

· 综 述 ·

胶质母细胞瘤相关pTERT突变的研究进展

蒋谷峰 综述 周 杰 审校

【关键词】胶质母细胞瘤;端粒酶逆转录酶;基因启动子;基因突变

【文章编号】1009-153X(2023)03-0212-04 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41; Q 786

胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)在中枢神经系统肿瘤中的发病率及恶性程度最高。端粒酶是一种依赖核糖核酸的脱氧核糖核酸聚合酶,主要由两个亚基组成,即端粒酶逆转录酶(telomerase reverse tranase, TERT)和RNA。TERT是端粒酶全酶的核心催化亚基,可通过从头合成将TTAGGG重复序列添加到端粒上,从而对抗端粒丢失,最终使细胞无限增殖^[1]。TERT在大多数正常成人细胞中由TERT启动子(TERT-promoter, pTERT)的转录抑制而失活,但在中枢神经系统肿瘤中却普遍活跃,尤其是GBM。pTERT突变通过相关机制可重新激活TERT,在GBM发生、发展中起关键作用。本文就GBM相关pTERT突变分子机制进行总结,并分析其在GBM中的相关作用,为pTERT在GBM的诊断、预后判断及治疗上提供参考。

1 pTERT突变的发病机制

1.1 C228T和C250T突变 TERT基因位于体细胞的5号染色体短臂上,由16个外显子和15个内含子组成,分别为C228T和C250T。这两种突变是相互排斥的,任何一种突变均会增加TERT的表达,从而增加端粒酶的活性。它们在所有亚型的胶质瘤中发生率均很高,尤其是原发性GBM,突变率达70%。这两种突变均产生一条完全相同的碱基对序列,包含ETS转录因子结合基序,可从ETS家族招募转录因子。ETS家族成员包括ETS1、ETS2、GABPA、GABPB、ETV1、ETV4和ETV5,其中GABPA参与TERT的转录激活。敲除GABPA的基因表达显著降低突变型启动子的活性,却不影响野生型启动子的活性^[2]。

体外细胞培养实验也同时表明,突变型pTERT需要一个四聚体形成的 β 1L亚型的GABPA进行激活,而野生型pTERT不需要,因此GABPA是GBM中TERT表达的关键转录因子。另外,pTERT还存在其他更罕见的突变,包括C249T和C228A,但这些突变并不会产生ETS转录因子的结合位点。

1.2 pTERT甲基化 大多数GBM都存在端粒酶RNA基因(telomerase RNA component, TERC)和TERT的高表达。研究发现,TERC和TERT表达水平升高与儿童非脑干GBM的预后较差有关,但与成人GBM相比,儿童GBM的pTERT改变却非常罕见,这可能是由于端粒酶在成年前的干细胞和祖细胞中活跃而不需要通过TERT突变来上调端粒酶活性;此外,pTERT甲基化与儿童脑肿瘤及野生型GBM中TERT表达增加密切相关^[3]。这表明某些pTERT野生型GBM及儿童GBM的TERT的上调可以用pTERT甲基化来解释,但这一发现与启动子突变的典型作用相反,因为在启动子甲基化中,甲基化通常会沉默相关基因的表达。

1.3 端粒重复序列结合因子(telomeric repeat binding factor, TRF)2-G-四链(pTERT)成人GBM存在非端粒的DNA结合因子,包括TRF1、TRF2和Ras相关蛋白1,其中大部分由G-四链的非双链结构组成。研究表明,pTERT突变能破坏TRF2与GBM中pTERT的G-四链结合^[4],使TERT抑制解除,当加入G-四链体稳定配体,TRF2结合重新获得,并重新抑制携带pTERT突变的端粒酶。

1.4 pTERT突变的时间节点 研究表明,C228T和C250T突变可以将pTERT的转录活性上调2~4倍,而且GBM中pTERT mRNA及TERT表达水平高于正常人脑细胞,表明GBM中pTERT突变导致TERT表达上调。然而,pTERT突变发生在GBM的早期还是晚期,尚不明确。虽然TERT在GBM中表达升高,但pTERT突变GBM的端粒比对照组却更短,表明这些

突变可能发生在癌变之后。Ackermann 等^[5]研究表明突变在同一病人不同肿瘤病灶中高频率出现,比较瘤周组织(脑室下区)、肿瘤组织与匹配的正常组织发现,瘤周区域早已有 pTERT 突变,可能是肿瘤的起源。因此 GBM 早期可能会通过 PTEN 的基因复制丢失与 TERT 突变共同作用进展为一种的癌变前体,最终引发 GBM。

