



· 专家述评与论著 ·



刘云会，中国医科大学附属盛京医院副院长，神经外科主任，主任医师、教授、博士研究生导师。1997年获得日本山梨医科大学博士学位，1999年完成美国UCLA Cedars-Sinai Medical Center博士后研究工作。2004年入选辽宁省百千万人才工程的百人层次。2007年获得“中国医科大学优秀专家”称号。2008年获得“辽宁省重点学科建设工作先进个人”和“中国医科大学科学研究与技术开发特殊贡献奖励津贴”。2009年获全省卫生系统“诚信服务先进个人”荣誉称号。2011年获得辽宁省首届“十大健康卫士”荣誉称号。获得“2015年辽宁省优秀硕士学位论文指导教师”和“2016年辽宁省优秀博士学位论文指导教师”荣誉称号。2016年获得国务院特殊津贴。2017年获得“辽宁名医”和“沈阳市领军人才”荣誉称号。

中国医师协会神经外科医师分会微侵袭神经外科专家委员会主任委员，中国医院协会医疗法制专业委员会副主任委员，中国抗癌协会脑胶质瘤专业委员会副主任委员，中华医学会神经外科学分会常务委员，中国医师协会神经外科医师分会常务委员，中国医师协会脑胶质瘤专业委员会常务委员，中国神经科学学会神经外科学基础与临床分会委员会常务委员，中国研究型医院学会移动医疗专业委员会常务委员，辽宁省医学会神经外科学分会主任委员，辽宁省医师协会神经外科医师分会主任委员，辽宁省脑损伤疾病质控中心主任，辽宁省干细胞临床研究专家委员会副主任委员，沈阳市医学会神经外科学分会主任委员。*Neurocritical Care Chinese Version*主编，《辽宁医学杂志》副主编，《Neurosurgery Chinese Edition》、《中华神经外科学杂志》、《中国微侵袭神经外科杂志》、《临床神经外科杂志》、《中华脑血管病杂志（电子版）》、“国家卫生和计划生育委员会专科医师规范化培训规划教材”《神经外科学》以及国家级《临床转化神经科学（英文）》编委。

评价替莫唑胺对脑胶质瘤治疗敏感性的新方法

张雷¹，刘一博²，刘继才²，刘云会¹

1. 中国医科大学附属盛京医院神经外科，辽宁 沈阳 110004；
2. 胤安国际（沈阳）基因科技股份有限公司，辽宁 沈阳 110169

[摘要] **背景与目的：**替莫唑胺（temozolomide, TMZ）是治疗胶质母细胞瘤的唯一化疗药。O⁶-甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶（O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT）基因启动子甲基化是评价TMZ敏感性的唯一指标。但通过检测MGMT的甲基化程度来评估TMZ的敏感性是不够的，因为目前MGMT检测只是定性检测，而且这种检测只能反映DNA损伤修复的一条通路，而另两条通路的修复情况却没有反映出来。**方法：**该研究一方面是应用高分辨率熔解曲线（high resolution melting, HRM），对MGMT的甲基化进行定量检测，同时应用实时荧光定量聚合酶链反应（real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR）来探讨另外两条修复通路蛋白N-甲基化嘌呤DNA糖基化酶（N-methylpurine DNA glycosylase, MPG）和人类烷烃羟化酶基因同系物2（alkane hydroxylase gene homolog 2, ALKBH2）的mRNA表达。将MPG和ALKBH2的表达分为高表达和低表达。**结果：**结合MGMT的甲基化（阳性）和非甲基化（阴性）程度，再把MPG和ALKBH2结合起来评估患者对TMZ的敏感性。三阳性（MGMT非甲基化，MPG阳性和ALKBH2阳性）

为化疗抵抗, 两阳性为不敏感, 两阴性为次敏感, 三阴性 (*MGMT*甲基化, *MPG*阴性和*ALKBH2*阴性) 为最敏感。结合8例胶质母细胞瘤患者的检测和生存期, 结果与我们的判断结果相吻合, 三阴性的患者生存时间最长, 三阳性的患者的生存时间最短。**结论:** 通过定量检测*MGMT*同时结合*MPG*和*ALKBH2*可以更精准地判断TMZ的敏感性。

[关键词] 替莫唑胺; O⁶-甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶; N-甲基化嘌呤DNA糖基化酶; 烷烃羟化酶基因同系物2

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2018.09.000

中图分类号: R739.41 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2018)09-0657-08

