

· 论 著 ·

M6A 去甲基化酶 FTO 在脑胶质瘤中的表达及其与病人预后的关系

张丽娜 王 凯 范国锋 秦 虎

【摘要】目的 探讨 6-甲基腺嘌呤(m6A)去甲基化酶肥胖相关蛋白(FTO)在脑胶质瘤中的表达及其与病人生存预后的关系。**方法** 选取 2015 年 1 月至 2017 年 8 月手术切除的脑胶质瘤标本 84 例(Ⅱ级 24 例,Ⅲ级 14 例,Ⅳ级 46 例)和颅脑损伤内减压术中获取的非肿瘤脑组织 40 例为对照。免疫印迹法和免疫组化法检测组织 FTO 表达水平。胶质瘤病人随访截止 2022 年 8 月,计算总生存期。**结果** 免疫组化染色显示,WHO 分级Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ级脑胶质瘤组织 FTO 高表达率分别为 20.83%(5/24)、50.00%(7/14)、73.91%(34/46),均明显高于非肿瘤脑组织[10%(4/40); $P<0.05$];而且,WHO 分级Ⅳ级胶质瘤 FTO 过表达率明显高于Ⅱ级胶质瘤($P<0.05$)。免疫印迹法检查结果显示脑胶质瘤组织 FTO 蛋白表达水平明显高于非肿瘤脑组织($P<0.05$)。截止随访结束,脑胶质瘤死亡 30 例,其中高表达组死亡 18 例,低表达组死亡 12 例。多因素 logistic 回归分析显示,FTO 高表达是胶质瘤预后不良的独立危险因素(OR=3.794;95% CI 1.164~5.108; $P<0.001$)。生存曲线分析显示,FTO 高表达组中位总体生存期较低表达组明显缩短($P<0.001$)。**结论** 脑胶质瘤组织 m6A 去甲基化酶 FTO 呈高表达,与病人不良生存预后有关。

【关键词】 脑胶质瘤;去甲基化酶;肥胖相关蛋白;生存预后

【文章编号】 1009-153X(2023)01-0034-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Expression of m6A demethylase FTO in glioma tissues and its relationship with patients' prognoses

ZHANG Li-na, WANG Kai, FAN Guo-feng, QIN Hu. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 841100, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression of 6-methyladenine (m6A) demethylase obesity-related protein (FTO) in glioma tissues and its relationship with patients' survival prognoses. **Methods** The expression of FTO was detected in glioma tissues obtained from 84 glioma patients who underwent surgery from January 2015 to August 2017 (24 cases of WHO grade Ⅱ, 14 cases of WHO grade Ⅲ, 46 cases of Ⅳ) and in non-tumor brain tissue obtained from 40 patients with traumatic brain injury who underwent decompression by western blotting and immunohistochemistry, respectively. The glioma patients were followed up until August 2022, and the overall survival time was calculated. **Results** Immunohistochemical staining showed that the high expression rates of FTO in glioma tissue of WHO grade Ⅱ, Ⅲ, and Ⅳ were 20.83% (5/24), 50.00% (7/14) and 73.91% (34/46), respectively, which were significantly higher than that [10% (4/40)] in non-tumor brain tissue ($P<0.05$). In addition, the high expression rate of FTO in WHO grade Ⅳ gliomas was significantly higher than that in grade Ⅱ gliomas ($P<0.05$). Western blotting showed that the expression level of FTO protein in glioma tissues was significantly higher than that in non-tumor brain tissues ($P<0.05$). By the end of follow-up, 30 glioma patients died, including 18 patients with high expression of FTO and 12 with low expression. Multivariate logistic regression analysis showed that high expression of FTO was an independent risk factor for poor prognosis of glioma patients (OR=3.794; 95% CI 1.164~5.108; $P<0.001$). Survival curve analysis showed that the median overall survival time was significantly shorter in the patients with high FTO expression than the patients with low FTO expression ($P<0.001$). **Conclusions** The m6A demethylase FTO is highly expressed in glioma tissues, which is associated with a poor survival prognosis of glioma patients.

