

## · 论 著 ·

IDH 突变调控 BMP2、COL27A1 和 SERPINA5 基因表达  
影响人脑胶质瘤的生存预后

包逸雯 朱伟良

**【摘要】目的** 探讨异柠檬酸脱氢酶(IDH)突变影响胶质瘤临床预后的潜在分子机制。**方法** 计算机检索 CGGA 和 TCGA 数据库,获取胶质瘤 RNA 测序数据(RNA-seq),应用生物信息学分析方法分析 IDH 突变改善胶质瘤临床预后的潜在分子机制。**结果** 从 TCGA 数据库下载胶质母细胞瘤(GBM)和低级别胶质瘤(LGG)相关 RNA-seq,从 CGGA 数据量下载 648 例胶质瘤的 RNA-seq(234 例 GBM 和 414 例 LGG),从 GEO 数据量下载单细胞 RNA-seq 数据 GSE131928 数据集(28 例 IDH 野生型 GBM)。GO 和 KEGG 分析显示,IDH 突变显著下调胞外基质(ECM)相关基因表达,GEPIA 分析显示 BMP2、COL27A1、SERPINA5、VEGFA 基因表达水平与胶质瘤生存预后有关,多因素 Cox 比例回归风险模型分析显示 BMP2、COL27A1、SERPINA5 基因表达是胶质瘤生存预后独立影响因素,BMP2 联合 SERPINA5 预测胶质瘤生存预后效果最好。**结论** 我们结果提示胶质瘤 IDH 基因突变,可能通过调控 BMP2、COL27A1 和 SERPINA5 基因表达,影响病人生存预后。

**【关键词】** 胶质瘤; IDH 突变; 生存预后; 基因表达

**【文章编号】** 1009-153X(2023)03-0179-05 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

**IDH mutation regulates expressions of BMP2, COL27A1, and SERPINA5 to improve survival prognoses of glioma patients**

BAO Yi-wen, ZHU Wei-liang. Department of Oncology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510220, China

**【Abstract】 Objective** To explore the potential molecular mechanisms of isocitrate dehydrogenase (IDH) mutation improving the clinical prognoses of glioma patients. **Methods** Glioma RNA sequencing data (RNA-seq) were obtained from CGGA and TCGA databases. The potential molecular mechanisms of IDH mutation to improve the clinical prognoses of glioma patients was analyzed using bioinformatics methods. **Results** RNA-seq related to glioblastoma (GBM) and low-grade glioma (LGG) were downloaded from the TCGA database, and RNA-seq of 648 gliomas (234 GBM and 414 LGG) were downloaded from CGGA data. Single cell RNA-seq dataset GSE131928 (28 IDH wild-type GBM) was downloaded from GEO database. GO and KEGG analyses showed that IDH mutation significantly down-regulated the expression of extracellular matrix related genes. GEPIA analysis showed that the expression levels of BMP2, COL27A1, SERPINA5 and VEGFA genes were correlated with the survival prognoses of glioma patients. Multivariate Cox proportional regression risk model analysis showed that expressions of BMP2, COL27A1, and SERPINA5 genes were independent risk factors for survival prognoses of glioma patients, and BMP2 combined with SERPINA5 was the best predictor for survival prognoses of glioma patients. **Conclusions** Our results suggest that IDH gene mutation may improve survival prognoses of glioma patients by regulating the expressions of BMP2, COL27A1, and SERPINA5.

**【Key words】** Gliomas; IDH mutations; Gene expression; Survival prognosis

胶质瘤是颅内最常见的原发性恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,预后较差,占有胶质瘤一半以上的胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)的5、10年生存率仅在5%、0.71%左右<sup>[2,3]</sup>。低级别胶质瘤(low-grade

gliomas, LGGs)的预后常优于GBM,有些LGGs亚型的5年生存率在41%~88%<sup>[4]</sup>。研究表明,异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH)突变型胶质瘤病人生存预后相对IDH野生型胶质瘤病人要好<sup>[5]</sup>。因此,分析IDH突变导致的基因表达差异具有重要的临床意义。近年来,成纤维细胞在胶质瘤中的多能性备受关注,包括与其他类型细胞的交联、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的构建以及免疫调节等作用<sup>[6-8]</sup>。本文拟采用生物信息学方法探讨胶质瘤IDH突变是否通过调控成纤维细胞基因表达抑制胶质瘤恶性生物学行为,从而改善病人预后。