A novel method to predict temozolomide sensitivity for the treatment of glioblastoma ZHANG Lei¹, LIU Yibo², LIU Jicai², LIU Yunhui¹ (1. Department of Neurosurgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China; 2. Yinan International (Shenyang) Gene Technologies, Shenyang 110169, Liaoning Province, China)

Correspondence to: LIU Yunhui E-mail: liuyh@sj-hospital.org

[Abstract] **Background and purpose:** Temozolomide (TMZ) is the only drug available for the treatment of glioblastoma, and O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) promoter methylation is the only gene for prediction of the sensitivity of TMZ in glioblastoma patients. However, detecting the status of *MGMT* gene methylation alone is not sufficient for evaluating the sensitivity to TMZ. One reason is that the current *MGMT* detection is qualitative and it is not quantitative. Another reason is that detection of *MGMT* gene methylation just reflects one of the three DNA repair pathways. The other two repair pathways are not tested. **Methods:** In this study, we used high resolution melting (HRM) analysis to qualify the methylation status of the patients' samples, and then measured mRNA levels of N-methylpurine DNA glycosylase (*MPG*) and human alkane hydroxylase gene homolog 2 (*ALKBH2*) in the other two pathways by polymerase chain reaction (PCR). Furthermore, the expression levels of *MPG* and *ALKBH2* were divided into high and low expressions, respectively. **Results:** We found that patients with triple positive test results were more resistant to TMZ whereas patients with triple negative test results were more sensitive to TMZ. The results were consistent with the survival data. Patients with triple negative test results survived the longest, while patients with triple positive test results survived the shortest. **Conclusion:** Our results suggest that this novel method may predict TMZ sensitivity more precisely in glioblastoma patients.

[Key words] Temozolomide; O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase; N-methylpurine DNA glycosylase; Alkane hydroxylase gene homolog 2

脑胶质瘤是最常见的神经系统恶性肿瘤, 其中胶质母细胞瘤是胶质瘤中最恶性的一种, 中位生存时间仅14.6个月^[1]。目前脑胶质瘤的标准治疗是手术(在保护功能的情况下, 尽量全切)、同步放化疗及辅助化疗。替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 是目前最常用的烷化剂类化疗药物。TMZ是一种口服二代烷化剂咪唑四嗪类衍生物, 通过损伤肿瘤细胞的DNA来杀死肿瘤。DNA损伤修复酶O⁶-甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶 (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, *MGMT*) 在胶质瘤组织中的表达与肿瘤对TMZ的敏感性相关。细胞对于DNA鸟嘌呤O⁶位置上烷化基团的修复能力取决于*MGMT*在细胞中的表达, 而*MGMT*基因启动子区的甲基化状态决定*MGMT*

的表达。因此, 检测*MGMT*基因启动子区的甲基化情况, 已经作为临床上评价脑胶质瘤患者对TMZ药物敏感性的主要手段。然而临床上发现, *MGMT*基因启动子区甲基化程度类似的脑胶质瘤患者对TMZ的敏感性仍然存在一定程度的个体化差异^[2]。其原因一方面可能与甲基化的程度即甲基化的量有一定的关系; 另一方面可能是由于*MGMT*不是唯一的DNA损伤修复机制。

TMZ引起的DNA损伤一般分为主要损伤和次要损伤。主要损伤多发生在鸟嘌呤的O⁶部位和鸟嘌呤的N⁷/腺嘌呤的N³位置上^[3]。次要损伤主要在腺嘌呤的N¹和胞嘧啶的N³部位上(图1)。主要损伤中的*MGMT*是唯一能将烷基加合物从鸟嘌呤O⁶的位置上移除的蛋白, 一般在突变前清除这

