

· 论 著 ·

# TRIM38 基因非 CpG 岛 DNA 甲基化与胶质母细胞瘤临床预后的关系

殷安安 陆 南 贺亚龙 章 翔 刘玉河

**【摘要】目的** 探讨免疫基因 TRIM38 非 CpG 岛 DNA 甲基化在胶质母细胞瘤 (GBM) 中改变模式和临床意义。**方法** 利用公共数据库, 比较 TRIM38 甲基化在 GBM 与非肿瘤脑组织 (NTB) 中的差异程度, 并通过统计分析探讨该基因甲基化水平与基因表达、病人预后、生物学背景的关系。**结果** 纳入 3 组 GBM (共 509 例) 和 3 组 NTB (共 37 例) 样本。TRIM38 基因非 CpG 岛 DNA 甲基化位点在 GBM 中呈低甲基化改变 ( $P<0.05$ ), 而其基因表达呈现高表达改变 ( $P<0.05$ ), 并且甲基化与基因表达呈显著负相关 ( $P<0.05$ )。TRIM38 低甲基化病人生存时间明显短于高甲基化组 ( $P<0.05$ ), 甲基化水平是独立的预后影响因素 ( $P<0.05$ )。TRIM38 低甲基化 GBM 样本可能富集免疫调节及 Toll 样受体通路相关的基因簇。**结论** TRIM38 可能在 GBM 中通过非 CpG 岛低甲基化介导的基因异常表达上调, 参与肿瘤发生、发展; TRIM38 非 CpG 岛甲基化可能作为指导 GBM 预后评价的潜在生物标记物; TRIM38 甲基化导致的预后差异很可能与 Toll 样受体通路及免疫调节的差异有关。

**【关键词】** 胶质母细胞瘤; TRIM38 基因; 非 CpG 岛; DNA 甲基化

**【文章编号】** 1009-153X(2020)02-0076-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

**Impacts of TRIM38 non-CpG island DNA methylation alterations on clinical prognosis in patients with glioblastomas**  
YIN An-an<sup>1,2</sup>, LU Nan<sup>1</sup>, HE Ya-long<sup>2</sup>, ZHANG Xiang<sup>2</sup>, LIU Yu-he<sup>1</sup>. 1. Department of Neurosurgery, the 960th Hospital of PLA, Taian 271000, China; 2. Department of Neurosurgery, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China

**【Abstract】 Objective** To study the relationship of TRIM38 non-CpG island (CGI) DNA methylation with the prognosis in the patients with glioblastomas (GBMs). **Methods** By using experimental and clinical data acquired from the public databases, the degrees of DNA methylation of non-CGI open sea regions of TRIM38 in the GBMs tissues and non-tumor brains (NTB) tissues were analyzed and compared each other. The relationship of degrees of the methylation with the gene expression and prognosis in the patients with GBMs were analyzed. **Results** Three datasets of GBM (n=509) and NTB (n=37) were acquired respectively from the databases. The CpGs at non-CGI regions of TRIM38 was significantly hypomethylated in GBMs tissues compared that in NTB tissues ( $P<0.05$ ). The DNA methylation of the CpGs was negatively related with TRIM38 expression ( $P<0.05$ ). The included patients were divided into both the subgroups with TRIM38 hypermethylated and hypomethylated tumors. The overall survival time was significantly longer in the subgroup with hypermethylated tumors than that in the subgroup with hypomethylated tumors ( $P<0.05$ ). The multivariate Cox models suggested that TRIM38 non-CGI DNA methylation was a independent factor related to the prognosis in the patients with GBMs ( $P<0.05$ ). The bioinformatic analysis showed that the subgroup with TRIM38 hypomethylated tumors was enriched with gene sets related to immune process regulation and toll-like receptors signaling. **Conclusion** Taking TRIM38 as an example, this study highlighted the potential significance of non-CGI DNA methylation alterations in gene expression and prognosis in the patients with GBMs.

