

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.01.010

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.01.010>

丘脑多级别肿瘤 K27M-H3.3 型突变对 H3K27me3 蛋白表达的影响及其与预后的相关性

邢乐成, 张秀丽, 周立兵

(乐陵市人民医院神经外科, 山东 乐陵 253600)

[摘要] 目的: 明确K27M-H3.3型突变对H3K27me3蛋白表达的影响, 探讨丘脑多级别胶质瘤H3F3A基因K27M-H3.3型突变与患者的预后相关性。方法: 整理并分析2013年1月至2016年12月经术后病理证实的24例丘脑胶质瘤的临床资料, 包括性别、年龄、发病年龄、病程、首发症状、临床表现、影像学资料、病理分型等, 记录各病例总生存期及无进展生存期。将患者分为实验组(K27M-H3.3型突变阳性)及对照组(K27M-H3.3型突变阴性)。采用H3K27me3抗体免疫组织化学后复染, 观察H3K27me3蛋白在肿瘤组织中的表达情况并摄片。采用Kaplan-Meier统计方法分析两组患者预后差异性。结果: 11例K27M-H3.3型突变阳性患者肿瘤组织切片均表现出明显的H3K27me3染色细胞减少及大片染色缺失区域。其中少部分切片在染色缺失区域中呈现局部零星环状及带状染色阳性, 为血管内皮细胞及成纤维细胞染色, 并非肿瘤细胞。突变阴性者H3K27me3核染色极其显著, 未见染色细胞减少及染色缺失区域。Kaplan-Meier分析、log-rank检验提示实验组与对照组总生存期和无进展生存期差异无统计学意义(分别为 $P=0.335$ 与 $P=0.097$)。结论: K27M-H3.3型突变可明显抑制H3组蛋白第27位氨基酸三甲基化, 造成H3K27me3蛋白表达减少, H3F3A基因H3.3K27M突变与预后关系有待进一步研究。

[关键词] 丘脑胶质瘤; 基因突变; H3F3A; H3K27me3; 预后

Effects of K27M-H3.3 mutation on expression of H3K27me3 protein in thalamic glioma and its correlation with prognosis

XING Lecheng, ZHANG Xiuli, ZHOU Libing

(Department of Neurosurgery, Leling People's Hospital, Leling Shandong 253600, China)

Abstract **Objective:** To investigate the relationship between H3.3K27M mutation and H3K27me3 protein expression by immunohistochemistry (IHC) and to discuss the correlation between K27M-H3.3 mutation and thalamic glioma prognosis. **Methods:** We collected the clinical documents and data of 24 thalamic glioma patients who received surgical resection from January 2013 to December 2016, including sex, age, initial symptoms, clinical manifestations, CT/MRI images and pathologic test results. We recorded each patient's surviving data,

收稿日期 (Date of reception): 2017-10-26

通信作者 (Corresponding author): 邢乐成, Email: sdxinglecheng@126.com

including progress-free survival (PFS) and overall survival (OS). Finally, we separated them into experimental group and control group. The sections were tested by IHC with H3K27me3 antibody in order to estimate H3K27me3 protein expression. Analysis of prognosis was investigated by the SPSS V20.0 software. **Results:** The levels of H3K27 trimethylation (H3K27me3) were reduced globally in all the 11 H3.3K27M patient sample sections, while all the control group sections presented normally, lack of reduced or even deleted H3K27me3 areas. There was no significant statistical difference in OS and PFS between these two groups. **Conclusion:** The K27M-H3.3 mutation can severely lead to H3K27me3 reduction or even deletion, due to the reduced trimethylation of the 27th amino of H3 histone by H3.3K27M mutation. The prognostic factor of K27M-H3.3 mutation is still unclear.

