

· 论 著 ·

# miR-126 表达水平及其基因启动子甲基化状态与胶质母细胞瘤术后复发的关系

王艳新 叶富跃 王 艳

**【摘要】目的** 探讨 miR-126 表达水平及其基因启动子甲基化状态与胶质母细胞瘤(GBM)术后复发的关系。**方法** 收集 2016 年 8 月到 2020 年 12 月手术切除的 GBM 组织标本 86 例和同期颅脑损伤内减压术中切除非肿瘤脑组织 30 例,采用 PCR 和 MSP 法检测 miR-126 表达水平及其基因启动子甲基化状态。随访至 2021 年 3 月,随访时间 2~56 个月,中位随访时间 24.0 个月。术后定期复查 MRI 确定肿瘤复发和复发时间。**结果** 术后 58 例复发,复发率为 67.44%。与非肿瘤脑组织相比,GBM 组织 miR-126 表达水平明显降低( $P<0.05$ ),miR-126 基因启动子甲基化率明显升高( $P<0.05$ )。与未复发组相比,复发组 GBM 组织 miR-126 表达水平明显降低( $P<0.05$ ),同时 miR-126 基因启动子甲基化率明显升高( $P<0.05$ )。生存曲线分析显示,miR-126 甲基化组中位复发时间(16.0 个月)较非甲基化组(39.0 个月)明显缩短( $P<0.05$ )。多因素 logistic 回归分析显示 miR-126 基因启动子高甲基化是 GBM 术后复发的独立危险因素( $P<0.05$ )。ROC 曲线分析显示,miR-126 表达水平预测 GBM 术后复发的曲线下面积为 0.894 (95% CI 0.837~0.950; $P<0.05$ ),最佳截断值为 0.830,灵敏度和特异度分别为 90.0%和 75.6%。**结论** GBM 组织 miR-126 表达水平普遍降低,与其基因启动子异常甲基化有关。检测 miR-126 表达水平对 GBM 术后复发有良好的预测价值。

**【关键词】** 胶质母细胞瘤;miR-126;基因启动子甲基化;术后复发;影响因素

**【文章编号】** 1009-153X(2021)09-0682-05 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

## Relationship between miR-126 expression level and its gene promoter methylation status and postoperative recurrence of glioblastoma

WANG Yan-xin, YE Fu-yue, WANG Yan. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the relationship between miR-126 expression level and its gene promoter methylation status and the postoperative recurrence of glioblastoma (GBM). **Methods** The level of miR-126 and methylation rate of imR-126 gene promoter were detected in GBM tissues obtained from 86 GBM patients who underwent microsurgery from August 2016 to December 2020 and in non-neoplastic cerebral tissues obtained from 30 patients with traumatic brain injury who underwent decompression using PCR and MSP methods, respectively. The deadline for follow-up was March 2021, and the follow-up ranged from 2 months to 56 months with a 24.0-month median follow-up. MRI was reexamined regularly after the surgery to determine tumor recurrence and time to tumor recurrence (TTR). **Results** Tumor recurrence was occurred in 58 patients (67.44%). Compared with non-neoplastic cerebral tissues, the level of miR-126 in GBM tissues was significantly decreased ( $P<0.05$ ) and the methylation rate of miR-126 gene promoter was significantly increased ( $P<0.05$ ) in GBM tissues. Compared with the non-relapsed group, the level of miR-126 in GBM tissues was significantly decreased ( $P<0.05$ ) and the methylation rate of miR-126 gene promoter was significantly increased ( $P<0.05$ ) in relapsed group. Survival curve analysis showed that the median TTR (16.0 months) in the miR-126 methylation group was significantly shorter than that (39.0 months) in the non-methylation group ( $P<0.05$ ). Multivariate logistic regression analysis showed the hypermethylation of miR-126 gene promoter was an independent risk factor for postoperative recurrence of GBM ( $P<0.05$ ). ROC curve analysis showed that the area under the curve for miR-126 level to predict postoperative recurrence of GBM was 0.894 (95% CI 0.837~0.950;  $P<0.05$ ), the best cut-off value was 0.830, and the sensitivity and ecificity were 90.0% and 75.6%, respectively. **Conclusions** The expression level of miR-126 in GBM tissues generally decreases, which is related to abnormal methylation of its gene promoter. Detection of miR-126 has a good predictive value for postoperative recurrence of GBM.

