

· 论 著 ·

# TERT 启动子突变、ATRX 表达水平在人脑胶质瘤病人预后评估中的作用

苏优勒 李昊 朝博 田复明

**【摘要】目的** 探讨端粒酶逆转录酶(TERT)启动子突变、 $\alpha$ -地中海贫血伴智力低下综合征基因(ATRX)表达水平在人脑胶质瘤病人预后评估中的价值。**方法** 回顾性分析 2016 年 6 月~2018 年 6 月手术治疗的 102 例人脑胶质瘤的临床资料。术后检测脑胶质瘤组织 TERT 启动子突变及 ATRX 表达情况。所有病人术后随访 2 年。**结果** 102 例中,低级别胶质瘤 48 例(WHO 分级 II 级),高级别胶质瘤 54 例(III 级 31 例,IV 级 23 例)。低级别组 TERT 启动子突变率(37.50%, 18/48)明显低于高级别组(59.26%, 32/54;  $P<0.05$ ),而 ATRX 表达阳性率(60.42%, 29/48)明显高于高级别组(37.04%, 20/54;  $P<0.05$ )。多因素 Cox 比例回归风险模型结果显示,TERT 启动子突变、ATRX 表达阴性是生存预后不良的独立危险因素( $P<0.05$ )。生存曲线分析显示,TERT 启动子突变型胶质瘤病人较野生型病人生存期明显缩短( $P<0.05$ ),ATRX 表达阴性胶质瘤病人较表达阳性病人生存期明显缩短( $P<0.05$ )。**结论** TERT 启动子突变、ATRX 基因表达对人脑胶质瘤预后评估具有重要价值。

**【关键词】** 人脑胶质瘤; $\alpha$ -地中海贫血伴智力低下综合征基因(ATRX);端粒酶逆转录酶(TERT);预后

**【文章编号】** 1009-153X(2021)04-0246-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

## Role of TERT promoter mutation and ATRX expression level in prognosis assesement of patients with glioma

SU You-le, LI Hao, CHAO Bo, TIAN Fu-ming. Department of Neurosurgery, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot Municipality 010050, China

**【Abstract】 Objective** To explore the value of telomerase reverse transcriptase (TERT) promoter mutation and  $\alpha$ -thalassaemia with alpha thalassaemia/mental retardation syndrome, X-linked (ATRX) gene expression in the prognosis assesement of patients with glioma. **Methods** The clinical data of 102 glioma patients who underwent surgery from June 2016 to June 2018 were analyzed retrospectively. Glioma tissues were collected to detect the promoter mutation of TERT and expression level of ATRX. All the patients were followed up for 2 years. **Results** Of these 102 glioma patients, 48 patients were of low-grade gliomas and 54 of high-grade. The mutation rate of TERT promoter in the low-grade group (37.50%, 18/48) was significantly lower than that (59.26%, 32/54) in the high-grade group ( $P<0.05$ ), and the positive rate of ATRX expression in the low-grade group (60.42%, 29/48) was significantly higher than that (37.04%, 20/54) in the high-grade group ( $P<0.05$ ). Multivariate Cox proportional regression risk model analysis showed that TERP promoter mutation and negative expression of ATRX were independent risk factors for poor survival prognoses in the patients with glioma ( $P<0.05$ ). Kaplan-Meier survival analysis showed that the survival time of TERT promoter mutant glioma patients was significantly shorter than that of wild type patients ( $P<0.05$ ), and the survival time of ATRX negative glioma patients was significantly shorter than that of positive patients ( $P<0.05$ ). **Conclusion** TERT promoter mutation and ATRX expression are of great value in the prognosis evaluation of patients with glioma.

**【Key words】** Glioma; Alpha thalassaemia/mental retardation syndrome, X-linked; Telomerase reverse transcriptase; Prognosis

人脑胶质瘤是颅内常见的恶性肿瘤,手术切除难度大,治愈率低,预后差<sup>[1,2]</sup>。近年来,研究发现,端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)与中枢神经系统肿瘤进展有关,TERT 启动子突变增加端粒酶活性,促进肿瘤发展<sup>[3]</sup>。另有研究显示脑胶质瘤组织 TERT 呈高表达<sup>[4]</sup>。此外, $\alpha$ -地中海

