

· 论 著 ·

胶质母细胞瘤 FMOD 基因非 CpG 岛 DNA 甲基化水平与病人预后的关系

李 剑 毛星刚 贺亚龙 董必峰

【摘要】目的 探讨纤调蛋白(FMOD)基因非 CpG 岛区域 DNA 甲基化在人脑胶质母细胞瘤(GBM)中的改变模式以及与基因表达、临床预后的关系。**方法** 检索国癌症基因组图谱计划数据库(TCGA)和国国立卫生院下属基因表达数据库(GEO)下载人脑 GBM 组织基因表达芯片 GSE36278、GSE22891 及 GSE50923。分析 FMOD 基因的 CpG 探针[cg26987645 和 cg03764585,均来自人类全基因组 DNA 甲基化芯片(Infinium HumanMethylation 27 k 和 450 k BeadChips),均位于非 CpG 岛区域(www.illumina.com)] β 值(与甲基化水平呈正相关)。**结果** 与非肿瘤组织相比,GBM 组织 FMOD 基因非 CpG 岛区域探针 cg26987645 和 cg03764585 的 β 值均显著下降,提示 GBM 组织 FMOD 基因发生特异性低甲基化。将 CpG 岛区域探针 cg26987645 和 cg03764585 的 β 值与 mRNA 数据进行关联分析发现,DNA 甲基化水平与 FMOD 基因表达水平呈显著负相关($P<0.001$)。Cox 回归分析显示,随 FMOD 基因 CpG 岛区域探针 cg26987645 和 cg03764585 的 β 值增加,GBM 病人生存期显著延长($P<0.05$)。FMOD 基因非 CpG 岛 cg03764585 和 cg26987645 探针分析显示,非 G-CIMP 亚型病人甲基化水平较 G-CIMP 亚型病人明显降低($P<0.05$),而 FMOD 基因表达水平明显增高($P<0.05$)。**结论** 本文结果提示,GBM 组织 FMOD 基因非 CpG 岛区域呈低甲基化表现,与 FMOD 基因表达和病人生存预后均呈明显负相关。

【关键词】 胶质母细胞瘤;纤调蛋白(FMOD);基因表达;非 CpG 岛;DNA 甲基化;预后

【文章编号】 1009-153X(2021)05-0336-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Change in DNA methylation of non-CpG islands of FMOD gene in glioblastoma

Li Jian, MAO Xing-gang, HE Ya-long, DONG Bi-feng. Department of Neurosurgery, Xijing Hospital, The First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China

【Abstract】 Objective To investigate the change pattern of DNA methylation of non-CpG island of FMOD gene in glioblastoma (GBM) and its relationship with FMOD gene expression and patients' survival prognosis. **Methods** The National Cancer Genome Atlas Database (TCGA) and the National Institute of Health Gene Expression Database (GEO) were searched to download human brain GBM tissue gene expression chips GSE36278, GSE22891 and GSE50923. The β value, which was positively correlated with the methylation level, was analyzed using the FMOD gene CpG probes cg26987645 and cg03764585 which were obtained from human genome-wide DNA methylation chips (Infinium HumanMethylation 27 k and 450 k BeadChips), and were located in the non-island region (www.illumina.com)]. **Results** Compared with non-tumor tissues, the β values of probes cg26987645 and cg03764585 in the non-CpG island region of the FMOD gene of GBM tissues were significantly decreased, suggesting that the FMOD gene of GBM tissues was specifically hypomethylated. Correlation analysis between the β values of probes cg26987645 and cg03764585 in the CpG island region and the mRNA data found that the DNA methylation level was significantly negatively correlated with the FMOD gene expression level ($P<0.001$). Cox regression analysis showed that as the β values of the probes cg26987645 and cg03764585 in the CpG island region of the FMOD gene increased, the survival time of GBM patients was significantly prolonged ($P<0.05$). The analysis of FMOD gene non-CpG island probes cg03764585 and cg26987645 showed that the methylation level of non-G-CIMP subtype patients was significantly lower than that of G-CIMP subtype patients ($P<0.05$), while the FMOD gene expression level was significantly increased ($P<0.05$). **Conclusions** Our results suggest that the non-CpG island regions of FMOD gene in GBM tissues are hypomethylated, which is significantly negatively correlated with FMOD gene expression and patient survival prognosis.