**【Key words】** TRIM38; non-CpG island; Methylation; Glioblastomas

胶质母细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM) 是临床上最常见且恶性程度最高的中枢神经系统肿瘤, 约占所有脑胶质瘤的 50%<sup>[1]</sup>。基于替莫唑胺的标准治疗方案对 GBM 治疗效果存在巨大差异, 原因主要是肿瘤内部分子特征的异质性。GBM 的发生、发

展伴随着显著的 DNA 甲基化改变, 其中以启动子 CpG 岛超甲基化介导的抑癌基因表达沉默的研究最多<sup>[2,3]</sup>。然而, 人类基因组中大约有 40% 的基因的转录调控区域并不包含 CpG 序列局部富集的 CpG 岛结构, 只有散在分布的 CpG 位点。这些基因的非 CpG 岛 DNA 甲基化改变在肿瘤中作用尚不清楚, 特别是 GBM<sup>[4]</sup>。本研究基于课题组前期研究结果<sup>[2]</sup>, 选取免疫基因 TRIM38 及其相关非 CpG 岛 DNA 甲基化位点作为研究对象, 利用公共数据库信息, 探讨基因非 CpG 岛 DNA 甲基化与 GBM 临床预后的关系。

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.02.005  
作者单位: 271000 山东泰安, 中国人民解放军联勤保障部队第九六〇医院泰安院区神经外科(殷安安、陆 南、刘玉河); 710032 西安, 空军军医大学西京医院神经外科(殷安安、贺亚龙、章 翔)

1 资料与方法

1.1 GBM 及非肿瘤脑组织(non-tumor brain, NTB)对照组 本研究纳入 GBM 样本主要来自于:美国癌症基因组图谱计划(TCGA; <https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>)<sup>[5]</sup>(共 354 例,其中男 212 例,女 141 例;中位年龄 61 岁;O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(O6-methylguanine DNA methyltransferase, MGMT)启动子甲基化 161 例,未甲基化 174 例];美国国立图书馆基因表达数据库(GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中 GSE22891 系列<sup>[6]</sup>(共 50 例,其中男 25 例,女 24 例;中位年龄 58 岁;MGMT 启动子甲基化 29 例,未甲基化 21 例);中国胶质瘤基因组图谱计划(CGGA; <http://www.cgga.org.cn/>)<sup>[7]</sup>(共 105 例,其中男 62 例,女 43 例;中位年龄 46 岁;MGMT 启动子甲基化状态未知)。纳入对照组样本来自 GSE63347 系列(25 例)<sup>[8]</sup>、GSE22891 系列(4 例)及 CGGA(8 例)数据库。

1.2 TRIM38 基因非 CpG 岛 DNA 甲基化及基因表达数据 基于前期研究<sup>[2]</sup>,选取距离 TRIM38 转录调控区 1 500 bp 范围内的独立 CpG 位点(探针 cg22502502)为主要研究对象, CpG 甲基化数据来自 Illumina 公司全基因组 DNA 甲基化芯片,其水平由探针 $\beta$ 值决定。部分纳入样本亦具有全基因组表达谱数据,均经过芯片数据标准化处理,具体步骤详见各参考文献<sup>[5~7]</sup>。

1.3 统计学及生物信息学分析 应用 GraphPad Prism 及 R 软件进行数据分析;连续变量采用 Mann-Whitney 检验或 *t* 检验;关联性分析采用 Spearman 检验;生存分析采用生存曲线、log-rank 检验及多因素 Cox 风险回归模型;分组界值由 R 软件 maxstat 包计算;生物信息学分析由基因簇富集分析(GSEA)比较; $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TRIM38 基因非 CpG 岛 DNA 甲基化及基因表达在 GBM 中的改变模式 对比 TRIM38 基因非 CpG 岛 DNA 甲基化探针(cg22502502)在 GBM 与对照样本的数据,该探针在 GBM 中 $\beta$ 值显著下降( $P<0.05$ ;图 1a),提示该位点在 GBM 中呈低甲基化改变。同时,比较 GBM 与对照样本中 TRIM38 基因的表达水平,其基因 mRNA 表达值显著上升( $P<0.05$ ;图 1b),提示该基因在肿瘤中呈现高表达状态。

2.2 TRIM38 基因非 CpG 岛 DNA 甲基化与基因表达的关系 TRIM38 基因在 GBM 中呈现的低甲基化状

态和高表达状况,提示该基因可能存在非 CpG 岛 DNA 甲基化依赖的基因表达调控机制。为进一步验证上述可能,利用 Spearman 检验分析甲基化与表达谱数据之间的关系,发现在不同数据库中,TRIM38 基因非 CpG 岛 DNA 甲基化数据均与其基因表达数据呈显著负向相关性(Spearman 系数均小于-0.3,图 1c),进一步提示非 CpG 岛 DNA 甲基化可能参与 TRIM38 的表达调控。

