

脑胶质瘤中单酰甘油脂肪酶的表达及意义

张小林, 张文静, 陈腊, 蒋峰, 陈忠波, 张行泉(浙江省舟山医院, 浙江 舟山 316021)

摘要: 目的 研究内源性大麻素代谢酶单酰甘油脂肪酶(monoacylglycerol lipase, MAGL)在脑胶质瘤组织中的表达情况及其与胶质瘤病理级别的关系, 探讨其临床意义。方法 选取脑胶质瘤标本 23 例, 其中 WHO I 级 1 例, WHO II 级 7 例, WHO III 级 5 例, WHO IV 级 10 例。对照组 8 例, 均为脑挫裂伤后行内减压术切除的正常脑组织。应用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)、LC-MS 分别检测各组织标本中 MAGL mRNA、MAGL 活性的表达。结果 MAGL mRNA、MAGL 活性在低级别(WHO I~II 级)和高级别(WHO III~IV 级)脑胶质瘤组织中的表达水平较正常脑组织明显降低($P<0.01$), 且随着肿瘤病理级别的增高而降低, 与肿瘤的病理分级呈负相关(均 $P<0.01$)。MAGL mRNA 的表达水平与 MAGL 活性呈正相关。结论 MAGL 可能参与了脑胶质瘤的发生、发展过程, 检测 MAGL 的表达可评价脑胶质瘤的恶性程度。

关键词: 大麻素; 2-花生四烯酸甘油; 单酰甘油脂肪酶; 胶质瘤

中图分类号: R965 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)06-0905-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.06.026

引用本文: 张小林, 张文静, 陈腊, 等. 脑胶质瘤中单酰甘油脂肪酶的表达及意义[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(6): 905-907.

Expression and Significance of Monoacylglycerol Lipase in Brain Glioma

ZHANG Xiaolin, ZHANG Wenjing, CHEN La, JIANG Feng, CHEN Zhongbo, ZHANG Xingquan(Zhejiang Province Zhoushan Hospital, Zhoushan 316021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the relationship between the expression of endocannabinoid metabolic enzyme monoacylglycerol lipase(MAGL) in human brain glioma tissues and the grade of brain glioma, explore its clinicopathological significance. **METHODS** Twenty-three patients with brain glioma, including one case with WHO grade I, 7 cases with WHO grade II, 5 cases with WHO grade III, and 10 cases with WHO grade IV, performing surgical excision were enrolled in the study and 8 samples of normal brain tissues from patients performing decompression operation due to cerebral hernia served as controls. qRT-PCR and LC-MS were used to detect the mRNA and activity of MAGL. **RESULTS** The mRNA expression and activity of MAGL was significantly higher in low grade (WHO grade I – II) and high grade (WHO grade III – IV) brain glioma tissues than those in the normal brain tissues, and both were negatively correlated to the pathological grade($P<0.01$). The MAGL mRNA expression was positively correlated with the the MAGL activity. **CONCLUSION** MAGL may be involved in the occurrence and development of brain glioma. Detection of MAGL expression may be can evaluate the matignant of brain gliomas.

KEY WORDS: cannabinoid; 2-arachidonylglycerol; monoacylglycerol lipase; glioma

花生四烯酸乙醇胺(anandamide, AEA)是第一个被发现并从体内分离出来的内源性大麻素, 前期研究发现脑胶质瘤中 AEA 的代谢酶脂肪酰氨水解酶(fatty acid amide hydrolysis, FAAH)的表达与肿瘤病理级别呈负相关^[1], 但脑组织中内源性大麻素 2-花生四烯酸甘油(2-arachidonylglycerol, 2-AG)含量远高于 AEA, 故探讨 2-AG 代谢酶单酰甘油脂肪酶(monoacylglycerol lipase, MAGL)在胶质瘤组织中的表达情况及其与病理级别的相关性更具意义。

1 仪器与试剂

7300 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI); 1200 型液相色谱仪、5975B inert XLMSD 型气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent); 3200 Q Trap 型质谱仪(美国 ABI); 2-oleoylglycerol(美国 Sigma-Aldrich,

批号: M2787); Trizol(美国 Invitrogen, 批号: 15596026); ReverTra Ace® qPCR RT Kit(日本 ToYoBo, 批号: F0921K); SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒(日本 TaKaRa, 批号: DRR081A); 引物(上海生工生物工程有限公司)。

