

胶质母细胞瘤分子标志物的研究进展

荆尧 综述 陈世文 审校

苏州大学附属上海市第六人民医院神经外科,上海 200233

摘要: 胶质母细胞瘤(Glioblastoma, GBM)是最常见的中枢神经系统恶性肿瘤,因其分子生物学上的异质性及生长方式的侵袭性,决定了其无法通过外科手术切除,以及配合术后放、化疗治愈。分子标志物的发现,为胶质母细胞瘤的治疗提供了指导,它们有助于判断肿瘤的发生、发展及预后。如MGMT、MicroRNA、IDH、EGFR、P53、PTEN,这些分子标志物的研究,作为基因组分析的一部分,通过和遗传及病理特征的联合,使得对GBM的发病机制更加清晰,为个体化的治疗提供了可能。本文对GBM相关分子标志物的研究进展进行综述。

关键词: 胶质母细胞瘤; 分子标志物; 诊断; 预测; 预后

胶质母细胞瘤是最常见的中枢神经系统恶性肿瘤,根据2007年WHO的组织病理学分类,胶质母细胞瘤属于IV级,一种极度异质性的肿瘤。外科手术切除,配合术后放、化疗是目前治疗胶质母细胞瘤的主要方法,但因其肿瘤的异质性和组织侵袭性,疗效不佳,复发率极高。有文献报道,GBM患者的中位生存时间大约为15个月,只有3%~5%患者存活超过36个月^[1]。然而,每个患者的预后不尽相同^[2]。因此,个体化的治疗方案尤为重要。近几年来,一些分子标志物的出现,为个体化的治疗提供了可能。

1 O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, MGMT)

MGMT,即O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶,是人类细胞中迄今唯一发现的修复甲基化损伤的甲基化转移酶,它是由MGMT基因编码的,该基因定位于染色体10q26, hMGMT为其单肽结构,含207个氨基酸残基,相对分子量为23 000,有13个保守氨基酸。MGMT的主要功能是在不需任何辅助因子和其他酶的条件下,可将烷化剂作用下形成的O6位甲基化鸟嘌呤上的甲基移除到自身的半胱氨酸残基上,有效地修复DNA损伤,而通过MGMT基因启动子甲基化造成的MGMT表观遗传沉默阻止了DNA的修复,增强了烷化剂对GBM肿瘤细胞的杀伤作用。有报告显示,启动子甲基化的GBM患者使用替莫唑胺和放疗的中位总生存期(23.4个月、21.7个月)比单纯放疗(15.3个月、

15.3个月)的明显延长^[1,3]。而无启动子甲基化的GBM患者,两者差别不大(分别为12.7和11.8个月),证明MGMT基因启动子的甲基化状态是GBM患者化疗效果预测的良好指标。此外,作者通过对50例GBM患者的研究发现,MGMT未甲基化的患者(27例中有16例发生早期进展)比甲基化的患者(23例中有2例发生早期进展)在接受放、化疗时更易出现肿瘤的早期进展和恶化^[4],因此,启动子的甲基化水平还可以预测肿瘤进展的情况。

但是,目前MGMT水平常用的检测方法是甲基化特异性聚合酶反应或者是焦磷酸测序技术,其检测费时、费力,是不能广泛应用于临床的主要原因^[5]。因此,探索高通量,灵敏度高,费时短,价格低廉的检测方法是非常有必要的。

2 微小RNA(MicroRNA)

MicroRNA是小的非编码RNA分子,长度约21~25个核苷酸。目前,在microRNA库中,已经确定的有1500个microRNA前体和1921个成熟且有功能的microRNA^[6]。典型的特征是具有发卡结构,其合成途径开始于一个MicroRNA基因的初始MicroRNA的转录,这个具有70~100氨基酸的发卡结构在核内被核糖核酸酶加工处理而最终成为microRNA前体;之后microRNA前体被核输出蛋白转运入胞质,接着被第二个核糖核酸酶分解为具有21~25个核苷酸序列的microRNA;这个阶段的microRNA可以结合RNA诱导沉默复合体,并与靶向mRNA互补结合,从而抑制了mRNA的翻译水平。

