

# MGMT 甲基化及 TERT 突变对高级别胶质瘤无进展生存期的意义

曹 明 徐培坤 李庆新 洪 洋 侯保森 刘兴瑞

**摘要** 目的 研究高级别胶质瘤(HGG)组织中O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(MGMT)启动子甲基化及端粒酶逆转录酶(TERT)启动子突变情况,判断其对于患者无进展生存期(PFS)的影响。方法 收集HGG患者的MGMT启动子甲基化及TERT启动子突变情况、PFS,运用 $\chi^2$ 检验明确MGMT启动子甲基化及TERT启动子突变与胶质瘤WHO分级之间、MGMT启动子甲基化与TERT启动子突变之间有无关联,运用Kaplan-Meier生存曲线分析MGMT启动子甲基化及TERT启动子突变对于患者PFS的影响。结果 MGMT启动子甲基化率及TERT启动子突变率与胶质瘤WHO分级之间无明显相关,MGMT甲基化胶质瘤患者PFS较非甲基化患者长( $P=0.001$ ),TERT启动子突变型胶质瘤患者PFS较野生型短( $P=0.041$ ),MGMT非甲基化-TERT突变型患者预后最差。结论 MGMT启动子及TERT启动子状态可作为HGG患者PFS的检测指标,联合检测具有更精准的预测价值及治疗意义。

**关键词** 高级别胶质瘤;MGMT;TERT;Kaplan-Meier生存曲线

中图分类号 R 739.41

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)04-0626-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.04.025

神经胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤,多呈浸润性生长,术后常规的病理仅能进行肿瘤组织学分级,但相同的肿瘤病理分级常有着不同的生存表现和预后。近年肿瘤的分子病理诊断逐渐引起重视,分子病理诊断结合组织学诊断更能显示肿瘤的精确分级并对患者的预后判断有着较为明显的指导意义<sup>[1]</sup>,目前常用的分子标志物有O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(O6-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)、异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH)、染色体1p19q、抑癌基因p53

等<sup>[2]</sup>。该研究从高级别胶质瘤(high-grade glioma, HGG)中MGMT启动子甲基化和端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)启动子突变与否入手,分析其在HGG的表达情况,相互之间是否关联及对于患者无进展生存期(progression-free survive, PFS)的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料及标本来源** 选取安徽医科大学第一附属医院神经外科自2016年9月~2017年12月经影像学诊断的HGG病例,收集其术中部分肿瘤组织,并迅速转移至相应的储存液中进行保存,术前告知患者家属检测项目并同意后,肿瘤组织分别送病理科检常规病理和中心实验室检分子病理并分别记录检测结果。病例纳入标准:①手术次全或完全切除肿瘤,且术后72h内经增强磁共振(magnetic resonance image, MRI)证实;②术后病理证实为HGG;③有详细的病历及随访资料。排除标准:①因术后并发症死亡或自动出院;②有着严重的基础疾病不能耐受后续治疗;③合并有其他部位肿瘤。

## 1.2 检测方法

**1.2.1 基因组DNA提取** 本实验组DNA提取采用德国QIAGEN公司生产的DNA提取试剂盒(Cat No. 69505),严格按照试剂盒说明书的要求进行操作,并采用紫外分光光度计(基因科技上海有限公司)进行质检提取DNA浓度( $10\text{ ng}/\mu\text{l} \leq \text{浓度} \leq 100\text{ ng}/\mu\text{l}$ )。

**1.2.2 MGMT甲基化检测** ①DNA重亚硫酸盐转化:取30 $\mu\text{l}$ 待测样本DNA至PCR反应管中,按样本数量取相应管数的重亚硫酸盐(8样本/管),向每管中加入0.65ml转化液A(氢氧化钠),充分振荡混合;向样品及对照管中分别加入60 $\mu\text{l}$ 完全溶解的重亚硫酸盐溶液及10 $\mu\text{l}$ 转化液B(变性剂、pH指示剂),振荡混匀反应液;将反应管置于PCR仪中95 $^{\circ}\text{C}$  5min、60 $^{\circ}\text{C}$  1h共计5个循环,反应结束后20 $^{\circ}\text{C}$ 温浴保存后按步骤将转化产物进行提纯。

