

. 论 著 .

miR-126 基因启动子甲基化状态与高危低级别胶质瘤
同步放化疗后生存结局的关系

平建峰 麻来峰 林昌福

【摘要】目的 探讨 miR-126 基因启动子甲基化状态对高危低级别胶质瘤(LGG)同步放化疗后生存结局的影响。**方法** 前瞻性收集 2015 年 7 月至 2016 年 9 月经术后病理证实为高危 LGG 组织标本共 69 例,另选取同期颅脑损伤内减压术切除非肿瘤脑组织 20 例为对照。采用 PCR 和 MSP 法检测 miR-126 水平及其基因启动子甲基化水平。根据实体肿瘤疗效评价标准分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、疾病稳定(SD)和疾病进展期(PD),其中 CR+PR 为敏感组,SD+PD 为不敏感组。随访截止时间为 2021 年 5 月 31 日,69 例胶质瘤随访 19~55 个月,中位时间 27 个月;主要终点为无进展生存期(PFS)、总生存期(OS)。**结果** 胶质瘤组织 miR-126 水平显著低于非肿瘤脑组织($P<0.001$),而胶质瘤组织 miR-126 基因启动子甲基化率明显高于非肿瘤脑组织($P<0.05$)。胶质瘤组织 miR-126 水平与其基因启动子甲基化率呈明显负相关($r=-0.722, P<0.001$)。多因素 logistic 回归分析显示 miR-126 基因启动子高甲基化率是高危 LGG 对同步放化疗不敏感的独立危险因素($P<0.05$)。多因素 Cox 回归分析显示 miR-126 基因启动子高甲基化率是高危 LGG 病人 PFS、OS 明显缩短的独立危险因素($P<0.05$)。Kaplan-Meier 生存曲线分析显示,miR-126 基因启动子甲基化组 OS、PFS 较非甲基化组明显缩短($P<0.001$)。**结论** 高危 LGG 组织 miR-126 水平与启动子甲基化水平呈明显负相关,miR-126 基因启动子高甲基化率是高危 LGG 同步放化疗不良结局的独立危险因素。

【关键词】 低级别胶质瘤;同步放化疗;miR-126;启动子甲基化;生存结局
【文章编号】 1009-153X(2021)08-0603-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Relationship between promoter methylation status of miR-126 gene and survival outcome of patients with high-risk low-grade glioma after concurrent radiochemotherapy

PING Jian-feng, MA Lai-feng, LIN Chang-fu. Department of Neurosurgery, The Third People's Hospital of Henan, Zhengzhou 450006, China

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between the promoter methylation status of miR-126 gene and the survival outcome of patients with high-risk low-grade glioma (LGG) after concurrent radiochemotherapy. **Methods** PCR and MSP methods were used to detect miR-126 levels and its gene promoter methylation levels in glioma tissues obtained from 69 patients with high-risk LGG who were prospectively recruited from July 2015 to September 2016 and in non-tumor cerebral tissues obtained from 20 patients with tranmatic brain injury who underwent decompression, respectively. According to the evaluation criteria of solid tumors, the efficacy of concurrent radiochemotherapy was divided into complete remission (CR), partial remission (PR), stable disease (SD) and advanced disease (PD), with CR+PR as the sensitive group and SD+PD as the insensitive group. The deadline for follow-up was on May 31, 2021. The follow up of 69 LGG patients ranged from 19 months to 55 months, with a median time of 27 months; the primary endpoints were progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). **Results** The level of miR-126 in glioma tissues was significantly lower than that in non-tumor cerebral tissues ($P<0.001$), and the methylation rate of miR-126 gene promoter in glioma tissues was significantly higher than that in the non-tumor cerebral tissues ($P<0.05$). The level of miR-126 in glioma tissues was significantly negatively correlated with its gene promoter methylation rate ($r=-0.722, P<0.001$). Multivariate logistic regression analysis showed that the high methylation rate of miR-126 gene promoter in glioma tissues was an independent risk factor for the insensitivity of high-risk LGG to concurrent radiochemotherapy ($P<0.05$). Multivariate Cox regression analysis showed that the high methylation rate of the miR-126 gene promoter in glioma tissues was an independent risk factor for the significant shortening of PFS and OS in high-risk LGG patients ($P<0.05$). Kaplan-Meier survival curve analysis showed that the OS and PFS of the miR-126 gene promoter methylation group were significantly shorter than those of the non-methylation group ($P<0.001$). **Conclusions** The level of miR-126 in high-risk LGG tissues is significantly negatively correlated with its promoter methylation level. The high methylation rate of the miR-126 gene promoter is an independent risk factor for the adverse outcomes of high-risk LGG patients after concurrent radiochemotherapy.

