

【临床研究】

通信作者:李 鑫(1982-),男,陕西乾县人,学士,主治医师,研究方向:神经系统肿瘤的诊断与治疗;E-mail:357343097@qq.com。

patients were analyzed by univariate and multivariate Cox regression models. **Results** Among the 90 glioma patients, the positive rate of MGMT gene promoter methylation in glioma tissues and peritumoral tissues was 43.33% (39/90) and 4.44% (4/90), respectively. The positive rate of MGMT gene promoter methylation in glioma tissues was significantly higher than that in the adjacent tissue ($\chi^2 = 37.430, P < 0.05$). The positive rate of MGMT gene promoter methylation in glioma tissues of 75 patients with recurrence was 42.86% (30/70), and the positive rate of MGMT gene promoter methylation in glioma tissues of 15 patients without recurrence was 60.00% (9/15). The positive rate of MGMT gene promoter methylation in glioma tissues of patients with recurrence was significantly lower than that of patients without recurrence ($\chi^2 = 6.978, P < 0.05$). The PFS and OS of 39 patients with positive MGMT gene promoter methylation in glioma tissues were (58.69 ± 3.36) and (82.36 ± 4.56) weeks, respectively. The PFS and OS of 51 patients with negative MGMT gene promoter methylation in glioma tissues were (52.74 ± 3.08) and (78.76 ± 4.01) weeks, respectively. The PFS and OS of patients with positive MGMT gene promoter methylation in glioma tissues were significantly longer than those of negative patients ($t = 8.730, 3.932; P < 0.05$). Up to 36 months after surgery, among the 90 patients, 28 patients survived and 62 patients died. Univariate analysis results showed that the age, surgical resection method, tumor clinical stage and MGMT gene promoter methylation were related to the survival of patients with glioma ($P < 0.05$), while the gender, tumor diameter, Karnofsky score, tumor histology type and tumor location were not related to the survival of patients with glioma ($P > 0.05$). Cox regression model analysis showed that the age > 40 years old and subtotal resection were the independent risk factors for the survival of patients with glioma ($P < 0.05$), and the MGMT gene promoter methylation was a protective factor for survival of patients with glioma ($P < 0.05$). **Conclusion** The MGMT gene promoter methylation can improve the sensitivity of glioma patients to chemotherapy, it is a protective factor for the survival of patients with glioma.

Key words: glioma; O6-methylguanine-DNA methyltransferase; methylation; chemotherapy; sensitivity

脑胶质瘤是原发于中枢神经系统的恶性肿瘤,可呈浸润性生长,具有高度恶性转化趋势,由于脑组织结构功能复杂,手术切除的范围有限,患者预后较差^[1]。化学治疗是脑胶质瘤的重要补充手段,烷化剂是目前脑胶质瘤的常用化学治疗药物,具有可透过血脑屏障、毒副作用小等特点,但部分患者因肿瘤耐药而导致化学治疗失败,预后不佳^[2]。研究显示,肿瘤耐药的发生与肿瘤细胞内源性或化学治疗诱导的耐药基因表达有关^[3]。甲基化是DNA修饰的一种形式,可以在不改变DNA序列的情况下导致相关基因功能的缺失,是目前研究的癌症治疗靶点之一。O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(O6-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)是机体修复烷基加合物的关键酶,烷化剂可导致DNA-O6位烷基化合物形成,使鸟嘌呤O6位甲基化,修复DNA损伤^[4]。有研究显示,MGMT基因与脑胶质瘤患者的预后有关^[5],但其甲基化后对脑胶质瘤患者化学治疗敏感性及预后的影响仍有待探讨。本研究采用甲基化特异性聚合酶链反应(methylation specific polymerase chain reaction, MSP)法检测胶质瘤组织中MGMT基因启动子甲基化水平,探讨MGMT基因启动子甲基化对脑胶质瘤患者化学治疗敏感性及预后的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2014年1月至2017年8月延安大学咸阳医院收治的脑胶质瘤患者为研究对