2.3 TRIM38 基因非 CpG 岛 DNA 甲基化与病人生存时间(overall survival, OS)的关系 为了减少单因素分析中其他因素对 GBM 病人 OS 数据的干扰,选取 TCGA 及 GSE22891 数据库中接受替莫唑胺联合放疗的原发 GBM 进行生存分析,并利用 maxstat 计算最佳分组界值,将 TCGA 及 GSE22891 数据库的 GBM 样本分为两组:TRIM38 高甲基化组和低甲基化组。生存分析表明:两组病例库中,拥有高甲基化组 OS 显著优于低甲基化组( $P<0.05$ ;图 1d)。多因素 Cox 回归分析进一步表明 TRIM38 甲基化水平 GBM 病人预后的独立影响因素。

2.4 基于 TRIM38 甲基化分组的生物信息学分析 分别将 TCGA 数据库中 TRIM38 高甲基化及低甲基化组 GBM 样本的全基因组表达谱数据带入 GSEA 分析,结果显示低甲基化样本(预后较差组)显著富集免疫功能调控及 Toll 样受体通路相关基因簇(表 1)。

3 讨论

GBM 内部的分子异质性是导致其临床治疗效果欠佳的主要原因之一<sup>[5]</sup>。表观遗传学,特别是 DNA 甲基化,作为重要的分子调控机制广泛参与肿瘤异质性的形成。早在 20 世纪 80 年代,就有学者研究 DNA 甲基化异常改变在肿瘤疾病中的意义。肿瘤特异的启动子区域 CpG 岛超甲基化,通过表观遗

表 1 TCGA 数据库中富集于 TRIM38 低甲基化样本的代表性基因簇

代表性基因簇	标准富集得分	<i>P</i> 值
免疫反应相关基因簇		
调节分子介导的免疫反应	-1.77	0.011
正向调节免疫效应过程	-1.74	0.022
调节获得性免疫反应	-1.73	0.033
Toll 样受体相关基因簇		
Toll 受体信号通路	-1.75	0.022
MyD88 非依赖的 Toll 样受体信号通路	-1.69	0.021
IKK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路	-1.61	0.042

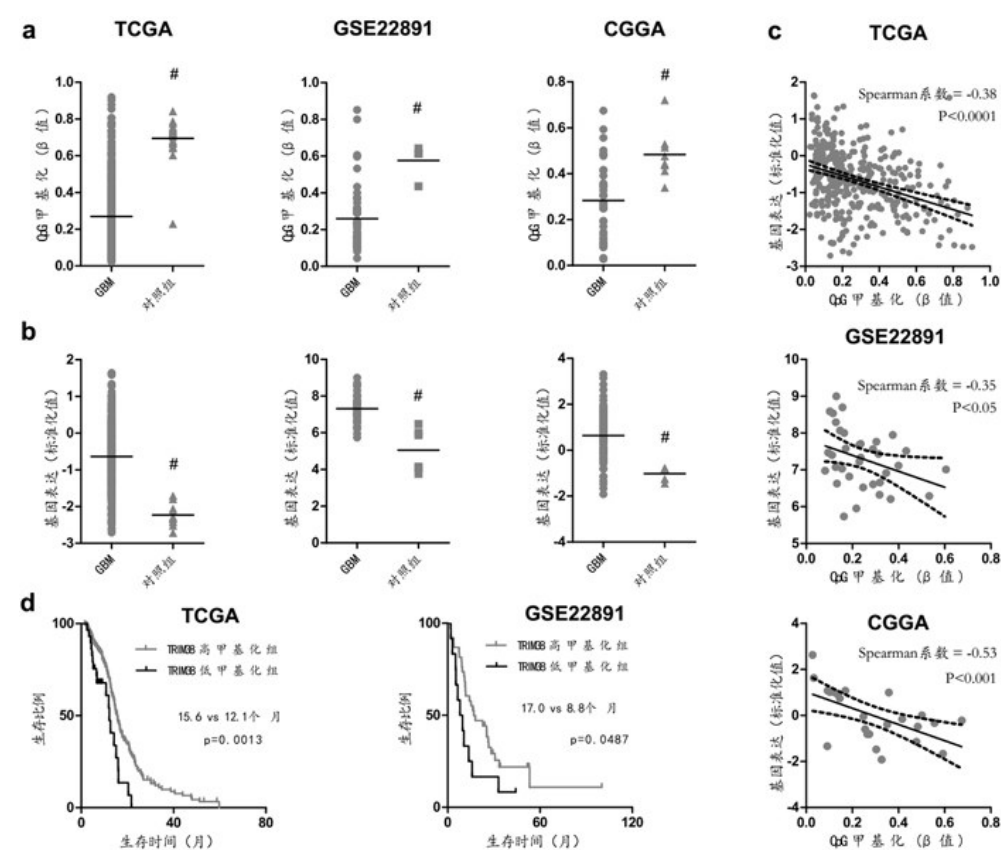


图1 TCGA 的肿瘤甲基化数据与 GSE63347 的对照样本进行比较分析 TRIM38 非 CpG 岛 DNA 甲基化在胶质母细胞瘤中的改变模式以及与基因表达、临床预后的关系 a~c. 胶质母细胞瘤 TRIM38 甲基化和基因表达与非肿瘤脑组织的改变模式,以及两组数据之间的关系;d. TRIM38 甲基化与胶质母细胞瘤病人生存时间的关系