2 组织标本

选择舟山医院神经外科 2012 年 1 月—2016 年 1 月首次手术切除并经病理检查证实为脑胶质瘤的组织标本 23 例, 患者无神经精神疾病史和毒物接触史, 术前均未行放疗、化疗和免疫治疗; 对照组 8 例, 均为脑挫裂伤行内减压术切除的正常脑组织。一部分标本用甲醛溶液固定后作病理学和免疫组化, 按照 WHO 神经系统肿瘤分类分级标准(2007 版)进行分级: I 级 1 例, II 级 7 例, III 级

作者简介: 张小林, 男, 硕士, 主治医师 Tel: (0580)2292755

E-mail: syzxlin@qq.com

5 例, IV 级 10 例。另一部分用标本液氮速冻, -80 °C 冰箱保存, 留作基因及酶活性检测。本研究纳入统计学的组织标本分为 3 组: 正常脑组织组(8 例)、低级别脑胶质瘤组(WHO I~II 级, 8 例)和高级别脑胶质瘤组(WHO III~IV 级, 15 例)。

3 方法

3.1 实时荧光定量 PCR 检测

按照文献[1]的实验方法进行。①组织总 RNA 的提取: 液氮下研钵粉碎组织块, 按照 Trizol 试剂说明书推荐的步骤操作。②cDNA 的合成: 使用 ReverTra Ace® qPCR RT Kit 进行逆转录反应, 总反应体系为 10 μ L, 所有操作均在冰上完成, 混匀放置于 PCR 后 37 °C 15 min、98 °C 5 min、4 °C 10 min, 即得到逆转录产物(cDNA), 加灭菌纯水稀释至 10 倍, -20 °C 保存备用。③RT-PCR: 以 cDNA 为模板进行扩增。GAPDH 引物正义: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'; 反义: 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'。MAGL 引物正义: 5'-CATGTGGATTCCATGCAGAAAG-3'; 反义: 5'-AGGATTGGCAAGAACCAGAGG-3'。

PCR 所用试剂为 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒, 反应体系为 20 μ L。置于 PCR 仪上按下述条件扩增: 95 °C 30 s 预变性, 95 °C 5 s、60 °C 31 s, 扩增 40 个循环, 然后 95 °C 15 s、60 °C 1 min、95 °C 15 s。PCR 完成后, 调整基线循环和计算域值, 根据标准曲线, ABI 7300 System SDS Software 软件进行分析, 计算出待测基因的表达水平, 将待测基因的表达量/管家基因 GAPDH 表达量的值进行统计分析。

3.2 MAGL 活性测定

参照文献[1-2]所述方法进行 MAGL 活性测定(略有改动)。LC-MS 条件: Agilent 1200 series 型液相色谱仪, ABI 3200 Q TrapLC/MS/MS system 型质谱仪, Agilent ZOR BAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 1.8 μ m), 柱温保持在 40 °C, 进样量为 5 μ L, 流动相 A 为水(含 0.25% 醋酸和 5 mmol·L⁻¹ 醋酸铵), 流动相 B 为甲醇, 流速为 0.6 mL·min⁻¹, 95%B 洗脱 5 min。质谱为 ESI(-)离子源, 干燥气为 N₂, 温度为 350 °C, 扫描质量范围为 50~400 amu。按照 BCA 法测定组织蛋白的浓度, 用 80 μ g 蛋白进行 MAGL 活性测定: 在 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCL(pH 8.0) 含有 0.05% BSA 的缓冲液中加入 80 μ g 蛋白、25 μ mol·L⁻¹ 反应底物 2-oleoylglycerol

(2-OG)混合均匀, 在 37 °C 下反应 30 min, 随后加入含有 1 nmol 17:0 脂肪酸内标的甲醇终止液 200 μ L 终止反应, LC-MS 分析水解反应产物含量。结果以 17:0 脂肪酸(m/z =269)作为内标对 MAGL 水解产物油酸(m/z =281)进行定量分析。

3.3 统计学方法

采用 SPSS 14.0 统计软件, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验。MAGL mRNA、MAGL 活性与脑胶质瘤病理级别的相关性采用 Spearman 相关分析。MAGL mRNA 与 MAGL 活性的关系采用 Pearson 相关分析。

