

. 论 著 .

新诊断胶质瘤MGMT基因启动子甲基化水平定量分析

张国臣 常玉喜 韩磊 徐欣 赵明 陈忠平

【摘要】目的 探讨新诊断胶质瘤O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(MGMT)基因启动子甲基化(简称MGMT甲基化)水平的变化。**方法** 回顾性分析2016年1月至2019年6月郑州大学附属肿瘤医院神经外科收治的225例新诊断胶质瘤的临床资料,定量分析MGMT甲基化。**结果** 新诊断胶质瘤MGMT甲基化水平为(23.68±14.88)%,阳性率89.33%。≥40岁病人MGMT甲基化水平[(24.89±15.67)%]显著高于<40岁病人[(19.85±11.31)%;*P*<0.05]。少突胶质细胞瘤MGMT甲基化水平[(30.41±12.99)%]显著高于其他类型的胶质瘤[星形细胞瘤为(20.81±13.53)%、少突星形细胞瘤为(23.00±8.21)%、胶质母细胞瘤为(23.39±17.85)%;*P*<0.05]。胶质瘤MGMT甲基化水平与病人年龄呈正相关(*r*=0.135, *P*<0.05),而与病人性别和肿瘤级别无明显关系(*P*>0.05)。**结论** 新诊断胶质瘤MGMT甲基化水平与病人年龄正相关,少突胶质细胞瘤MGMT甲基化水平明显高于其他类型胶质瘤。

【关键词】 脑胶质瘤;O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶;甲基化;定量分析

【文章编号】 1009-153X(2020)06-0374-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Quantitative analysis of methylation level of MGMT gene promoter in newly diagnosed glioma

ZHANG Guo-chen¹, CHANG Yu-xi², HAN Lei¹, XU Xin¹, ZHAO Ming¹, CHEN Zhong-ping³. 1. Department of Neurosurgery, The Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China; 2. Department of Molecular Pathology, The Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China; 3. Department of Neurosurgery/Neuro-oncology, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, China

【Abstract】 Objective To explore the change of methylation level of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene promoter in newly diagnosed glioma. **Methods** The methylation level of MGMT gene promoter of 225 newly diagnosed glioma patients who were admitted to our hospital from January 2016 to June 2019 were analyzed retrospectively. **Results** The mean methylation level of MGMT gene promoter in newly diagnosed glioma patients was (23.68+14.88)% with a positive rate of 89.33%. The methylation level in patients over 40 years [(24.89+15.67)%] was significantly higher than that [(19.85 +11.31)%] under 40 years (*P*<0.05). The methylation level was significantly higher in patients with oligodendroglioma [(30.41+12.99)%] than patients with astrocytoma [(20.81+13.53)%, *P*<0.05], oligoastrocytoma [(23.00±8.21)%, *P*<0.05], or glioblastoma [(23.39±17.85)%, *P*<0.05]. There were no significant differences in the methylation level between different gender and grade of tumour (*P*>0.05). The methylation level of MGMT was positively related to the age (*r*=0.135, *P*<0.05), but not related to the gender and the grade of glioma (*P*>0.05). **Conclusions** The methylation level of MGMT gene promoter is not related to the gender and the grade of glioma, but positively related to the age. The methylation level of MGMT of oligodendroglioma is higher than other glioma types.

【Key words】 Glioma; O6-methylguanine-DNA methyltransferase; Methylation; Quantitative analysis

O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(O6-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)可以修复烷化剂对染色体的致癌、致突变和细胞毒作用的损伤。在正常情况下,MGMT对细胞起保护作用,但是在胶质瘤的化疗过程中,MGMT可以修复化疗药物对胶质瘤细胞产生的杀伤,从而降低化疗疗效^[1]。MGMT基因启动子甲基化(简称MGMT甲基化)可以降低MGMT的表达。本文定量分析新诊断胶质

瘤MGMT甲基化水平,为临床诊治提供参考。

1 资料和方法

1.1 标本来源 收集郑州大学附属肿瘤医院神经外科2016年1月至2019年6月手术切除并经病理诊断为胶质瘤标本225例,其中男116例,女109例;平均年龄(48.71±14.82)岁;少突胶质细胞瘤50例(WHO分级Ⅱ级36例,Ⅲ级14例),星形细胞瘤109例(WHO分级Ⅰ级4例,Ⅱ级58例,Ⅲ级47例),少突星形细胞瘤9例(WHO分级Ⅱ级),胶质母细胞瘤(WHO分级Ⅳ级)57例。

1.2 入组标准 经手术病理证实为胶质瘤;新诊断初治胶质瘤;肿瘤组织行MGMT甲基化水平检测。

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.06.012

作者单位:450008 郑州,郑州大学附属肿瘤医院神经外科(张国臣、韩磊、徐欣、赵明),分子病理科(常玉喜);510060 广州,中山大学附属肿瘤医院神经外科/神经肿瘤科(陈忠平)