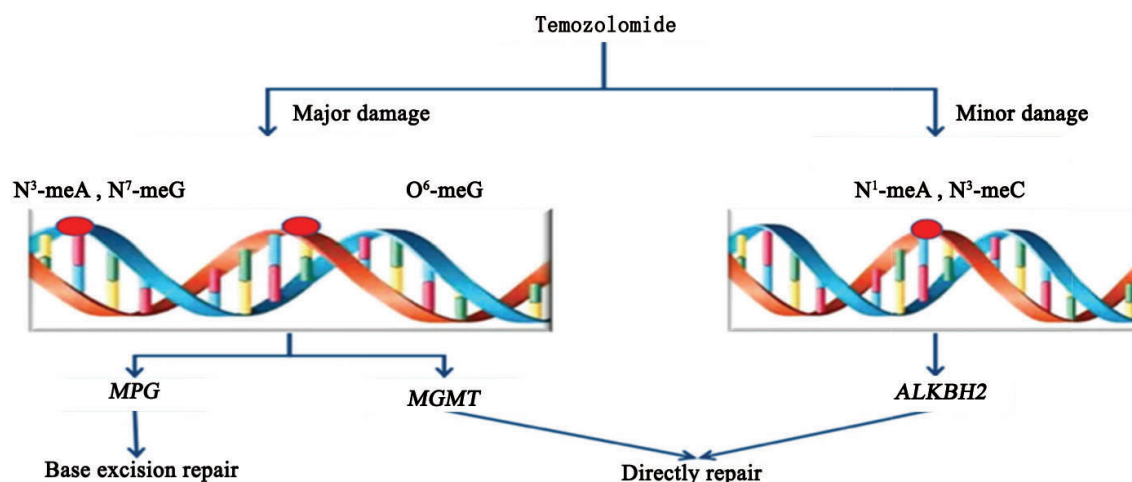


图1 TMZ导致DNA损伤的部位

Fig. 1 DNA damage sites induced by TMZ

DNA damages are usually divided into major damages and minor ones. The major damages are at the sites of O⁶-meG and N³-meA/ N⁷-meG. The minor damages are at the sites of N¹-meA and N³-meC. MGMT directly repairs the damage at the site of O⁶-meG. MPG repairs the damage at the sites of N³-meA and N⁷-meG through BER. ALKBH2 directly repairs the damage at the sites of N¹-meA and N³-meC

种加合物。MGMT主要通过不可逆的方式将烷化基团从O⁶-甲基鸟嘌呤（O⁶-methylguanine, O⁶-meG）转移到MGMT蛋白145位的半胱氨酸残基上，从而保护细胞免受TMZ的损伤^[4]。在这一过程中，MGMT不需要辅助因子和其他蛋白质的参与，同一蛋白既作为甲基转移酶，又作为甲基受体蛋白。同时，MGMT蛋白反应位点与烷化基团不可逆结合而失活，故该反应又称自杀反应^[5]。因为在DNA复制过程中，错配修复系统虽能识别错配的碱基对，但不能为O⁶-meG找到配对碱基，因此子链DNA有缺口形成，缺口随细胞分裂而逐渐积累，最终阻碍细胞复制启动，从而使细胞周期停滞在G₂-M期，发生细胞死亡；还可使细胞DNA的单链或双链断裂，阻断DNA的复制从而抑制肿瘤生长^[3]。目前常规的检测MGMT启动子甲基化的方法，甲基化聚合酶链反应（polymerase chain reaction, PCR）只是定性检测。主要损伤的另一个修复途径是DNA碱基切除修复（base excision repair, BER）^[6]。BER途径有一系列催化酶，其中N-甲基化嘌呤DNA糖基化酶（N-methylpurine DNA glycosylase, MPG）是该途径的启动酶^[7]，正常情况下仅在细胞核中起作用，其底物包括N³-甲基腺嘌呤（N³-methyladenine, N³-meA）和N⁷-甲基腺嘌呤

（N⁷-methylguanine, N⁷-meG）等。它负责识别并将受损的碱基从DNA链上切除，留下的腺嘌呤位点在下流其他酶的催化下，连接正确的碱基，从而完成对DNA损伤的修复。MPG的蛋白表达会提高BER途径的活性，使肿瘤细胞对TMZ的敏感性降低^[8-9]。另外，烷烃羟化酶基因同系物2（alkane hydroxylase gene homolog 2, ALKBH2）蛋白也被认为可以参与TMZ细胞毒性的修复。ALKBH2是一种氧化脱甲基酶，它能够直接地去除双链或单链DNA中的N¹-甲基腺嘌呤（N¹-methyladenosin, N¹-meA）和N³-甲基胞嘧啶（N³-methylcytosine, N³-meC）的损伤^[10]。ALKBH2仅存在于细胞核中，通过与增殖细胞核形成复合物，在细胞周期的S期发挥作用，即在靠近复制叉的DNA修复过程中起重要作用。当ALKBH2高表达时，能够增强N¹-meA和N³-meC的损伤修复，进而降低TMZ对肿瘤细胞的毒性作用^[11-12]。目前仅通过检测能够修复O⁶位点的MGMT的甲基化程度，来评估对TMZ的敏感性是不够准确的。结合国外的研究现状和前期的研究结果，本研究拟通过联合检测修复TMZ引起的DNA损伤的三个方面的MGMT、MPG和ALKBH2，希望能够更全面、更精准地评估TMZ的用药敏感性。