**【Key words】** Glioblastoma; miR-126; Gene promoter methylation; Postoperative recurrence

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是最常见和  
doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2021.09.009  
作者单位:570102 海口,海南医学院第一附属医院神经外科(王艳  
新、叶富跃、王 艳)

最具侵袭性的原发性恶性脑肿瘤<sup>[1]</sup>,即使采用手术联合术后放化疗,预后仍很差。因此,探讨其生物标志物对其临床诊治具有实际的临床意义。研究发现 miR-126 在多种肿瘤中表达失调<sup>[2]</sup>。本文探讨 miR-126 表达水平及基因启动子甲基化状态与 GBM 术后

复发的关系。

1 资料与方法

1.1 标本来源 纳入标准:①符合原发性GBM(WHO 分级Ⅳ级)诊断标准<sup>[3]</sup>;②临床资料完整;③手术前后影像学资料完整,术前没有接受放疗或化疗;④均接受显微手术,术后常规综合治疗。排除合并其他恶性肿瘤或自身免疫性疾病、心力衰竭、慢性阻塞性肺病、肝功能不全、肾衰竭。

收集2016年8月到2020年12月手术切除的石蜡包埋的GBM组织标本86例,其中男41例,女45例;年龄25~83岁,中位年龄51.0岁;术前KPS评分56~92分,中位评分70.0分。另选择颅脑损伤内减压术中切除非肿瘤脑组织30例,其中男15例,女15例;年龄23~85岁;中位年龄52.0岁。本研究经我院伦理委员会批准。

1.2 实时荧光定量PCR法检测miR-126水平 使用QIAamp DNA/RNA FFPE组织提取试剂盒(德国QIAGEN公司)提取石蜡包埋组织基因组DNA/RNA<sup>[4]</sup>。将总RNA样本依照RevertAid FirstStrand cDNA合成试剂盒(美国Thermo Scientific公司)和基因特异性环状引物进行逆转录反应,反应条件:将混合物在冰浴上孵育5 min,42℃ 60 min,70℃ 5 min。用ABI 7500实时PCR系统(美国Applied Biosystems公司)进行PCR扩增(扩增条件:94℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 60 s,40次循环,反应体积25 μl)。用2<sup>-ΔΔCt</sup>法以β-actin为内参计算miR-126 mRNA的相对表达量。数据用RNU6标准化。miR-126正向引物5'-TGCCTCGTACCGTGAGTAC-3',反向引物5'-GTG-CAGGGTCCGAGGT-3'。

1.3 miR-126甲基化状态检测<sup>[4]</sup> ①取1 μg组织总DNA,使用EZ DNA甲基化试剂盒-Gold(北京中西远大科技有限公司)进行亚硫酸处理。用Wizard DNA纯化树脂对修饰后的DNA样本进行纯化。②取200 μg修饰后DNA样本进行甲基化特异性PCR(methylation-specific PCR,MSP)扩增。将PCR产物经2.0%琼脂糖凝胶电泳分离,溴化乙锭染色观察。用SssI甲基化酶处理基因组DNA作为甲基化DNA的阳性对照,用外周血单个核细胞DNA作为非甲基化基因的阳性对照。甲基化引物出现阳性扩增视为甲基化,否则为非甲基化。miR-126-M正向引物5'-TTG GCG GTC GGG TTT GGT C-3',反向引物5'-TAA AAC CCC GCG ACG AAC G-3'。miR-126-U正向引物5'-TTG GTT TTT GGT GGT TGG GTT TGG

TT-3',反向引物5'-CAA ACA AAA AAA CTA AAA CCC CAC AAC AAA CA-3'。③变性高效液相色谱法检测:分别取8 μl miR-126-M扩增产物和miR-126-U扩增产物以分离方式置于DNASep核酸分析柱(美国Transgenomic公司)中,收集更多的片段。采用Navigator软件对结果进行分析(设置:碎片大小100~200 bp,分析温度50℃,流速0.9 ml/min,紫外检测波长260 nm)。

1.4 临床和影像学随访 术中观察肉眼全切除(Simpson分级Ⅰ~Ⅱ级),次全切除(Simpson分级Ⅲ级)。随访至2021年3月,随访时间2~56个月,中位随访时间24.0个月。术后72 h内进行增强MRI扫描,出院后前1年每间隔3个月、术后1~3年每间隔6个月、术后3年后每间隔1年,或出现如癫痫、神经功能障碍、颅内高压等症状时复查增强CT或MRI,观察肿瘤情况。自术后至复查增强CT或MRI扫描时观察到新增强病灶的时间为复发时间。肿瘤复发包括原位复发、邻近部位复发或远隔部位复发。

