteins in glioma cell lines before and after all-trans retinoic acid (ATRA) treatment. **Results** The percentage of FABP5 positive cells was (16±9)% in glioma samples of WHO grade II, (33±22)% in WHO grade III and (50±29)% in WHO grade IV; FABP5 expression was positively correlated with WHO grades of glioma ( $P<0.05$ ). The percentage of CRABP2 positive cells was (46±12)% in glioma samples of WHO grade II, (30±15)% in WHO grade III and (10±9)% in WHO grade IV; CRABP2 expression was negatively correlated with WHO grades of glioma ( $P<0.05$ ). ATRA promoted the proliferation of glioma cell lines. Moreover, after ATRA treatment, FABP5 mRNA expression was increased while CRABP2 mRNA expression was decreased significantly. **Conclusion** The abnormal expression of FABP5 and CRABP2 are closely associated with glioma grades and may play roles in the retinoic acid resistance of glioma.

**Key words:** Fatty acid-binding protein 5(FABP5); Cellular retinoic acid-binding protein 2(CRABP2); Glioma

**摘要: 目的** 探讨脂肪酸结合蛋白5 (fatty acid-binding protein 5, FABP5) 与细胞维甲酸结合蛋白2 (cellular retinoic acid-binding protein 2, CRABP2) 在脑胶质瘤中的表达及与脑胶质瘤病理级别、维甲酸治疗抵抗的关系。**方法** 应用免疫组织化学染色法检测125例脑星型细胞瘤组织中FABP5及CRABP2蛋白表达。全反式维甲酸作用前后, 以Brdu-ELISA法检测胶质瘤细胞增殖, 并以实时荧光定量PCR检测胶质瘤细胞株中FABP5及CRABP2在mRNA水平的表达。**结果** FABP5阳性细胞比例在WHO II级星型细胞瘤中占(16±9)%, III级中占(33±22)%, IV级中占(50±29)%, FABP5蛋白表达与胶质瘤病理级别呈显著正相关( $P<0.05$ )。CRABP2阳性细胞比例在II级星型细胞瘤中占(46±12)%, WHO III级中占(30±15)%, IV级中占(10±9)%, CRABP2蛋白表达与胶质瘤病理级别呈显著负相关( $P<0.05$ )。全反式维甲酸促进了胶质瘤细胞株的增殖, 全反式维甲酸作用后胶质瘤细胞FABP5 mRNA表达显著上调, 而CRABP2显著下调。**结论** FABP5及CRABP2的异常表达与胶质瘤恶性程度相关, 并可能介导了胶质瘤细胞对维甲酸的分化抵抗效应。

**关键词:** 脂肪酸结合蛋白5; 细胞维甲酸结合蛋白2; 脑胶质瘤

**中图分类号:** R730.264 **文献标识码:** A

## 0 引言

胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤, 尽管经手术、放疗及化疗等综合治疗, 患者总体预后仍较差<sup>[1]</sup>。近10余年研究进展发现, 胶质瘤内的胶质瘤

干细胞为放、化疗抵抗及肿瘤复发的根源, 因此诱导该类原始细胞分化, 增强其对术后辅助治疗的敏感度, 为一重要的研究策略<sup>[2]</sup>。

在众多的促分化药物中, 维甲酸因较显著地促白血病干细胞的分化效应在胶质瘤的研究中受到了关注。维甲酸促分化治疗已开始用于脑胶质瘤的II期临床研究, 但疗效欠佳, 提示胶质瘤细胞可能对维甲酸诱导分化存在着抵抗<sup>[3]</sup>。可能抵抗机制众多, 而维甲酸在肿瘤细胞内的代谢、

收稿日期: 2014-03-21; 修回日期: 2014-10-09

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81201681)