传机制沉默抑癌基因的表达,促进肿瘤发生发展<sup>[4]</sup>。然而,人类基因组中大约一半的基因,其转录调控区域并不包含 CpG 序列局部富集的 CpG 岛结构,只有散在分布的 CpG 位点,被称为非 CpG 岛区域 DNA 甲基化位点<sup>[4]</sup>。目前,关于这些区域的 DNA 甲基化改变在疾病特别是肿瘤中的作用及意义尚不清楚。我们的前期研究中,通过全基因组多组学数据分析,发现非 CpG 岛区域 DNA 甲基化改变可能与免疫基因的表达及 GBM 病人预后广泛相关<sup>[2]</sup>。

TRIM38 来自 TRIM 蛋白家族中最大的 C-IV 亚组,包括 RING 区、BBox 区及 PRY/SPRY 区<sup>[9]</sup>。TRIM38 能够通过 E3 泛素化连接酶、类泛素化酶以及其他作用方式广泛参与固有免疫及炎症反应调控<sup>[9]</sup>。基于之前全基因组 DNA 甲基化数据分析结果<sup>[2]</sup>,本文结果显示 TRIM38 非 CpG 岛甲基化位点在 GBM 中发生低甲基化改变,而基因水平发生高表达改变;关联分析证实 TRIM38 非 CpG 岛 DNA 甲基化水平与其基因表达呈强负向相关关系。这提示非 CpG 岛 DNA 甲基化可能直接参与 TRIM38 的表达调控。因此,基因非 CpG 岛甲基化,很可能和启动子 CpG 岛相似,通过调控功能基因的表达,参与肿瘤的发生、发展过程。本文生存分析结果显示,TRIM38 甲基化程

度与 GBM 病人 OS 显著相关,多因素 Cox 比例回归风险模型分析进一步证实其为独立预后影响因素。这些结果提示基因非 CpG 岛甲基化亦可能是用于预测肿瘤预后或治疗反应的独立生物标记物。为了寻找 TRIM38 甲基化预后分组背后的生物学背景,我们对 GBM 样本的全基因组表达谱数据进行 GSEA 分析,结果发现甲基化分组所带来的预后差异很可能与其亚组之间重要功能基因簇表达程度的差异有关,其中具有代表性的基因簇包括免疫功能调节及 Toll 样受体通路相关的基因簇。Toll 样受体通路是机体重要的免疫调控通路,能够通过识别外源性或内源性相关分子模式激活下游效应因子,参与机体炎症反应和固有免疫反应<sup>[10]</sup>。对于肿瘤,特别是 GBM, Toll 样受体通路被认为是联系肿瘤细胞增殖侵袭和免疫抑制活动的重要信号枢纽<sup>[10]</sup>。既往研究表明,TRIM38 能够通过多种方式(酶依赖或非酶依赖)调控 Toll 受体通路下游信号蛋白及效应因子激活状态,从而影响 Toll 样受体通路依赖的病理生理过程<sup>[9]</sup>。因此,TRIM38 甲基化导致的预后差异很可能与 TRIM38 基因异常表达和对 Toll 样受体通路的调控所带来的肿瘤免疫活动的影响有关。

(下转第 81 页)



come for 371 foramen magnum decompressions [J]. Neurosurgery, 2012, 71(2): 365–380.

[3] Godil SS, Parker SL, Zuckerman SL, *et al.* Accurately measuring outcomes after surgery for adult Chiari I malformation: determining the most valid and responsive instruments [J]. Neurosurgery, 2013, 72(5): 820–827.

[4] 李京,秦燕霞,刘盼盼,等. 枕骨大孔的解剖学研究及其临床意义[J]. 中国现代医学杂志,2018,28(14):120–122.

[5] Genitori L, Peretta P, Nurisso C, *et al.* Chiari type I anomalies in children and adolescents: minimally invasive management in a series of 53 cases [J]. Childs Nerv Syst, 2000, 16(10–11): 707–718.