Keywords thalamic glioma; gene mutation; H3F3A; H3K27me3; prognosis

H3F3A突变广泛存在于胶质瘤当中, 包括WHO IV级胶质瘤、神经胶质瘤(diffuse intrinsic pontine glioma, DIPG)等, 绝大多数存在于胶质母细胞瘤中。H3F3A基因两型突变具有肿瘤颅内定位不同的特点, K27-H3.3型多表现于丘脑胶质瘤等中线结构胶质瘤中。近年来经过不断深入研究^[1], 发现组蛋白H3.3突变在中线结构(如丘脑、脑干及脊髓等)区域胶质瘤中具有极高的表达, 且常见于儿童和年轻成人, 呈弥漫性生长, 肿瘤恶性程度极高, 预后极差。该突变与IDH1突变相互排斥, 而IDH1 R132H型突变已经确定为胶质瘤预后较好的指标; 突变造成EZH2过表达, 促进肿瘤血管新生; 突变可引起部分原癌基因上调, 如MYCN。因此, K27H3.3型突变有可能是一个与胶质瘤负相关的重要指标。根据以上理论, 本研究拟探讨K27M-H3.3型突变对H3K27me3蛋白表达的影响, 同时探讨丘脑多级别胶质瘤H3F3A基因K27M-H3.3型突变与患者预后相关性。

1 对象与方法

1.1 对象

选取2013年1月至2016年12月经术后病理证实的24例丘脑胶质瘤患者的临床资料。24例患者均接受手术治疗, 术后单纯TMZ化学治疗者1例, 放射治疗+TMZ化学治疗者19例, 术后行脑脊液分流术(Ommaya植入)者10例。通过电话随访及门诊复查资料统计记录各病无进展生存期(progress-free survival, PFS)与总生存期(overall survival, OS)。末次随访日期为2016年12月, 随访时间最短为1个月(患者死亡), 最长为29个月(肿瘤复发后死亡), 平均随访时间为10个月。截至末次随访日期, 低级

别胶质瘤失访1人, 高级别胶质瘤存活1人, 作为删失数据。将患者分为实验组(K27M-H3.3型突变阳性)及对照组(K27M-H3.3型突变阴性)。本文所有实验获得乐陵市人民医院伦理委员会批准, 所有患者或家属签署知情同意书。

1.2 试剂

主要试剂为UltraVision Quanto Detection System HRP DAB免疫组织化学试剂盒, H3K27me3蛋白抗体(Western印迹, IHC通用)购自美国博奥派克生物公司; 第一抗体: Tri-Methyl-Histone H3 (Lys27) (C36B11) 兔单克隆抗体#9733(100 μ L, 50次)购自美国Cell Signaling公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学检查

选取上述丘脑胶质瘤24例石蜡包埋肿瘤组织(甲醛溶液固定), 切片机切片、制片(4 μ m/张, 每例肿瘤组织5张), 采用UltraVision Quanto Detection System HRP DAB免疫组织化学试剂盒, H3K27me3蛋白抗体行免疫组织化学实验后染色观察H3K27me3蛋白在肿瘤组织中的表达情况并摄片。具体步骤如下: 切片脱蜡并补充水分; 用缓冲液洗涤; 为防止内源性过氧化物酶造成背景非特异性染色, 将切片浸入过氧化物阻断剂(hydrogen peroxide block)内室温孵育10 min; 用缓冲液洗涤; 加入Ultra V Block, 阻止背景非特异性染色, 5 min后甩掉; 以缓冲液洗涤后加入第一抗体三甲基化组蛋白H3(Lys27) (C36B11)兔单克隆抗体, 于室温孵育过夜; 以缓冲液洗涤; 加入一抗增强剂, 于室温孵育10 min; 以缓冲液洗涤; 加入酶标二抗, 避光于室温孵育10 min; 以缓冲液洗涤后

加入去离子水洗涤, 再次以缓冲液洗涤; 将30 μ L (1滴)DAB 显色剂和染色剂加入1 mL DAB显色剂和底物中, 充分混匀, 并滴加至组织上, 室温孵育5 min; 去离子水洗涤; 以苏木精复染, 去离子水冲洗至透明, 并用永久封闭剂盖玻片封闭, 于镜下观察。