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院神经外科

作者简介: 曾令成(1978-), 男, 博士, 主治医师, 主要从事脑胶质瘤的基础及临床研究

转运异常可作为一重要的研究切入点<sup>[4]</sup>。在乳腺癌中的研究表明维甲酸可与细胞质内维甲酸结合蛋白2 (cellular retinoic acid-binding protein 2, CRABP2) 结合, 发挥促细胞分化或凋亡效应, 或与脂肪酸结合蛋白5 (fatty acid-binding protein 5, FABP5) 结合, 发挥促增殖效应<sup>[4]</sup>。FABP5的异常高表达、CRABP2的异常低表达导致维甲酸促增殖效应的发挥, 可为肿瘤对维甲酸抵抗机制之一<sup>[4]</sup>。因此, 我们推测胶质瘤细胞质内维甲酸转运蛋白 FABP5和CRABP2的表达可能存在异常, 基于此我们进行了上述两分子在脑胶质瘤中的表达研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

收集2011年9月—2012年9月期间华中科技大学同济医学院附属同济医院神经外科行手术治疗并经病理证实的脑胶质瘤标本, 共125例, 其中男70例、女55例; 年龄15~77岁, 平均年龄(45±28)岁; 按WHO病理分级为: II级25例、III级34例、IV级66例。胶质瘤细胞株NCH82、NCH87及NCH89由德国海德堡大学神经外科研究室Herold-Mende教授惠赠。

### 1.2 试剂

鼠抗人FABP5单克隆抗体(稀释度1:50)及鼠抗人CRABP2单克隆抗体(稀释度1:50)均购自英国Abcam公司; 生物素化羊抗鼠二抗(1:200)、ABC法试剂盒及AEC显色试剂盒均购自美国Vector Laboratories公司。RNA提取试剂盒RNEasy Mini Kit购自德国Qiagen公司。荧光定量Absolute™ QPCR Capillary Mix Kit试剂盒购自美国Thermo scientific公司。FABP5、CRABP2及内参PitPNB实时定量PCR引物设计采用Universal probe finder网络软件, 引物均由德国Tibmol公司合成。BrdU-ELISA试剂盒购自德国Roche公司。全反式维甲酸(all trans retinoic acid, ATRA)购自美国Sigma-Aldrich公司。

### 1.3 免疫组织化学染色法

采用ABC法。石蜡切片经二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗5 min, 以pH 9.9枸橼酸盐抗原修复液, 94℃孵育20 min行抗原修复。PBS洗涤3次, 每次5 min, 再滴加FABP5或CRABP2一抗, 4℃过夜孵育。PBS洗涤3次, 每次5 min后, 以生物素化抗鼠二抗室温下孵育30 min。继以PBS洗涤3次, 每次5 min, 加ABC复合物室温作用30 min。PBS洗涤3次, 每次5 min后, 加AEC显色5~30 min, 显微镜下依据显色强度, 适时在PBS中终止显色反应, 苏木精对比染色, 自来水冲洗, 封片。

### 1.4 免疫组织化学结果评判

在200倍视野下观察, 随机选取4个视野, 拍

照。每视野行阳性细胞计数, 并计算百分比, 取平均值作为该样本的阳性细胞表达比例。同时采用华中科技大学同济医学院病理教研室HMIAS-2000型全自动医学彩色图像分析系统进行图像分析, 测量FABP5及CRABP2表达的吸光度值, 取平均值作为其表达强度。平均吸光度值≥0.04为阳性表达。

### 1.5 细胞培养

阳性细胞组为ATRA处理组, 阴性对照组为无ATRA处理组。阴性组胶质瘤细胞培养于添加10%胎牛血清的DMEM培养液中, 阳性组细胞培养于含1 μmol/L ATRA的上述培养液中, ATRA作用时间为1周。培养箱环境为37℃、含5% CO<sub>2</sub>和20% O<sub>2</sub>, 每3天换液1次。

### 1.6 BrdU-ELISA细胞增殖测定

胶质瘤细胞以每孔 $5 \times 10^3$ 的密度接种于96孔板, 孵育48 h后, 每孔加入10 μmol/L的BrdU标记液, 37℃孵育24 h后, 按说明书步骤完成BrdU测定。