通讯作者:赵明, E-mail: zm6392@163.com

1.3 排除标准 术后病理证实为非胶质瘤;既往经过放、化疗等治疗的复发胶质瘤;肿瘤组织未行MGMT甲基化水平检测。

1.4 MGMT的检测 采用焦磷酸测序仪(美国QIAGEN公司, Qiagen PyroMark Q24),严格按照 Human MGMT Gene methylation Detection Kit 试剂盒(美国QIAGEN公司)说明书进行测序。采用TIANamp FF-PE DNA Kit 提取DNA, DNA浓度为20 ng/μl, OD260/280为1.82,检测灵敏度为1%(10 ng/μl DNA),引物类型为YGAYGTTYGTAGGTTTTTYGT。标本类型为石蜡块。结果判读:选择MGMT基因启动子区甲基化水平最高的4个CpG位点,将各位点的甲基化水平以百分率的形式作为定量数据,取4个位点的平均值作为最终MGMT甲基化水平。

1.5 判断标准 健康人群血液平均检测值:MGMT甲基化水平≤4%。胶质瘤平均检测值:MGMT甲基化水平≥8%为阳性,否则判为阴性,其中MGMT甲基化水平≥40%病人,替莫唑胺化疗总生存期明显延长^[2]。

1.6 统计学方法 利用SPSS 19.0软件处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用*t*检验和单因素方差分析;计数资料采用 χ^2 检验;采用Pearson相关系数或Spearman秩相关系数分析相关性;*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

新诊断胶质瘤MGMT基因启动子甲基化水平为

(23.68±14.88)%,阳性率为89.33%。≥40岁病人MGMT甲基化水平明显高于<40岁病人(*P*<0.05,表1),少突胶质细胞瘤MGMT甲基化水平较星形细胞瘤、少突星形细胞瘤、胶质母细胞瘤均明显增高(*P*<0.05,表1)。而不同性别、不同WHO分级病人MGMT甲基化水平均无明显差异(*P*>0.05,表1)。胶质瘤MGMT甲基化水平与病人年龄呈正相关(*r*=0.135, *P*<0.05),而与病人性别和肿瘤WHO级别无明显关系(*P*>0.05)。

3 讨论

MGMT既能修复外界不良因素对正常细胞造成的损害,也可修复化疗药物对肿瘤细胞造成的杀伤。影响MGMT表达的因素很多。Ovchinnikov等^[3]证实,MGMT基因启动子CpG岛处于甲基化状态,可导致MGMT基因停止转录,从而减少MGMT的表达。另外,赵宇航等^[4]发现胶质瘤细胞MGMT甲基化、IDH1突变、P53和TERT突变之间存在复杂的相互调节作用。目前认为,MGMT甲基化是胶质瘤病人预后良好的独立预测因素之一^[5],检测胶质瘤细胞MGMT甲基化可以预测烷化剂等化疗药物的效果^[6]。

对于MGMT甲基化检测方法,起初多采用免疫组织化学法,并将其分为阴性(-)、弱阳性或可疑阳性(+/-)、阳性(+)、中等阳性(++)、强阳性(+++),间接说明MGMT甲基化程度^[7],并用于指导胶质瘤化疗

表1 新诊断胶质瘤MGMT基因启动子甲基化水平量化分析结果

临床特征	MGMT甲基化平均水平				MGMT甲基化水平≥8%(例)				MGMT甲基化水平≥40%(例)			
	例数	水平(%)	统计量	<i>P</i> 值	阳性	阴性	统计量	<i>P</i> 值	阳性	阴性	统计量	<i>P</i> 值
性别			<i>t</i> =-0.145	0.885			$\chi^2=2.125$	0.145			$\chi^2=0.643$	0.423
男	116	23.54±14.75			107	9			11	105		
女	109	23.83±15.08			94	15			14	95		
年龄			<i>t</i> =-2.586	0.011			$\chi^2=1.283$	0.257			$\chi^2=0.987$	0.321
<40岁	54	19.85±11.31			46	8			4	50		
≥40岁	171	24.89±15.67			155	16			21	150		
肿瘤类型			<i>F</i> =5.034	0.002			$\chi^2=4.628$	0.201			$\chi^2=5.407$	0.144
OG	50	30.41±12.99			48	2			9	41		
AT	109	20.81±13.53			95	14			8	99		
OA	9	23.00±8.21			9	0			0	9		
GBM	57	23.39±17.85			49	8			8	49		
WHO分级			<i>F</i> =0.116	0.951			$\chi^2=1.547$	0.671			$\chi^2=1.829$	0.609
I级	4	19.75±11.32			4	0			0	4		
II级	103	24.01±13.72			92	11			9	94		
III级	61	23.66±14.18			56	5			8	53		
IV级	57	23.39±17.85			49	8			8	49		

注:MGMT. O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶;OG. 少突胶质细胞瘤;AT. 星形细胞瘤;OA. 少突星形细胞瘤;GBM. 胶质母细胞瘤