收稿日期:2014-01-22;修回日期:2014-04-15

作者简介:荆尧(1990-),男,在读研究生。主要从事脑外伤和脑肿瘤的基础与临床研究。

通讯作者:陈世文(1971-),男,博士,副主任医师,硕士生导师,主要从事脑外伤、脑血管病和脑肿瘤的基础与临床研究。

MicroRNA 可以区分胶质瘤的等级,血浆中的 microRNA-128 和 microRNA-342-3P 水平与胶质瘤的组织病理分级呈一致性改变^[7]。microRNA 可以对 GBM 的发生进行检测,一项研究表明,血浆中的 microRNA,包括 microRNA-21, microRNA-128 和 microRNA-342-3P 在 50 例 GBM 患者中有不同于正常对照组的改变,血浆特异性 microRNA 可能会成为脑胶质瘤^[7]的潜在检测标志物。microRNA 对 GBM 发展有预测作用, microRNA-181C 和 microRNA-21 组合对肿瘤六个月发展进程的预测具有高达 92% 的敏感性和 81% 特异性,因而可以帮助识别手术^[8]后的患者早期复发的高风险期。microRNA 与 GBM 的预后及生存期有关,研究原发性 GBM 样本时发现, microRNA-18 的低表达与 TGF β 的高表达(生长转化因子 β -被证实其在恶性胶质瘤中高活性表达,并且与较差的预后相关)呈负相关一致^[9]。同时一项生存分析表明,高表达的 microRNA-326/microRNA-130a 和低表达的 microRNA-155/microRNA-210 能够有效地延长 GBM 患者的无进展生存期和总生存期^[10]。此外, microRNA-328 的表达在 20 个间变性胶质瘤和 60 个胶质母细胞瘤的肿瘤样本降低,并且这种低表达与原发性 GBM 患者的低生存率有关^[11]。microRNA 可能与 GBM 患者的耐药性有一定的联系,研究表明,GBM 中的 microRNA 失调,使其获得对替莫唑胺的耐药性^[12],同时已有体外研究证明,长期使用替莫唑胺是导致 microRNA 失调的主要原因,它会引起 microRNA-21 表达升高^[13]。因而,通过抑制 microRNA-21 的表达,即 microRNA-21 抑制剂和替莫唑胺联合用药,与单独使用替莫唑胺相比,能够显著提高化疗后肿瘤细胞的凋亡率,因此, microRNA-21 可以作为替莫唑胺耐药 GBM 的生物标志物,提示 microRNA-21 抑制剂可作为替莫唑胺耐药 GBM 的辅助治疗药物,但这还需要长期的临床验证。

3 异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase, IDH)

IDH 是一种蛋白酶,它分为 IDH1 (NADP + 依赖型) 和 IDH2 (NAD + 依赖型), IDH1 又包括两种类型,一种位于线粒体基质中,另一种则位于胞浆中,它在生物体的能量代谢、脂类的生物合成以及抗氧化应激中起着重要的作用, IDH1 的另一个功能可能与线粒体中基因翻译的调节有关^[14]。IDH2 分为三种类型,且均位于线粒体的基质中,它是三

羧酸循环中的一种关键性限速酶,其可催化异柠檬酸氧化脱酸生成 α -酮戊二酸和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 等。

IDH 对 GBM 的鉴别诊断和预后有一定的指导意义, Yan 等人^[15]通过对 404 个不同级别的胶质瘤患者进行 IDH1 突变的检测发现,其突变率与肿瘤的级别呈负相关, II 级突变率达 77%, III 级有 55%, 而 IV 级仅为 6% (以上分级依据世界卫生组织对胶质瘤的分级标准),这就对鉴别诊断 GBM 起到了简单的指导作用。在所有的胶质瘤(包括 GBM)中, IDH 发生突变的患者预后明显优于 IDH 未发生突变的患者^[14]。Parsons 等人通过对 22 例 GBM 患者 20661 个蛋白编码基因进行全测序发现, 12% 的 GBM 患者的 IDH1 发生了频繁突变,而这种突变与其存活期有关^[16]。IDH 突变型的患者存活期为 3.8 年; IDH 野生型的患者存活期为 1.1 年。同时另一项研究也显示, GBM 患者 IDH1/IDH2 突变型和 IDH1/IDH2 野生型的生存期分别为 20 个月和 15 个月^[15],证实了 IDH 对预后预测的意义。IDH 虽然是一个有效的鉴别诊断和预后因素,然而其在肿瘤治疗中所扮演的角色尚未清楚,需要未来严谨而深入的研究。