【Key words】 Glioblastoma; FMOD; Non-CpG island; Methylation; Prognosis

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是颅内恶性

程度最高的原发性肿瘤,即使采用手术联合术后放疗化疗等综合治疗,预后仍很差^[1]。DNA 甲基化是一类非常重要的表观遗传水平的基因表达调控机制,尤其是 CpG 岛超甲基化,通过抑制相关基因表达,调控肿瘤分化、生长以及药物抵抗性等^[2]。O6-甲基鸟

嘌呤-DNA 甲基转移酶(O6-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)启动子 CpG 岛超甲基化可预测 GBM 对替莫唑胺的化疗敏感性^[2]。随着新的甲基化检测技术和高通量数据平台的应用,使探索表观遗传学特征拥有更强大的技术平台^[3]。纤调蛋白(fibromodulin, FMOD)是一种分泌性细胞外基质蛋白,属富含亮氨酸的小蛋白多糖家族,其异常表达与多种肿瘤的进展有密切的关系^[4]。本文采用生信分析方法探讨人脑 GBM 组织 FMOD 基因非 CpG 岛 DNA 甲基化水平与病人预后的关系。

1 资料与方法

1.1 计算机检索方法 检索国癌症基因组图谱计划数据库(TCGA)^[5]和国国立卫生院下属基因表达数据库(GEO)下载人脑 GBM 组织基因表达芯片 GSE36278、GSE22891 及 GSE50923^[6-8]。纳入 GBM 样本信息详见表 1。纳入的非肿瘤样本来自 TCGA^[5]及 GSE63347 系列^[9]。TCGA 基因表达分型主要包括原神经细胞型(proneural, P)、神经细胞型(neural, N)、经典型(classical, C)、间质型(mesenchymal, M)。

1.2 FMOD 基因 DNA 甲基化及基因表达数据 针对 FMOD 基因的 CpG 探针(cg26987645 和 cg03764585)

表 1 纳入 GBM 队列的样本特征

病例特征	TCGA	GSE36278	GSE22891	GSE50923
样本量(例)	395	57	50	52
年龄(岁,中位数+范围)	60(18~89)	45(18~57)	58(26~80)	57(22~82)
性别(例,男/女)	233/162	34/23	25/24	30/22
治疗(例)				
放疗+TMZ	263		50	52
放疗	70		0	0
其他/未知	62	57	0	0
G-CIMP 阳性(例)	32	12	2	5
MGMT 甲基化(例)	168	27	29	26
TCGA 基因表达亚型				
P/N/C/M	96/65/108/115	11/0/3/5	9/3/7/16	

注:GBM. 胶质母细胞瘤;TMZ. 替莫唑胺;G-CIMP. 胶质瘤 CpG 岛甲基化表型;MGMT. O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶;TCGA 基因表达分型(P. 原神经细胞型;N. 神经细胞型;C. 经典型;M. 间质型)

来自人类全基因组 DNA 甲基化芯片(Infinium HumanMethylation 27 k 和 450 k BeadChips),均位于非 CpG 岛区域(www.illumina.com)。甲基化水平由探针的 β 值决定。部分纳入样本亦具有 FMOD 基因 mRNA 表达谱数据,均经过相应的芯片标准化处理^[6-8]。G-CIMP 表型以及 MGMT 甲基化状态的确定均基于 DNA 甲基化芯片数据^[10,11]。

1.3 统计学分析 应用 SPSS 19.0 软件分析;正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验、单因素方差分析和 Bonferroni 检验;非正态分布计量资料采用采用 Mann-Whitney U 检验、Kruskal-Wallis 和 Dunns 检验;采用 Pearson 相关系数分析相关性;多因素 Cox 比例回归风险模型分析生存预后影响因素;*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 GBM 组织 FMOD 基因非 CpG 岛区域的甲基化改变 与非肿瘤组织比,GBM 组织 FMOD 基因非 CpG 岛区域探针 cg26987645 和 cg03764585 的 β 值均显著下降(图 1)。这提示 GBM 发生特异性低甲基化。

2.2 FMOD 基因非 CpG 岛 DNA 甲基化水平与基因表达水平的关系 将 CpG 岛区域探针 cg26987645 和 cg03764585 的 β 值与 mRNA 数据进行关联分析发现,DNA 甲基化水平与 FMOD 基因表达水平呈显著负相关(*P*<0.001,图 2)。