2018-12-10 接收

基金项目:安徽省科技攻关计划项目(编号:1301042208)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院神经外科,合肥 230022

作者简介:曹 明 男 硕士研究生;

徐培坤 男 主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: xpkayfy@163.com

② PCR 扩增: 在 96 孔反应板中分别加入 27  $\mu\text{l}$  反应液, 再将 3  $\mu\text{l}$  重亚硫酸盐转化 DNA 样本和空白对照分别加入相应反应孔中; 将 PCR 反应板放入 PCR 仪中, 先 95  $^{\circ}\text{C}$  3 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 54  $^{\circ}\text{C}$  20 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s (50 个循环), 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min 进行扩增; PCR 反应结束后, 取出反应板, 其产物直接进行焦磷酸测序 (Pyrosequencing) 反应; ③ Pyrosequencing 测序: 将 PCR 反应板置于振荡器中振荡混和 5 min, 在测序板的每个反应孔中分装 40  $\mu\text{l}$  测序反应液, 采用配套的单链纯化装置从 PCR 反应液中分离单链 DNA; 将测序反应板置于 80  $^{\circ}\text{C}$  温浴 2 min, 转移至室温冷却后, 置于 Pyrosequencing 测序仪中; 采用 PyroMark Q96 软件设定胞嘧啶 (cytosine) -磷酸 (phosphate) -鸟嘌呤 (guanine) (CpG) 测序程序, 分析位点为 YGTTTTGYGTTYGAYGTTYGTAGTTTTYGYGGTGYGTA, 在样本及对照中按指定位置加入测序酶、Subtract、dATP、dCTP、dGTP、dTTP, 运行程序, 采用 PSQ-96MA/PyroMark ID 焦磷酸测序仪配套的 CpG 分析软件进行数据分析。MGMT 基因启动子区 8 个 CpG 位点的甲基化程度以百分率的形式显示在相对应的位点上, 一般将界限 (Cutoff) 值设定为 8%。分析结果见图 1~3。