4 表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)

EGFR 是胶质母细胞瘤中最常见的分子标志物,是一种具有酪氨酸激酶活性的糖蛋白,由原癌基因 c-erbB1 翻译编码,该基因定位于 7p11-13, 包含 26 个外显子,长约 110 kb, EGFR 主要分布在各个组织器官的上皮细胞膜上。其主要结构分为胞外区、跨膜区和胞内区:胞外区—配体结合区,跨膜区—支持和固定作用,胞内区—近膜亚区(降低与配体结合力)酪氨酸激酶亚区(细胞内源物的结合位点) C 端亚区(细胞内源物的结合位点,具有激活、降解及磷酸化作用)。EGFR 共有六种配体:表皮生长因子,转化生长因子 α , 双调蛋白, β 细胞素,肝素结合表皮生长因子,表皮素。EGFR 是前两者的唯一受体,其与配体的结合具有高亲和性、可饱和性和特异性。

约 40% 的原发性胶质瘤中,位于染色体 7p12 的 EGFR 基因有过度表达和突变的趋势^[14]。胶质母细胞瘤中 EGFR 最常见的突变体第八 EGFR (EGFRvIII),约占 EGFR 基因过度表达的胶质母细胞瘤的 50% ~ 60%^[14], EGFRvIII 可以激活表皮生长因

子-磷脂酰肌醇3'-激酶/丝氨酸/苏氨酸激酶(EGFR-PI3K/Akt)通路,促进肿瘤的生长和增值^[17],增加肿瘤的侵袭性,据报道,EGFRvIII的GBM患者比野生型EGFR的GBM患者,肿瘤更具有侵袭性^[18]。有研究表明^[19],组蛋白去乙酰化抑制剂可以减少EGFRvIII 50%~80%的表达量,从而达到抑制肿瘤增值和侵袭的作用。EGFR还与GBM患者的总生存期有关,一项关于125名GBM患者的临床及病理资料研究显示,有EGFR扩增、PTEN蛋白及野生型p53和p16并使用替莫唑胺治疗及化疗的GBM患者有较长的预后总生存期^[20]。

5 肿瘤抑制蛋白53(P53)

P53是一种由TP53编码的具有转录因子功效的肿瘤抑制蛋白,由393个氨基酸残基组成,包含多个功能域,其基因定位于17P13上,对阻滞细胞周期、促进细胞凋亡、维持基因组稳定、抑制肿瘤血管生成有重要作用。GBM不同亚型之间的P53突变的概率及分布不同。有文献报道^[21],p53发生突变的概率在原发性GBM中是25%~30%,继发性GBM中是60%~70%,一项以715个GBM患者为样本的研究显示:在继发性GBM中,57%的突变位于248和273两个热点密码子上,而在原发性GBM中,突变通过外显子更平均的分布—只有17%的发生在密码子248和273上^[22]。

P53有助于区分肿瘤等级,P53的突变表达会随着胶质瘤的恶性程度的增加而升高^[23]。但是对预后的预测效果尚不肯定^[24],早有临床研究显示:P53的缺失突变与GBM患者预后和生存期关系不大^[25],而Schmidt等人^[26]通过对97例GBM患者研究认为,P53的缺失突变可以预测GBM患者预后良好。Ohgaki等人对我国广州地区715例GBM患者进行统计分析发现,发生P53缺失突变的患者有较长的总生存期,但是当改变统计患者年龄时,通过多变量分析显示,是否发生P53突变,GBM患者的生存期相差不大^[22]。

6 磷酸酶及张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homolog,PTEN)

PTEN是一个具有磷酸酶活性的肿瘤抑制基因,它是在杂合性缺失的染色体10q23上被发现,转录产物为515kb信使RNA。PTEN在原发性GBM中的表达率为50%~70%,继发性GBM中为54%~63%,同时在14%~47%的原发性GBM中,PTEN会发生缺失突变^[27]。