2.3 FMOD 基因非 CpG 岛 DNA 甲基化水平与病人生存期的关系 FMOD 基因非 CpG 岛 DNA 甲基化水平与病人生存期存呈显著正相关,即随 CpG 岛区域探针 cg26987645 和 cg03764585 的 β 值增加,生存期显著延长(*P*<0.05;表 2)。另外,Cox 分析结果还显示,随年龄增加,生存期明显缩短(*P*<0.05,表 2);替莫唑胺化疗、胶质瘤 CpG 岛甲基化表型(glioma CpG island methylator phenotype, G-CIMP)阳性、MGMT 启动子甲基化病人生存期均明显延长(*P*<0.05,表 2)。

2.4 FMOD 基因非 CpG 岛 DNA 甲基化改变与分子亚型的 关系 FMOD 基因非 CpG 岛 cg03764585 和 cg26987645 探针均显示,G-CIMP 阴性病人甲基化水平较 G-CIMP 阳性病人明显降低(*P*<0.05),而 FMOD 基因表达水平明显增高(*P*<0.05)。见图 3。

3 讨论

表观遗传学修饰,特别是 DNA 甲基化改变,在肿瘤发生、发展中具有重要作用。研究发现,肿瘤组织主要发生整体 DNA 甲基化水平的下降,以及区域

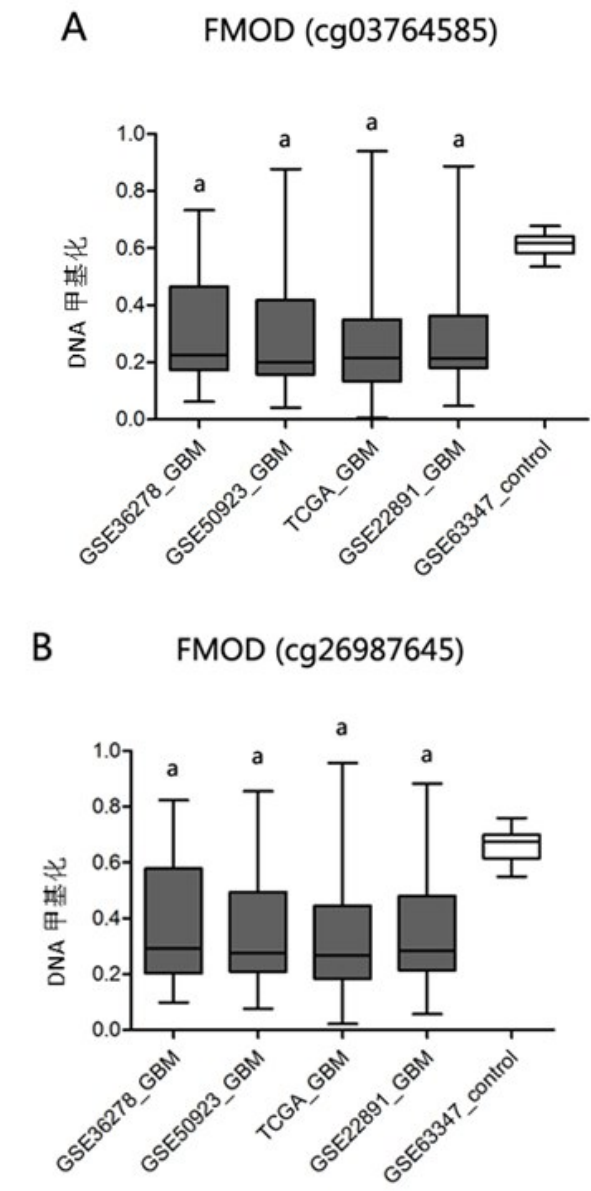


图 1 GBM 组织非 CpG 岛区域 DNA 甲基化水平
A. cg03764585 探针; B. cg26987645 探针; 与 GSE63347-control (非肿瘤组织) 相比, $a P<0.001$; GBM. 胶质母细胞瘤

马赛克式的超甲基化改变^[12]。功能基因组研究表明,无论是肿瘤整体 DNA 低甲基化,还是局部 CpG 岛超甲基化,都与肿瘤早期形成以及后期进展密切相关^[12]。近期研究表明 FMOD 基因参与多种肿瘤的进展,且其转录区域不含 CpG 岛结构^[4]。我们推测:①GBM 组织 FMOD 基因非 CpG 岛区域 DNA 发生低甲基化改变;② FMOD 基因非 CpG 岛 DNA 甲基化改