1 材料和方法

1.1 样本的收集

选取近3年收集的脑胶质瘤样本8例,入组条件:病理学确认样本为世界卫生组织(World Health Organization, WHO) IV级胶质母细胞瘤,样本来源患者均接受手术及术后同步放疗(60 Gy, 2 Gy/次,共30次,化疗同步75 mg/m²),再加5/28化疗方案(28 d给5 d药150 mg/m²) 6个周期。

1.2 样本DNA的提取

取3 mm×3 mm组织块样本,放入2 mL Eppendorf管,使用AxyPrep基因组DNA小量制备试剂盒,按照试剂盒说明书进行DNA提取。

1.3 样本DNA重亚硫酸盐处理及纯化

取适量提取的样本DNA,使用EpiTectPlus DNA Bisulfite Kit试剂盒,按照试剂盒说明书进行DNA重亚硫酸盐处理及纯化。

1.4 采用高分辨率溶解曲线(high resolution melting, HRM)的方法检测样本MGMT的甲基化

首先根据引物序列5'-GGATATGTTGGGATAGTT-3'和5'-CCCAAACACTCACCAAAT-3'设计引物。再将装有引物干粉的离心管短暂离心,加入相应的蒸馏水溶解为100 μmol/L,涡旋混匀,短暂离心,保存于-20℃,避免反复冻融。将溶解后的引物稀释为10 μmol/L,并分装保存于-20℃,避免反复冻融。将所有DNA模板稀释至均一浓度20 ng/μL。准备好所需要的引物和处理后的DNA和HRM试剂(Precision Melt Supermix购自美国BioRad公司)和双蒸馏水。计算所需要的引物总量、反应混合液总量和水的总量。将引物与反应混合液、双蒸馏水按所需量加入同一离心管中。涡旋离心,将混合液按等量分别加至8联管或96孔板中。加入等量的模板至反应混合液中,然后离心,去掉液体中的气泡并使液体集中于管底部,放置于实时荧光定量PCR(real-time fluorescent quantitative PCR, RTFQ-PCR)仪中。反应体系:HRM试剂7.5 μL;引物2×0.6 μL,终浓度为400 nmol/L(每个引物);双蒸馏水5.3 μL;处理后的DNA 1 μL, 20 ng,总体积15.0 μL。反应程序设置:

起始DNA变性95℃, 2 min, 1个循环。变性95℃, 10 s;退火/延长60℃, 30 s, 45个循环;异源双链形成, 95℃, 30 s, 1个循环;60℃, 30 s, 1个循环;HRM和读盘65~92℃(每步升温0.1℃)每步10 s, 1个循环。设置反应孔的引物模板等信息,然后运行程序。应用BioRad Precision Melt Analysis软件进行结果分析。

1.5 样本RNA提取

取50~100 mg组织,置于1.5 mL离心管中,加入1 mL TRIzol充分匀浆,室温静置5 min。加入0.2 mL氯仿(1:5),手动颠倒混匀15 s(30次),室温静置3 min。在4℃离心机中(13 000×g)离心15 min。样品通常分3层:下层(红色有机相)、中间层和上层(无色水相)。RNA主要在水相中,把上层(约600 μL)转移到新管中。加入等体积的异丙醇,再将管中液体上下颠倒混匀,在室温下静置10 min或在-20℃放置20~30 min。然后在4℃离心机(13 000×g)中离心15 min,弃上清液。加入500 μL 75%的无水乙醇[加入适量的焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)处理过的水配制],轻轻洗涤沉淀(每使用1 mL TRIzol至少加500 μL无水乙醇)。在4℃离心机(7 500×g)中离心5 min,弃上清液,晾干。加入适量DEPC处理水溶解(20~30 μL)。

1.6 样本RNA反转录

将样本提取好的RNA,按照PrimeScript™ RT Reagent Kit(日本Takara公司)试剂盒说明书进行反转录。

1.7 RTFQ-PCR检测MPG和ALKBH2 mRNA的表达

MPG的正向引物序列为5'-GTCCTAGTCCGGCGACTTCC-3',反向引物序列为5'-CTTGTCTGGGCAGGCCCTTTGC-3'。ALKBH2的正向引物序列为5'-GCTGGGCTGACCTACACATT-3',反向引物序列为5'-TGCCGG AAGACAAAGTCTCT-3'。用于扩增内参磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)基因的正向引物序列为5'-AGATCATCAGCAATGCCCTCT-3',反向引物序列为5'-GGTCATGAGTCCTTCCACGA-3'。