【Key words】 Glioma; Demethylase; Fat mass and obesity-associated protein; Prognosis

胶质瘤是颅内常见肿瘤,多呈浸润性生长,手术

常难以完全切除,术后易复发。近年来手术及放化疗技术有所发展,但是胶质瘤 5 年生存率未见明显提高^[1],因此,寻找新的胶质瘤标志物,对胶质瘤的治疗及预后评估具有重要临床意义。RNA 6-甲基腺嘌呤(N6-methyladenosine, m6A)甲基化修饰是真核生物常见的一种化学修饰,受去甲基化酶、甲基化酶调控,并且被结合蛋白识别,调节 RNA 代谢、mRNA 稳定性、翻译效率等^[2]。m6A 甲基化修饰可以调控肿

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2023.01.010

基金项目:新疆维吾尔自治区卫生计生委青年科技人才专项科研项目(wjwy201818)

作者单位:841100 乌鲁木齐,新疆医科大学第一附属医院神经外科(张丽娜、王 凯、范国锋、秦 虎)

通讯作者:秦 虎, E-mail: Qinhuh86@163.com

瘤相关基因表达,影响肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移^[3, 4]。肥胖相关蛋白(fat mass and obesity-associated protein, FTO)是m6A去甲基化酶家族成员之一,与胃癌^[5]、结直肠癌^[6]、食管鳞癌^[7]等发生、发展密切相关。研究发现,FTO促进体外培养的胶质瘤细胞增殖、侵袭和迁移^[8, 9]。本文探讨脑胶质瘤组织FTO表达水平变化及其与病人生存预后的关系。

1 资料与方法

1.1 病例选择标准 纳入标准:术后病理检查证实为脑胶质瘤;未合并其他部位肿瘤;术前未接受放/化疗;临床资料完整。排除标准:合并严重心肝肾脏功能不全;合并其他类型脑肿瘤。

1.2 标本来源 选择2015年1月至2017年8月手术切除的脑胶质瘤标本84例,其中男49例,女35例;平均年龄(52.09±4.32)岁;WHO分级Ⅱ级24例,Ⅲ级14例,Ⅳ级46例;术后化疗61例。选取同期颅脑损伤内减压术中获取的非肿瘤脑组织40例为对照,其中男22例,女18例;平均年龄(51.25±2.87)岁。

1.3 免疫组织化学染色法检测组织FTO表达水平 胶质瘤组织和非肿瘤脑组织用10%中性福尔马林固定,随后梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,再进行切片(厚度4 μm)。免疫组化检测前,先用柠檬酸钠抗原修复液(武汉卡诺斯科技有限公司)进行抗原修复。按照免疫组化SP法检测试剂盒(武汉菲恩生物科技有限公司)说明书,加入兔抗人FTO多克隆抗体(1:500,上海江莱生物科技有限公司),4℃孵育过夜。然后,滴加酶标羊抗兔抗体(美国Sigma公司)

室温孵育1 h,二氨基联苯胺显色,显微镜下观察。FTO主要定位于细胞浆(图1),其表达评分为染色强度评分和阳性细胞比例评分相乘,其中≥4分为高表达^[10]。

1.4 免疫印迹法检测组织FTO表达水平 选取WHO分级Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ级胶质瘤组织以及非肿瘤脑组织各8例,用蛋白裂解液提取总蛋白,SDS-PAGE电泳分离蛋白,用半干转移法将蛋白转至聚偏二氟乙烯膜(武汉菲恩生物科技有限公司)。5%脱脂奶粉封闭2 h,加入兔抗人FTO多克隆抗体(1:500,上海江莱生物科技有限公司)以及GAPDH内参抗体(1:1 000,上海江莱生物科技有限公司)4℃孵育过夜,除去一抗,用TBST缓冲液洗涤3次,加入羊抗兔二抗(美国Sigma公司)封闭1 h。ECL发光仪进行蛋白成像,Image J软件分析灰度值。

1.5 随访 术后门诊和电话随访,随访截止2022年8月,计算总生存时间(即入组至任何原因死亡时间)。

1.6 统计学方法 采用SPSS 20.0软件分析;计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析和t检验;计数资料采用 χ^2 检验;用Cox比例回归风险模型分析生存预后的危险因素;采用Kaplan-Meier法绘制生存曲线分析胶质瘤FTO表达水平与生存期的关系; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑胶质瘤组织FTO的表达水平 免疫组化染色显示,WHO分级Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ级脑胶质瘤组织FTO高表达率分别为20.83%(5/24)、50.00%(7/14)、73.91%(34/46),均明显高于非肿瘤脑组织[10%(4/40); $P < 0.05$];而且,WHO分级Ⅳ级胶质瘤FTO过表达率明显高于Ⅱ级胶质瘤($P < 0.05$)。免疫印迹法检查结果显示脑胶质瘤组织FTO蛋白表达水平明显高于非肿瘤脑组织($P < 0.05$,图2)。