PTEN的主要功能是可抑制磷脂酰肌醇3'-激酶/丝氨酸/苏氨酸激酶(PI3K/AKT)通路的调节,并在细胞增殖,细胞凋亡和肿瘤浸润中起着重要作用^[27]。PTEN与患者的生存期有关,Cox分析显示,有确定的9个基因甲基化标记(其中包括PTEN)可以预测GBM的生存期^[28]。另外,PTEN还可作为预后分子标记,预测个体化治疗之后的效果^[29]。当PTEN发生缺失突变时,不使用替莫唑胺而使用其它辅助治疗措施的GBM患者生存期会缩短,使用替莫唑胺化疗的患者生存期会延长^[29],未发生突变时,则无该现象。

7 展望

随着分子标志物的研究进展,我们可以建立一个GBM的诊断、治疗、预测的假想模型。首先是GBM的诊断,血浆中microRNA-21,microRNA-128和microRNA-342-3P的异常加上影像学资料可以对GBM进行初步诊断,血浆中的microRNA-128和microRNA-342-3P水平,IDH,EGFRvIII,P53可以帮助我们进一步确定胶质瘤的等级和侵袭性,一旦确定有EGFRvIII的突变发生,我们可以通过组蛋白去乙酰化抑制剂的使用下调EGFRvIII的表达,从而达到抑制肿瘤增值和侵袭的作用。这些分子标志物的检测也可以帮助术者确定手术切除的范围,根据术中病理,我们可以确诊GBM患者,microRNA-181C和microRNA-21可以监测GBM的复发和进展程度。术后对患者进行放化疗,MGMT和PTEN突变的检测可以帮助确定患者对替莫唑胺的敏感性,microRNA-18、microRNA-326/microRNA-130a和microRNA-155/microRNA-210的表达水平,IDH的突变,EGFR的扩增,PTEN的突变提示GBM患者的总生存期会延长,当患者发生替莫唑胺耐药时,microRNA-21抑制剂可作为替莫唑胺耐药GBM的辅助治疗药物。

目前,就新兴的分子标志物而言,还处于起步阶段,机制尚未完全清晰,广泛的应用于临床还需要一个缓慢的过程,但这些分子标志物作为检测工具,增加了对GBM发病机制的了解,使个体化治疗成为可能。

参 考 文 献

- [1] Stupp R,Hegi ME,Mason WP,et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomized phase III study: 5-Year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*,2009,10(5):459-466.