1.3.2 染色细胞百分数及核染色形态综合判定

每张免疫组织化学切片在400倍光镜下随机选取5个视野, 以每个视野计数1 000个细胞作为判断标准。若染色细胞数大于95%, 则为染色阳性; 每5个视野中有4个染色阳性, 则判断该肿瘤组织切片染色阳性。由于H3K27me3蛋白在类别上隶属组蛋白, 因此切片中组织细胞染色均为椭圆状核染色。若细胞核呈现棕黄色细颗粒状物质沉积, 则为细胞核阳性反应, 细胞核免疫阳性产物为清晰的点状。实验组与对照组无论染色阳性细胞数量还是染色区域大小, 都存在有明显的区别。

1.4 统计学处理

使用SPSS20.0软件进行分析, 采用Kaplan-Meier统计方法分析实验组与对照组患者预后差异性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 K27M-H3.3 型突变情况

24个样本的H3F3A基因突变筛查鉴定出1个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点, 1个新发现的、或频率极低的SNP位点(c.-23-80G>C, NCBI上未查到RS号), 发现1个突变位点(c.*67A>C; 图1)。有11例(45.8%)样本(不包含重复项)在2号外显子上发生错义突变(杂合突

变), 导致p.Lys27Met。

在突变病例中, 年龄16~58(中位32)岁。对H3F3A突变的检测结果显示突变患者的平均年龄(37岁)较非突变患者(45岁)小, 差异有统计学意义($P<0.05$); 突变患者中只有1例年龄超过40岁。

2.2 染色结果

镜下观察发现: 13例突变阴性者H3K27me3蛋白核染色极其显著, 切片中每个所选视野染色细胞数均大于95%, 未见染色细胞减少、染色程度降低及染色缺失区域(图2)。

11例K27M-H3.3型突变阳性肿瘤组织切片均表现出明显的H3K27me3染色减少, 大片染色缺失区域, 甚至镜下无染色区, 但染色阳性细胞染色程度并未降低。其中部分切片在大片染色缺失区域中存在零星环状或带状染色区, 为血管内皮细胞及成纤维细胞核染色, 并非肿瘤细胞(图3)。

2.3 预后相关性

按低级别、高级别胶质瘤对全部病例进行寿命表统计。其中, 低级别胶质瘤(WHO II级, 本文均为星形细胞瘤)中位生存期及中位PFS分别为14.5个月与10.5个月; 高级别胶质瘤(WHO III, IV级, 本文包括间变性星形细胞瘤及胶质母细胞瘤)中位生存期及中位PFS分别为7.6个月与5.1个月。采用SPSS20.0软件, 制作Kaplan-Meier生存曲线(图4, 5)。在低级别胶质瘤中, 突变阳性者中位生存期及中位PFS为12个月; 阴性者为18个月; 高级别胶质瘤中阳性者分别为7与3个月; 阴性者为8与5个月。Log-rank检验提示实验组与对照组总生存时间, 差异无统计学意义($P=0.335$); PFS差异无统计学意义($P=0.097$)。