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2023.03.011

基金项目:广东省自然科学基金(2018A030313846; 2021A1515012593)

作者单位:510220 广州,南方医科大学珠江医院肿瘤科(包逸雯、朱伟良)

通讯作者:朱伟良, E-mail: duarion@126.com

## 1 资料与方法

1.1 数据收集 计算机检索TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov>),通过UCSC Xena下载GDC-TCGA-GBM和GDC-TCGA-LGG相关RNA-seq。648例胶质瘤(234例GBM和414例LGG)的RNA-seq数据来自CGGA数据库<sup>[9]</sup>。此外,从GEO数据库下载单细胞RNA-seq数据集GSE131928(包含28例IDH野生型GBM)<sup>[10]</sup>。

1.2 差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)的识别 CGGA数据库胶质瘤RNA-seq数据分析DEGs时, $P < 0.05$ 和 $FC > 1.5$ 的基因被认为DEGs。TCGA数据库胶质瘤RNA-seq数据分析DEGs时, $P < 0.05$ 和 $FC > 2$ 被认为DEGs。

1.3 基因富集分析 通过R统计软件包clusterProfiler、KEGG.db、clusterProfiler进行GO富集分析、KEGG分析和GESA相关分析。Entrez基因id是从“c2.cp.kegg.v7.4.entrez.gmt”文件中检索到的。

1.4 生存分析 首先利用GEPIA(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)中的“Expression on Box Plots”模块对肿瘤组织和正常组织的靶基因进行单因素生存分析,Cox比例风险分析和预后模型通过R统计软件包survminer、survival、rms、pROC和RColorBrewer进行分析。

1.5 肿瘤纯度、免疫细胞浸润和免疫微环境的评估 通过R软件包ESTIMATE、MCPcounter评估胶质瘤样本的肿瘤纯度和肿瘤微环境中基质细胞等比例。

1.6 单细胞聚类分析 单细胞RNA-seq数据集(GSE131928)的细胞聚类由R软件包Seurat进行分析。首先,采用“LogNormalize”缩放归一化方法,去除具有超过2 500或 $< 200$ 、 $> 5\%$ 线粒体计数的独特特征细胞。在数据归一化后,使用带有默认参数的UMAP执行单元格的非线性降维。最后,通过t-SNE方法和UMAP方法划分生物标志物簇。此外,通过DEGs的富集分析,再次鉴定出免疫细胞亚群和成纤维细胞亚群。

1.7 数据可视化 生信分析结果通过多种R软件包可视化,包括GOplot、enrichplot、ggplot2、ComplexHeatmap、forestplot和ggforestplot等,以及应用GraphPad Prism 9和Adobe Photoshop 2020等专业软件。

## 2 结果

2.1 IDH突变显著下调LGGs细胞活性以及与细胞外因子的结合能力 GO富集分析显示IDH突变显著下调的DEGs主要参与细胞活力的调节,包括细胞因子

受体复合物、免疫复合物等。此外,IDH突变显著抑制LGGs肿瘤细胞与细胞外因子的结合能力,包括细胞因子、趋化因子、ECM成分等。KEGG分析结果再次验证IDH突变下调ECM构建相关的通路。信号通路图谱提示这些DEGs几乎覆盖了ECM构建通路。IDH突变上调的DEGs也被富集,但并未显著参与ECM的构建。这提示IDH突变会削弱肿瘤细胞活力和抑制胞外结构构建,降低肿瘤细胞的侵袭性。

2.2 筛选同时影响LGGs和GBM生存预后的DEGs GEPIA数据库的“Survival Plots”模块对IDH突变产生的DEGs进行单基因生存分析,成功筛选出超过50个显著改变LGGs病人总体生存期的DEGs,12个显著影响LGGs和GBM生存预后的靶基因,包括BMP2、COL27A1、SERPINA5和VEGFA等(图1A)。多变量coxph分析发现,TCGA-LGG、CGGA-LGG、TCGA-GBM和CGGA-GBM中BMP2、SERPINA5和COL27A1表达水平与病人生存预后相关(图1B、1C)。Cox回归分析显示BMP2和SERPINA5的组合比单独BMP2或SERPINA5具有更高的预测价值。这提示BMP2、COL27A1和SERPINA5可能是影响胶质瘤病人生存预后的关键基因。