贫血伴智力低下综合征基因(Alpha thalassaemia/mental retardation syndrome,X-linked, ATRX)对脑胶质瘤发生也有影响,尤其对星形细胞瘤,ATRX 基因突变更为常见<sup>[5]</sup>;ATRX 表达缺失可改变染色质结构,从而对胶质瘤生物学行为产生影响<sup>[6]</sup>。本文探讨 TERT 启动子突变、ATRX 表达水平在人脑胶质瘤病人预后评估中的作用。

## 1 资料与方法

### 1.1 纳入与排除标准

1.1.1 纳入标准 ①病理检查证实为脑胶质瘤;②原

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2021.04.008

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金(2017MS(LH)0840)

作者单位:010050 呼和浩特,内蒙古医科大学附属医院神经外科(苏优勒、李昊、朝博、田复明)

通讯作者:田复明,E-mail:wanzhongyixin\_07@163.com

发性脑胶质瘤;③首次就诊;④精神状态正常,认知功能良好,具备良好的交流能力;⑤病例资料完整;⑥知情同意。

1.1.2 排除标准 ①伴有其他部位原发性肿瘤;②入院前有化疗、放疗史;③凝血功能异常;④肝、肾、心等脏器严重损害;⑤近期有急性/慢性感染病史。

1.2 研究对象 2016年6月至2018年6月收治符合标准的人脑胶质瘤102例,其中男58例,女44例;年龄37~78岁,平均(59.53±15.24)岁;低级别胶质瘤48例(WHO分级Ⅱ级),高级别胶质瘤54例(Ⅲ级31例,Ⅳ级23例);肿瘤直径(5.39±1.64)cm;肿瘤全切除48例;术后放疗59例;术后化疗63例;入院时KPS评分<60分23例,60~80分50例,>80分29例;异柠檬酸脱氢酶1(isocitrate dehydrogenases 1, IDH1)基因突变47例。

### 1.3 检测方法

1.3.1 ATRX 检测 首先行HE染色观察,然后行免疫组化染色,待脱蜡、水化后,滴入ATRAX多克隆抗体,根据En Vision 二步法行染色处理,阴性对照经缓冲液替代一抗予以孵育。细胞核呈棕褐色,即视作阳性表达。免疫组化判断:各切片均选择5个不相邻高倍视野(×400)观察,分析阳性细胞数量,若ATRAX阳性细胞>10%,则判定为阳性。

1.3.2 TERT 启动子突变检测 经巢式PCR法检测。肿瘤组织标本存放:获得组织标本后,留取部分组织行病理诊断,剩余组织经PBS洗净,切块后分装于冻存管,在液氮下存放。提取DNA备用,检测DNA纯度、浓度,首先取Buffer AE 1 μl,滴至加样孔,对仪器进行校准。其次,将加样孔擦干,取DNA样本1 μl,对其纯度、浓度予以测定。引物设计:TERT启动子区的引物序列包括1,295,250(C250T)、1,295,228(C228T)两个位点。引入设计:①第一轮上游序列为5'-GTCCTGCCCC TTCACCTT-3',下游序列为5'-GCACCTCGCGGTACTGG-3'。②第二轮上游序列为5'-TTCCAGCTCCGCCTCCT-3',下游序列为5'-GCGCTGCCTGAAACTCG-3'。PCR反应条件:①第一轮:96℃ 5 min;95℃ 30 s、62℃ 30 s、72℃ 30 s,35个循环;72℃ 8 min。②第二轮:96℃ 5 min;96℃ 30 s、62℃ 30 s、72℃ 30 s,35个循环;72℃ 8 min。行琼脂糖凝胶电泳,待鉴定无误,取10 μl第二轮PCR产物,取2 μl下游引物测序,经配套软件予以分析。

1.4 随访 术后随访2年,记录总生存率。

1.5 统计学处理 采用SPSS 21.0软件分析;计数资料行 $\chi^2$ 检验;采用Cox比例回归风险模型分析脑胶质瘤

预后的影响因素;用Kaplan-Meier绘制生存曲线; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 不同级别胶质瘤TERT启动子、ATRAX表达水平比较 低级别组TERT启动子突变率(37.50%,18/48)明显低于高级别组(59.26%,32/54; $P<0.05$ ),而ATRAX表达阳性率(60.42%,29/48)明显高于高级别组(37.04%,20/54; $P<0.05$ )。