1.5 统计学处理 采用SPSS 21.0软件处理;定量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用t检验;多因素Cox回归分析复发的危险因素;生存曲线分析miR-126甲基化与术后复发时间的关系;绘制受试者工作特性(receiver operating characteristic,ROC)曲线分析miR-126水平预测术后复发的效能; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GBM组织miR-126表达水平和甲基化状态 与非肿瘤脑组织相比,GBM组织miR-126表达水平明显降低( $P<0.05$ ),同时基因甲基化率明显升高( $P<0.05$ )。见图1和表1。

2.2 GBM组织miR-126表达水平和甲基化状态的关系 甲基化组GBM组织miR-126表达水平( $0.530\pm 0.139$ )明显低于未甲基化组( $0.861\pm 0.121$ ; $P<0.05$ )。

表1 GBM组组织miR-126表达水平和甲基化水平状态

组织	miR-126表达水平	miR-126甲基化率
非肿瘤脑组织	1.003±0.171	7(23.33%)
GBM组织	0.684±0.211*	46(53.49%)*

注:与非肿瘤脑组织相比,\* $P<0.05$ ;GBM.胶质母细胞瘤

表2 miR-126水平和甲基化率与GBM复发的关系

组别	miR-126表达水平	miR-126甲基化率
未复发组	0.896±0.118	5(17.86%)
复发组	0.581±0.164*	41(70.69%)*

注:与未复发组相比,\* $P<0.05$ ;GBM.胶质母细胞瘤

表 3 本文 86 例胶质母细胞瘤术后复发危险因素的 Cox 回归分析结果

影响因素	单因素分析		多因素分析	
	风险比(95%置信区间)	P 值	风险比(95%置信区间)	P 值
性别(男=0,女=1)	0.865(0.517~1.449)	0.582		
年龄(≤50 岁=0,>50 岁=1)	1.079(0.643~1.810)	0.773		
术前 KPS 评分(≤70 分=0,>70 分=1)	0.796(0.475~1.334)	0.386		
miR-126 甲基化(未甲基化=0,甲基化=1)	3.888(2.186~6.914)	<0.001	4.337(2.425~7.759)	<0.001
肿瘤切除程度(全切除=0,未全切除=1)	0.929(0.554~1.557)	0.780		
术后治疗(放疗=0,同步放化疗=1)	0.862(0.511~1.455)	0.578		
TP53(野生型=0,突变型=1,n=53 例)	1.075(0.989~1.220)	0.071		
IDH1(野生型=0,突变型=1,n=37 例)	1.678(1.012~2.811)	0.040	2.065(1.227~3.477)	0.006
BRAF V600E(野生型=0,突变型=1,n=48 例)	1.446(0.767~2.405)	0.378		
PTEN(野生型=0,突变型=1,n=29 例)	1.312(0.930~1.889)	0.170		
PIK3R1(野生型=0,突变型=1,n=23 例)	1.095(0.874~1.735)	0.181		
EGFR(野生型=0,突变型=1,n=23 例)	1.172(0.903~1.984)	0.117		
Ki-67(≤25%=0,>25%=1,n=56 例)	1.149(0.611~1.965)	0.349		

2.3 GBM 组织 miR-126 甲基化状态和术后复发的关系 术后 58 例(67.44%)复发。与未复发组相比,复发组 GBM 组织 miR-126 表达水平明显降低( $P<0.05$ ,表 2),同时基因甲基化率明显升高( $P<0.05$ ,表 2)。生存曲线分析显示,miR-126 甲基化组中位复发时间(16.0 个月)较非甲基化组(39.0 个月)明显缩短( $P<0.05$ ,图 2)。

2.4 GBM 术后复发的影响因素 单因素和多因素 Cox 回归分析显示,GBM 组织 miR-126 甲基化和 IDH1 基因突变是 GBM 术后复发的独立危险因素( $P<0.05$ )。见表 3。

2.5 GBM 组织 miR-126 表达水平预测术后复发的价

值 ROC 曲线分析显示,GBM 组织 miR-126 表达水平预测术后复发的曲线下面积为 0.894(95% CI 0.837~0.950; $P<0.05$ ),最佳截断值为 0.830,灵敏度和特异度分别为 90.0%和 75.6%。见图 3。