2.3 胶质瘤IDH突变与BMP2、SERPINA5、COL27A1基因表达水平的相关性 CGGA数据库样本分析结果显示,IDH突变显著下调BMP2在LGGs和GBM中的表达,而显著上调COL27A1和SERPINA5的表达(图2A、2B)。这提示IDH突变是改变三个靶基因表达水平的共性条件。相关性分析显示,无论是GBM还是LGGs,BMP2与COL27A1和SERPINA5呈中等强度负相关(图2C、2D),而SERPINA5与COL27A1呈中等强度正相关(图2C、2D)。

2.4 基质评分和成纤维细胞丰度与胶质瘤预后不良呈正相关 免疫估算结果显示COL27A1和SERPINA5高表达、BMP2低表达的数据集基质评分明显增高,IDH突变显著下调四个数据集的基质评分。MCPcounter评估结果显示IDH突变和BMP2高表达显著降低LGGs成纤维细胞的绝对丰度,而COL27A1和SERPINA5高表达显著增加成纤维细胞的绝对丰度(图3)。GBM成纤维细胞的绝对丰度显著高于LGGs。这提示IDH突变也许通过上调BMP2以及下调COL27A1和SERPINA5表达,抑制胶质瘤ECM的构建和成纤维细胞丰度,最终影响病人的预后。