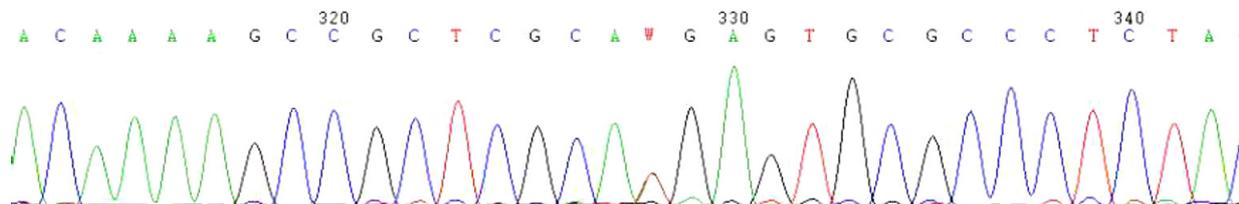


图1 24例样本H3.3K27M型突变检测示意图

Figure 1 A schematic diagram of H3.3K27M mutation detection in 24 samples

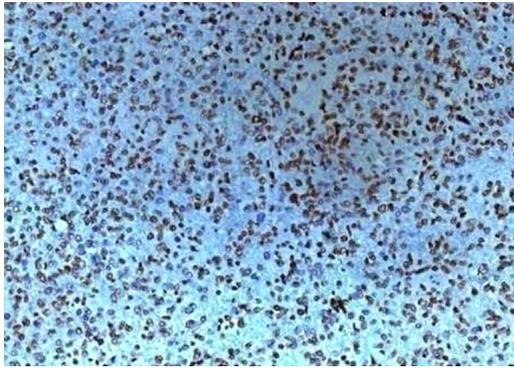


图2 K27M-H3.3突变阴性患者(IHC, ×400)
Figure 2 K27M-H3.3 mutant negative patients (IHC, ×400)

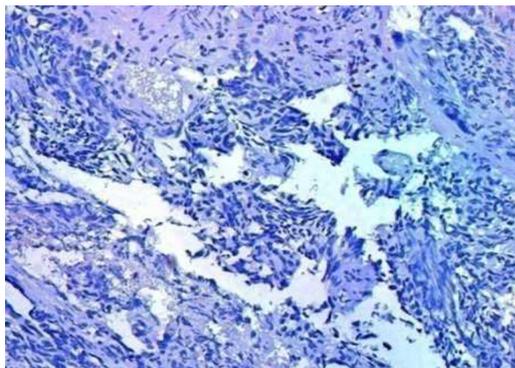


图3 K27M-H3.3突变阳性患者(IHC, ×400)
Figure 3 K27M-H3.3 mutation positive patients (IHC, ×400)

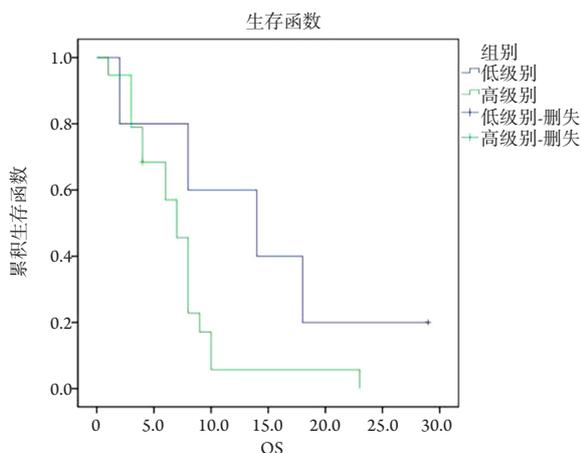


图4 24例丘脑胶质瘤低级别组和高级别组OS生存曲线
Figure 4 OS curve of 24 cases of hypothalamic glioma in the low-grade group and high-grade group

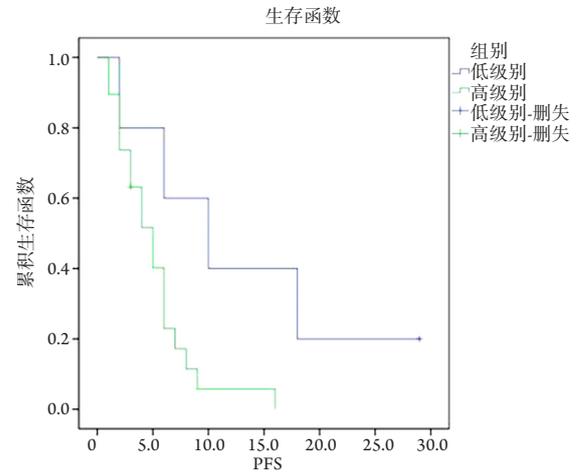


图5 24例丘脑胶质瘤低级别组和高级别组PFS生存曲线
Figure 5 PFS curve of 24 cases of hypothalamic glioma in the low-grade group and advanced group

