

胶质母细胞瘤相关分子标志物研究进展

刘梦昱¹, 谢 飞¹, 张 鑫¹, 赵鹏翔^{1,2*}

1.北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京 100124;

2.北京工业大学激光工程研究院, 北京 100124

摘 要: 胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 是中枢神经系统中最常见的原发性恶性肿瘤, 肿瘤患者预后差, 中位生存时间仅为 14 个月, 并且经过治疗后仍有极高的复发率。现今无法治愈 GBM 的重要原因之一是人们仍然缺乏对 GBM 耐药性在肿瘤生物学机制方面的理解。因此, 全面探究 GBM 相关分子标记物对于研究 GBM 是必不可少的。对近年来研究发现的 GBM 相关分子标志物进行了全面的介绍, 包括表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、异柠檬酸脱氢酶 1/2 (isocitrate dehydrogenase 1/2, IDH1/2)、1p19q 等以及影像学 and 免疫学相关分子标志物等, 这些分子标志物为胶质母细胞的准确分类和精准治疗提供了理论基础, 通过对以上标志物相关的肿瘤分子通路的探究, 有利于发展出更为有效的靶向治疗手段, 从而大幅提高 GBM 患者的生存时间。

关键词: 胶质母细胞瘤; 表皮生长因子受体; 异柠檬酸脱氢酶 1/2; 1p19q; 端粒酶反转录酶; 免疫关卡蛋白; microRNA; 影像学生物标志物

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2018.0118

Review of Biomarkers for Glioblastoma

LIU Mengyu¹, XIE Fei¹, ZHANG Xin¹, ZHAO Pengxiang^{1,2*}

1. College of Life Science and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China;

2. Beijing Engineering Researching Center of Laser Technology, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China

Abstract: As one of the common primary malignant tumor in central nerve system, glioblastoma (GBM) demonstrates poor prognosis with 14 months of median survival. Higher recurrence is one of the characters of GBM after treatment. The reason for absence of effective therapy of GBM is our poor understanding of tumor biology and mechanism of GBM. As a consequence, it is necessary that comprehensively understanding molecular markers of GBM to improve clinical outcome. This review introduced GBM markers such as EGFR, IDH1/2 and 1p19q as well as imaging biomarkers and immune checkpoints. Accurate classification of GBM and personalized treatment was developed based on these markers. Furthermore, the relevant cancer pathway gives a chance to develop the target treatment and improve the GBM patient survival.

Key words: glioblastoma; epidermal growth factor receptor; isocitrate dehydrogenase 1/2; 1p19q; telomerase reverse transcriptase; immune checkpoints; microRNA; imaging biomarkers

胶质瘤是一种由脑部或中枢神经系统的胶质细胞发展出来的原发性肿瘤, 约占脑部和中枢神经系统肿瘤总数的 30%^[1]。其恶性程度极高, 占有原发性恶性脑肿瘤的 80%^[2]。世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 按照形态和发病部位将胶质瘤分为星形细胞瘤、少突神经胶

质瘤、混合胶质瘤和室管膜瘤。WHO 根据肿瘤组织病理学特征 (如肿瘤细胞增殖能力、细胞核多形性、细胞结构和坏死程度) 以及恶性程度由低到高将胶质瘤分为 I、II、III、IV 四个等级。低等级胶质瘤, 即 I、II 级胶质瘤, 肿瘤细胞分化程度高, 肿瘤呈良性, 患者有较好的预后, 但是在治疗

收稿日期: 2018-11-13; 接受日期: 2018-12-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81602408); 北京市激光应用技术工程技术研究中心开放课题 (BG0046-2018-03); 北京工业大学 2018 日新人才项目支持经费 (015000514118003) 资助。

作者简介: 刘梦昱, 博士研究生, 主要从事脑胶质瘤治疗与分子机制研究。E-mail: mengyuliu@emails.bjut.edu.cn。* 通信作者: 赵鹏翔, 讲师, 硕士生导师, 主要从事炎症与分子肿瘤学研究。E-mail: zpx@bjut.edu.cn

后有极高的复发可能性,并随着时间延长能够演变为等级更高的恶性胶质瘤。高等级胶质瘤,即Ⅲ级和Ⅳ级胶质瘤,恶性程度高,具有肿瘤细胞分化程度低、病人预后差的特点。肿瘤组织学上认为,GBM 具有高度异质性,该特性体现在细胞的类型,如不同大小的未分化细胞、纤维形胶质细胞和多形性星形胶质细胞、有丝分裂的数目、细胞的分布密度以及血管生成情况和坏死程度等^[3]。不仅如此,GBM 瘤区还有可能包括非胶质细胞生成的肿瘤细胞。由于这些特性,GBM 被划为Ⅳ级胶质瘤,同时,这些特性也反映了 GBM 的高度恶性行为产生的原因。

肿瘤治疗中,手术切除被认为是最安全有效的治疗方法,但是由于胶质瘤的肿瘤细胞具有侵袭周围组织的特点,使得仅仅通过手术治愈胶质瘤并不可行。此外,胶质母细胞瘤对放化疗有很强的耐受性。因此,尽管经过了手术切除和常规治疗,GBM 患者的平均生存时间仍只有 12~15 个月^[4]。研发新的治疗手段帮助延长患者生存时间、改善生存质量成为目前胶质瘤治疗中最迫切的需要。因此,深入全面的了解肿瘤标志物对研究新的治疗 GBM 的方法具有重要意义。本文将对已发现的肿瘤标志物进行全面的综述,以期对胶质母细胞瘤的治疗研究提供参考。