象。病例纳入标准:(1)原发性肿瘤;(2)所有患者行手术切除治疗,术后留取新鲜胶质瘤组织和瘤旁组织标本,保存于液氮中备用;(3)术后给予同步放射治疗、化学治疗联合替莫唑胺辅助治疗;(4)术后组织病理学检查证实为脑胶质瘤。排除标准:(1)患者预计生存期<6个月;(2)Karnofsky评分<60分;(3)有放射治疗、化学治疗禁忌证。本研究共纳入脑胶质瘤患者90例,男51例,女39例;年龄26~75(58.65 ± 8.50)岁;世界卫生组织中枢神经系统肿瘤分级^[6]:Ⅱ级18例,Ⅲ级46例,Ⅳ级26例;组织学类型:星形胶质细胞瘤43例,少枝细胞瘤22例,室管膜瘤17例,混合胶质瘤8例。本研究通过医院医学伦理委员会批准,所有患者和(或)家属签署知情同意书。

1.2 MSP法检测胶质瘤组织和瘤旁组织中MGMT基因启动子甲基化水平 取液氮中保存的胶质瘤组织和瘤旁组织,裂解液裂解,使用GenElute™哺乳动物基因组DNA提取试剂盒(美国默克公司)提取样本DNA;10 g·L⁻¹琼脂糖凝胶电泳和Multiskan FC光吸收分光光度计(赛默飞世尔科技中国有限公司)检测DNA浓度及纯度,抽提的DNA以亚硫酸氢钠修饰处理,修饰后未发生甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶,甲基化胞嘧啶保持不变;以甲基化的DNA为模板,设计MGMT基因甲基化和非甲基化引物序列,进行MSP检测。甲基化引物序列:正向为5'-TAAGTGTGTCATGCTAATCCGTTAACAGT-3',反向为5'-CTATCTGAGGAATCCAAGCTGCTGCTA-3';非甲

基化引物序列:正向为 5'-GATTGATCTGTGGATAGT-CATGCTTAAT-3',反向为 5'-AAGTCCTAGCTAGGACAT-AGTGCTGAT-3';引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,进行聚合酶链式反应扩增,反应条件:95 ℃ 预变性 10 min;94 ℃ 变性 40 s,52 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,重复 35 个循环;72 ℃ 再延伸 5 min。以 CpG 甲基转移酶(赛默飞世尔科技中国有限公司)处理的胎盘 DNA 和正常外周血淋巴细胞 DNA 作为非甲基化和甲基化对照,扩增产物经 25 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳分离,紫外凝胶成像系统观察。分离条带中出现非甲基化条带扩增但无甲基化条带扩增则为甲基化阴性,有甲基化条带或甲基化与非甲基化条带均出现则为甲基化阳性。

1.3 治疗方案 所有患者行手术治疗,术后行同步放射治疗、化学治疗联合替莫唑胺辅助治疗,放射治疗期间给予替莫唑胺胶囊(芬兰 Orion Corporation,进口药品注册证号 H20171091)75 mg · m⁻²,口服,每日 1 次,连续服用 42 d;放射治疗结束后给予替莫唑胺胶囊 150 mg · m⁻²,口服,每日 1 次,连续 5 d,停药 23 d,28 d 为 1 个周期,连续治疗 6 个周期。

1.4 术后随访 所有患者术后以复查、电话等方式进行随访 36 个月,记录患者的复发、无进展生存期(progression free survival, PFS)和总生存期(overall survival, OS)情况。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较采用 *t* 检验;计数资料以例数和百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,分析脑胶质瘤患者的生存情况;采用 log-rank 检验,以 Cox 回归模型分析影响脑胶质瘤患者生存的危险因素;*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胶质瘤组织与瘤旁组织中 MGMT 基因启动子甲基化阳性率比较 90 例脑胶质瘤患者中,胶质瘤组织中 MGMT 基因启动子甲基化阴性 51 例,阳性 39 例,阳性率为 43.33% (39/90);瘤旁组织中 MGMT 基因启动子甲基化阴性 86 例,阳性 4 例,阳性率为 4.44% (4/90);胶质瘤组织中 MGMT 基因启动子甲基化阳性率显著高于瘤旁组织,差异有统计学意义($\chi^2 = 37.430, P < 0.05$)。