将iTaQ Universal SYBR Green Supermix及其他反应试剂室温解冻，充分混合，瞬时离心后放在冰上避光备用。在冰上准备足够量的反应混合液（包括iTaQ Universal SYBR Green Supermix、水及引物），按不同引物分成若干管。具体量：反应混合液量SYBR Green Mix 5 μL；引物：2 × 0.25 μL，终浓度为250 nmol/L；DNA模版：1 μL，50 ng~50 pg；水：3.5 μL；总体积共10 μL。彻底混匀反应混合液，按事先设计好的位置加入到8联管或孔板中。使用校准过的移液枪，以确保分析精密准确。按事先设计好的位置加入DNA模板，盖好盖子。充分混合，瞬时离心，将整个反应体系收集到管底部。将8联管或孔板放入仪器（CFX-connect系统），注意位置要与设计的一致，盖好仪器盖。运行仪器按操作软件设置各孔信息。热循环反应参数：酶激活和DNA预变性参数为95 °C，3 min；扩增变性参数为95 °C，5 s；退火，延伸和读板参数为60 °C，30 s；40个循环。溶解曲线：65~95 °C每步升温0.5 °C。应用CFX-Manager分析软件进行结果分析。

1.8 统计学处理

应用SPSS 20.0软件进行统计学分析，分析MGMT甲基化、MPG和ALKBH2 mRNA表达与TMZ药物敏感性的相关性。用GraphPad Prism软

件分析胶质瘤患者的生存曲线。

2 结果

2.1 胶质瘤患者的MGMT基因甲基化水平

为明确MGMT启动子甲基化程度的定量，我们应用HRM的方法对8例的胶质母细胞瘤的患者标本的MGMT启动子甲基化进行定量检测。发现4例（50%）标本无甲基化（阴性），4例（50%）标本有甲基化（阳性），但甲基化的程度或量明显不同，最高37%，最低7%左右（表1，图2）。

表1 MGMT甲基化的结果

Tab. 1 The results of MGMT promotor methylation

Samples	MGMT promotor methylation
1	unmethylated (positive)
2	unmethylated (positive)
3	unmethylated (positive)
4	methylated (negative)
5	methylated (negative)
6	methylated (negative)
7	methylated (negative)
8	unmethylated (positive)

The unmethylated (positive) MGMT promoters are shown in samples (1, 2, 3 and 8) and the methylated (negative) MGMT promoters are shown in samples (4, 5, 6 and 7)

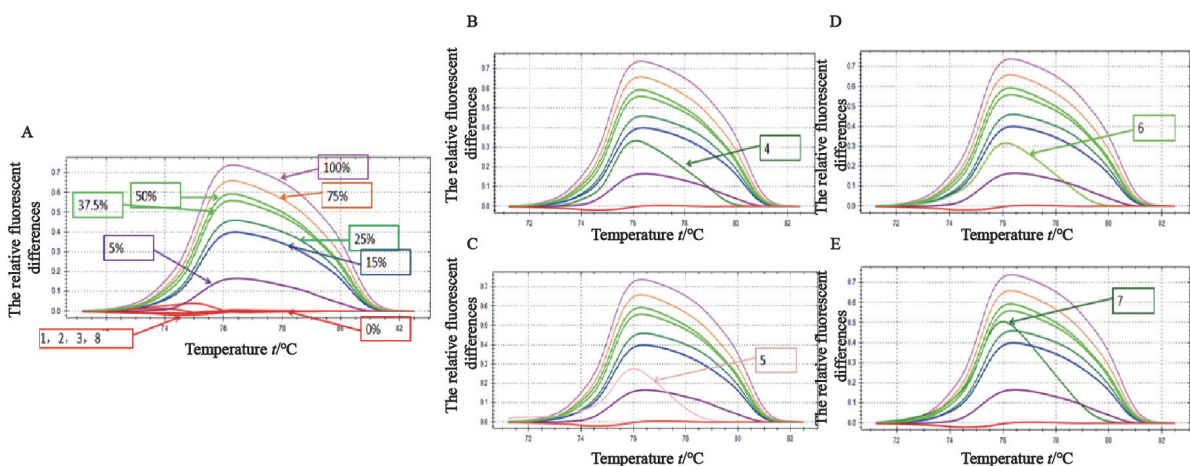


图2 MGMT甲基化的定量分析

Fig. 2 Quantitative analysis of MGMT promoter methylation

The HRM analysis method was used to analyze the methylation status of MGMT promoter in the eight samples of glioblastoma patients quantitatively. A: The standard curve of HRM analysis. This curve reflected its percentage deviation according to the relative fluorescent differences of each sample. The 0% difference means methylation was negative. Samples (P1, P2, P3 and P8) showed 0% difference and it means that there was no methylation of the MGMT promoter in each sample. B, C, D: Samples (P4, P5 and P6) were located within 5%-15% range indicating their MGMT promoters were methylated mildly. E: Sample 7 was located within 25.0%-37.5% indicating its MGMT promoter was highly methylated