2 预后预测

2.1 pTERT 单核苷酸多态性(SNPrs2853669) pTERT 的单核苷酸多态性 SNPrs2853669 包括纯合子 C/C 突变和野生型 T/T 等,通过调控其他途径导致与预后相关。一项对 126 例 GBM 的研究表明,携带 SNPrs2853669 的 pTERT 突变亚组比 SNPrs2853669 非携带者的中位生存期更长;然而,当 SNPrs2853669 发生 C/C 纯合子变异时,尤其是在 C228T 或 C250T pTERT 突变存在的情况下,生存期显著缩短^[6]。这提示携带 SNPrs2853669 可能是 pTERT 突变相关 GBM 的有利预后因素,而当 SNPrs2853669 发生 C/C 纯合子突变时,使 ETS2 结合位点的破坏和 TERT 表达降低,最终导致端粒酶活性低于野生型 T/T 纯合子,因此 SNPrs2853669 C/C 纯合子基因型可作为 pTERT 突变病人短期生存期的独立预测因素。但目前仍缺乏关于 SNPrs2853669 野生型纯合子 T/T 对 pTERT 突变相关 GBM 病人生存率是否有影响的研究。

2.2 pTERT 突变与其他基因关联 pTERT 突变具有独立负性预后影响。Dono 等^[7]同时观察异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH)和 pTERT 突变的 GBM,发现即使在没有 IDH 突变的肿瘤中,GBM 的 pTERT 突变也预示着低存活率,且同时携带 pTERT 突变型和 IDH 野生型肿瘤的总体生存期最差。Bollam 等^[8]发现 pTERT 突变的存在不是预后不良的独立影响因素,表现为 IDH 突变型和 IDH 野生型 GBM 无显著差异。因此,pTERT 能否作为预测 GBM 的预后独立因素暂无定论。

研究表明,pTERT 突变的负面影响与共同存在的分子和临床因素有关,如年龄、IDH-wt 状态和未甲基化的 O6-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶(O6-methylguanine- DNA methyltransferase, MGMT)状态。研究表明,这些因素未能观察到与 pTERT 突变的存在有统计学意义的独立的生存关联。刘千琪等^[9]发现,pTERT 突变的存在与总体生存期无关,GBM 的 pTERT 突变与 IDH1/2 突变同时发生的频率较低

(11.5%),同时野生型 IDH1/2 联合 pTERT 突变的 GBM 病人总体生存期较 IDH1/2 突变联合 pTERT 突变的 GBM 低。此外,pTERT 突变型与上皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)扩增高度相关(44.1%),且 EGFRⅧ在 24%~67%的 GBM 中表达,当 GBM 中 EGFR 扩增及 pTERT 突变同时存在时,病人总体生存期明显下降。在 GBM 中,pTERT 突变与 MGMT 启动子甲基化同时发生的概率为 43.6%,MGMT 启动子未甲基化较低级别胶质瘤高,表明 MGMT 未甲基化与 pTERT 突变共存是 GBM 的预后不良因素^[10]。

3 辅助诊断技术

3.1 MRI 的诊断价值 一项对 60 例 GBM 的研究发现,GBM 未显示 TERTp-mut 与肿瘤部位相关;但对于原发性中枢神经系统淋巴瘤的 MRI 分析显示,TERTp-mut 更常累及胼胝体压部;此外,联合分析 IDH1/2 和 pTERT 突变状态可以区分胶质病变是 GBM 还是反应性胶质增生,反应性胶质增生样本不包含 pTERT 区域的 C228T 或 C250T 突变^[11]。

3.2 检测 pTERT 的新兴技术 2016 年 WHO 对 GBM 的分类仍基于 IDH,分为 IDH 野生型 GBM、IDH 突变型 GBM 和未另行指定的 GBM。随后,TERTp 突变、EGFR 突变和 MGMTp 甲基化可通过体液活检肿瘤分子谱整合到临床诊断中。循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)在血液和体液中的释放取决于肿瘤的位置、大小和肿瘤的血管浸润^[12],因此通过血液、脑脊液、尿液和其他体液检测和分离循环肿瘤细胞和 ctDNA,间断分析 ctDNA 可提供肿瘤成分、异质性、预后生物标记物及其与其他临床相关癌症生物标记物的关系等信息。液体活检中的 ctDNA 水平因人而异,通过间断的 ctDNA 监测,同时利用液滴式数字 PCR 分析检测 pTERT 突变,可评估 GBM 的进展,使 pTERT 突变作为未来个体化诊治的生物标志物成为可能。

4 靶点治疗

4.1 端粒酶抑制剂 由于端粒缩短的生理病理机制,TERT 抑制可能在经历多个细胞周期后才发挥作用,因此限制了端粒酶抑制剂的应用。目前,这种靶向治疗在癌症中没有得到批准。伊美司他是一种小型的 TERT 抑制剂,在治疗原发性血小板减少症方面显示出明确的疗效,同时在 GBM 细胞系中,长期伊美司他治疗可导致 GBM 肿瘤起始细胞的进行性端粒