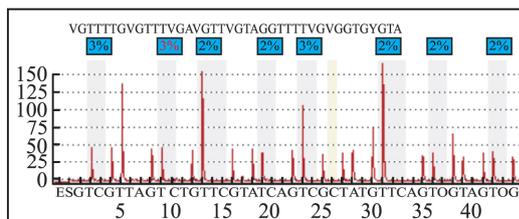


图 1 正常人 MGMT 样本参考图谱

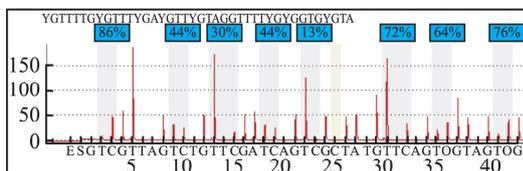


图 2 MGMT 甲基化样本检测图谱

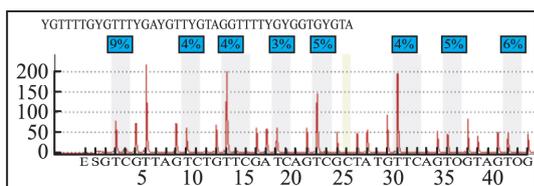


图 3 MGMT 非甲基化样本检测图谱

1.2.3 TERT 突变检测 ① 取出 TERT 测序反应液 1、GC PCR MIX3, 室温融化并震荡均匀后予以 2 000 r/min 离心 10 s, 从样本 DNA 液中取出 3  $\mu\text{l}$

加至测序反应液 1 的离心管中, 予以 42  $^{\circ}\text{C}$  5 min、94  $^{\circ}\text{C}$  5 min、94  $^{\circ}\text{C}$  30 s、58  $^{\circ}\text{C}$  30 s、72  $^{\circ}\text{C}$  60 s (20 个循环进行) 扩增; ② 取出 TERT 测序反应液 2、GC PCR MIX3, 按照上述步骤及条件予以 10 个循环进行扩增, 再将 PCR 扩增标本取出 5  $\mu\text{l}$ , 加入 2  $\mu\text{l}$  SAP 混合物、混匀, 予以 37  $^{\circ}\text{C}$  60 min、80  $^{\circ}\text{C}$  15 min 进行酶解; ③ 取出酶解产物 3  $\mu\text{l}$ 、测序试剂 1  $\mu\text{l}$  和测序引物 2  $\mu\text{l}$  进行 PCR 扩增, 条件为 96  $^{\circ}\text{C}$  1 min、96  $^{\circ}\text{C}$  10 s、50  $^{\circ}\text{C}$  5 s、60  $^{\circ}\text{C}$  4 min (25 次循环), 恒温 4 min, 后将产物进行提纯; ④ 将提纯的产物置于基因分析仪上测序, 使用测序分析软件 Chromas 进行分析, 核苷为 CCCCCTCCCAGCCCCTCCCGGGTCCC CGGCCAGCCCCCTCCGGGCCCTCCCAGCCCCT 标记处第一个为 C250T、第二个为 C228T 可能突变位置。结果见图 4~5。

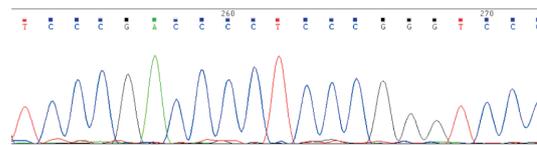


图 4 TERT 野生型图谱

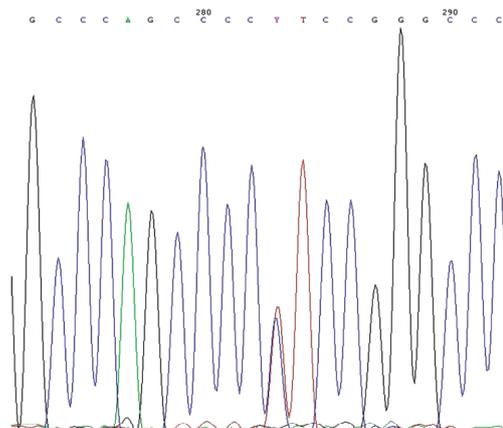


图 5 TERT C228T 突变图谱

1.3 随访 通过查阅病历、电话咨询、门诊随访等方式, 对于纳入本研究的患者进行一般资料及治疗后情况调查, 记录患者 PFS, PFS 定义为自手术之日起至复发或随访截止时间 (2018 年 5 月 31 日)。

1.4 一般资料描述 符合标准的病例共 43 例, 其中 WHO III 级胶质瘤有 17 例, WHO IV 级胶质瘤 26 例 (胶质母细胞瘤 20 例); 男 33 例, 女 10 例; 年龄 19~78 岁, 中位年龄 54 岁; PFS 范围在 2~16 个月, 中位 PFS 为 8.3 个月; MGMT 启动子甲基化 (MGMT-methylation, MGMT-met) 18 例, MGMT 启动子非甲基化 (MGMT-unmethylation, MGMT-unmet) 25 例, TERT 启动子突变型 (TERT-mutation, TERT-mut)

24 例 ,TERT 启动子野生型( TERT-wildtype , TERT-wt) 19 例 ,进一步分为 4 组为 MGMT met/TERT wt 8 例( 组别 1) ,MGMT met/TERT mut 10 例( 组别 2) ,MGMT unmet/TERT wt 11 例( 组别 3) ,MGMT unmet/TERT mut 14 例( 组别 4) 。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析 ,采用  $\chi^2$  检验分别分析 MGMT 启动子与 TERT 启动子之间的关联、二者与 WHO 分级之间的关联 ,MGMT 启动子甲基化及 TERT 启动子突变与患者 PFS 的关系采用 Kaplan-Meier 生存曲线表示 ,以 Log-rank 进行分析 ,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

2.1 MGMT 启动子甲基化与 HGG PFS 分析 在 43 例 HGG 中 ,WHO III 级有 17 例( MGMT 甲基化 6 例) ,WHO IV 级胶质瘤 26 例( MGMT 甲基化 12 例) ,WHO III 级和 WHO IV 级胶质瘤之间的 PFS 差异无统计学意义( 中位 PFS: 7.6 vs 9.7  $P = 0.548$ ) ,MGMT 启动子甲基化发生率在 WHO III-IV 级之间差异无统计学意义(  $\chi^2 = 0.498$  , $P = 0.480$ ) 。MGMT 启动子甲基化患者的 PFS 长于非甲基化患者 ,差异有统计学意义( 中位 PFS: 11.4 vs 5.0  $P = 0.001$ ) 。见图 6A。