2.2 胶质瘤患者的MPG mRNA的表达

为检测MPG mRNA在脑胶质瘤患者组织中的表达, 我们进一步应用RTFQ-PCR进行检测。发现MPG mRNA的表达在不同的肿瘤中的表达不同。我们将正常脑组织的GAPDH表达设为1, 然后将各个肿瘤的MPG mRNA与GAPDH相除, 平均最高表达为10。5以上为阳性表达, 5以下为阴性表达。

2.3 胶质瘤患者的ALKBH2 mRNA表达

进一步应用RTFQ-PCR检测ALKBH2 mRNA

的表达。发现在不同的肿瘤中ALKBH2 mRNA的表达也不同。我们将正常脑组织的GAPDH表达设为1, 然后将各个肿瘤的ALKBH2 mRNA与GAPDH相除, 平均最高表达为5。2.5以上为阳性表达, 2.5以下为阴性表达。

2.4 胶质瘤患者的生存曲线

随访了8例患者, 根据他们的生存时间绘制了三阳性(化疗抵抗)和三阴性(最敏感)患者的生存曲线, 发现三阴性患者的生存时间明显长于三阳性的患者(图3~5, 表2)。

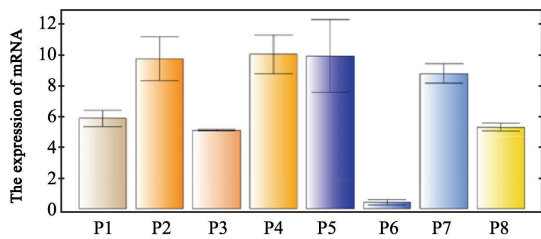


图3 MPG mRNA的表达

Fig. 3 The expression of MPG mRNA

The quantitative PCR was used to measure the expression of MPG mRNA in eight glioblastoma samples. The GAPDH of normal brain was suggested as one, and each sample was divided by its own GAPDH value. The bar graphs were made according to the divided results. The value 10 was indicated as the highest of expression. The value above 5 means the expression was positive, and the value below 5 means the expression was negative. MPG expression were negative in samples (P1, P3, P6 and P8), and MPG expression were positive in samples (P2, P4, P5 and P7)

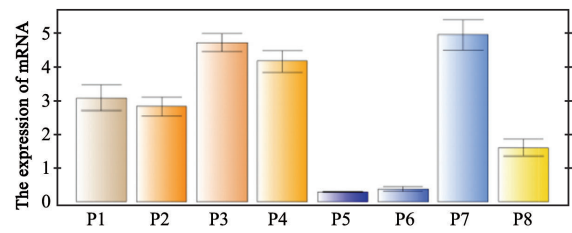


图4 ALKBH2 mRNA的表达

Fig. 4 The expression of ALKBH2 mRNA

The quantitative PCR was used to measure the expression of ALKBH2 mRNA in glioblastoma samples. The GAPDH of normal brain was suggested as one, and each sample was divided by its own GAPDH value. The bar graphs were made according to the divided results. The value 5 was indicated as the highest of expression. The value above 2.5 means the expression was positive, and the value below 2.5 means the expression was negative. ALKBH2 expression were negative in samples (P5, P6 and P8), and ALKBH2 expression were positive in samples (P1, P2, P3, P4 and P7)

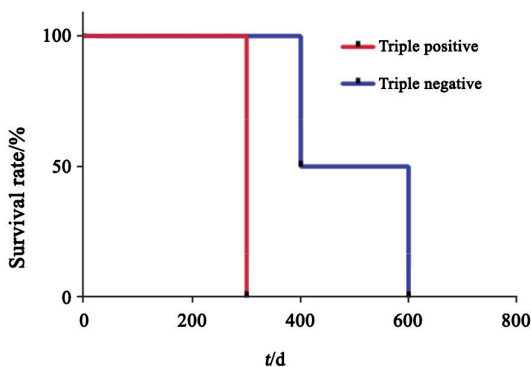


图5 三阳性和三阴性患者的生存曲线

Fig. 5 The survival curves of triple positive and triple negative patients

The blue curve was the survival time of the triple negative patient (P6), and it was around 600 d. The red curve was the survival time of the triple positive patient (P2), and it was around 300 d