缩短、增殖率降低和诱导细胞死亡;另外,伊美司他联合放疗和替莫唑胺化疗对 GBM 细胞存活率有显著影响^[13]。然而,一项针对儿童难治性中枢神经系统肿瘤的临床试验,因出现治疗相关的血小板减少继发的肿瘤内出血而过被迫停止。同时,另一项临床前研究表明,治疗转移性乳腺癌中经常使用的微管抑制剂灯盏花素作为一种微管抑制剂,也被证明对依赖 TERT-RNA 的 RNA 聚合酶具有特异的抑制活性^[14],可以抑制 pTERT 突变的 GBM 细胞系的生长,并显著延长小鼠的生存时间,但缺乏临床试验。靶向 GABP β 1L 而非 TERT 本身可能是灯盏花素靶向治疗 TERTP 突变细胞的一种方向,且同时保留正常细胞以避免伊美司他的引起的造血功能障碍。在一项 GBM 细胞系研究中,破坏 β 1L 亚型可以逆转 TERTp 突变的 GBM 细胞的无限复制^[15]。在小鼠 GBM 的异种移植模型中,敲除 GABP β 1L 会削弱肿瘤的生长并提高小鼠的存活率。此外,BIBR1532 作为一种可破坏 β 1L 亚型有效的端粒酶抑制剂,可以通过在转录和翻译水平下调端粒酶活性来诱导细胞凋亡^[16],但还没有可用的临床数据或临床试验。

4.2 TERT 活性靶向疫苗 一项从自体肿瘤干细胞培养中提纯的 RNA 转染的树突状细胞的试验表明^[17],所有接受治疗的细胞均出现了免疫反应,没有明显的毒性或自身免疫的迹象;接种疫苗的病入的无进展生存期明显更长,经过 2 年的随访,7 例中有 5 例存活。一项 II 期临床试验表明,树突状细胞疫苗(dendritic cell vaccine, DCV)没有显著改善 43 例 GBM 病人的总体生存期或无进展生存期,在调整 B7-H4 的表达后,DCV 改善总体生存期,这是由于 B7 分子是肿瘤微环境中重要的免疫逃逸介质,其中 B7-H4 在高级别胶质瘤中高表达,可阻断有效的 T 细胞免疫反应。因此,DCV 可作为治疗 pTERT 突变肿瘤的 GBM 的首选疫苗。同时,UCPV_{ax} 作为一种基于端粒酶衍生辅助肽的治疗性抗癌疫苗,可诱导 Th1CD4T 细胞的强烈反应^[18],尽管 I 期试验结果尚未公布,但这种这种疫苗被证实是安全的,未来将可能替代 DCV 成为治疗 GBM 的首选活性靶向疫苗。

综上所述,pTERT 突变作为 GBM 发生、发展的最重要机制之一,对于大部分成年 GBM,其可通过突变后的碱基序列招募 GABPA 转录因子或通过破坏 TRF2 与 pTERT 的 G-四链结合来激活 TERT 活性,然后通过 PTEN 的基因复制丢失(杂合子缺失)与 TERT 突变共同作用进展为一种的癌变前体,最终引发 GBM。而对于小部分的儿童 GBM 及野生型

GBM,其机制可能为 pTERT 的甲基化。其次,pTERT 对于能否预测 GBM 病人预后,仍存在争议。但若同时携带 SNPrs2853669 的 pTERT 突变的 GBM,比非携带者的预后更好,当 SNPrs2853669 发生纯合子 C/C 突变时,存活率明显降低。再者,当 pTERT 突变同时携带 IDH 野生型、pTERT 突变、GFR 扩增、MGMT 未甲基化其中之一者,预后更差。pTERT 对于头颅 MRI 的意义表现为 TERTp-mut 原发性中枢神经系统淋巴瘤病例更常累及胼胝体压部,联合分析 IDH1/2 状态可以区分胶质病变是 GBM 与反应性胶质增生。间断液体活检及液滴式数字 PCR 分析对个体化诊疗及判断预后具有重要的意义。靶向作用于 GABP β 1L 可能是灯盏花素靶向治疗 TERTP 突变细胞的一种方向,且同时保留正常细胞以避免伊美司他的引起的造血功能障碍,已逐渐形成取代伊美司他的趋势。此外,BIBR1532 可通过在转录和翻译水平下调端粒酶活性诱导细胞凋亡达到治疗效果,也将成为研究的热点。就免疫靶向活疫苗来说,DCV 可作为治疗 B7-H4 分子低表达的 pTERT 突变肿瘤的 GBM 的首选方案,而 UCPV_{ax} 作为一种基于端粒酶衍生辅助肽的治疗性抗癌疫苗,亦在未来有可能取代 DCV。