【Key words】 Low-grade glioma; Concurrent radiochemotherapy; miR-126; Methylation; Survival outcome

低级别胶质瘤(low-grade glioma, LGG)具有显著的个体差异性,生存时间可长达10年以上^[1]。目前,其最佳治疗方案仍有争议。近年来,染色体1p/19q联合缺失以及异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH)基因突变等与LGG更好的预后和放化疗反应有关^[2]。越来越多的研究显示微小核糖核酸(microRNA, miRNA)有望成为肿瘤病人临床靶向治疗和个体化治疗的潜在生物标志物。miR-126是位于表皮生长因子样结构域7宿主基因第9q34.3号染色体上的重要miRNA,与脑胶质瘤的放化疗敏感性有关^[3]。本文探讨miR-126基因启动子甲基化状态与高危LGG病人同步放化疗后生存结局的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象 纳入标准:①符合WHO神经系统肿瘤分级标准Ⅱ级,病理检查证实为星形胶质细胞瘤、少突胶质细胞瘤或混合胶质细胞瘤,未行肿瘤全切术,且存在以下3种或以上高危因素(年龄≥40岁;术前肿瘤直径≥6 cm;肿瘤越过中线;星形胶质细胞瘤/混合型组织学特征;术前神经功能状态>1级,即中、重度);②术前未接受放、化疗;③术前Zubrod-ECOG-WHO评分0~2分。排除标准:①合并严重心、肺、肝、肾等重要脏器功能障碍或其他部位原发性恶性肿瘤;②伴有严重高血压病史、出血倾向、抗凝治疗;③既往接受过头颈部放疗或化疗。

前瞻性收集2015年7月至2016年9月术后病理证实为高危LGG共69例。选取同期因颅脑损伤内减压术切除的非肿瘤脑组织样本20例为对照。本研究经本院伦理审查委员会批准。

1.2 治疗方法 术后均接受同步放化疗。使用西门子加速器精确调强技术或三维适形技术进行放疗,根据头颅CT/MRI确定勾画靶区,放疗剂量为2 Gy/次,2次/d,5d/周,共持续6周,总剂量为60 Gy。放疗前开始口服替莫唑胺,采用stupp方案。若不良反应较重,且对症治疗无效,则减量[替莫唑胺剂量最低不得<100 mg/(m²·d)]或停药处理。

1.3 检测方法

1.3.1 采用RT-qPCR法检测miR-126表达 使用TRIzol试剂(美国Invitrogen公司)提取组织总RNA,采用逆转录系统(美国Promega公司)合成cDNA,以cDNA为模板进行PCR扩增(美国Applied Biosystems公司),扩增条件:95℃ 1 min,62℃ 1 min,72℃ 1.5 min;共35个循环。以U6 mRNA为内源性参考基

因。采用2^{-ΔΔCT}法进行量化分析。每个样本进行3次PCR检测。

1.3.2 miR-126启动子区甲基化状态分析 使用DNeasy血液和组织试剂盒提取基因组DNA。根据EpiTect Bisulfite Kit(德国Qiagen公司)说明书对DNA样本进行亚硫酸氢盐转化,并用Wizard DNA纯化树脂(美国Promega公司)对修饰后的DNA进行纯化。以CpGenome Universal Methylated DNA(美国MilliporeSigma公司)作为阳性对照,使用亚硫酸氢盐转化的DNA为模板,采用Pyromark PCR试剂盒(德国Qiagen公司)进行PCR扩增(95℃初始变性10 min,共35个循环:94℃ 15 s,62℃ 30 s,72℃ 30 s,最终延伸在72℃ 10 min)。PCR产物经用2%琼脂糖凝胶电泳分离,采用PyromarkTMQ24焦磷酸测序仪进行焦磷酸测序,测序结果采用PyromarkTMQ24v2.0.6软件(德国Qiagen公司)进行分析。