表2 TMZ敏感性结果

Tab. 2 The results of TMZ sensitivity

Patient	MGMT	MPG	ALKBH2	Sensitivity
7	Negative	Positive	Positive	Not sensitive
6	Negative	Negative	Negative	The highest sensitive
4	Negative	Positive	Positive	Not sensitive
5	Negative	Positive	Negative	The lower sensitive
1	Positive	Negative	Positive	Not sensitive
2	Positive	Positive	Positive	The highest resistant
3	Positive	Negative	Positive	Not sensitive
8	Positive	Negative	Negative	The lower sensitive

Results of patient 6 (triple negative) indicated it was the highest sensitive one to TMZ. Results of patient 2 (triple positive) indicated he had the highest level of resistance to TMZ. Results of patients (1, 3, 4 and 7) indicated they were not sensitive to TMZ, and patients (5 and 8) were lower sensitive to TMZ

3 讨 论

本研究应用HRM对8例胶质母细胞瘤患者标本的MGMT启动子甲基化进行定量检测,发现4例标本无甲基化(阴性),4例有甲基化(阳性),但甲基化的程度或量明显不同,最高37%,最低7%左右。Hegi等^[13]曾经报道,MGMT基因沉默提示用TMZ治疗胶质母细胞瘤有效。胶质母细胞瘤MGMT启动子甲基化比非甲基化的患者预后好^[14]。Yamashita等^[15]最近报道,HRM比甲基化PCR更加敏感、更加优越,可以作为一种检测MGMT甲基化的替代方法,与本研究结果一致。

但由于MGMT甲基化程度主要反映在鸟嘌呤的O⁶部位的修复情况,而其他部位如鸟嘌呤的N⁷、腺嘌呤的N³、腺嘌呤的N¹和胞嘧啶的N³部位的修复情况却还没有反映。Agnihotri等^[16]报道了高表达MPG会诱导TMZ耐药,且与不良预后相关。Xipell等^[17]又报道了内质网应激诱导药物可通过降低MPG的表达使化疗药TMZ更加敏感。另外,Johannessen等^[18]报道在脑胶质瘤细胞中另一个DNA修复蛋白ALKBH2与TMZ的药物抵抗有关。同时致癌代谢产物D-羟基戊酸酯可抑制ALKBH2表达,而使异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH)突变的细胞对烷基类化疗药更敏感^[19]。Wilson等^[20]也报道针对ALKBH2的荧光探针可用来检测DNA损伤的修复和药物的耐药情况。本研究进一步应用RTFQ-PCR检测MPG和ALKBH2 mRNA的表达,发现在不同的肿瘤中的MPG和ALKBH2的mRNA表达也不同。

本研究将MPG的表达分为高表达(5以上为阳性)和低表达(5以下为阴性)。ALKBH2的表达分为高表达(2.5以上为阳性)和低表达(2.5以下为阴性)。根据检测的结果,三阳性为化疗抵抗(12.5%, n=1),两阳性为不敏感(50%, n=4);三阴性为最敏感(12.5%, n=1),两阴性为次敏感(25%, n=2)。结合患者的生存时间,正好与我们的判断结果相吻合,三阴性的患者生存时间最长,三阳性的患者生存时间最短。本项目的不足是患者例数太少,将来需要更多的

例数来进一步证实我们的结论。

综上所述,通过检测定量MGMT同时结合MPG和ALKBH2可以更精准地判断TMZ的敏感性。

[参 考 文 献]