2.2 MGMT 基因启动子甲基化状态与化学治疗敏感性的关系 90 例脑胶质瘤患者中,未复发 15 例,复发 75 例,复发率为 83.33% (75/90);75 例复发患者胶质瘤组织中 MGMT 基因启动子甲基化阳性 30 例,阳性率为 42.86% (30/70);15 例未复发患者胶

质瘤组织中 MGMT 基因启动子甲基化阳性 9 例,阳性率为 60.00% (9/15);复发患者胶质瘤组织中 MGMT 基因启动子甲基化阳性率显著低于未复发患者,差异有统计学意义($\chi^2 = 6.978, P < 0.05$)。

2.3 MGMT 基因启动子甲基化状态与脑胶质瘤患者生存的关系 39 例胶质瘤组织中 MGMT 基因启动子甲基化阳性患者的 PFS、OS 分别为 (58.69 ± 3.36)、(82.36 ± 4.56) 周,51 例胶质瘤组织中 MGMT 基因启动子甲基化阴性患者的 PFS、OS 分别为 (52.74 ± 3.08)、(78.76 ± 4.01) 周;胶质瘤组织中 MGMT 基因启动子甲基化阳性患者的 PFS、OS 显著长于阴性患者,差异有统计学意义(*t* = 8.730、3.932, *P* < 0.05)。

2.4 脑胶质瘤患者生存影响因素单因素分析 结果见表 1。截至术后 36 个月,90 例患者中存活 28 例,死亡 62 例。单因素生存分析显示,年龄、手术切除方式、肿瘤临床分期、MGMT 基因启动子甲基化状态与脑胶质瘤患者生存有关(*P* < 0.05),而性别、肿瘤直径、Karnofsky 评分、肿瘤组织学类型、肿瘤部位与脑胶质瘤患者生存无关(*P* > 0.05)。

表 1 脑胶质瘤患者生存影响因素单因素分析
Tab.1 Univariate analysis of influencing factors on survival of patients with glioma

因素	<i>n</i>	存活(<i>n</i> = 28)	死亡(<i>n</i> = 62)	χ^2	<i>P</i>
性别					
男	51	17(60.71)	34(54.84)	0.271	0.552
女	39	11(39.29)	28(45.16)		
年龄					
≤40 岁	31	15(53.57)	16(25.81)	6.585	0.010
>40 岁	59	13(46.43)	46(74.19)		
肿瘤直径					
≤5 cm	33	13(46.43)	20(32.26)	1.668	0.197
>5 cm	57	15(53.57)	42(67.74)		
Karnofsky 评分					
≤70 分	43	10(35.71)	33(53.23)	2.371	0.124
>70 分	47	18(64.29)	29(46.77)		
手术切除方式					
全切	36	17(60.71)	19(30.65)	7.267	0.007
次全切	54	11(39.29)	43(69.35)		
肿瘤临床分期					
I、II 期	18	11(39.29)	7(11.29)	9.448	0.002
III、IV 期	72	17(60.71)	55(88.71)		
肿瘤组织学类型					
星形胶质细胞瘤	43	11(39.29)	32(51.61)	0.685	0.727
少枝细胞瘤	22	8(28.57)	14(22.58)		
室管膜瘤	17	6(21.43)	11(17.74)		
混合胶质瘤	8	3(10.71)	5(8.06)		
肿瘤部位					
幕上	65	21(75.00)	44(70.97)	1.040	0.595
幕下	14	5(17.86)	9(14.52)		
脑桥	11	2(7.14)	9(14.52)		
MGMT 基因启动子甲基化状态					
阳性	44	20(71.43)	24(38.71)	8.264	0.004
阴性	46	8(28.57)	38(61.29)		