【参考文献】

- [1] Dymova MA, Kuligina EV, Richter VA. Molecular mechanisms of drug resistance in glioblastoma [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(12): 6385.
- [2] Miglar A, Reuling IJ, Yap XZ, *et al.* Biomarkers of cellular aging during a controlled human malaria infection [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 18733.
- [3] Mancini A, Xavier-Magalhes A, Woods WS, *et al.* Disruption of the β 1L isoform of GABP reverses glioblastoma replicative immortality in a TERT promoter mutation-dependent manner [J]. Cancer Cell, 2018, 34(3): 513-528.
- [4] Geng J, Liu Y, Guo Y, *et al.* Correlation between TERT C228T and clinic-pathological features in pediatric papillary thyroid carcinoma [J]. Sci China Life Sci, 2019, 62(12): 1563-1571.
- [5] Ackermann A, Çapcı A, Buchfelder M, *et al.* Chemical hybridization of sulfasalazine and dihydroartemisinin promotes brain tumor cell death [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 20766.
- [6] Janovi T, Stojaspal M, Veverka P, *et al.* Human telomere

repeat binding factor TRF1 replaces TRF2 bound to shelterin core hub TIN2 when TPP1 is absent [J]. *J Mol Biol*, 2019, 431(17): 3289–3301.

[7] Dono A, Wang E, Lopez-Rivera V, *et al*. Molecular characteristics and clinical features of multifocal glioblastoma [J]. *J Neurooncol*, 2020, 148(2): 389–397.

[8] Bollam SR, Berens ME, Dhruv HD. When the ends are really the beginnings: targeting telomerase for treatment of GBM [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2018, 18(4): 15.

[9] 刘千琪,尹晓雪,邹艳,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.

[10] 苏优勒,李昊. ERT 启动子突变、ATRX 表达水平在人类胶质瘤病人预后评估中的作用[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2021, 26(4): 246–249.

[11] 赵宇航,王泽芬. 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.

[12] Hewer E, Phour J, Gutt-Will M, *et al*. TERT promoter mutation analysis to distinguish glioma from gliosis [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2020, 79(4): 430–436.

[13] Okla K, Wertel I, Wawruszak A, *et al*. Blood-based analyses of cancer: Circulating myeloid-derived suppressor cells is a new era coming [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2018, 55(6): 376–407.

[14] Vengoji R, Ponnusamy MP, Rachagani S, *et al*. Novel therapies hijack the blood-brain barrier to eradicate glioblastoma cancer stem cells [J]. *Carcinogenesis*, 2019, 40(1): 2–14.

[15] Cacciotti C, Choi J, Alexandrescu S, *et al*. Immune checkpoint inhibition for pediatric patients with recurrent/refractory CNS tumors: a single institution experience [J]. *J Neurooncol*, 2020, 149(1): 113–122.

[16] BirayAvci C, Dogan F, Ozates Ay NP, *et al*. Effects of telomerase inhibitor on epigenetic chromatin modification enzymes in malignancies [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(12): 9817–9824.

[17] Wang JY, Wang WP. B7-H4, a promising target for immunotherapy [J]. *Cell Immunol*, 2020, 347: 104008.

[18] Yuan L, Ye J, Fan D. The B7-H4 gene induces immune escape partly via upregulating the PD-1/Stat3 pathway in non-small cell lung cancer [J]. *Hum Immunol*, 2020, 81(5): 254–261.

(2021-08-10 收稿, 2021-12-27 修回)

(上接第 187 页)

[10] Bao ZS, Chen HM, Yang MY, *et al*. RNA-seq of 272 gliomas revealed a novel, recurrent PTPRZ1-MET fusion transcript in secondary glioblastomas [J]. *Genome Res*, 2014, 24(11): 1765–1773.

[11] Zhao Z, Meng F, Wang W, *et al*. Comprehensive RNA-seq transcriptomic profiling in the malignant progression of gliomas [J]. *Sci Data*, 2017, 4: 170024.

[12] Tang Z, Li C, Kang B, *et al*. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W98–W102.

[13] Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(9): 533–548.

[14] Attia HR, Ibrahim MH, El-Aziz SHA, *et al*. ITGA4 gene methylation status in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Future Sci OA*, 2020, 6(7): Fso583.

[15] Martini M, De Santis MC, Braccini L, *et al*. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review [J]. *Ann Med*, 2014, 46(6): 372–383.

[16] Faleiro I, Roberto VP, Demirkol Canli S, *et al*. DNA methylation of PI3K/AKT pathway-related genes predicts outcome in patients with pancreatic cancer: a comprehensive bioinformatics-based study [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(24): 6354.

[17] Yan J, Yang X, Jiao X, *et al*. Integrative transcriptomic and proteomic analysis reveals CD9/ITGA4/PI3K-Akt axis mediates trabecular meshwork cell apoptosis in human glaucoma [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(1): 814–829.

(2022-11-08 收稿, 2023-02-07 修回)