### 1.7 实时荧光定量PCR

胶质瘤细胞的RNA提取采用RNEasy Mini Kit试剂盒并按说明书指导步骤进行。cDNA的合成及PCR反应液的配制采用Absolute™ QPCR Capillary Mix Kit试剂盒, 依据厂家指导步骤进行。FABP5上游引物序列: 5'-GCAGACCCCTCTCTGCAC-3'; 下游引物序列: 5'-TCGCAAAGCTATTCCTACTC-3'。CRABP2上游引物序列: 5'-CGAGGAATTGCTCAAAGTGC-3'; 下游引物序列: 5'-TCCTGTTTGATCTCCACTGCT-3'。PitPNB上游引物序列: 5'-CGAGACTCAGAAAGAACTAGAAACAA-3'; 下游引物序列: 5'-TGACCCTACAGGGGACTCAT-3'。反应条件为: 95℃ 15 min; 95℃ 15 s, 59℃ 1 min, 72℃ 1 s, 循环40次; 40℃ 30 s。管家基因PitPNB作为内参, FABP5 mRNA及CRABP2 mRNA定量结果采用RelQuant 1.01软件分析得出。

### 1.8 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间均数比较以Excel软件t检验进行统计分析,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 FABP5蛋白表达与胶质瘤患者病理级别的关系

免疫组织化学染色显示脑胶质瘤样本中FABP5阳性染色主要定位于细胞质, 见图1。FABP5蛋白表达随胶质瘤病理级别的升高而显著增加( $P < 0.05$ ): 在WHO II级星型细胞瘤中阳性细胞比例为(16±9)%, 平均表达强度为(0.0686±0.03); WHO III级肿瘤中占(33±22)%, 平均表达强度为(0.0948±0.0476); 在WHO IV级肿瘤中占



( $50 \pm 29$ )%, 平均表达强度为( $0.1541 \pm 0.044$ )。

## 2.2 CRABP2蛋白表达与胶质瘤患者病理级别的关系

免疫组织化学染色显示脑胶质瘤样本中CRABP2阳性染色主要定位于细胞质, 见图2。CRABP2表达随胶质瘤病理级别的升高而显著减少( $P < 0.05$ ): 在Ⅱ级星型细胞瘤中阳性细胞比例为( $46 \pm 12$ )%, 平均表达强度为( $0.210 \pm 0.056$ ); Ⅲ级肿瘤中占( $30 \pm 15$ )%, 平均表达强度为( $0.160 \pm 0.064$ ); 在Ⅳ级肿瘤中占( $10 \pm 9$ )%, 平均表达强度为( $0.080 \pm 0.055$ )。

## 2.3 全反式维甲酸(ATRA)对胶质瘤细胞株的增殖效应检测

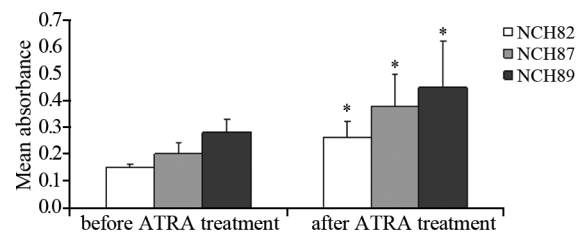
用BrdU-ELISA法检测并比较了ATRA对胶质瘤细胞株NCH82、NCH87及NCH89作用前后的细胞增殖状况, 结果显示ATRA作用后, 细胞增殖显著增加( $P < 0.05$ ), 见图3。

## 2.4 ATRA作用前后胶质瘤细胞株中FABP5及CRABP2在mRNA水平的表达

以实时荧光定量PCR检测ATRA作用前后胶质瘤细胞株NCH82、NCH87及NCH89中FABP5及CRABP2在mRNA水平的表达, 显示ATRA作用后FABP5表达显著上调( $P < 0.05$ ), 见图4A, 而CRABP2显著下调( $P < 0.05$ ), 见图4B。