1.4 近期疗效 根据实体肿瘤疗效评价标准^[4]:完全缓解(complete remission, CR)、部分缓解(partial remission, PR)、疾病稳定(stable disease, SD)和疾病进展期(progressive disease, PD)。CR+PR为放化疗敏感组,SD+PD为不敏感组。

1.5 随访 随访截止时间为2021年5月31日,69例胶质瘤随访19~55个月,中位时间27个月。主要终点为无进展生存期(progression-free survival, PFS)、总生存期(overall survival, OS)。PFS定义为手术至观察到疾病进展的时间,OS定义为手术至发生任何原因死亡的时间或随访截止时间。

1.6 统计学方法 采用SPSS 17.0软件分析;计数资料采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验;采用Spearman相关系数分析相关性;采用多因素logistic回归分析放化疗敏感性的影响因素;采用多因素Cox比例回归风险模型分析生存结局的影响因素;绘制Kaplan-Meier生存曲线分析生存时间,采用log检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高危LGG组织miR-126表达水平和甲基化状态 LGG组织miR-126表达水平显著低于非肿瘤脑组织($P < 0.001$),同时miR-126基因启动子甲基化率(49.28%, 34/69)明显高于非肿瘤脑组织组(20.00%, 4/20; $P < 0.05$)。见图1。

2.2 高危LGG组织miR-126表达和基因启动子甲基化状态的关系 miR-126基因启动子甲基化组miR-126表达水平(0.496 ± 0.174)明显低于非甲基化组

(0.868 ± 0.187 ; $P<0.001$)。高危 LGG 组织 miR-126 表达水平和其基因启动子甲基化水平呈明显负相关($r=-0.722$; $P<0.001$)。

2.3 高危 LGG 组织 miR-126 表达水平和基因启动子甲基化状态与同步放化疗敏感性的关系 69 例中,放化疗敏感 33 例,不敏感 36 例。敏感组高危 LGG 组织 miR-126 表达水平(0.912 ± 0.131)明显高于不敏感组(0.476 ± 0.147 ; $P<0.05$)。敏感组高危 LGG 组织 miR-126 启动子甲基化率(18.18%, 6/33)明显低于不敏感组(77.78%, 28/36; $P<0.05$)。多因素 logistic 回归分析显示胶质瘤组织 miR-126 基因启动子高甲基化率是高危 LGG 同步放化疗不敏感的独立危险因素($OR=1.078$; 95% CI 1.023~1.268; $P<0.001$)。

2.4 高危 LGG 病人生存结局的影响因素 多因素 Cox 回归分析显示,胶质瘤组织 miR-126 基因启动子高甲基化是高危 LGG 同步放化疗生存结局不良的独立

危险因素($HR=1.212$; 95% CI 1.093~1.645; $P=0.001$)。

2.5 胶质瘤组织 miR-126 甲基化状态与高危 LGG 病人同步放化疗后生存时间的相关性 根据 miR-126 基因启动子甲基化状态,甲基化组和非甲基化组。Kaplan-Meier 生存曲线显示,胶质瘤组织 miR-126 基因启动子甲基化组 OS、PFS 较非甲基化组明显延长($P<0.001$;图 2)。

3 讨论

目前,LGG 多采取手术治疗,但大部分病人仍会复发或进展,尤其是高危 LGG;因此绝大多数高危 LGG 更倾向于术后进行同步放化疗。我们发现高危 LGG 组织 miR-126 呈低表达,且与近期放化疗疗效和远期生存结局有关,因此,miR-126 可能在预测高危 LGG 病人预后中有一定价值。