4 结果

4.1 MAGL 表达水平和 MAGL 活性在正常脑组织和胶质瘤组织中的表达情况

因正常脑组织和脑胶质瘤组织均含有 MAGL 及其底物 2-AG, 且 FAAH 酶也能部分水解 2-AG^[2], 因此在 MAGL 活性测定时加入了 FAAH 酶的抑制剂 URB597。每个样本再加入外源性底物 2-AG 以测定组织 MAGL 活性, 每个组织样本测 3 次以减少实验误差, 设立 1 个不加外源性 2-AG 的空白对照组, 3 次测得的酶活性减去空白对照组酶活性所得的数据纳入统计学计算, 结果见表 1。所有组织中均能检测到 MAGL mRNA 的表达, 在正常脑组织中呈高表达, 而在脑胶质瘤组织中呈低表达, 差异有统计学意义($P<0.01$), 并且 MAGL mRNA 的表达量与胶质瘤的病理级别呈负相关($r=-0.73$, $P<0.01$); 此外, 所有组织中还可检测到 MAGL 活性, 正常脑组织 MAGL 活性明显高于脑胶质瘤组织, 差异也有统计学意义($P<0.01$), 并且 MAGL 活性与胶质瘤的病理级别也呈负相关($r=-0.63$, $P<0.01$)。

表 1 正常脑组织和各级别胶质瘤组织中 MAGL 的表达水平
Tab. 1 The MAGL expression of normal brain tissue and glioma tissue

组别	<i>n</i>	MAGL mRNA/GAPDH mRNA	MAGL 活性
正常组	8	14.85±1.25	6.79±0.22
低级别组	8	9.39±0.88	5.82±0.35
高级别组	15	4.31±0.53	3.84±0.20
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01

4.2 MAGL 表达水平与 MAGL 活性的关系

将每个组织样本的 MAGL mRNA/GAPDH mRNA 的值与该组织的 MAGL 活性进行 Pearson 相关分析, MAGL 表达水平与 MAGL 活性之间具有明显的正相关关系($r=0.49$, $P<0.05$)。结果见图 1。

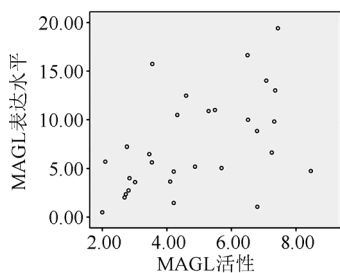


图1 MAGL mRNA 表达水平与 MAGL 活性的关系

Fig. 1 The relationship between MAGL mRNA and MAGL activity

5 讨论

MAGL 是一个胞浆酶, 在脂代谢及大麻素系统中有重要的生理作用, 研究上述 2 种系统对恶性肿瘤的影响成为肿瘤领域研究的热点问题。2010 年 Nomura 的研究团队在《Cell》上提出了一条关于肿瘤细胞生长和侵袭的全新信号通路, 即 MAGL-FFA-LPA/PGE₂/LPE/PA 通路^[3]。Guida 等^[4]对 16 例健康女性和与之配对的 18 例子宫内膜癌患者进行对比分析, 采用 Western blot 检测技术, 发现正常女性子宫内膜中 MAGL 蛋白的表达明显高于子宫内膜癌患者。同时, 运用 LC-MS 检测发现, 2-AG 在正常子宫内膜组织和内膜癌组织中的表达是有差异的, 子宫内膜癌组织中的表达明显高于正常组织。随后, Ye 等^[5]研究发现, MAGL 蛋白在结直肠癌组织中高表达, 药理学上抑制 MAGL 活性或基因干扰 MAGL 的表达能抑制肿瘤细胞的生长及侵袭, 凋亡的肿瘤细胞增多, 细胞内 CyclinD1 和 Bcl-2 基因表达减少。Ma 等^[6]发现, 应用 JZL184 特异性抑制结直肠癌细胞 MAGL 的表达, 可引起基因 Bax/Bcl-2 表达增多, 导致细胞凋亡。同时, 在上皮-间质转化实验中发现, 钙黏附蛋白 E 表达增多, 波形蛋白及锌指蛋白 SNAI1 减少, 增强了肿瘤细胞的侵袭性及转移能力。此外, 还发现 JZL184 可提高肿瘤细胞对 5-Fu 化疗的敏感性。秦易等^[7]运用免疫组化发现 MAGL 主要集中在肝癌组织的细胞核中, 在肝癌组织中的表达高于癌旁组织及正常组织。Western blot 结果显示, MAGL 与肿瘤恶性程度呈正相关, 其高表达也许是肝癌的恶性表型之一。Zhu 等^[8]也发现, MAGL 的表达在肝癌组织中显著高于周边的癌旁组织, 且与肿瘤大小、低分化、微血管侵犯、TNM 分期呈正相关。高表达 MAGL 蛋白的肝癌患者表现出更差的临床预后, 其 5 年生存率明显低于低表达 MAGL 蛋白的肝癌患者, 肿瘤复发的概率明显高于后者。因此, 提出 MAGL 可以作为肝癌患者预后的独立检测指标。在 EMT 实验中, 该研究团队进一步发现 MAGL 可通过 NF-κB 信号通