2.2 脑胶质瘤生存预后的影像因素 截止随访结束,脑胶质瘤死亡30例,其中高表达组死亡18例,低表达组死亡12例。多因素Cox比例回归风险模型分析显示,肿瘤级别高、术后未化疗、FTO高表达是胶质瘤生存预后不良的独立危险因素($P < 0.05$,表1)。

2.3 FTO表达水平与脑胶质瘤生存预后的关系 生存曲线分析显示,FTO高表达组中位总体生存期较低表达组明显缩短($P < 0.001$,图3)。

3 讨论

表观遗传学修饰异常在脑胶质瘤发生、发展中

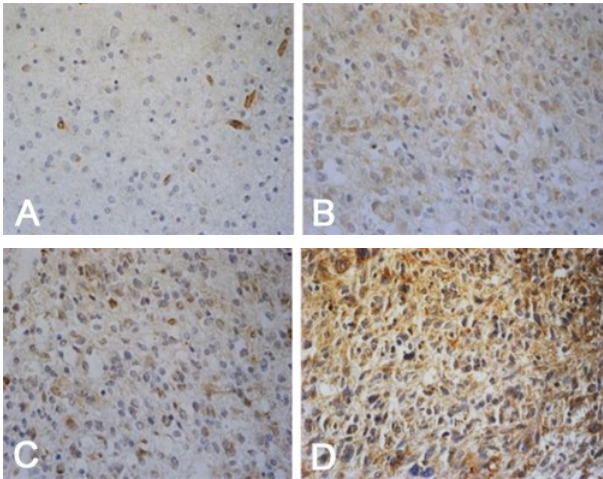


图1 免疫组化染色检测FTO表达(×200)

A. 非肿瘤脑组织;B. WHO 分级Ⅱ级胶质瘤;C. WHO 分级Ⅲ级胶质瘤;D. WHO 分级Ⅳ级胶质瘤;FTO, 6-甲基腺嘌呤去甲基化酶肥胖相关蛋白

表 1 脑胶质瘤生存预后危险因素的 Cox 比例回归风险模型分析

危险因素	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
年龄≥55 岁	1.089	0.901~1.121	0.461			
男性	0.982	0.912~1.123	0.328			
肿瘤直径≥5 cm	1.200	0.865~1.462	0.101			
肿瘤位于额叶	0.913	0.897~1.121	0.300			
高级别胶质瘤	7.893	2.356~15.089	<0.001	5.823	2.000~10.898	<0.001
肿瘤未全切除	1.210	0.905~1.332	0.104			
术后未化疗	4.098	1.267~6.896	<0.001	2.275	1.573~3.786	0.008
FTO 高表达	4.654	1.786~6.784	<0.001	3.794	1.164~5.108	<0.001