## 3 讨论

本研究表明在脑胶质瘤中FABP5蛋白表达与胶质瘤恶性级别呈显著正相关, FABP5可能与脑胶质瘤的恶性进展相关。FABP5属于脂质结合蛋白超



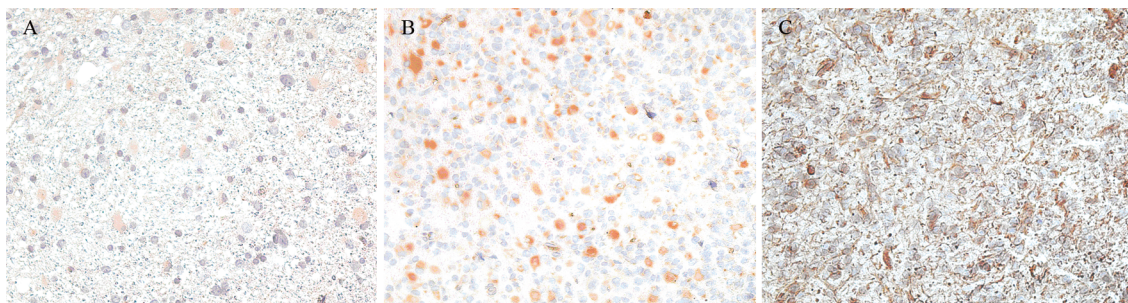
\*:  $P < 0.05$ , compared with the data before ATRA treatment

图3 ATRA对胶质瘤细胞株的增殖效应检测

Figure3 Proliferative effect of ATRA on glioma cell lines

家族的一员, 主要参与细胞脂肪酸的代谢、转运, 并可与细胞内维甲酸结合, 将其转运至PPAR $\beta/\delta$ 信号通路, 从而发挥促细胞增殖功能<sup>[4]</sup>。已有研究表明, FABP5促增殖效应参与了许多人类肿瘤的发生及发展。例如, 在胆管癌细胞的研究中, FABP5沉默后, 细胞增殖明显降低, 而过表达后, 细胞增殖及侵袭能力明显增高; 在临床样本中, FABP5蛋白表达与肿瘤大小、淋巴结转移、血管侵袭及病变分期呈显著正相关<sup>[5]</sup>。在雌激素阴性表达的乳腺癌细胞中, FABP5敲除后, 细胞增殖降低; 在乳腺癌组织中, FABP5蛋白表达与肿瘤级别及患者预后显著相关<sup>[6]</sup>。因此, FABP5在脑胶质瘤中的效应与在其他人类肿瘤中的效应体现了一致性。

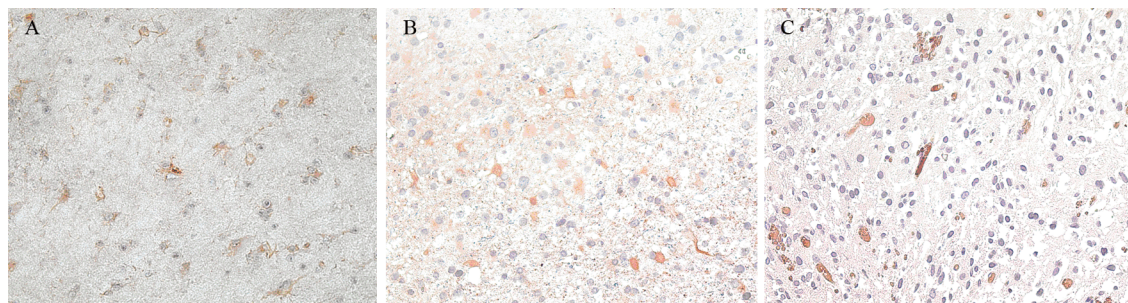
CRABP2蛋白也为细胞内维甲酸的结合转运蛋白, 但其负责将维甲酸转运至维甲酸受体信号通路, 继而发挥了促细胞分化及凋亡功能<sup>[4]</sup>。有关CRABP2蛋白与人类肿瘤之间关系的报道较少。本研究表明, 在脑胶质瘤中, CRABP2蛋白表达与胶质瘤恶性级别呈显著负相关, 提示CRABP2扮演了