2.5 脑胶质瘤患者生存影响因素 Cox 回归分析

结果见表 2。Cox 回归模型分析显示,年龄 > 40 岁、手术次全切是影响脑胶质瘤患者生存的独立危险因

表 2 脑胶质瘤患者生存影响因素 Cox 回归分析

Tab.2 Cox regression analysis of influencing factors of survival in patients with glioma

因素	B	SE	Wald χ^2	风险比	95% 置信区间		P
					下限	上限	
年龄 > 40 岁	1.985	0.901	4.854	7.279	2.379	9.521	0.001
手术次全切	1.857	0.889	4.363	6.404	2.365	7.854	0.001
MGMT 基因启动子甲基化阳性	0.281	0.330	0.725	0.786	0.414	0.954	0.012

3 讨论

中枢神经系统恶性肿瘤具有颅内广泛浸润、易转移等特点。即使采用全切手术治疗,术后仍有较高的复发风险,研究显示,脑胶质瘤患者采用早期手术切除联合术后辅助放射治疗、化学治疗,总体复发率仍可高达 70%,仅有约 50% 的患者术后生存时间超过 12 个月^[7]。随着肿瘤基因研究的发展,越来越多的相关分子标志物被发现与脑胶质瘤有关。美国国立综合癌症网络指南推荐对脑胶质瘤患者进行 MGMT 基因启动子甲基化、端粒酶反转录酶基因突变、编码 RAF 家族丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶基因突变等检测,为临床治疗方案的选择提供依据^[8]。MGMT 作为 DNA 修复酶可抵消烷化剂引起的肿瘤细胞 DNA 毒性,影响肿瘤细胞的耐药性。因此,了解 MGMT 基因启动子甲基化对脑胶质瘤化学治疗敏感性及预后的影响,对制定治疗方案、改善患者预后有重要意义。

因血脑屏障的存在,脑胶质瘤的化学治疗方案多以烷化剂为基础,烷化剂杀灭肿瘤细胞的机制是造成肿瘤细胞 DNA 的烷基化(甲基化、乙基化、氯乙基化等)损伤,阻断 DNA 的复制^[9]。MGMT 存在 2 个烷基受体,能接受烷化剂损伤后细胞 DNA-O6-烷基鸟嘌呤上的烷基,修复 DNA 的烷基化损伤,因此,对抗烷基化药物对肿瘤细胞的杀灭作用是肿瘤细胞产生耐药的主要原因^[10]。MGMT 基因的转录受其启动子区 CpG 岛嘧啶甲基化的影响,可使 MGMT 基因转录下调或停止。研究显示,MGMT mRNA、MGMT 蛋白和酶活性的高低可决定肿瘤细胞对烷基化的耐药性,其活性越高细胞对烷基化药物耐药越强^[11-13]。薛智文等^[14]研究发现,MGMT 基因启动子甲基化可影响非小细胞肺癌的化学治疗敏感性。本研究结果显示,胶质瘤组织中 MGMT 基因启动子甲基化阳性率显著高于瘤旁组织,提示脑胶