2.2 单独 TERT 启动子突变与高级别胶质瘤 PFS 的分析 在 43 例 HGG 中 ,WHO III 级有 17 例( TERT 启动子突变 7 例) ,WHO IV 级胶质瘤 26 例( TERT 启动子突变 17 例) ,TERT 启动子突变率在 WHO III-IV 级之间差异无统计学意义(  $\chi^2 = 2.443$   $P = 0.118$ ) ,TERT 启动子野生型患者的 PFS 长于突变型( 中位 PFS: 9.7 vs 7.0  $P = 0.041$ ) 。见图 6B。

2.3 MGMT 及 TERT 联合对于判断 HGG 别患者预后的意义 本研究中 HGG 患者 MGMT 启动子甲基化( MGMT met) 18 例 ,非甲基化( MGMT unmet) 25 例 ,TERT 启动子突变型( TERT mut) 24 例 ,野生型( TERT wt) 19 例 ,MGMT 启动子甲基化与 TERT 启动子突变之间相关性无统计学意义(  $\chi^2 = 0.001$  , $P = 0.977$ ) 。进一步分为 4 组并分别对其 PFS 进行分析 ,4 组患者 PFS 的差异有统计学意义(  $P = 0.001$ ) ,MGMT 非甲基化/TERT 突变型患者( 组别 4) 预后最差 ,但 MGMT met/TERT wt( 组别 1) 与 MGMT met/TERT mut( 组别 2) PFS 之间差异无统计学意义(  $P = 0.194$ ) 。见图 7。

### 3 讨论

MGMT 是一种可以编码修复 DNA 的酶 ,其过度

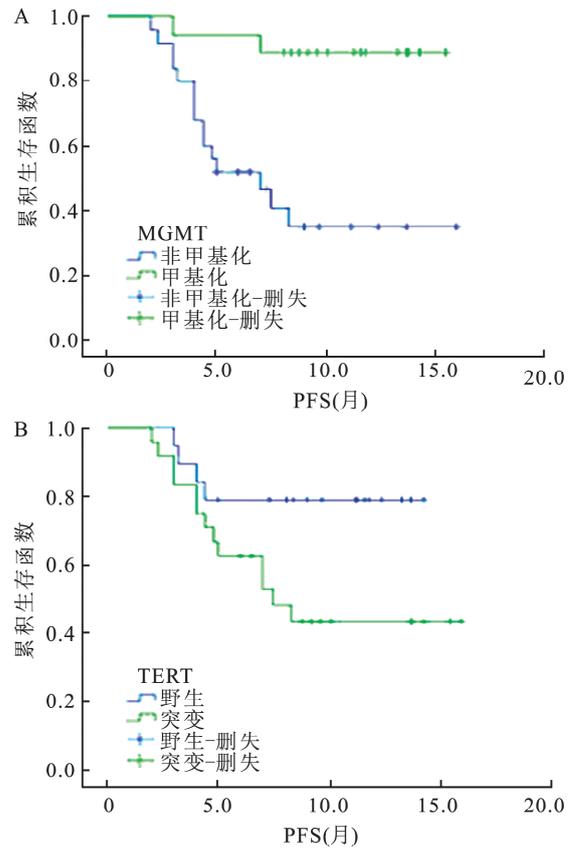


图6 MGMT 甲基化、TERT 突变与 HGG PFS 相关性分析  
A: MGMT; B: TERT

表达可以保护肿瘤染色体免受烷化剂损伤 ,使得肿瘤对于烷化剂耐药<sup>[3]</sup> ,但其启动子甲基化后可以沉默基因及抑制蛋白表达 ,使肿瘤细胞对于化疗敏感 ,增强杀灭肿瘤细胞的目的<sup>[4]</sup> 。与较多研究相同 ,本研究表明 MGMT 甲基化患者 PFS 长于非甲基化患者。