A: WHO grade II glioma; B: WHO grade III glioma; C: WHO grade IV glioma

图1 FABP5蛋白在脑胶质瘤中的表达 (ABC  $\times 200$ )

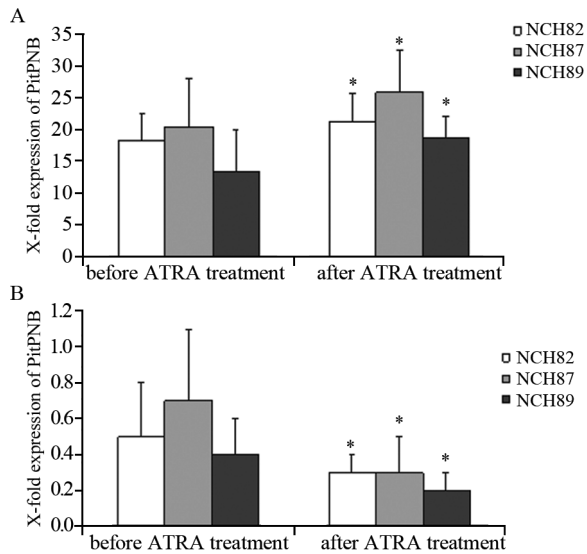
Figure1 Expression of FABP5 proteins in gliomas (ABC  $\times 200$ )



A: WHO grade II glioma; B: WHO grade III glioma; C: WHO grade IV glioma

图2 CRABP2蛋白在脑胶质瘤中的表达 (ABC  $\times 200$ )

Figure2 Expression of CRABP2 proteins in gliomas (ABC  $\times 200$ )



A: FABP5; B: CRABP2

\*:  $P < 0.05$ , compared with the data ATRA treatment

图4 ATRA作用前后胶质瘤细胞株中FABP5及CRABP2在mRNA水平的表达

Figure4 Expression of FABP5 and CRABP2 mRNA in glioma cell lines before and after ATRA treatment

抑癌基因的角色。

生理状况下,细胞通过调控FABP5/CRABP2表达比例,对机体内源性维甲酸的促分化或促增殖效应进行调节,继而保持了自身稳态。而病理状况下,上述比例失控,如肿瘤细胞中FABP5过度高表达,而CRABP2过度低表达,则造成了维甲酸被竞争性的转运至PPAR $\beta/\delta$ ,导致促增殖通路持续活化,肿瘤细胞异常增殖,促进肿瘤发生发展;同时,因维甲酸受体促分化通路持续失活,肿瘤细胞表现出对维甲酸分化的抵抗效应<sup>[4]</sup>。例如, Schug等<sup>[7]</sup>在维甲酸抵抗的鼠乳癌模型中观察到FABP5/CRABP2表达比例高于正常,维甲酸发挥了明显的促增殖效应,但将上述比例逆转后,维甲酸则表现出促分化的抗癌效应。Gupta等<sup>[8]</sup>在胰腺癌中依据FABP5/CRABP2表达比例的不同,同样发现了维甲酸的截然相反效应。本研究在脑胶质瘤标本中发现FABP5及CRABP2蛋白表达随胶质瘤级别呈截然相反的变化,在WHO IV级胶质母细胞瘤中,FABP5/CRABP2比例可达最高。进一步在培养的胶质瘤细胞中显示维甲酸处理组相对于未处理组,细胞增殖明显增强,FABP5表达显著上调,而CRABP2显著下调,因此维甲酸作用后胶质瘤细胞中FABP5/CRABP2比例显著增高,提示维甲酸可能被竞争性转运至FABP5-PPAR $\beta/\delta$ 增殖通路,发挥了促增殖效应,与此同时,胶质瘤细胞体现了对维甲酸的分化抵抗效应。