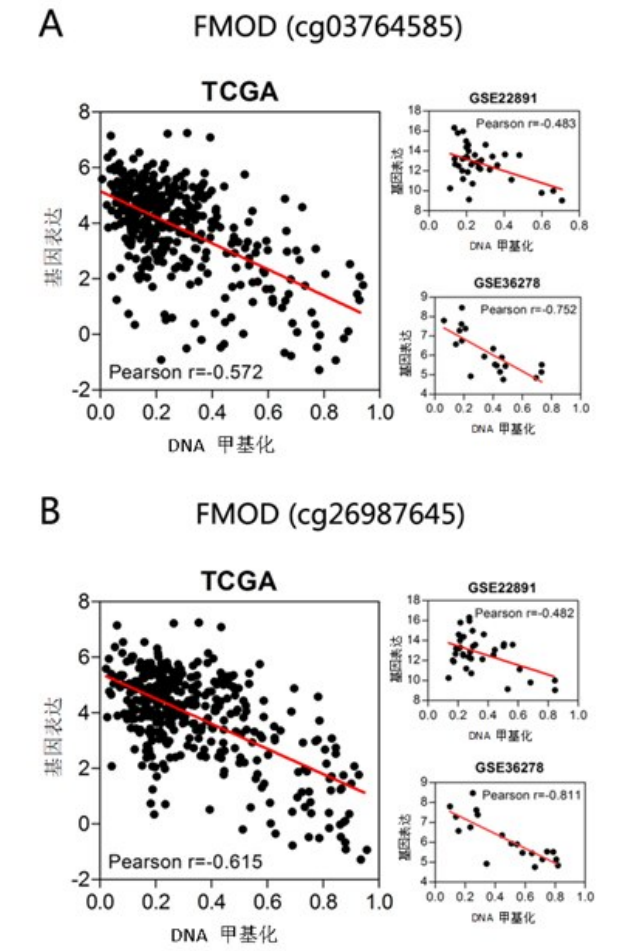


图 2 FMOD 基因非 CpG 岛 DNA 甲基化和基因表达的关系
FMOD; A. cg03764585; B. cg26987645; 所有 $P<0.001$

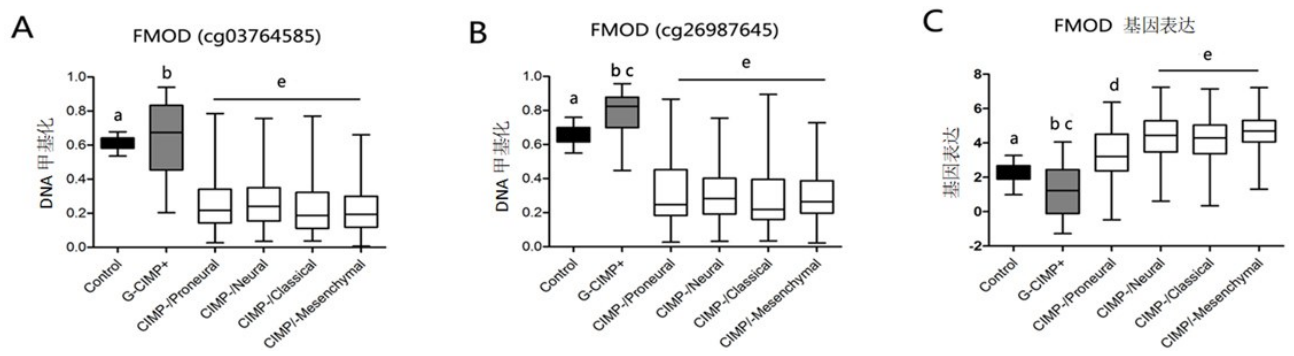


图 3 TCGA 数据库中不同分子亚型 GBM 样本 FMOD 基因 DNA 甲基化水平和基因表达水平的比较
A. cg03764585 探针; B. cg26987645 探针; C. FMOD 基因表达; 与每个 G-CIMP 子类型组比, $a P<0.05$; 与每个 G-CIMP 子类型组比, $b P<0.05$; 与 control 组 (对照组) 比, $c P<0.05$; 与其他 G-CIMP 阳性肿瘤组比, $d P<0.05$