端粒酶是一种可以延长染色体端粒结构的酶 , TERT 是其中的催化亚单位 ,当 TERT 启动子区突变可使得其过度表达 ,使得端粒酶能够多次高效快速地延伸端粒 ,染色体在分裂过程中不再因端粒的逐渐短缩而使得细胞衰老死亡 ,由此可促进肿瘤的发生发展<sup>[5-6]</sup> 。本研究采用单因素分析方法分析显示突变型患者的 PFS 较野生型短 ,差异有统计学意义 ,与李瑞等<sup>[7]</sup> 报道的 TERT 突变型与胶质母细胞瘤患者 PFS 并无确切关系有所差别 ;国内外也有文献<sup>[6,8-10]</sup> 报道 ,TERT 突变型及胶质瘤细胞中端粒较长 ,提示胶质瘤患者的预后较差 ,TERT 启动子突变在单因素分析中有着统计学意义 ,但多因素分析并没有显著的统计学意义 ,这种结果可能与影响胶质瘤患者预后的分子因素较多有关 ,暗示了 TERT 需要联合其他分子病理标志物进行分析。

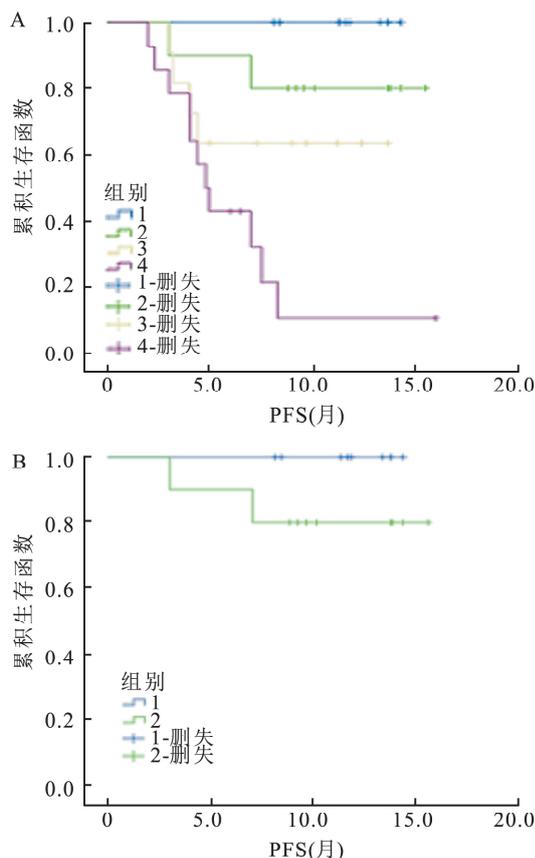


图7 不同分组与 HGG PFS 相关性分析

A: 各组之间 PFS; B: 组 1 与组 2 之间 PFS; 1: MGMT met/TERT wt 组; 2: MGMT met/TERT mut 组; 3: MGMT unmet/TERT wt 组; 4: MGMT unmet/TERT mut 组

有文献<sup>[2, 8]</sup>表明术后仅进行放疗的 TERT 启动子突变型患者 2 年生存时间少于野生型, MGMT 甲基化能够增加放化疗的敏感性, 同时 MGMT 非甲基化/TERT 突变型的胶质瘤对于常规放化疗存在一定的抵抗性<sup>[11]</sup>, 因此将其联合检测对于分析患者预后有着更加精准的意义。考虑本研究对于 HGG 患者总生存期的随访时间较短, 仅进行 PFS 的探讨, 结果表明 MGMT 启动子甲基化或 TERT 野生型患者的 PFS 均较长, 同时 MGMT 甲基化与 TERT 突变的发生率之间并无明显相关, 与 Lotsch et al<sup>[10]</sup> 和 Nencha et al<sup>[12]</sup> 报道二者之间发生率无关联有相同之处; 进一步将其分为 4 个组别后, 显示 4 组患者 PFS 之间的差异有统计学意义 ( $P = 0.001$ ); MGMT 甲基化/TERT 野生型患者 (组别 1) 与 MGMT 甲基化/TERT 突变型患者 (组别 2) PFS 之间的差异无统计学意义 ( $P = 0.194$ ), 可能与其他基因突变相关; 文献<sup>[13]</sup> 表明在接受正规放化疗的 IDH 野生型胶质母细胞瘤患者中, MGMT 甲基化-TERT 突变型患者预后最好。这表明了 TERT 启动子状态有着多重意