3 讨论

丘脑是颅内胶质瘤发病率相对较低的部位, 约占所有脑部肿瘤的1%^[1-3]。以本文为例, 低级别胶质瘤中位生存期及中位PFS分别为14.5和10.5个月; 高级别胶质瘤中位生存期及中位PFS分别为7.6, 5.1个月, 与既往数据^[4]相比, 患者生存期并未得到延长。随着第二代DNA测序技术^[5-6]的发展, 胶质瘤中组蛋白编码基因H3F3A的突变在2012年第一次被发现。H3.3组蛋白是一类变异型组蛋白, 与经典组蛋白(H1, H2A, H2B, H3, H4)不同, H3.3并不是结构性组蛋白, 其合成与细胞周期无关, 多位于转录基因活跃的位点如端粒^[7-8], 参与一系列DNA转录活性调节及转录后修饰。2012年, Schwartzentruber等^[9]第一次在48例GBM病例(2~20岁)组织中发现H3F3A基因两型点突变, 产生了两类氨基酸序列的改变: 1)N-terminal端第27位赖氨酸(K)被蛋氨酸替代(M), 产生H3.3K27M蛋白; 2)34位甘氨酸(G)变为精氨酸或缬氨酸(H3.3G34R/V), 总突变率达到31%。随后对784例各级别, 各年龄胶质瘤进行上述突变检测, 阳性患者年龄5~20岁, 绝大部分存在于GBM中(43/408), 以儿童患者为主(32/90, 35.6%), 少数发生于年轻成人患者(11/318, 3.4%)。在III级肿瘤中, 只有极

少数儿童AA突变阳性(2/11, 18.2%), II, I级均为阴性。但上述研究中各肿瘤组织定位于全脑各部位, 目前严格针对于丘脑部位胶质瘤的H3F3A基因K27M-H3.3型突变国内外仅发现1篇研究^[8]报道。该研究^[8]收集27例丘脑胶质瘤患者, 新鲜肿瘤组织例16例, 对其中20例进行H3F3A基因突变检测, 11例突变阳性, 年龄17~46(平均38)岁, 因此认为H3F3A基因K27M-H3.3型突变多存在于高级别肿瘤中。

本研究检测丘脑胶质瘤目标基因后发现突变阳性患者平均年龄37岁, 与Aihara等^[8]的研究结果相一致。不同之处在于, 该型突变在本次实验各级别胶质瘤中均有阳性病例, 虽突变阳性患者较非突变患者年龄偏低, 但与Schwartzentruber等^[9]报道的数据相比, 平均年龄较大, 且1例患者发病年龄<40岁(58岁)。后续研究^[10-11]发现: H3.3K27M可与PRC2复合物的重要组成酶EZH2结合并抑制其活性, 使PRC2无法激活, 造成组蛋白H3第27位氨基酸三甲基化显著抑制, H3K27me3蛋白表达明显下降。这与本实验结果一致, 且本研究在免疫组织化学中发现了在大片肿瘤细胞染色缺失区域中的正常染色血管内皮细胞, 进一步证实了其研究结果。不仅如此, 多项研究^[12-14]表明K27M-H3.3型突变阳性肿瘤细胞具有多种其他分子学异常, 可被看作潜在的精准治疗靶点及预后相关性因素。首先, H3F3A突变与IDH1突变相互排斥, 且几乎伴随TP53突变, 而IDH1突变是目前公认的预后正相关因素。其次, K27-H3.3型突变能上调某些原癌基因, 如MYCN等^[12]; K27M-H3.3型突变不仅改变H3K27me3表达, 还可使全基因组范围内数百个位点发生EZH2过表达, 通过沉默Vash1基因促进肿瘤血管新生^[13]。最后, Zhang等^[14]发现EZH2表达与肿瘤级别正相关, 与预后负相关。鉴于上述情况, Aihara等^[8]对16例丘脑高级别胶质瘤进行了K27M-H3.3突变与预后相关性分析, 差异无统计学意义。但是, 由于该研究样本量较小, 且研究对象多仅接受活检, 因此预后分析结果可信度较低。而本文24例研究对象接受手术方式为部分或次全切除, 肿瘤体积均有效减少, 预后相关分析显示, 实验组与对照组生存期及PFS差异无统计学意义, 其原因可能是样本量过少, 尤其是胶质母细胞瘤仍缺乏足够数量。目前笔者正进行长期随访, 且进一步扩大样本量, 并将IDH1突变、MGMT甲基化状态等预后相关性因素列入检测范