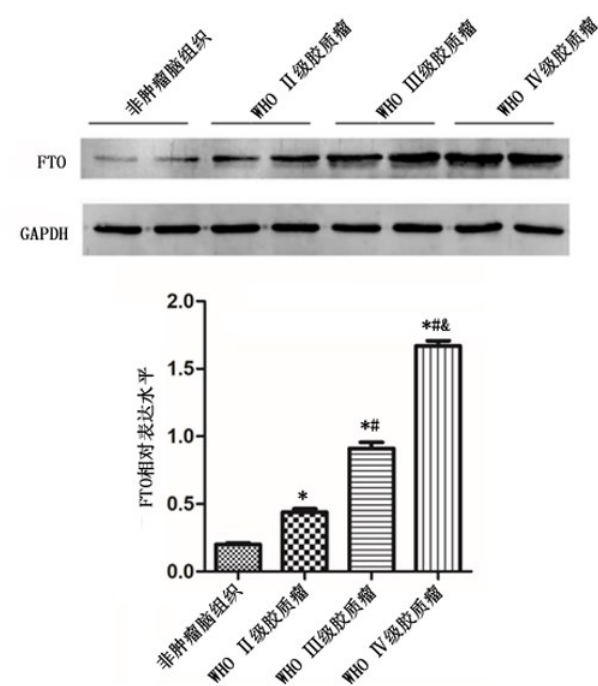


图 2 免疫印迹法检测组织 FTO 蛋白表达水平
与非肿瘤脑组织相应值比, * $P<0.05$; 与 WHO II 级胶质瘤相应值比, # $P<0.05$; 与 WHO III 级胶质瘤相应值比, & $P<0.05$; FTO, 6-甲基腺嘌呤去甲基化酶肥胖相关蛋白

起重要作用。RNA 甲基化是一种表观遗传修饰,其中 m6A 甲基化是最常见和研究最深入的 RNA 甲基化。m6A 在人整个生命周期中均有发现,通过影响 RNA 代谢发挥生物学功能^[11]。FTO 是定位于 16q12.2 上的 m6A 去甲基化酶,与肥胖有关^[12]。研究发现 FTO 与肿瘤发生、发展密切相关^[5-7]。FTO 在肿瘤中发挥作用的机制:一是 FTO 单核苷酸多态性增加肿瘤易感性^[13,14];二是 FTO 作为去甲基化酶可影响 m6A 甲基化水平、细胞分化和干细胞自我更新、细胞增殖、化疗耐药等,进而参与肿瘤发生、发展^[15-17]。研

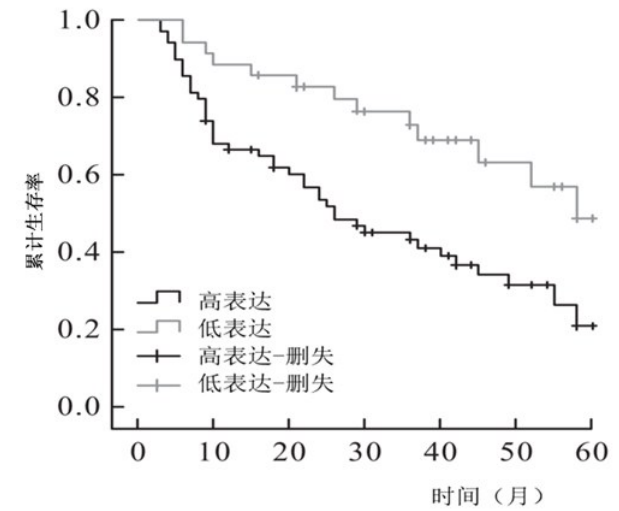


图 3 生存曲线分析 FTO 表达与胶质瘤生存预后的关系

究发现 FTO 抑制剂具有抗肿瘤作用^[18]。本文发现脑胶质瘤组织 FTO 呈高表达,并且 WHO 分级越高,FTO 蛋白表达水平越高。有研究发现,胶质母细胞瘤细胞 FTO 表达水平升高^[9]。Xiao 等^[8]发现 FTO 靶向 MYC-miRNA155/23a-MXI1z 轴有增强替莫唑胺的抗胶质瘤作用。也有研究发现,FTO 可通过 m6A/MYC/CEBPA 信号通路在胶质瘤中发挥抗肿瘤作用^[19]。这提示 FTO 可能参与胶质瘤的发生、发展。

脑胶质瘤的预后受多种因素影响,例如瘤细胞侵袭和迁移力^[20]。FTO 会影响脑胶质瘤细胞侵袭和迁移^[9],我们推测 FTO 与脑胶质瘤生存预后有关。有研究发现 m6A 去甲基化可影响脑胶质瘤预后^[21,22]。本文结果显示 FTO 高表达是胶质瘤不良生存预后的独立危险因素;生存曲线分析显示,FTO 高表达胶质瘤病人中位总体生存期较低表达病人明显缩短。这提示 FTO 高表达与脑胶质瘤不良生存预后有关。

总之,脑胶质瘤组织 m6A 去甲基化酶 FTO 呈高表达,与不良生存预后有关。

【参考文献】

[1] Xu S, Tang L, Li X, *et al.* Immunotherapy for glioma: current management and future application [J]. *Cancer Lett*, 2020, 476: 1–12.