2.5 IDH野生型GBM中成纤维细胞的多能性 包含28例IDH野生型GBM的单细胞数据集(GSE131928)被聚类分析<sup>[13]</sup>,最后筛选出成纤维细胞

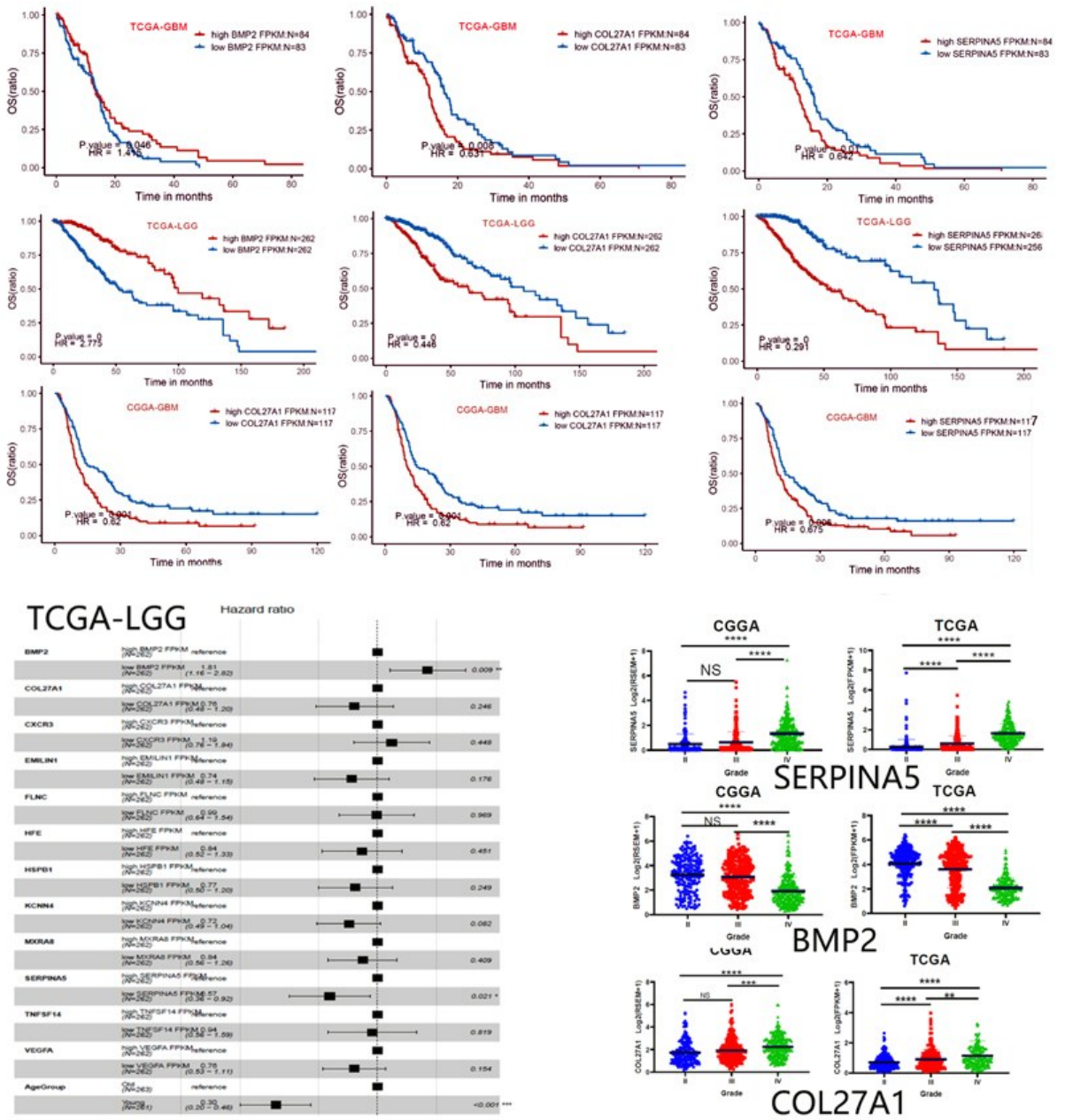


图1 BMP2、COL27A1和SERPINA5的表达水平显著影响胶质瘤病人的生存预后

A. TCGA-GBM、TCGA-LGG、CGGA-GBM数据库Kaplan-Meier生存曲线分析结果与胶质瘤病人生存预后相关的靶基因；B. 多因素Cox回归分析显示，BMP2高表达、COL27A1和SERPINA5低表达是胶质瘤生存预后的保护性因素；C. 胶质瘤病理分级越高，COL27A1和SERPINA5的表达水平越高，而BMP2表达水平越低，NS.  $P>0.05$ , \*\*  $P<0.05$ , \*\*\*  $P<0.01$ , \*\*\*\*  $P<0.001$

亚集。GSM3828672第8亚组的富集分析显示成纤维细胞增强内皮细胞、平滑肌细胞等多种细胞的趋化性，并促进微血管的形成；成纤维细胞也可以正向调节上皮细胞向间充质细胞转化并促进间充质细胞增殖和分化。KEGG分析显示PI3K/Akt、MAPK和Ras等信号通路在成纤维细胞中被激活。GSM3828673第11亚组富集分析显示成纤维细胞激活包括脂肪酸代谢、丙酮酸代谢、类固醇代谢等多个能量代谢通路。因此，我们推测成纤维细胞不仅促

进ECM的框架构建，还赋予血管内皮细胞和胶质瘤细胞合适的生存环境。这些过程可能是成纤维细胞导致恶性程度最高的IDH野生型GBM治疗预后差的因素之一。

### 3 讨论

即使采用手术联合术后放化疗等综合治疗，几乎所有GBM仍会复发，中位生存期仅12~15个月<sup>[11]</sup>。而IDH野生型LGGs通常比IDH突变型更早、更