义, 难以简单定论, 联合其他标志物有着成为预测患者生存期标志物的价值。

现阶段术后病理证实为 HGG 的患者多进行联合放化疗方案后继续行替莫唑胺化疗, 进行多基因检测对进行个体化治疗有着较为重要的作用, MGMT 非甲基化对常规替莫唑胺化疗有一定的抵抗性, 有文献<sup>[14-15]</sup> 表明可以应用分子抑制剂、基因疗法及免疫疗法等控制 TERT 的表达以达到重新使胶质瘤细胞中的端粒缩短、减少细胞增殖的目的, TERT 启动子可以作为另外的靶点进行治疗<sup>[11]</sup>。

## 参考文献

- [1] 李智. 2016 版世界卫生组织中枢神经系统肿瘤分类实践解读 I (胶质源性肿瘤部分) [J]. 广东医学 2017, 38(1): 3-8.
- [2] Bush N A, Butowski N. The effect of molecular diagnostics on the treatment of glioma [J]. Curr Oncol Rep 2017, 19(4): 26.
- [3] 常丙林. 恶性脑胶质瘤组织 MGMT 的表达及临床意义 [J]. 中国临床神经外科杂志 2017, 22(3): 171-3.
- [4] 宣自学, 袁守军, 王维, 等. MGMT 基因甲基化检测在神经胶质瘤治疗中的应用 [J]. 肿瘤学杂志 2016, 22(10): 850-5.
- [5] 刘浚坤, 刘俊文. 端粒酶反转录酶启动子突变在肿瘤发生中的研究进展 [J]. 医学综述 2016, 22(14): 2755-8.
- [6] Vinagre J, Pinto V, Celestino R, et al. Telomerase promoter mutations in cancer: an emerging molecular biomarkers [J]. Virchows Arch 2014, 465(2): 119-33.
- [7] 李瑞. TERT 启动子突变在胶质瘤中的分布及预后分层研究 [D]. 南京: 南京医科大学 2016.
- [8] Gao K, Li G, Qu Y, et al. TERT promoter mutations and long telomere length predict poor survival and radiotherapy resistance in gliomas [J]. Oncotarget 2016, 7(8): 8712-25.
- [9] 何洁, 万经海, 李学记, 等. 胶质瘤中端粒酶逆转录酶启动子区突变分析及其预后意义 [J]. 癌变·畸变·突变, 2015, 27(5): 361-5.
- [10] Lotsch D, Ghanim B, Laaber M, et al. Prognostic significance of telomerase-associated parameters in glioblastoma: effect of patient age [J]. Neuro Oncol 2013, 15(4): 423-32.
- [11] Arita H, Yamasaki K, Matsushita Y, et al. A combination of TERT promoter mutation and MGMT methylation status predicts clinical relevant subgroups of newly diagnosed glioblastomas [J]. Acta Neuropathol Commun 2016, 4(1): 79.
- [12] Nencha U, Rahimian A, Giry M, et al. TERT promoter mutations and rs2853669 polymorphism: prognostic impact and interaction with common alterations in glioblastomas [J]. J Neurooncol 2016, 126(3): 441-6.
- [13] Nguyen H N, Lie A, Li T, et al. Human TERT promoter mutation enables survival advantage from MGMT promoter methylation in IDH1 wild-type primary glioblastoma treated by standard chemoradiotherapy [J]. Neuro Oncol 2017, 19(3): 394-404.
- [14] Popli D B, Sircar K, Chowdhry A. Telomerase: an exploration toward the end of cancer [J]. Indian J Dent Res 2017, 28(5): 574-84.
- [15] 解静蕾, 侯卜, 张超, 等. 端粒酶抑制剂研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报 2017, 34(9): 817-24.