质瘤的发生伴有 MGMT 基因启动子甲基化;随访发现,复发患者胶质瘤组织中 MGMT 基因启动子甲基化阳性率低于未复发患者,提示 MGMT 基因启动子甲基化可抑制脑胶质瘤细胞的耐药性。本研究结果显示,胶质瘤组织中 MGMT 基因启动子甲基化阳性患者的 PFS、OS 显著长于阴性患者,提示 MGMT 基因启动子甲基化与脑胶质瘤患者的生存有关;单因素生存分析显示,年龄、手术切除方式、肿瘤临床分期、MGMT 基因启动子甲基化状态与脑胶质瘤患者生存有关,Cox 回归模型分析显示,MGMT 基因启动子甲基化阳性是脑胶质瘤患者生存的保护因素。MGMT 基因启动子甲基化可能通过抑制脑胶质瘤细胞的耐药而提高化学治疗效果,延长患者生存期,改善预后。BELL 等^[11]研究显示,129 例高级别脑胶质瘤中,非 MGMT 基因启动子甲基化患者的 PFS、OS 显著短于 MGMT 基因启动子甲基化患者。BINABAJ 等^[15]荟萃分析结果表明,MGMT 基因启动子甲基化脑胶质瘤患者的 PFS、OS 更长。以上研究提示 MGMT 基因启动子甲基化可影响脑胶质瘤患者的生存状态。O'REGAN 等^[16]研究发现,复发性脑胶质瘤患者的 MGMT 甲基化状态较稳定,原发性胶质瘤患者的 MGMT 甲基化状态不稳定,但复发性与原发性胶质瘤患者的 PFS、OS 比较差异无统计学意义,分析原因可能是因为启动子区甲基化并非调节 MGMT 表达的唯一因素,还可受如单核苷酸多态性等其他因素影响,其具体原因仍需进一步深入研究。

综上所述,MGMT 基因启动子甲基化水平与脑胶质瘤患者化学治疗敏感性有关,且 MGMT 基因启动子甲基化是脑胶质瘤患者生存的独立保护因素,可考虑将其作为脑胶质瘤患者化学治疗敏感性及预后判断的分子标志物。

参考文献:

[1] WANG T J C,MEHTA M P. Low-grade glioma radiotherapy treat-

ment and trials[J]. *Neurosurg Clin N Am*,2019,30(1):111-118.

[2] JIAPAER S, FURUTA T, TANAKA S, *et al.* Potential strategies overcoming the temozolomide resistance for glioblastoma[J]. *Neurol Med Chir (Tokyo)*,2018,58(10):405-421.

[3] 余露山,曾苏. 基于表观遗传的摄取型药物转运体表达调控是肿瘤耐药干预的新途径[J]. *医学研究生学报*,2019,32(5):449-454.

YU L S, ZENG S. Epigenetics-based regulation of uptake drug transporter expression is a new approach for cancer drug resistance intervention[J]. *J Med Postgra*,2019,32(5):449-454.

[4] RAO A M, QUDDUSI A, SHAMIM M S. The significance of MGMT methylation in glioblastoma multiforme prognosis[J]. *J Pak Med Assoc*,2018,68(7):1137-1139.

[5] WANG H W, XU Z K, SONG Y, *et al.* Correlations of MGMT genetic polymorphisms with temozolomide resistance and prognosis of patients with malignant gliomas;a population-based study in China[J]. *Cancer Gene Ther*,2017,24(5):215-220.

[6] 占传家,朱文珍,王承缘. 2007 年世界卫生组织对于中枢神经系统肿瘤的分类[J]. *放射学实践*,2008,23(2):122-127.

ZHAN C J, ZHU W Z, WANG C Y. 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system [J]. *Radiol Pract*,2008,23(2):122-127.

[7] 吕爽,张海波,徐莹,等. 复发脑胶质瘤再程放疗的远期疗效分析[J]. *中华放射肿瘤学杂志*,2020,29(6):411-415.

LYU S, ZHANG H B, XU Y, *et al.* Analysis of long-term efficacy of re-irradiation for recurrent glioma[J]. *Chin J Radiat Oncol*,2020,29(6):411-415.

[8] NABORS L B, PORTNOW J, AMMIRATI M, *et al.* NCCN guidelines insights;central nervous system cancers,version 1. 2017[J]. *J Natl Compr Canc Netw*,2017,15(11):1331-1345.

[9] MIYAUCHI J T, TSIRKA S E. Advances in immunotherapeutic research for glioma therapy[J]. *J Neurol*,2018,265(4):741-756.

[10] MA R M, ZHENG G H, SHAO C Q, *et al.* Downregulation of miR-196b promotes glioma cell sensitivity to temozolomide chemotherapy and radiotherapy[J]. *Ann Clin Lab Sci*,2018,48(6):719-725.