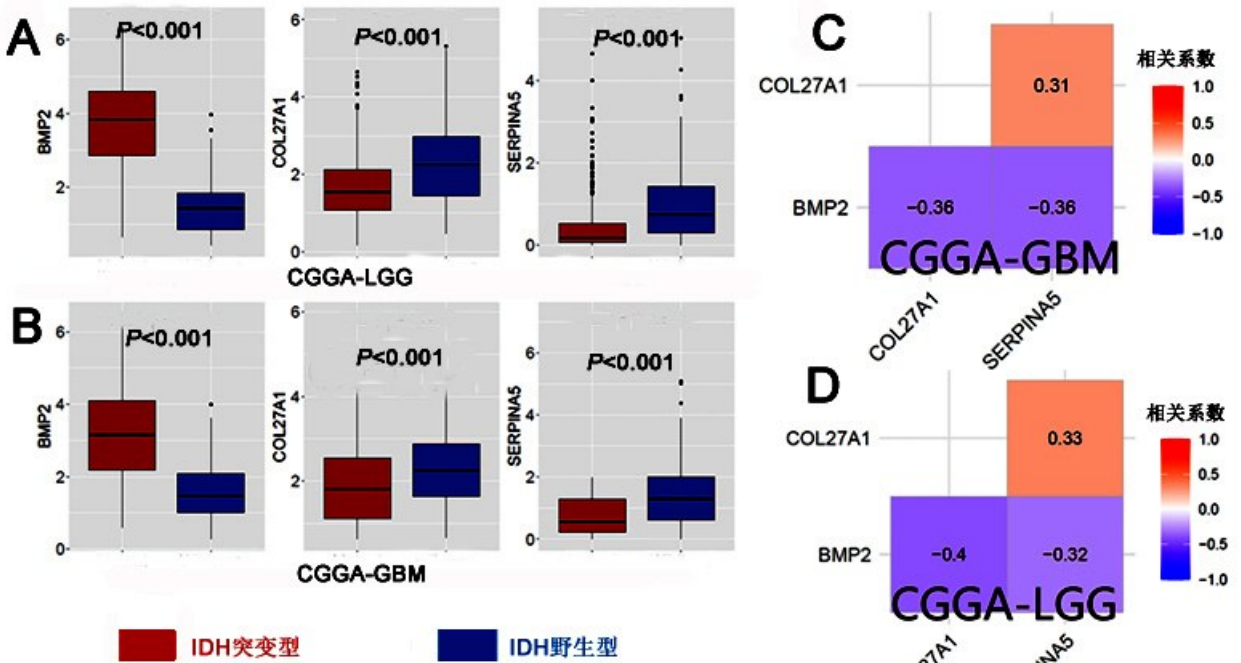


图2 胶质瘤IDH突变与BMP2、SERPINA5、COL27A1基因表达水平的相关性分析

A. CGGA-LGG 样本BMP2、SERPINA5和COL27A1表达水平与IDH突变的关系; B. CGGA-GBM 样本BMP2、SERPINA5和COL27A1表达水平与IDH突变的关系; C、D. CGGA-LGG、CGGA-GBM 样本BMP2与SERPINA5和COL27A1相关系数

快地复发<sup>[12]</sup>。尽管IDH突变作为保护性因素在胶质瘤治疗中已形成广泛共识,但IDH的保护性机制仍未完全被认知。为了探讨其潜在机制,我们从CGGA数据库和TCGA数据库获取包括LGGs和GBM在内的四个数据集,采用多维度多样本的分析,以IDH突变为切入点,结果显示BMP2、SERPINA5和COL27A1三个基因的表达水平的变化会影响LGGs和GBM的生存预后,并与IDH突变高度相关。这与既往报道较为一致<sup>[13-15]</sup>。

那么, IDH突变是如何调控BMP2、COL27A1和SERPINA5的表达水平来影响胶质瘤的侵袭性? 基于CGGA数据库相关差异分析的结果表明, IDH突变下调BMP2的表达,并上调COL27A1和SERPINA5的表达。这提示IDH突变是改变三个靶基因表达水平的共性条件。那么,明确BMP2、COL27A1和SERPINA5之间是否存在从属关系尤为重要。为此,我们进行相关性分析,结果显示无论GBM还是LGGs, BMP2与COL27A1和SERPINA5呈中等程度负相关,而COL27A1和SERPINA5呈中等强度正相关。此外,热图聚类分析结果与相关性分析结果一致,即三种基因之间找不到绝对从属关系。因此,这三种基因对胶质瘤的影响可能以多元化途径调控肿瘤微环境的变化,例如对免疫微环境的调控,而非直

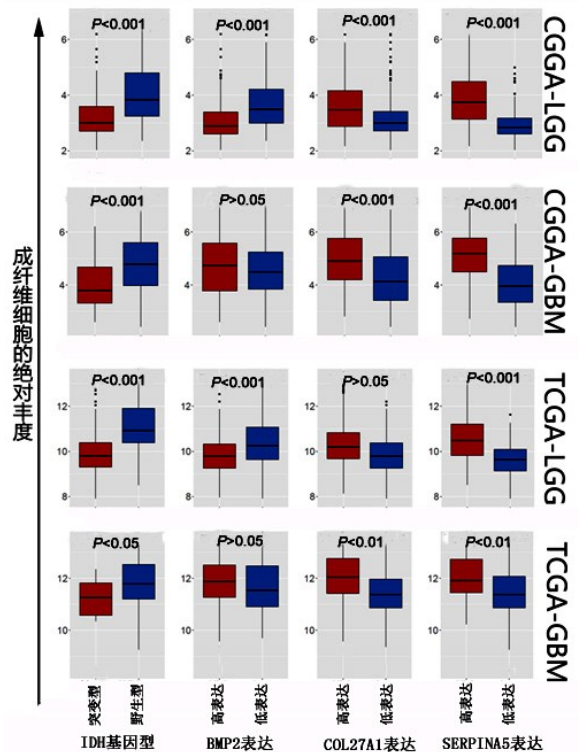


图3 胶质瘤IDH基因型以及BMP2、COL27A1、SERPINA5表达水平与成纤维细胞丰度的关系  
IDH野生型、BMP2低表达上调成纤维细胞的丰度值; COL27A1和SERPINA5高表达上调成纤维细胞的丰度值