# 皮质下缺血性血管病患者 ApoE 基因多态性及血清亲环素 A 浓度对认知障碍的影响

王 瑶<sup>1</sup>,倪明珠<sup>1</sup>,刘文灿<sup>1</sup>,宋莉莉<sup>1</sup>,王兆平<sup>2</sup>,王文静<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨皮质下缺血性血管病(SIVD)患者载脂蛋白 E(ApoE) 基因多态性及血清亲环素 A(CypA) 浓度对认知障碍的影响。方法 选取 SIVD 患者 126 例,根据头颅磁共振(MRI) 表现评定患者白质病变(WML) 程度以及腔隙性梗死(LI) 数目。使用蒙特利尔认知评估量表(MoCA)、日常生活活动力量表(ADL)、哈金斯基缺血指数量表(HIS)、汉密顿抑郁量表(HAMD) 进行神经心理学评估,分为皮质下缺血性血管病认知障碍组(SVCI) 和皮质下缺血性血管病无认知障碍组(SNCI),并检测两组 ApoE 基因多态性及血清 CypA 浓度。结果 ① SVCI 组血清 CypA 浓度明显高于 SNCI 组( $P < 0.01$ ); ② SVCI 组中 ApoE 3/4 基因型及  $\epsilon 4$  等位基因频率(25.6%/20.7%) 显著高于 SNCI 组(6.8%/

6.8%) ,ApoE 3/3 基因型及  $\epsilon 3$  等位基因频率(51.2%/70.1%) 明显低于 SNCI 组(81.8%/88.6%) ,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); ③  $\epsilon 4$  等位基因携带者血清 CypA 浓度显著高于  $\epsilon 4$  等位基因非携带者( $P < 0.01$ ); ④ logistic 回归分析显示: 高血压、血清总胆固醇水平增加、血清 CypA 浓度的增加以及携带  $\epsilon 4$  等位基因,均可增加 SVCI 的发病风险( $P < 0.05$ )。结论 携带  $\epsilon 4$  等位基因及血清 CypA 浓度升高对 SVCI 的发生、发展可能具有一定促进作用,检测 ApoE 基因及血清 CypA 浓度或许可以为早期诊断 SVCI 提供部分理论依据。

**关键词** 皮质下缺血性血管性认知障碍; ApoE 基因多态性; 亲环素 A

中图分类号 R 743.9; R 394.5; R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)04-0630-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.04.026

2018-12-10 接收

基金项目: 安徽省卫生厅医学科研课题(编号: 13zc032)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学附属省立医院神经内科,合肥 230001

<sup>2</sup> 蚌埠市第一人民医院神经内科,蚌埠 233000

作者简介: 王 瑶,女,住院医师,硕士研究生;

王文静,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-

mail: wangwj1961@aliyun.com

皮质下缺血性血管性认知障碍(subcortical ischemic vascular disease with cognitive impairment, SVCI) 是血管性认知障碍的主要亚型之一,是引起老

## Significance of MGMT methylation and tert mutation in the progression-free survival of high grade gliomas

Cao Ming, Xu Peikun, Li Qingxin, et al

(Dept of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To determine the significance of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation and telomerase reverse transcriptase (TERT) promoter mutation on patients with progression-free survival (PFS) in high grade glioma tissue. **Methods** Collecting the MGMT promoter and TERT promoter of patients with high grade glioma,  $\chi^2$  test was used to determine whether if there was correlation between MGMT promoter/TERT promoter and glioma WHO classification or between MGMT promoter and TERT promoter, and Kaplan-Meier survival curve was used to determine the effects of the MGMT promoter or/and TERT promoter in patients with progression-free survival. **Results** There was no significant correlation between WHO classification and MGMT promoter methylation/TERT promoter mutation. The PFS of patients with MGMT promoter methylation was longer than those patients with MGMT promoter unmethylation( $P = 0.001$ ), and the PFS of patients with TERT promoter mutation was shorter than those patients with TERT promoter wildtype( $P = 0.041$ ). Patients with unmethylated MGMT-mutated TERT had the worst prognosis. **Conclusion** The state of MGMT promoter and TERT promoter can be used as prognostic indicator of high grade glioma, and combined detection has more accurate prognostic value and therapeutic significance.

**Key words** high grade glioma; MGMT; TERT; Kaplan-Meier survival curve