方案的选择^[8];但是该方法为MGMT的定性分析,结果受主观因素影响较大,且表达量的多少容易受到电离辐射、糖皮质激素等的影响,并不能精确地指导化疗。随着分子生物学技术的发展,Pulling等^[9]利用甲基化特异性聚合酶链反应检测MGMT甲基化水平,并与既往免疫组织化学法结果相比较,两者符合率达83%,但没有研究MGMT甲基化的程度。对于MGMT甲基化阳性病例,因MGMT活性有强弱之分,对化疗药物的杀伤修复能力也一定有差别,化疗药物效果也势必不同,因此,单纯定性分析MGMT甲基化,并不能很好地指导化疗。

我们采用焦磷酸测序检测方法,选择MGMT基因启动子甲基化水平最高的四个CpG位点,将甲基化水平以百分率的形式表示,取四个位点的平均值进行量化分析MGMT甲基化水平。按照本文标准,本文病人MGMT甲基化阳性率为89.33%,且不受性别、年龄、肿瘤类型、肿瘤级别的影响,与文献^[10]报道基本相符。虽然MGMT甲基化阳性率较高,但是胶质瘤病人预后并不好,本文发现MGMT甲基化水平 $\geq 40\%$ 的病人仅占11.11%,可能调高MGMT甲基化阳性标准更符合临床实际。黄磊等^[11]报道,MGMT水平与年龄呈负相关,且男性MGMT mRNA含量较女性高。本文MGMT甲基化水平与病人年龄正相关,年龄越大MGMT甲基化水平越高($P < 0.05$),但是不同性别之间并无明显差异($P > 0.05$),与上述文献不全相符。另外,我们还发现,不同病理类型胶质瘤MGMT甲基化水平也有差异,少突胶质细胞瘤MGMT甲基化水平明显高于星形细胞瘤($P < 0.05$),与文献^[12]报道相符,这可能也是少突胶质细胞瘤病人放、化疗效果较好的原因之一。唐天友等^[13]认为,MGMT甲基化水平越高,胶质瘤级别越高。陈功等^[14]认为高级别胶质瘤MGMT甲基化水平低于低级别胶质瘤,并认为其是高级别胶质瘤预后较差的因素之一。本文结果显示,MGMT甲基化水平与胶质瘤级别均无明显关系($P > 0.05$),与文献报道不同,实际情况有待进一步研究验证。

总之,新诊断胶质瘤MGMT甲基化水平与病人与年龄正相关,少突胶质细胞瘤MGMT甲基化水平明显高于其他类型胶质瘤。

【参考文献】

[1] 赵庭生. MGMT基因甲基化在胶质瘤化疗中的意义[J]. 中国临床神经外科杂志, 2010, 15(6): 378-380.

[2] Colella S, Shen L, Baggerly KA, *et al.* Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites [J]. *Biotechniques*, 2003, 35(1): 146-150.

[3] Ovchinnikov DA, Cooper MA, Pandit P, *et al.* Tumor-suppressor gene promoter hypermethylation in saliva of head and neck cancer patients [J]. *Transl Oncol*, 2012, 5(5): 321-326.

[4] 赵宇航, 王泽芬, 徐成仕, 等. 人脑胶质瘤IDH1突变状态与MGMT启动子甲基化、P53和TERT突变相关性[J]. 中国临床神经外科杂志, 2018, 23(5): 339-342.

[5] 徐立新, 张新定. MGMT与胶质瘤相关研究进展[J]. 中华神经医学杂志, 2011, 10(6): 574-577.

[6] 许洪升, 张俊英, 岳伟英, 等. 脑胶质瘤MGMT表达与体外药敏相关性及其临床意义[J]. 中国临床神经外科杂志, 2007, 12(5): 263-266.

[7] Araki Y, Mizoguchi M, Yoshimoto K, *et al.* Quantitative digital assessment of MGMT immunohistochemical expression in glioblastoma tissue [J]. *Brain Tumor Pathol*, 2011, 28(1): 25-31.

[8] 郝振强, 卢培刚, 袁绍纪, 等. MGMT表达检测指导恶性脑胶质瘤个体化化疗研究[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2013, 12(3): 262-264.

[9] Pulling LC, Divine KK, Klinge DM, *et al.* Promoter hypermethylation of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene: more common in lung adenocarcinomas from never-smokers than smokers and associated with tumor progression [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(16): 4842-4848.

[10] Weller M, Stupp R, Reifenberger G, *et al.* MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine [J]? *Nat Rev Neurol*, 2010, 6(8): 39-51.

[11] 黄磊, 江涛, 袁芳, 等. MGMT基因甲基化在胶质瘤化疗及预后中的意义[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2007, 12(10): 474-477.

[12] 宫惠琳, 梁华, 张娇娇, 等. 少突胶质细胞瘤中染色体1p/19q联合缺失与MGMT基因启动子甲基化的相关性[J]. 肿瘤防治研究, 2018, 45(8): 550-554.

[13] 唐天友, 许莹莹, 王建设, 等. 人脑胶质瘤组织MGMT和EGFR及Ki-67表达临床意义分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(11): 840-844.

[14] 陈功, 吴惺, 谢嵘, 等. 胶质母细胞瘤MGMT基因启动子甲基化、MGMT蛋白表达和预后相关性分析[J]. 中国临床神经科学, 2017, 25(2): 135-142.

(2019-12-10收稿, 2020-01-21修回)