3 讨论

近年来,胶质瘤的治疗方法取得了一定的进步,包括手术、放化疗等,但是 GBM 病人 3 年内病死率仍然超过 90%,这与术后复发关系密切<sup>[5]</sup>。为了预测 GBM 的临床病程,需要更清楚地了解引起术后复发的生物学因素。本文发现 GBM 组织 miR-126 表达水平明显下调,这与 miR-126 基因启动子区域发生超甲基化有关;而且 miR-126 甲基化是导致 GBM 术后复发的独立危险因素。

miRNA 是一种小的非编码 RNA,调控多种 mRNA 转录和转录后翻译过程。miR-126 是一种可调节人巨核细胞生成的 miRNA,并且在各种恶性肿瘤中普遍下调,因此,被认为是一种潜在的肿瘤抑制因子。有报道称 miR-126 是内皮细胞生物学和肿瘤血管生成的重要参与者,是肿瘤发展的标志性事件<sup>[6]</sup>。Chen 等<sup>[7]</sup>发现高度恶性胶质瘤组织和 U87MG 细胞 miR-126 的表达普遍低于正常脑细胞;miR-126 表达上调后,U87MG 细胞的增殖、迁移和侵袭活性则受到明显抑制,凋亡率明显增加;这与靶向抑制 PTEN/PI3K/AKT 通路和 MDM2-P53 途径有关。Xu 等<sup>[8]</sup>通过转染 miR-126 mimics 后发现,U87 和 U251 细胞的迁移能力明显降低。本文发现 GBM 组织 miR-126 表达水平较非肿瘤脑组织普遍降低,尤其