表 2 FMOD 基因非 CpG 岛甲基化探针的 Cox 回归分析

cg03764585 探针		cg26987645 探针	
影响因素	HR(95% CI)	影响因素	HR(95% CI)
接受所有治疗的病人		接受所有治疗的病人	
单变量 Cox 模型		单变量 Cox 模型	
cg03764585 探针β值	0.33(0.21~0.52)	cg26987645 探针β值	0.35(0.21~0.58)
多变量 Cox 模型		多变量 Cox 模型	
cg03764585 探针β值	0.62(0.38~1.01)	cg26987645 探针β值	0.61(0.36~1.04)
年龄	1.03(1.02~1.04)	年龄	1.03(1.02~1.04)
多变量 Cox 模型		多变量 Cox 模型	
cg03764585 探针β值	0.45(0.27~0.74)	cg26987645 探针	0.43(0.25~0.75)
治疗(放疗+替莫唑胺/放疗)	0.37(0.27~0.50)	治疗(放疗+替莫唑胺/放疗)	0.36(0.26~0.50)
多变量 Cox 模型		多变量 Cox 模型	
cg03764585 探针β值	0.85(0.47~1.54)	cg26987645 探针	0.83(0.48~1.45)
G-CIMP(是/否)	0.27(0.16~0.46)	G-CIMP(是/否)	0.27(0.16~0.46)
多变量 Cox 模型		多变量 Cox 模型	
cg03764585 探针β值	0.59(0.33~1.07)	cg26987645 探针	0.53(0.31~0.90)
TCGA 基因亚型(M/C/N/P)	1.15(1.04~1.27)	TCGA 基因亚型(M/C/N/P)	1.14(1.03~1.26)
接受放疗/替莫唑胺治疗		接受放疗/替莫唑胺治疗	
多变量 Cox 模型		多变量 Cox 模型	
cg03764585 探针β值	0.43(0.25~0.75)	cg26987645 探针	0.44(0.24~0.80)
MGMT 甲基化状态(甲基化/非甲基化)	0.59(0.46~0.76)	MGMT 甲基化状态(甲基化/非甲基化)	0.59(0.45~0.76)

变影响其基因表达水平;③FMOD 基因非 CpG 岛 DNA 甲基化水平与病人预后密切相关。

通过分析高通量 DNA 甲基化数据,发现一组具有多基因 CpG 岛超甲基化改变的 GBM 亚组,被称为 G-CIMP 阳性;这类亚型与 IDH 基因突变密切相关,且临床结局相对其他亚型较好^[10],原因可能是 G-CIMP 阳性 GBM 组织非 CpG 岛 DNA 呈低甲基化状态,从而抑制相关基因表达和肿瘤进展。FMOD 基因促进 GBM 等多种肿瘤细胞增殖及血管生成。我们推测,G-CIMP 阴性 GBM,包括 FMOD 基因在内的多种癌基因非 CpG 岛低甲基化改变,很可能通过表观遗传层面的基因表达激活的方式,促进肿瘤恶性表型的形成,影响病人的预后。

【参考文献】

[1] Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults [J]. N Engl J Med, 2008, 359(5): 492-507.

[2] Rodriguez- Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology [J]. Nat Med, 2011, 17(3): 330-339.

[3] 章 翔,毛星刚,章 薇. 大数据时代的精准医学 [J]. 中

华神经外科疾病研究杂志,2016,16(2):97-100.

[4] Mondal B, Patil V, Shwetha SD, *et al.* Integrative functional genomic analysis identifies epigenetically regulated fibro-modulin as an essential gene for glioma cell migration [J]. Oncogene, 2017, 36(1): 71-83.

[5] Brennan CW, Verhaak RG, Mckenna A, *et al.* The somatic genomic landscape of glioblastoma [J]. Cell, 2013, 155(2): 462-477.

[6] Sturm D, Witt H, Hovestadt V, *et al.* Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma [J]. Cancer Cell, 2012, 22(4): 425-437.

[7] Etcheverry A, Aubry M, de Tayrac M, *et al.* DNA methylation in glioblastoma: impact on gene expression and clinical outcome [J]. BMC Genomics, 2010, 11: 701.

[8] Lai RK, Chen Y, Guan X, *et al.* Genome-wide methylation analyses in glioblastoma multiforme [J]. PLoS One, 2014, 9 (2): e89376.

[9] Horvath S, Garagnani P, Bacalini MG, *et al.* Accelerated epigenetic aging in Down syndrome [J]. Aging Cell, 2015, 14(3): 491-495.