接通过胞内信号通路作用彻底改变肿瘤细胞活力。

BMP2、SERPINA5 和 COL27A1 三者之间没有绝对的从属关系,可能更多受 IDH 突变的影响,并可能以多信号通路的形式调控肿瘤细胞侵袭性。基于 IDH 突变的富集分析显示细胞外基质构建是 IDH 突变影响最为广泛的信号通路,而基质构建是影响胶质瘤治疗预后的关键因素之一。我们尝试通过 PPI 网络来挖掘 BMP2、SERPINA5、COL27A1 之间的相关作用以及对上下游关键蛋白节点的调控机制,但是未能有效挖掘。因为 PPI 蛋白互动分析是依赖于前人的研究结果,但目前 SERPINA5、COL27A1 对肿瘤细胞的影响机制的相关研究仍较少。

总之,我们的结果提示在基因表达水平层面, IDH 突变诱导 BMP2 上调、SERPINA5 和 COL27A1 下调,通过调控肿瘤免疫微环境和成纤维细胞功能活性,降低胶质瘤细胞恶性度。当然,我们基于生物信息学分析得出的相关结论仍需要更多相关领域的研究结果加以论证。

#### 【参考文献】

- [1] Poon MTC, Brennan PM, Jin K, *et al.* Might changes in diagnostic practice explain increasing incidence of brain and central nervous system tumors: a population-based study in Wales (United Kingdom) and the United States [J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(6): 979-989.
- [2] Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, *et al.* CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2012-2016 [J]. *Neuro Oncol*, 2019, 21(Suppl 5): v1-v100.
- [3] Tykocki T, Eltayeb M. Ten-year survival in glioblastoma: a systematic review [J]. *J Clin Neurosci*, 2018, 54: 7-13.
- [4] Ostrom QT, Cote DJ, Ascha M, *et al.* Adult glioma incidence and survival by race or ethnicity in the United States from 2000 to 2014 [J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4(9): 1254-1262.
- [5] Xia L, Wu B, Fu Z, *et al.* Prognostic role of IDH mutations in gliomas: a meta-analysis of 55 observational studies [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(19): 17354-65.
- [6] Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, *et al.* A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts [J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(3): 174-186.
- [7] Ducassou A, Uro-Coste E, Verrelle P, *et al.*  $\alpha\beta 3$  integrin and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1): prognostic factors in a phase I-II clinical trial associating continuous administration of Tipifarnib with radiotherapy for patients with newly diagnosed glioblastoma [J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(9): 2161-2169.
- [8] Bahleda R, Italiano A, Hierro C, *et al.* Multicenter Phase I Study of Erdafitinib (JNJ-42756493), oral pan-fibroblast growth factor receptor inhibitor, in patients with advanced or refractory solid tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(16): 4888-4897.
- [9] Zhao Z, Zhang KN, Wang Q, *et al.* Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA): a comprehensive resource with functional genomic data from Chinese glioma patients [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2021, 19(1): 1-12.
- [10] Neftel C, Laffy J, Filbin MG, *et al.* An integrative model of cellular states, plasticity, and genetics for glioblastoma [J]. *Cell*, 2019, 178(4): 835-849.
- [11] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(10): 987-996.
- [12] Fukuya Y, Ikuta S, Maruyama T, *et al.* Tumor recurrence patterns after surgical resection of intracranial low-grade gliomas [J]. *J Neurooncol*, 2019, 144(3): 519-528.
- [13] Yang X, Li D, Cheng S, *et al.* The correlation of bone morphogenetic protein 2 with poor prognosis in glioma patients [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(11): 11091-11095.
- [14] Wang JJ, Wang H, Zhu BL, *et al.* Development of a prognostic model of glioma based on immune-related genes [J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(2): 116.
- [15] Zeng WJ, Yang YL, Wen ZP, *et al.* Identification of gene expression and DNA methylation of SERPINA5 and TIMP1 as novel prognostic markers in lower-grade gliomas [J]. *PeerJ*, 2020, 8: e9262.

(2022-10-10 收稿, 2023-02-13 修回)