2.2 脑胶质瘤预后影响因素 多因素Cox比例回归风险模型结果显示,WHO分级Ⅲ~Ⅳ级、肿瘤直径 $\geq 5$  cm、肿瘤未全切除、术后未放疗、术后未化疗、术前KPS评分<60分、TERT启动子突变、ATRAX表达阴性是预后不良的独立危险因素( $P<0.05$ ),IDH1基因突变是预后的保护性因素( $P<0.05$ )。见表1。

2.3 TERT启动子突变、ATRAX表达水平与病人预后的关系 生存曲线分析显示,TERT启动子突变型胶质瘤病人较野生型病人生存期明显缩短( $P<0.05$ ),ATRAX表达阴性胶质瘤病人较表达阳性病人生存期明显缩短( $P<0.05$ )。见图1。

## 3 讨论

脑胶质瘤是颅内最常见的原发性恶性肿瘤,根据WHO分级,可分成低级别、高级别胶质瘤,其中低级别胶质瘤恶性程度相对较低,预后良好,但高级别胶质瘤大多预后欠佳<sup>[7]</sup>。尽早准确评估病人病情、预后,有利于及时采取针对性措施,以降低病死率,但

表1 人脑胶质瘤生存预后影响因素的多因素Cox比例回归风险模型分析

影响因素	P值	比值比(95%置信区间)
性别(男/女)	0.106	2.071(0.857~5.005)
年龄( $\geq 60$ 岁/ $<60$ 岁)	0.145	1.952(0.794~4.799)
WHO分级(Ⅲ~Ⅳ级/Ⅱ级)	0.040	3.907(1.067~14.306)
肿瘤直径( $\geq 5$ cm/ $<5$ cm)	0.008	3.825(1.414~10.347)
肿瘤切除程度(全切除/未全切除)	0.009	3.996(1.413~11.301)
放疗	0.010	2.954(1.298~6.723)
化疗	0.013	3.474(1.307~9.234)
术前KPS评分( $\geq 60$ 分/ $<60$ 分)	0.014	0.863(0.767~0.971)
TERT启动子突变	0.001	3.974(1.756~8.994)
ATRAX表达阳性	0.000	4.062(1.892~8.721)
IDH1基因突变	0.021	0.893(0.811~0.983)