[2] Deng LJ, Deng WQ, Fan SR, *et al.* m6A modification: recent advances, anticancer targeted drug discovery and beyond [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 52.

[3] An Y, Duan H. The role of m6A RNA methylation in cancer metabolism [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 14.

[4] Chen DH, Zhang JG, Wu CX, *et al.* Non-coding RNA m6A modification in cancer: mechanisms and therapeutic targets [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 778582.

[5] Shimura T, Kandimalla R, Okugawa Y, *et al.* Novel evidence for m(6)A methylation regulators as prognostic biomarkers and FTO as a potential therapeutic target in gastric cancer [J]. *Br J Cancer*, 2022, 126(2): 228–237.

[6] Wang J, Qiao Y, Sun M, *et al.* FTO promotes colorectal cancer progression and chemotherapy resistance via demethylating G6PD/PARP1 [J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(3): e772.

[7] Duan X, Yang L, Wang L, *et al.* m6A demethylase FTO promotes tumor progression via regulation of lipid metabolism in esophageal cancer [J]. *Cell Biosci*, 2022, 12(1): 60.

[8] Xiao L, Li X, Mu Z, *et al.* FTO inhibition enhances the anti-tumor effect of temozolomide by targeting MYC-miR-155/23a cluster-MX11 feedback circuit in glioma [J]. *Cancer Res*, 2020, 80(18): 3945–3958.

[9] Zhang S, Zhao S, Qi Y, *et al.* SPI1-induced downregulation of FTO promotes GBM progression by regulating pri-miR-10a processing in an m6A-dependent manner [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2022, 27: 699–717.

[10] 张朋肖, 吴红记, 甘宁, 等. 人脑胶质瘤 FAM46A 表达与病人预后的关系[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2022, 27(3): 171–173.

[11] Pan T, Wu F, Li L, *et al.* The role m(6)A RNA methylation is CNS development and glioma pathogenesis [J]. *Mol Brain*,

2021, 14(1): 119.

[12] Lan N, Lu Y, Zhang Y, *et al.* FTO—a common genetic basis for obesity and cancer [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 559138.

[13] Fan J, Zhuo Z, Chen G, *et al.* FTO gene polymorphisms and hepatoblastoma susceptibility among Chinese children [J]. *Cell Cycle*, 2022, 21(14): 1512–1518.

[14] Hua RX, Fu W, Lin A, *et al.* Role of FTO gene polymorphisms in Wilms tumor predisposition: a five-center case-control study [J]. *J Gene Med*, 2021, 23(8): e3348.

[15] Su R, Dong L, Li Y, *et al.* Targeting FTO suppresses cancer stem cell maintenance and immune evasion [J]. *Cancer Cell*, 2020, 38(1): 79–96.e11.

[16] Xu Y, Ye S, Zhang N, *et al.* The FTO/miR-181b-3p/ARL5B signaling pathway regulates cell migration and invasion in breast cancer [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2020, 40(10): 484–500.

[17] Li Y, Su R, Deng X, *et al.* FTO in cancer: functions, molecular mechanisms, and therapeutic implications [J]. *Trends Cancer*, 2022, 8(7): 598–614.

[18] Huang J, Sun W, Wang Z, *et al.* FTO suppresses glycolysis and growth of papillary thyroid cancer via decreasing stability of APOE mRNA in an N6-methyladenosine-dependent manner [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 42.

[19] Su R, Dong L, Li C, *et al.* R-2HG exhibits anti-tumor activity by targeting FTO/m(6)A/MYC/CEBPA signaling [J]. *Cell*, 2018, 172(1–2): 90–105.e123.

[20] Zhou Q, Liu J, Quan J, *et al.* lncRNAs as potential molecular biomarkers for the clinicopathology and prognosis of glioma: a systematic review and meta-analysis [J]. *Gene*, 2018, 668: 77–86.

[21] Cong P, Wu T, Huang X, *et al.* Identification of the role and clinical prognostic value of target genes of m6A RNA methylation regulators in glioma [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 709022.

[22] Tao N, Wen T, Li T, *et al.* Interaction between m6A methylation and noncoding RNA in glioma [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 283.

(2022-12-28 收稿, 2023-01-09 修回)