畴。后续研究有望得到K27M-H3.3型突变与丘脑胶质瘤预后相关性的可靠数据。

综上所述, 本研究发现对各级别丘脑胶质瘤均存在H3F3A基因K27-H3.3型突变, 突变多发生于青少年患者, 且以胶质母细胞瘤突变率最高。此外, K27-H3.3型突变还可影响H3组蛋白第27位氨基酸三甲基化受阻, 造成H3K27me3蛋白表达显著减少。

参考文献

- 伍碧武, 张义. 丘脑胶质瘤的研究现状[J]. 中华神经外科杂志, 2013, 29(3): 319-321.
WU Biwu, ZHANG Yi. Research status of thalamic glioma[J]. Chinese Journal of Neurosurgery, 2013, 29(3): 319-321.
- 耿锋, 李安民, 张志文, 等. 超选择性颅内动脉灌注ACNU、VM-26治疗丘脑、脑干胶质瘤的临床疗效观察[J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(22): 15-16.
GENG Feng, LI Anmin, ZHANG Zhiwen, et al. Observation on the clinical effect of super selective intracranial artery perfusion ACNU and VM-26 for the treatment of hypothalamus and brainstem glioma[J]. Chinese Journal of Modern Drug Application, 2013, 7(22): 15-16.
- 包海山, 卜博, 林和浦, 等. 功能神经导航下丘脑胶质瘤的手术治疗[J]. 内蒙古医学杂志, 2013, 45(9): 1085-1086.
BAO Haishan, BU Bo, LIN Hepu, et al. Surgical treatment of hypothalamic glioma by functional neuronavigation[J]. Inner Mongolia Medical Journal, 2013, 45(9): 1085-1086.
- Committee of Brain Tumor Registry of Japan. Report of Brain Tumor Registry of Japan (1984-2000)[J]. Neuro Med Chir (Tokyo), 2009, 49(Suppl): PS1-PS96.
- Metzker ML. Sequencing technologies—the next generation[J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(1): 31-46.
- Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008, 9: 387-402.
- Goldberg AD, Banaszynski LA, Noh KM, et al. Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions[J]. Cell, 2010, 140(5): 678-691.
- Aihara K, Mukasa A, Gotoh K, et al. H3F3A K27M mutations in thalamic gliomas from young adult patients[J]. Neuro Oncol, 2014, 16(1): 140-146.
- Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma[J]. Nature, 2012, 482(7384): 226-231.
- Khuong-Quang DA, Buczkowicz P, Rakopoulos P, et al. K27M

- mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas[J]. *Acta Neuropathol*, 2012, 124(3): 439-447.
11. Venneti S, Garimella MT, Sullivan LM, et al. Evaluation of histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) and enhancer of Zest 2 (EZH2) in pediatric glial and glioneuronal tumors shows decreased H3K27me3 in H3F3A K27M mutant glioblastomas[J]. *Brain Pathol*, 2013, 23(5): 558-564.
 12. Bjerke L, Mackay A, Nandhabalan M, et al. Histone H3.3. mutations drive pediatric glioblastoma through upregulation of MYCN[J]. *Cancer Discov*, 2013, 3(5): 512-519.
 13. Lu C, Han HD, Mangala LS, et al. Regulation of tumor angiogenesis by EZH2[J]. *Cancer Cell*, 2010, 18(2): 185-197.
 14. Zhang J, Chen L, Han L, et al. EZH2 is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in glioblastoma[J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(2 Pt B): 929-936.

本文引用：邢乐成，张秀丽，周立兵. 丘脑多级别肿瘤 K27M-H3.3型突变对H3K27me3蛋白表达的影响及其与预后的相关性[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(1): 55-60. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.01.010

Cite this article as: XING Lecheng, ZHANG Xiuli, ZHOU Libing. Effects of K27M-H3.3 mutation on expression of H3K27me3 protein in thalamic glioma and its correlation with prognosis[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(1): 55-60. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.01.010