- [1] STUPP R, MASON W P, VAN DEN BENT M J, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma [J]. N Engl J Med, 2005, 352(10): 987-996.
- [2] SCHIFF D. Temozolomide and radiation in low-grade and anaplastic gliomas: temoradiation [J]. Cancer Invest, 2007, 25(8): 776-784.
- [3] MUTTER N, STUPP R. Temozolomide: a milestone in neuro-oncology and beyond [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2006, 6(8): 1187-1204.
- [4] ESTELLER M, HAMILTON S R, BURGER P C, et al. Inactivation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia [J]. Cancer Res, 1999, 59(4): 793-797.
- [5] BEARZATTO A, SZADKOWSKI M, MACPHERSON P, et al. Epigenetic regulation of the MGMT and hMSH6 DNA repair genes in cells resistant to methylating agents [J]. Cancer Res, 2000, 60(12): 3262-3270.
- [6] ADHIKARI S, CHOUDHURY S, MITRA P S, et al. Targeting base excision repair for chemosensitization [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2008, 8(4): 351-357.
- [7] HARRISON J F, RINNE M L, KELLEY M R, et al. Altering DNA base excision repair: use of nuclear and mitochondrial-targeted N-methylpurine DNA glycosylase to sensitize astroglia to chemotherapeutic agents [J]. Glia, 2007, 55(14): 1416-1425.
- [8] ROSELL R, TARON M, BARNADAS A, et al. Nucleotide excision repair pathways involved in cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer [J]. Cancer Control, 2003, 10(4): 297-305.
- [9] TRIVEDI R N, WANG X H, JELEZCOVA E, et al. Human methylpurine DNA glycosylase and DNA polymerase beta expression collectively predict sensitivity to temozolomide [J]. Mol Pharmacol, 2008, 74(2): 505-516.
- [10] AAS P A, OTTERLEI M, FALNES P O, et al. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA [J]. Nature, 2003, 421(6925): 859-863.
- [11] GILLJAM K M, FEYZI E, AAS P A, et al. Identification of a novel, widespread, and functionally important PCNA-binding motif [J]. J Cell Biol, 2009, 186(5): 645-654.
- [12] JOHANNESSEN T C, PRESTEGARDEN L, GRUDIC A, et al. The DNA repair protein ALKBH2 mediates temozolomide resistance in human glioblastoma cells [J]. Neurol Oncol, 2013, 15(3): 269-278.
- [13] HEGI M E, DISERENS A C, GORLIA T, et al. MGMT gene

- silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(10): 997-1003.
- [14] HEGI M E, DISERENS A C, GODARD S, et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(6): 1871-1874.
- [15] YAMASHITA S, YOKOGAMI K, MATSUMOTO F, et al. *MGMT* promoter methylation in patients with glioblastoma: is methylation-sensitive high-resolution melting superior to methylation-sensitive polymerase chain reaction assay? [J]. *J Neurosurg*, 2018: 1-9. [Epub ahead of print]
- [16] AGNIHOTRI S, GAJADHAR A S, TERNAMIAN C, et al. Alkylpurine-DNA-N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(1): 253-266.
- [17] XIPELL E, ARAGÓN T, MARTÍNEZ-VELEZ N, et al. Endoplasmic reticulum stress-inducing drugs sensitize glioma cells to temozolomide through downregulation of *MGMT*, *MPG*, and *Rad51* [J]. *Neuro Oncol*, 2016, 18(8): 1109-1119
- [18] JOHANNESSEN T C, PRESTEGARDEN L, GRUDIC A, et al. The DNA repair protein *ALKBH2* mediates temozolomide resistance in human glioblastoma cells [J]. *Neuro Oncol*, 2013, 15(3): 269-278.
- [19] WANG P, WU J, MA S, et al. Oncometabolite D-2-hydroxyglutarate inhibits *ALKBH* DNA repair enzymes and sensitizes IDH mutant cells to alkylating agents [J]. *Cell Rep*, 2015, 13(11): 2353-2361.
- [20] WILSON D L, BEHARRY A A, SRIVASTAVA A, et al. Fluorescence probes of *ALKBH2* measure DNA alkylation repair and drug resistance responses [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018. [Epub ahead of print] .

(收稿日期: 2018-08-04 修回日期: 2018-09-12)

《肿瘤影像学》杂志2018年征订启事

《肿瘤影像学》杂志自1992年创刊以来深受医学界赞颂, 1998年经原国家科委、中央新闻出版总署批准为国内外公开正式发行的期刊, 刊号: ISSN 1008-617X, CN31-2087/R。杂志由优质铜版纸印制, 大16开, 64页/期, 双月刊。被中国科技核心期刊、中国学术期刊综合评价数据库、中国核心期刊(遴选)数据库、中国期刊全文数据库等收录。主要报道医学影像领域科研成果、临床应用、综述、病例报告、讲座及与理工结合的有关论文等。

《肿瘤影像学》坚持学术性与科学性, 信息量大, 具有临床实用价值。是医院图书馆、影像科室及高等医药院校收存和使用的学术刊物, 是临床医学影像医务人员晋升中、高级职称的重要论文发表园地。欢迎各医学院校、医学图书馆、影像科室及个人向当地邮局订阅。

本刊季末出版, 邮发代号4-653, 定价每期15元, 每年共90元整。

单位全称: 《肿瘤影像学》编辑部

通讯地址: 上海市东安路270号复旦大学附属肿瘤医院

邮 编: 200032

电 话: 021-64188274 021-64175590-83574

E-mail: imaging109@163.com

网 址: www.zhongliuyingxiangxue.com

《肿瘤影像学》编辑部