[11] BELL E H, ZHANG P, FISHER B J, *et al.* Association of MGMT promoter methylation status with survival outcomes in patients with high-risk glioma treated with radiotherapy and temozolomide: an analysis from the NRG oncology/RTOG 0424 trial[J]. *JAMA Oncol*,2018,4(10):1405-1409.

[12] SIGNORELL R D, PAPACHRISTODOULOU A, XIAO J W, *et al.* Preparation of PEGylated liposomes incorporating lipophilic lomeguatrib derivatives for the sensitization of chemo-resistant gliomas[J]. *Int J Pharm*,2018,536(1):388-396.

[13] 陈鑫,张国琴,阮秀杭,等. 基于表观扩散系数直方图分析预测多形性胶质母细胞瘤 MGMT 基因启动子甲基化状态[J]. *实用放射学杂志*,2020,36(6):965-968.

CHEN X, ZHANG G Q, RUAN X H, *et al.* ADC-based histogram analysis for prediction of MGMT gene promoter methylation status in glioblastoma multiforme[J]. *J Pract Radiol*,2020,36(6):965-968.

[14] 薛智文,王晓叶,魏益群. MGMT 基因启动子甲基化与非小细胞肺癌化疗敏感性 & 预后的关系[J]. *海南医学院学报*,2019,25(14):1083-1086,1091.

XUE Z W, WANG X Y, WEI Y Q. Relationship between methylation of MGMT gene promoter and chemosensitivity and prognosis of non-small cell lung cancer[J]. *J Hainan Med Univ*,2019,25(14):1083-1086,1091.

[15] BINABAJ M M, BAHRAMI A, SHAHIDSALES S, *et al.* The prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma: a meta-analysis of clinical trials[J]. *J Cell Physiol*,2018,233(1):378-386.

[16] O'REGAN C J, KEARNEY H, BEAUSANG A, *et al.* Temporal stability of MGMT promoter methylation in glioblastoma patients undergoing STUPP protocol[J]. *J Neurooncol*,2018,137(2):233-240.

(本文编辑:徐自超)

(上接第 237 页)

[7] ARAÚJO N C, REBELO M A P, DA SILVEIRA RIOJA L, *et al.* Sonographically determined kidney measurements are better able to predict histological changes and a low CKD-EPI eGFR when weighed towards cortical echogenicity[J]. *BMC Nephrol*,2020,21(1):123

[8] 刘帮燕,赵丽霞,郑曙光,等. 超声多参数评分诊断慢性肾病[J]. *中国医学影像技术*,2021,37(2):273-277.

LIU B Y, ZHAO L X, ZHEGN S G, *et al.* Ultrasound multi-parameter scoring in diagnosis of chronic kidney disease[J]. *Chin J Med Imaging Technol*,2021,37(2):273-277.

[9] KORKMAZ M, ARAS B, GÜNEYLI S, *et al.* Clinical significance of renal cortical thickness in patients with chronic kidney disease[J]. *Ultrasonography*,2018,37(1):50-54.

[10] 周明,韩鸿玲,张卿. 正常成年人肾脏大小估算公式初探[J]. *中华健康管理学杂志*,2014,8(4):264-267.

ZHOU M, HAN H L, ZHANG Q. Individual influencing factors of the normal adult kidney size[J]. *Chin J Health Manage*,2014,8(4):264-267.

[11] LUCISANO G, COMI N, PELAGI E, *et al.* Can renal sonography be a reliable diagnostic tool in the assessment of chronic kidney disease[J]. *J Ultrasound Med*,2015,34(2):299-306.

[12] YAPRAK M, ÇAKIR Ö, TURAN M N, *et al.* Role of ultrasonographic chronic kidney disease score in the assessment of chronic kidney disease[J]. *Int Urol Nephrol*,2017,49(1):123-131.

(本文编辑:郭 潇)