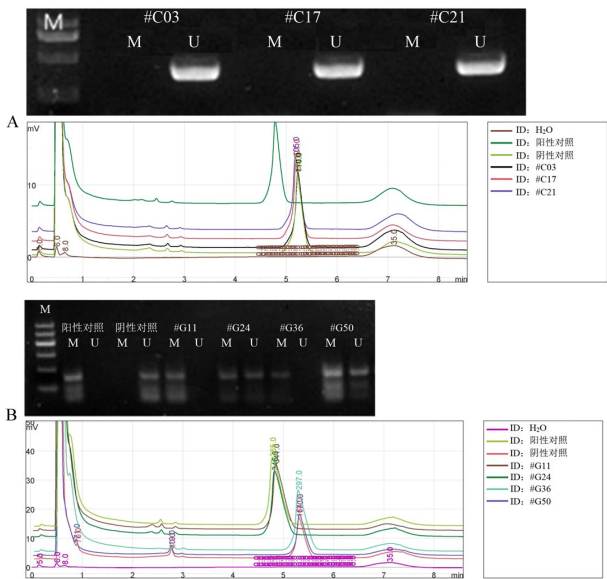


图 1 MSP-DHPLC 法检测 miR-126 基因启动子的甲基化状态 A. 非肿瘤脑组织;B. 胶质母细胞瘤组织



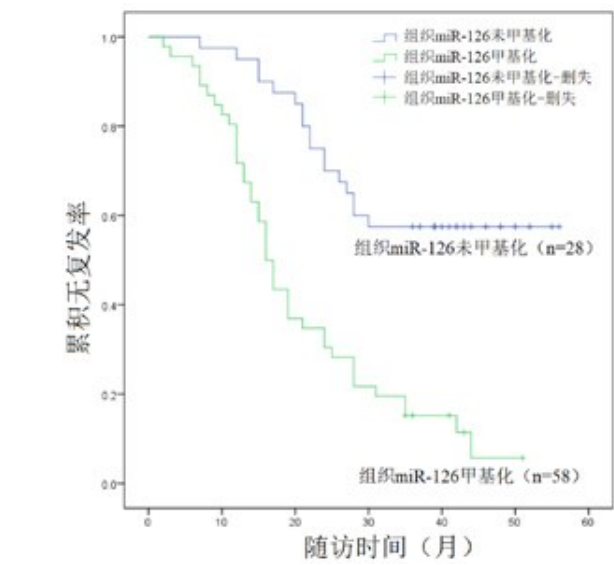


图2 生存曲线分析miR-126甲基化状态与术后复发的关系

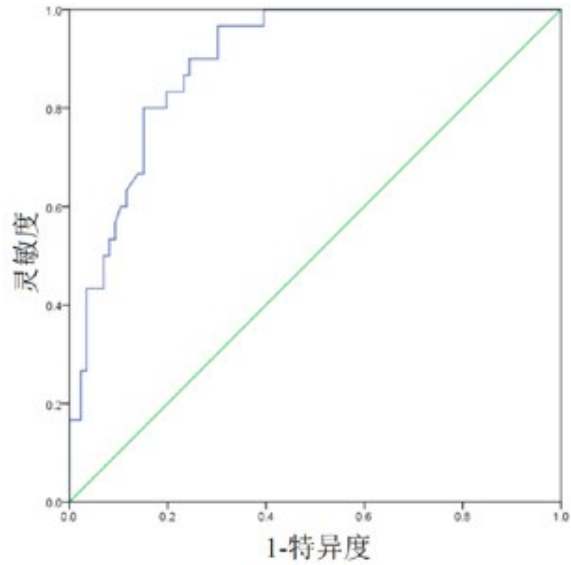


图3 ROC曲线分析miR-126表达水平预测胶质母细胞瘤术后复发的效果

是复发组降低水平更明显。这提示miR-126有望成为GBM诊断、治疗和预后的新型生物标志物。

肿瘤细胞 miRNA 的表达受到包括 DNA 甲基化修饰在内的表观修饰等多种机制的调控,而GBM具有广泛的遗传和表观遗传学异质性。表观遗传调控基因的突变已被确定为具有明显临床特征的神经胶质瘤亚型的关键驱动因素。Klughammer等<sup>[9]</sup>报道原发性和复发性GBM相匹配的DNA甲基化的基因组图谱,从而确定了DNA甲基化和肿瘤复发、病人生存预后之间的联系。表观遗传学的改变,如DNA启动子区CpG岛的甲基化状态,被认为是肿瘤早期和常见的事件,并在肿瘤进展中发挥重要作用。本文发现与非肿瘤脑组织相比,GBM组织miR-126基因异常甲基化率升高,这是导致miR-126表达水平降低的重要原因之一。Verhaak等<sup>[10]</sup>基于TCGA数据库分析GBM基因序列突变谱,并确认TP53、EGFR、IDH1、PIK3R1、BRAF V600E、PTEN等相关突变,大多数GBM存在这些基因或信号通路异常情况。这提示这些分子可能是GBM发生、发展的关键分子。本文结果显示miR-126基因甲基化和IDH1基因突变是影响GBM术后复发的独立危险因素。这提示miR-126基因甲基化和IDH1基因突变一样,都是与GBM复发相关的一个重要表观遗传学事件。

综上所述,GBM组织miR-126表达水平普遍降低,这与其基因启动子异常甲基化有关;miR-126基因高甲基化是GBM术后复发的独立危险因素,对预测病人预后有一定的作用。

【参考文献】

[1] Tan AC, Ashley DM, López GY, *et al.* Management of glioblastoma: State of the art and future directions [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(4): 299-312.

[2] Kong D, Ying B, Zhang J, *et al.* The anti-osteosarcoma property of aianthone through regulation of miR-126/VEGF-A axis [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 3913-3919.

[3] 王 凯,张 姝,施 露,等. 2016年世界卫生组织中枢神经系统肿瘤分类概述[J]. 磁共振成像,2016,7(12): 881-896.

[4] Chung JY, Cho H, Hewitt SM. The paraffin-embedded RNA metric (PERM) for RNA isolated from formalin- fixed, paraffin-embedded tissue [J]. Biotechniques, 2016, 60(5): 239-244.

[4] 袁 航,屠世良. 结直肠癌组织miR34a启动子区甲基化状态的临床意义探讨[J]. 浙江医学,2019,41(18): 1952-1955.

[5] Zhang X, Zhang W, Mao XG, *et al.* Malignant intracranial high grade glioma and current treatment strategy [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2019, 19(2): 101-108.

[6] 陈寿仁,王占祥,沈上杭,等. miR-126下调MMP-2抑制人脑胶质瘤细胞侵袭[J]. 肿瘤防治研究,2012,39(3): 264-266.

[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] 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.

[9] Klughammer J, Kiesel B, Roetzer T, *et al.* The DNA methylation landscape of glioblastoma disease progression shows extensive heterogeneity in time and space [J]. Nat Med, 2018, 24(10): 1611-1624.