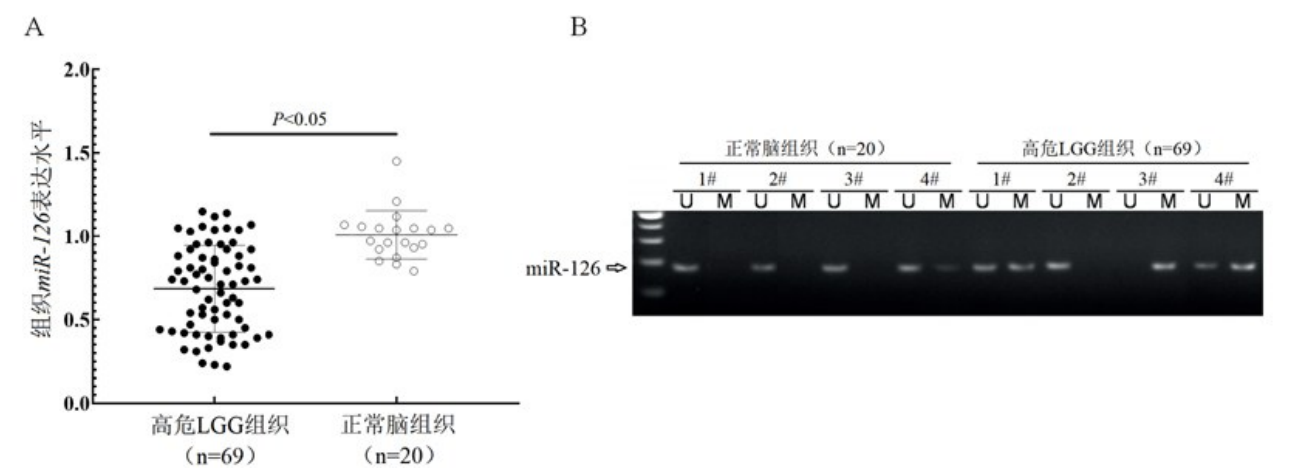


图1 高危低级别胶质瘤组织 miR-126 水平及其基因启动子甲基化水平检测
A. RT-qPCR 法检测 miR-126 水平; B. MSP 法检测 miR-126 基因启动子甲基化状态

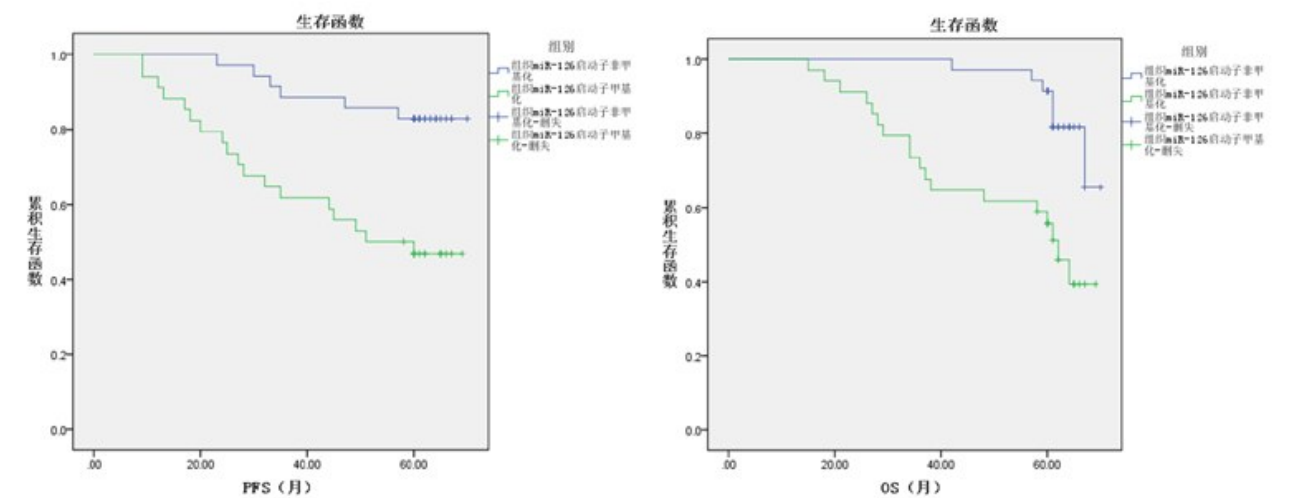


图2 Kaplan-Meier 生存曲线分析 miR-126 基因启动子甲基化状态与高危 LGG 同步放化疗生存结局的关系

在脑胶质瘤微环境中,肿瘤细胞与周围成分间的通信可能直接影响脑胶质瘤的特征,如肿瘤细胞可以通过微环境改变非肿瘤性星形胶质细胞的表现型,进而促进脑胶质瘤的生长和侵袭^[5],而细胞间转移的 miRNA 可通过调节邻近细胞甚至遥远细胞的表现型在细胞-细胞通信中发挥重要作用。目前,已有多种 miRNA 被证实参与脑胶质瘤的病理机制^[6,7]。miR-126 被证实具有一定的抑癌基因活性,其下游靶基因,如整合蛋白 α -6、高尔基体磷蛋白 3、成熟 T 细胞增殖蛋白 1、GATA74 等在脑胶质瘤细胞生长、迁移、上皮间质转化、细胞骨架形成等过程中具有重要作用^[8-11]。有学者认为高危 LGG 预后与 IDH1/2 突变相关, IDH 突变会导致 STAT1 蛋白降低,通过调节 T 细胞吸引趋化因子、影响 CD8⁺ T 细胞的累积影响 LGG 免疫环境^[12]。