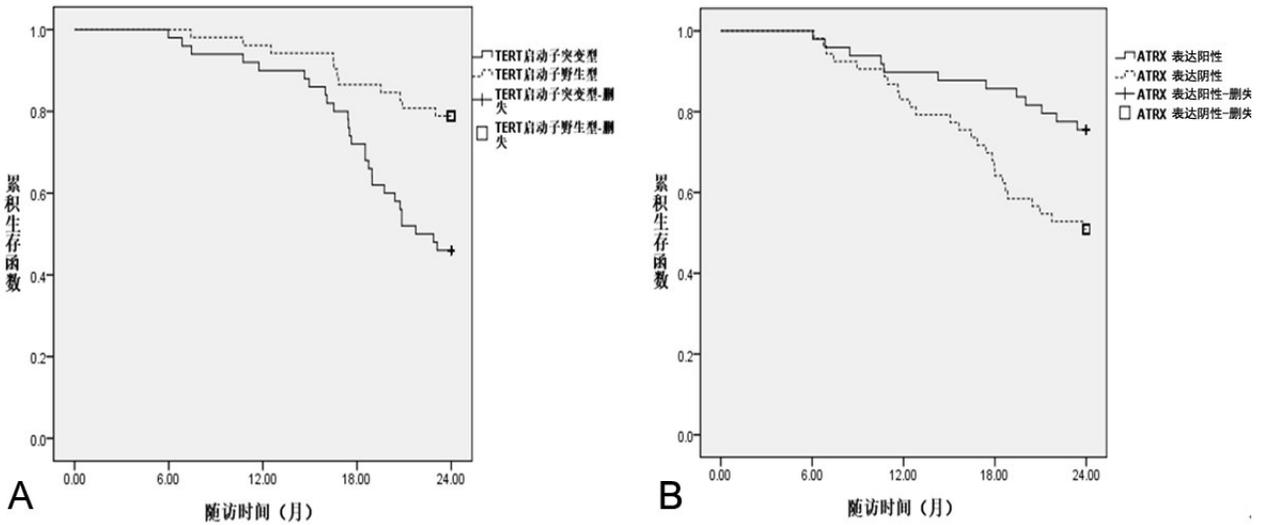


图 1 Kaplan-Meier 生存曲线分析 TERT 启动子突变和 ATRX 表达水平与人脑胶质瘤病人生存预后的关系

现阶段,临床尚缺乏有效的预后评估指标。近年来,有研究认为,TERT 启动子突变可能与肿瘤进展有关。TERT 属于逆转录酶,可将自身携带的 RNA 分子作为模板,于端粒添加更多核苷酸,而肿瘤可将端粒酶重新激活,维持端粒长度<sup>[8]</sup>。还有学者发现,胶质瘤 TERT 启动子核心区存在热点突变,提高端粒酶活性<sup>[9]</sup>。这提示,TERT 启动子突变可能与脑胶质瘤发生、进展有关。本文结果显示,TERT 启动子突变与脑胶质瘤恶性程度有关,其中低级别胶质瘤 TERT 启动子突变率相对较低。研究表明,TERT 启动子突变可导致两个结构相同的启动子相结合,形成结合域,增加转录活性<sup>[10,11]</sup>。本文结果显示高级别胶质瘤 TERT 启动子突变率更高。其机制可能在于,当 TERT 启动子发生突变后,可导致肿瘤细胞内基因表达增高,进一步促进肿瘤进展<sup>[12]</sup>。

此外,研究发现,ATRX 突变也与脑胶质瘤进展相关<sup>[13]</sup>。既往研究发现,ATRX 突变在 II 级星形细胞瘤中常见,且大多同时存在 p53 基因突变,而在 p53 基因未出现突变的情况下,ATRX 缺失并不会引起脑肿瘤的发生<sup>[14]</sup>。脑胶质瘤发生、进展是 IDH 突变以及 p53 与 ATRX 表达缺失共同作用的结果,尤其 ATRX 缺失可导致相关拷贝数发生变异,促进胶质瘤进展<sup>[15]</sup>。本文结果显示,高级别胶质瘤 ATRX 表达阳性率较低,这可能是因这类病人大多存在 ATRX 缺失,致相关拷贝数变异,加速肿瘤进展所致,而低级别组 ATRX 表达阳性率较高,提示 ATRX 缺失率低,降低了异常变异风险。

本文结果显示,TERT 启动子突变、ATRX 表达阴性的胶质瘤病人生存期明显缩短。研究表明,

TERT 启动子突变可导致端粒酶在肿瘤细胞中呈过表达,而端粒酶表达增高具有促癌作用,此外,TERT 可以调节 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号路径,对胶质瘤组织中的干细胞特性有诱导作用<sup>[16]</sup>。TERT 启动子发生突变后,调节 NF- $\kappa$ B 信号路径,促进炎症介质释放与肿瘤进展,加重机体损害,这可能是其增加死亡风险的机制之一<sup>[17]</sup>。ATRX 对脑胶质瘤预后也具有重要影响,其缺失表达有利于保持端粒长度,提升端粒酶活性,导致发展成高级别胶质瘤,这可能是其影响病人预后的重要机制<sup>[18]</sup>。

总之,TERT 启动子、ATRX 基因表达与脑胶质瘤恶性程度有关,在病人预后评估中具有重要意义。

【参考文献】

- [1] Gieryng A, Pszczolkowska D, Walentynowicz KA, et al. Immune microenvironment of gliomas [J]. Lab Invest, 2017, 97(5): 498-518.
- [2] Barthel FP, Wesseling P, Verhaak RGW. Reconstructing the molecular life history of gliomas [J]. Acta Neuropathol, 2018, 135(5): 649-670.
- [3] Khattar E, Kumar P, Liu CY, et al. Telomerase reverse transcriptase promotes cancer cell proliferation by augmenting tRNA expression [J]. J Clin Invest, 2016, 126(10): 4045-4060.
- [4] 季玉陈,湛允波,刘献志,等. IDH、TERT 及 1p/19q 对间变性少突胶质瘤患者预后的影响[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(25): 1959-1962.
- [5] 王 龙,张云东,李 飞. ATRX 基因突变在胶质瘤发生