[6] Navarro R, Olavarria G, Seshadri R, *et al.* Surgical results of posterior fossa decompression for patients with Chiari I malformation [J]. Childs Nerv Syst, 2004, 20(5): 349–356.

[7] Oró JJ, Mueller DM. Posterior fossa decompression and reconstruction in adolescents and adults with the Chiari I malformation [J]. Neurol Res, 2011, 33(3): 261–271.

[8] Litvack ZN, Lindsay RA, Selden NR. Dura splitting decompression for Chiari I malformation in pediatric patients: clinical outcomes, healthcare costs, and resource utilization [J]. Neurosurgery, 2013, 72(6): 922–929.

[9] Nishikawa M, Sakamoto H, Hakuba A, *et al.* Pathogenesis of Chiari malformation: a morphometric study of the posterior cranial fossa [J]. J Neurosurg, 1997, 86(1): 40–47.

[10] Guyotat J, Bret P, Jouanneau E, *et al.* Syringomyelia associated with type I Chiari malformation: a 21-year retrospective study on 75 cases treated by foramen magnum decompression with a special emphasis on the value of tonsils resection [J]. Acta Neurochir (Wien), 1998, 140: 745–754.

[11] Durham SR, Fjeld-Olenec K. Comparison of posterior fossa decompression with and without duraplasty for the surgical treatment of Chiari malformation Type I in pediatric patients: a meta-analysis [J]. J Neurosurg Pediatr, 2008, 2(1): 42–49.

[12] 熊兵. 两种手术方法治疗小脑扁桃体下疝畸形 I 型并脊髓空洞的疗效分析[D]. 遵义医学院,2016. 27.

[13] 吕学明,袁绍纪,张荣伟,等. Chiari 畸形并脊髓空洞的治疗与小脑扁桃体下疝分型[J]. 中国临床神经外科杂志, 2009, 14(4): 211–212, 216.

[14] 吕学明,袁绍纪,张荣伟,等. 小脑扁桃体下疝切除术治疗 Chiari 畸形并脊髓空洞[J]. 中国临床神经外科杂志, 2010, 15(3): 174–176.

(2019-04-25 收稿,2019-09-15 修回)

(上接第 78 页)

总之,TRIM38 可能通过非 CpG 岛低甲基化介导的基因异常表达上调,参与 GBM 发生、发展;TRIM38 非 CpG 岛甲基化可作为指导 GBM 预后评价的潜在生物标记物;TRIM38 甲基化导致的预后差异很可能与 Toll 样受体通路及免疫调节的差异有关。

【参考文献】

[1] Yin AA, Cheng JX, Zhang X, *et al.* The treatment of glioblastomas: a systematic update on clinical Phase III trialsm [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2013, 87(3): 265–282.

[2] Yin AA, Lu N, Etcheverry A, *et al.* A novel prognostic six-CpG signature in glioblastomas [J]. CNS Neurosci Ther, 2018, 24: 167–177.

[3] 康恩铭,章薇,章翔. 甲基化状态风险分析对胶质母细胞瘤患者预后评价意义[J]. 中华神经外科疾病研究杂志,2018,17(1):27–31.

[4] Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells [J]. Epigenomics, 2009, 1(2): 239–259.

[5] Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, *et al.* The somatic genomic landscape of glioblastoma [J]. Cell, 2013, 155(2): 462–477.

[6] Etcheverry A, Aubry M, de Tayrac M, *et al.* DNA methylation in glioblastoma: impact on gene expression and clinical outcome [J]. BMC Genomics, 2010, 11: 701–712.

[7] Zhang W, Yan W, You G, *et al.* Genome-wide DNA methylation profiling identifies ALDH1A3 promoter methylation as a prognostic predictor in G-CIMP- primary glioblastoma [J]. Cancer Lett, 2013, 328(1): 120–125.

[8] Horvath S, Garagnani P, Bacalini M G, *et al.* Accelerated epigenetic aging in Down syndrome [J]. Aging Cell, 2015, 14(3): 491–495.

[9] Hu MM, Shu HB. Multifaceted roles of TRIM38 in innate immune and inflammatory responses [J]. Cell Mol Immunol, 2017, 14(4): 331–338.

[10] Deng S, Zhu S, Qiao Y, *et al.* Recent advances in the role of toll-like receptors and TLR agonists in immunotherapy for human glioma [J]. Protein Cell, 2014, 5(12): 899–911.

(2019-02-12 收稿,2019-10-20 修回)