DNA 甲基化、组蛋白修饰在内的表观遗传机制的基因表达调控,在肿瘤的发生发展中起关键作用,异常的表观遗传调控可导致基因表达改变和细胞恶性转化。Cui 等^[13]研究发现,40%的脑胶质瘤 miR-126 启动子存在高甲基化状态。本文证实脑胶质瘤组织 miR-126 基因启动子甲基化率明显高于正常脑组织组,且胶质瘤组织 miR-126 水平和其基因启动子甲基化呈明显负相关。这说明表观遗传修饰是影响 miR-126 在脑胶质瘤中表达的重要机制之一。此外,本文结果表明胶质瘤组织 miR-126 基因启动子非甲基化病人比甲基化病人拥有更长的 PFS 及 OS。

总之, DNA 甲基化是调节 miR-126 表达的重要机制之一,两者呈负相关。胶质瘤组织 miR-126 高甲基化率是导致高危 LGG 病人同步放化疗不良结局的独立危险因素,因此检测胶质瘤组织 miR-126 基因启动子甲基化状态有助于临床对高危 LGG 病人同步放化疗效果及预后的评估。

【参考文献】

[1] Bell EH, Zhang P, Fisher BJ, *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.

[2] 潘 婷, 苏春秋, 张 璇, 等. 常规 MRI 特征在预测弥漫性低级别胶质瘤 1p/19q 缺失状态的应用价值[J]. 临床放

射学杂志, 2020, 39(6): 1189-1194.

[3] Balachandran AA, Larcher LM, Chen S, *et al.* Therapeutically significant microRNAs in primary and metastatic brain malignancies [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(9): 2534.

[4] Kim JH, Kim BJ, Jang HJ, *et al.* Comparison of the RECIST and EORTC PET criteria in the tumor response assessment: a pooled analysis [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2017, 80(4): 729-735.

[5] Buruiană A, Florian ȘI, Florian AI, *et al.* The Roles of miRNA in glioblastoma tumor cell communication: diplomatic and aggressive negotiations [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6): 1950.

[6] Yuan M, Da Silva ACAL, Arnold A, *et al.* MicroRNA (miR) 125b regulates cell growth and invasion in pediatric low grade glioma [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 12506.

[7] Chen SR, Cai WP, Dai XJ, *et al.* Research on miR-126 in glioma targeted regulation of PTEN/PI3K/Akt and MDM2-p53 pathways [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(8): 3461-3470.

[8] Li M, Wang Q, Zhang X, *et al.* Exosomal miR-126 blocks the development of non-small cell lung cancer through the inhibition of ITGA6 [J]. Cancer Cell Int, 2020, 20(1): 574.

[9] Ouyang J, Song F, Li H, *et al.* miR-126 targeting GOLPH3 inhibits the epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer BGC-823 cells and reduces cell invasion [J]. Eur J Histochem, 2020, 64(4): 3168.

[10] Han L, Liu H, Wu J, *et al.* MiR-126 suppresses invasion and migration of malignant glioma by targeting mature T cell proliferation 1 (MTCP1) [J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 6630-6637.

[11] Xu Y, Xu W, Lu T, *et al.* miR-126 affects the invasion and migration of glioma cells through GATA4 [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2017, 45(6): 1-7.

[12] Kohanbash G, Carrera DA, Shrivastav S, *et al.* Isocitrate dehydrogenase mutations suppress STAT1 and CD8⁺ T cell accumulation in gliomas [J]. J Clin Invest, 2017, 127(4): 1425-1437.

[13] Cui H, Mu Y, Yu L, *et al.* Methylation of the miR-126 gene associated with glioma progression [J]. Fam Cancer, 2016, 15(2): 317-324.

(2021-06-09 收稿, 2021-07-06 修回)