路促进肿瘤细胞的生长及侵袭。

本研究结果显示, 在脑胶质瘤组织中, 无论在基因水平还是在蛋白水平均可检测到 MAGL 的表达, MAGL 的表达明显低于正常脑组织, 并且与胶质瘤的病理级别呈负相关。该结果与上述大多数恶性肿瘤表达情况不一致, 推测在胶质瘤中, 内源性大麻素 2-AG 及其配体 CB2 受体异常高表达^[9], 而胶质瘤细胞为了维持其高侵袭性, 一方面通过分解大量的脂质来提高 FFAs 水平, 促使下游促癌因子的释放; 另一方面通过分解内源性大麻素 2-AG, 抑制 CB2 受体的作用, 上述 2 个过程中作为关键酶的 MAGL 均被消耗, 因此导致高级别胶质瘤中 MAGL 的表达更低, 这也从另一种角度证实 Nomura 的观点: MAGL 是通过调控脂肪酸系统赋予癌细胞侵袭性, 而非 MAGL 自身的作用。由此可以推测, MAGL 参与了脑胶质瘤的发生、发展过程, 检测 MAGL 的表达可评价脑胶质瘤的恶性行为, 为脑胶质瘤的临床治疗和预后提供参考依据。目前, MAGL 已成为肝癌治疗的一个新的治疗靶点及预后指标^[10], 因此, 深入探讨 MAGL 在脑胶质瘤发生、发展中的致病机制具有深远的意义。

REFERENCES

- [1] ZHANG X L, JIANG F, GONG Q Y, et al. Expression of fatty acid amide hydrolase in brain glioma and its significance [J]. Zhejiang Med J(浙江医学), 2013, 35(4): 268-270.
- [2] KING A R, DOTSEY E Y, LODOLA A, et al. Discovery of potent and reversible monoacylglycerol lipase inhibitors [J]. Chem Biol, 2009, 16(10): 1045-1052.
- [3] NOMURA D K, LONG J Z, Niessen S, et al. Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis [J]. Cell, 2010, 140(1): 49-61.
- [4] GUIDA M, LIGRESTI A, DE FILIPPIS D, et al. The levels of the endocannabinoid receptor CB2 and its ligand 2-arachidonoylglycerol are elevated in endometrial carcinoma [J]. Endocrinology, 2010, 151(3): 921-928.
- [5] YE L, ZHANG B, SEVIOUR E G, et al. Monoacylglycerol lipase (MAGL) knockdown inhibits tumor cells growth in colorectal cancer [J]. Cancer Lett, 2011, 307(1): 6-17.
- [6] MA M, BAI J, LING Y, et al. Monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 regulates apoptosis and migration of colorectal cancer cells [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(3): 2850-2856.
- [7] QIN Y, LIAN Z R, QIN F, et al. The expression and clinical significance of MAGL in human primary hepatocellular carcinoma [J]. Guangdong Med J(广东医学), 2012, 33(18): 2746-2749.
- [8] ZHU W, ZHAO Y, ZHOU J, et al. Monoacylglycerol lipase promotes progression of hepatocellular carcinoma via NF-κB-mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. J Hematol Oncol, 2016, 9(1): 127.
- [9] WU X, HAN L, ZHANG X, et al. Alteration of endocannabinoid system in human gliomas [J]. J Neurochem, 2012, 120(5): 842-849.
- [10] ZHANG J, LIU Z, LIAN Z, et al. Monoacylglycerol lipase: a novel potential therapeutic target and prognostic indicator for hepatocellular carcinoma [J]. Sci Rep, 2016(6): 35784.

收稿日期: 2017-08-14

(本文责编: 曹粤锋)