- 和发展中作用的研究进展[J]. 中华神经外科杂志, 2020, 36(2):203-206.
- [6] 王 龙, 蒋 航, 陈图南, 等. TAS102 选择性抑制 ATRX 缺失胶质瘤细胞的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(24):2393-2400.
- [7] Ferris SP, Hofmann JW, Solomon DA, *et al.* Characterization of gliomas: from morphology to molecules [J]. *Virchows Archiv*, 2017, 471(2): 257-269.
- [8] 刘千琪, 周 桥, 陈 颀, 等. 弥漫浸润性胶质肿瘤中 TERT 和 IDH 突变联合分析的预后价值[J]. 中华病理学杂志, 2018, 47(9):658-663.
- [9] 曹 明, 徐培坤, 李庆新, 等. MGMT 甲基化及 TERT 突变对高级别胶质瘤无进展生存期的意义[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(4):626-630.
- [10] 李 卓, 朴月善, 张立彦, 等. ATRX 在胶质瘤诊断及患者预后评估中的应用[J]. 中华病理学杂志, 2017, 46(10): 690-694.
- [11] 杨孝燕, 王春红, 吉宏明. TERT 启动子突变对原发性胶质母细胞瘤中小胶质细胞/肿瘤相关巨噬细胞极化的影响[J]. 山西医科大学学报, 2019, 50(4):447-450.
- [12] 吴雪梅, 吴 彬, 陈显久. hTERT 启动子介导的 PRPS2 基因表达下调对胶质瘤 U251 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(21):3123-3127.
- [13] Rampazzo E, Del Bianco P, Bertorelle R, *et al.* The predictive and prognostic potential of plasma telomerase reverse transcriptase (TERT) RNA in rectal cancer patients [J]. *Br J Cancer*, 2018, 118(6): 878-886.
- [14] 王轶群, 李心国, 臧培卓.  $\alpha$ -地中海贫血/精神发育迟滞综合征蛋白与中枢神经系统胶质瘤的相关性分析[J]. 四川医学, 2017, 38(11):1259-1262.
- [15] 褚明亮, 张著学, 张 赟, 等. ATRX 在不同类型中枢神经系统肿瘤中的表达及其在鉴别诊断中的意义[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(18):3026-3029.
- [16] 刘浚坤. 端粒酶反转录酶启动子突变在肿瘤发生中的研究进展[J]. 医学综述, 2016, 22(14):2755-2758.
- [17] 郭雪花, 刘 宁. 端粒酶逆转录酶的新生物学功能[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34(9):927-934.
- [18] 杨文圣, 季天海. 胶质瘤的组织形态学及分子特征[J]. 诊断病理学杂志, 2018, 25(1):1-6.

(2020-11-05 收稿, 2021-03-02 修回)

(上接第 245 页)

- [2] 王月芳, 钟 伟, 陈东琳. 利奈唑胺、替考拉宁及万古霉素治疗院内 MRSA 肺炎的临床观察[J]. 中国药房, 2016, 27(26):3708-3710.
- [3] 张立平, 何囡囡, 曹 雯, 等. 危重患者万古霉素血药谷浓度与肾损害的相关性研究[J]. 中国急救医学, 2014, 34(11):1022-1025.
- [4] 梁晓宇, 吴菊芳, 杨敏婕, 等. 万古霉素治疗药物浓度监测队列研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(5):472-478.
- [5] American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 171(4): 388-416.
- [6] Martin JH, Norris R, Barras M, *et al.* Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients: a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists [J]. *Clin Biochem Rev*, 2010, 31(1): 21-24.
- [7] Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, *et al.* Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children: executive summary [J]. *Clin Infect Dis*, 2011, 52(3): 285-292.
- [8] 张秀珍, 倪宇星, 俞云松, 等. 万古霉素临床应用中国专家共识[J]. 中国新药与临床杂志, 2011, 30(8):561-573.
- [9] Clemens EC, Chan JD, Lynch JB, *et al.* Relationships between vancomycin minimum inhibitory concentration, dosing strategies, and outcomes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, 71(4): 408-414.
- [10] Tunkel AR, Hasbun R, Bhim RAJA, *et al.* 2017 infectious diseases society of America's clinical practice guidelines for healthcare-associated ventriculitis and meningitis [J]. *Clin Infect Dis*, 2017, 64(6): e34-e65.
- [11] 中华医学会神经外科学分会. 中国神经外科重症患者感染诊治专家共识(2017)[J]. 中华医学杂志, 2017, 97(21):1607-1614.
- [12] 万古霉素临床应用剂量专家组. 万古霉素临床应用剂量中国专家共识[J]. 中华传染病学杂志, 2012, 30(11): 641-646.
- [13] 吴 涛, 袁先厚, 江普查, 等. 开颅术后颅内感染的临床诊治[J]. 中国临床神经外科杂志, 2004, 9(4):433-434.

(2020-10-11 收稿, 2021-03-14 修回)