在已报道的部分实验研究中证实了维甲酸对胶质瘤细胞显著的促分化、凋亡效应<sup>[9-10]</sup>,而本研究

观察到与上述研究不一致的维甲酸效应,该差异可归因于胶质瘤为一显著的异质性群体。不同个体的胶质瘤细胞可在其基因表达、调控、细胞构成以及对辅助治疗的敏感度上存在区别<sup>[11]</sup>。例如并非所有的胶质瘤细胞对化疗药物替莫唑胺敏感,其中表达DNA修复蛋白O6-甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶(O6-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)的胶质瘤细胞体现了明显的耐药性,同理,也并非所有的胶质瘤细胞可体现敏感的维甲酸治疗效应。基于本研究结果,未来可构想,依据肿瘤组织中FABP5/CRABP2表达比例判断肿瘤对维甲酸疗效的敏感度,或通过抑制FABP5的表达,促进CRABP2的表达,以降低FABP5/CRABP2比例,从而促进维甲酸促分化信号通路的活化,以增加维甲酸的治疗敏感度,并以此作为可能治疗策略,展开相应研究。

#### 参考文献:

- [1] Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review[J]. JAMA, 2013, 310(17): 1842-50.
- [2] Binello E, Germano IM. Targeting glioma stem cells: a novel framework for brain tumors[J]. Cancer Sci, 2011, 102(11): 1958-66.
- [3] Puduvalli VK, Yung W K, Hess K R, *et al.* North American Brain Tumour Consortium.Phase II study of fenretinide (NSC 374551) in adults with recurrent malignant gliomas: A North American Brain Tumour Consortium study[J]. J Clin Oncol, 2004, 22(21): 4282-9.
- [4] Schug TT, Berry DC, Shaw NS, *et al.* Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors[J]. Cell, 2007, 129(4): 723-33.
- [5] Jeong CY, Hah YS, Cho BI, *et al.* Fatty acid-binding protein 5 promotes cell proliferation and invasion in human intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Oncol Rep, 2012, 28(4): 1283-92.
- [6] Liu RZ, Graham K, Glubrecht DD, *et al.* Association of FABP5 expression with poor survival in triple-negative breast cancer: implication for retinoic acid therapy[J]. Am J Pathol, 2011, 178(3): 997-1008.
- [7] Schug TT, Berry DC, Toshkov IA, *et al.* Overcoming retinoic acid-resistance of mammary carcinomas by diverting retinoic acid from PPAR $\beta/\delta$  to RAR[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(21): 7546-51.
- [8] Gupta S, Pramanik D, Mukherjee R, *et al.* Molecular determinants of retinoic acid sensitivity in pancreatic cancer[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(1): 280-9.
- [9] Shi Z, Lou M, Zhao Y, *et al.* Effect of all-trans retinoic acid on the differentiation of U87 glioma stem/progenitor cells[J]. Cell Mol Neurobiol, 2013, 33(7): 943-51.
- [10] Li J, Zhang L, Fei Z, *et al.* Expression of Bcl-2 and Caspase-3 in apoptosis induced by all-trans-retinoic acid of C6 glioma cells in rat[J]. Zhonghua Shen Jing Wai Ke Ji Bing Yan Jiu Za Zhi, 2010, 9(1): 23-6. [李娟, 张磊, 费舟, 等. ATRA诱导胶质瘤C6细胞凋亡过程中Bcl-2和Caspase-3表达的研究[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2010, 9(1): 23-6.]
- [11] Jovčevska I, Kočevan N, Komel R. Glioma and glioblastoma - how much do we (not) know? [J]. Mol Clin Oncol, 2013, 1(6): 935-41.

[编辑: 黄园玲; 校对: 安凤]