- [2] Polley MY ,Lamborn KR ,Chang SM ,et al. Conditional probability of survival in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol* ,2011 ,29(31) : 4175-4180.
- [3] Hegi ME ,Diserens A ,Gorlia T ,et al. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New Engl J Med* , 2005 ,352(10) : 997-1003.
- [4] Brandes AA ,Franceschi E ,Tosoni A , et al. MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. *J Clin Oncol* ,2008 ,26(13) : 2192–2197.
- [5] Mason S ,McDonald K. MGMT testing for glioma in clinical laboratories: Discordance with methylation analyses prevents the implementation of routine immunohistochemistry. *J Cancer Res Clin Oncol* ,2012 ,138(11) : 1789-1797.
- [6] Kozomara A ,Griffiths-Jones S. MiRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* ,2011 , 39(Database issue) : D152-D157.
- [7] Wang Q ,Pengcun L ,Ailin L , et al. Plasma specific miRNAs as predictive biomarkers for diagnosis and prognosis of glioma. *J. Exp. Clin. Cancer Res* ,2012 ,22(31) : 97.
- [8] Lakomy R ,Sana J ,Hankeova S ,et al. MiR-195 ,miR-196b ,miR-181c ,miR-21 expression levels and o-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients. *Cancer Sci* , 2011 , 102 (12) : 2186–2190.
- [9] Fox JL ,Dews M ,Minn AJ ,et al. Targeting of TGFβ signature and its essential component CTGF by miR-18 correlates with improved survival in glioblastoma. *RNA* ,2013 ,19(2) : 177-190.
- [10] Qiu S ,Lin S ,Hu D ,et al. Interactions of miR-323/miR-326/miR-329and miR-130a/miR-155/miR-210 as prognostic indicators for clinical outcome of glioblastoma patients. *J Transl Med* ,2013 , 9 (11) : 10.
- [11] Wu Z ,Sun L ,Wang H ,et al. MiR-328 expression is decreased in high-grade gliomas and is associated with worse survival in primary glioblastoma. *PLoS One* ,2012 ,7(10) : e47270.
- [12] Mizoguchi M ,Guan Y ,Yoshimoto K ,et al. Clinicaiimplications of microRNAs in human glioblastoma. *Front Oncol* ,2013 , 7(3) : e19.
- [13] Wong ST ,Zhang XQ ,Zhuang JT , et al. MicroRNA-21 inhibition enhances in vitro chemosensitivity of temozolomide-resistant glioblastoma cells. *Anticancer Res* ,2012 ,32(7) : 2835-2841.
- [14] Riemenschneider MJ ,Jeuken JW ,Wesseling P ,et al. Molecular diagnostics of gliomas: State of the art. *Acta Neuropathol* ,2010 , 120(5) : 567-584.
- [15] Yan H ,Parsons DW ,Jin G , et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* ,2009 ,360(8) : 765-773.
- [16] Parsons DW ,Jones S ,Zhang X , et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* , 2008 , 321 (5897) : 1807-1812.
- [17] Feng H , Hu B , Vuori K , et al. EGFRvIII stimulates glioma growth and invasion through PKA-dependent serine phosphorylation of Dock180. *Oncogene* ,2013 ,3(198) : 1-9.
- [18] Fischer I , Aldape K. Molecular tools: Biology , prognosis , and therapeutic triage. *Neuroimaging Clin N Am* ,2010 ,20(3) : 273–282.
- [19] Del Vecchio CA ,Giacomini CP ,Vogel H ,et al. EGFRvIII gene rearrangement is an early event in glioblastoma tumorigenesis and expression defines a hierarchy modulated by epigenetic mechanisms. *Oncogene* ,2013 ,32(21) : 2670-2681.
- [20] Ang C ,Guiot MC ,Ramanakumar AV ,et al. Clinical significance of molecular biomarkers in glioblastoma. *Can J Neurol Sci* ,2010 ,37 (5) : 625-630.
- [21] England B , Huang T ,Karsy M. Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme. *Tumour Biol* ,2013 ,34(4) : 2063-2074.
- [22] Ohgaki H ,Dessen P ,Jourde B , et al. Genetic pathways to glioblastoma: A population-based study. *Cancer Res* ,2004 ,64(19) : 6892-6899.
- [23] Hulsebos TJ ,Troost D ,Leenstra S. Molecular-genetic characterisation of gliomas that recur as same grade or higher grade tumours. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* ,2004 ,75(5) : 723-726.
- [24] Tabatabai G ,Stupp R ,van den Bent MJ ,et al. Molecular diagnostics of gliomas: The clinical perspective. *Acta Neuropathol* ,2010 , 120(5) : 585-592.
- [25] Simmons ML ,Lamborn KR ,Takahashi M , et al. Analysis of complex relationships between age , p53 , epidermal growth factor receptor , and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res* ,2001 , 61(3) : 1122-1128.
- [26] Schmidt MC ,Antweiler S ,Urban N , et al. Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* ,2002 ,61(4) : 321-328.
- [27] Simpson L ,Parsons R. PTEN: Life as a tumor suppressor. *Exp. Cell Res* ,2001 ,264(1) : 29-41.
- [28] Shukla S ,Pia Patric IR ,Thinagararjan S ,et al. DNA Methylation Prognostic Signature of Glioblastoma: Identification of NPTX2-PTEN-NF-κB. Nexus. *Cancer Res* ,2013 ,73(22) : 6563-6573.
- [29] Carico C ,Nuño M ,Mukherjee D , et al. Loss of PTEN is not associated with poor survival in newly diagnosed glioblastoma patients of the temozolomide era. *PLoS One* ,2012 ,7(3) : 1-8.