[10] Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1 [J]. Cancer Cell, 2010, 17(1): 98-110.

(2021-04-27 收稿, 2021-06-08 修回)

· 个案报告 ·

大脑镰旁脑膜瘤术后丙戊酸钠中毒 1 例

许强华 刘平非 谢 腾 陈晓巍 胡 航 罗小程 陈治军

【关键词】脑膜瘤;显微手术;丙戊酸钠;中毒;医源性  
【文章编号】1009-153X(2021)09-0686-01 【文献标志码】B 【中国图书资料分类号】R 739.41; R 619

颅脑手术,特别是幕上开颅手术,为预防术后癫痫常预防性应用抗癫痫药物,而丙戊酸钠是临床上最常用的预防和控制癫痫的药物之一。本文报道大脑镰旁脑膜瘤术后丙戊酸钠严重中毒 1 例。

1 病例资料

55 岁女性,因头晕、左侧肢体乏力 1 个月入院。入院体格检查:左侧肢体肌力约 4 级,未发现其他神经系统阳性体征。入院后头部 MRI 检查示右侧大脑镰旁占位,大小约 3 cm×4 cm,位于右侧中央前回前方,且中央前回向后外侧受压明显,考虑脑膜瘤。常规预防癫痫治疗(口服丙戊酸钠缓释片,0.5 g,2 次/d)。入院第 5 天,全麻下行右侧大脑镰旁占位性病变切除术,手术顺利,术后静脉滴注丙戊酸钠(0.4 g,1 次/8 h)预防癫痫。术后 1 d,神志清楚,左上肢肌力 0 级,左下肢肌力 2 级。复查颅脑 CT 未见明显异常。术后 1 周,出现短暂意识障碍,呈失神样发作,几分钟后自行恢复正常。随后 2 周内,意识障碍逐渐加重,由嗜睡、昏睡到昏迷;出现呼吸急促,氧饱和度欠佳,行气管插管呼吸机辅助呼吸;四肢软瘫;期间多次复查颅脑、肺部 CT 及颅脑 MRI 均未见特殊异常。血浆氨、甲状腺激素、电解质等检查未见明显异常。因丙戊酸钠血药浓度检测结果未回,排除感染性疾病、内分泌及电解质等因素后,考虑丙戊酸钠中毒,停用丙戊酸钠,改用奥卡

西平预防癫痫。停丙戊酸钠 2 d 后,神志逐渐清楚,生命体征恢复正常。丙戊酸钠血药浓度检测结果为 110 mg/L。

2 讨论

癫痫的病因及发作形式多样。丙戊酸钠为临床预防癫痫的一线用药。颅脑术后预防性应用抗癫痫药物仍存在争议,但大脑半球手术,特别是涉及运动皮质区的手术,预防性应用抗癫痫药物逐渐达成共识。

丙戊酸钠有效血药浓度在 50~100 mg/L;血药浓度过低,可能无法控制癫痫;血药浓度过高,可能出现药物中毒。本文病例术前及术后给予常规剂量丙戊酸钠预防癫痫,术后 1 周开始出现间断性失神样意识障碍,影像学检查术区呈术后改变,未引起足够重视;随后,意识障碍进行性加重直至昏迷及呼吸抑制等。此时,因本院条件所限,无法进行丙戊酸钠血药浓度检测,在排除感染性疾病、内分泌及电解质等因素后,考虑丙戊酸钠中毒,停用丙戊酸钠后,病情逐渐好转,治愈出院。

本文病例诊治的经验教训:①病人术前及术后一直应用丙戊酸钠,术后 1 周出现间断失神样发作、嗜睡且症状逐渐加重,与影像学检查不相符时,应考虑到丙戊酸钠过量可能;②病人体内丙戊酸钠血药浓度个体化差异很大,与 CYP2C19 基因多态性有关,因此,丙戊酸钠血药浓度动态监测对指导临床用药十分重要;③针对病人出现的任何异常情况,应及时明确原因,尽早处理,提高临床诊疗水平,以确保病人安全。

(2019-09-20 收稿, 2019-10-10 修回)

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2021.09.010  
作者单位:448000 湖北,荆门市第一人民医院神经外科(许强华、刘平非、谢 腾、陈晓巍、胡 航、罗小程、陈治军)  
通讯作者:陈治军, E-mail: xuqianghua222@126.com