1 胶质母细胞瘤诊断及预后相关标志物

1.1 O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶 (O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, MGMT)

GBM 中,许多基因的启动子特殊位点会发生甲基化,这一变化会直接导致基因表达水平的改变,如肿瘤抑制基因 p53、RB1 以及 pten 等^[5,6]。临床上,MGMT 启动子是 GBM 最重要的 DNA 甲基化标志物之一。近 40% 的原发性 GBM 患者样品中均能检测出 MGMT 基因的转录沉默。有研究报道,对 GBM 患者使用烷化剂化疗过程中,其 MGMT 启动子的甲基化水平可以作为一种预后标志物^[7,8]。

MGMT 基因位于 10q26 号染色体上,其编码的 DNA 修复蛋白能够将重要的 DNA 烷基化位点,即鸟嘌呤 O6 位置的烷基基团清除。当 DNA 修复消耗的 MGMT 蛋白得不到补充时,未得到修

复的 DNA 会受到损伤,如化疗诱导的鸟嘌呤 O6 的甲基化,会引起细胞毒性和凋亡^[8]。烷基化试剂,如替莫唑胺 (TMZ) 能够将烷基基团转移至 DNA 上,通常的转移位点为鸟嘌呤的 N7 或 O6 位置^[9],这一过程中,若没有 DNA 的损伤修复,便会直接导致 DNA 损伤,最终引起细胞死亡。MGMT 启动子的 CpG 岛位点若发生甲基化,该基因的表达将会受到抑制,这一结果可以加强 DNA 对烷基化试剂的敏感性。之前的研究表明,高达 45%~47% 的 GBM 具有 MGMT 甲基化的特征^[8,9]。对于进行烷基化试剂治疗的患者,其肿瘤组织 MGMT 基因甲基化水平与患者的无进展生存期以及整体生存时间有着重要联系^[10]。通过对相关肿瘤患者的组织样品进行分析,发现几乎只有 MGMT 启动子甲基化的胶质瘤患者会在化疗中得到一定的治疗效果^[8]。其中,对于初诊为 GBM 的患者,最主要的治疗手段是使用烷基化试剂进行化疗,其中 MGMT 甲基化水平较高的患者会产生更好的化疗效果,若肿瘤患者 MGMT 基因未发生甲基化,则该类患者预后较差,生存率较低。对于晚期 GBM 患者而言,相较放疗,MGMT 基因甲基化对 TMZ 治疗效果的影响更加显著,研究表明,TMZ 对 MGMT 甲基化的患者往往会产生更好的疗效^[4,11]。同时,GBM 患者的 MGMT 甲基化水平与肿瘤复发无关,患者自身 MGMT 基因甲基化水平也没有发生改变,因此,对于 MGMT 基因甲基化的 GBM 复发患者,再次使用 TMZ 治疗仍是一种明智的选择^[10]。这些结果也表明 MGMT 启动子的甲基化不仅在预测肿瘤预后上起着一定作用,甚至可以作为 GBM 的预后标志物。最近的研究也再次证实了在 IDH1/2 野生型和突变型的 GBM 中,MGMT 基因甲基化患者的化疗预后效果更佳^[12]。

目前在临床上,无论患者的甲基化水平高低,通常都会选择 TMZ 来进行治疗。对于早期 GBM 患者,MGMT 启动子甲基化作为重要的预测标志,对未来的治疗具有重要的指导意义^[8]。并且可以根据 MGMT 基因的甲基化水平,将患者进行更好的分类,以采取更合适的治疗手段。但是长久以来,对于非早期 GBM 患者,MGMT 甲基化水平是否仍然具有重要的参考价值是一个极具争议的话题。即便如此,MGMT 甲基化水平对于区分非早期 GBM 患者仍然是有意义的。

1.2 表皮生长因子受体(epidermal factor growth receptor, EGFR)

EGFR 由胞外受体结构域、跨膜区和胞内具有酪氨酸激酶功能的结构域组成,在细胞增殖、迁移和生存等相关通路中起着重要的作用。EGFR 活性可通过基因水平上调或它的变体 EGFRvIII 的缺失突变增强,后者能够保证缩短后的受体保持持续的活性,进而促进有丝分裂的级联反应^[13]。EGFR 的扩增出现在 40%~60% 的 GBM 中,其中只有很小的部分发生 EGFR 突变,产生变体 EGFRvIII^[14]。EGFR 基因扩增水平可以通过荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)技术检测,而突变体 EGFRvIII 的表达可以使用免疫组织化学检测。近年来,关于 EGFR 基因扩增和突变体 EGFRvIII 产生影响的相关研究报道结果不一,在 GBM 研究中存在着相互矛盾的研究结果^[7,15]。以 EGFR 作为靶标,在多种癌症的治疗中均被证明是有效的。如针对 EGFR 的药物单独或联合化疗用于结直肠癌、非小细胞肺癌和胰腺癌等^[16]。从这些结果来看,研究者认为在癌症治疗中,受体酪氨酸激酶抑制剂起到了重要的作用^[15]。EGFR 是第一个被认为与 GBM 的肿瘤发生相关的分子^[17]。虽然 EGFR 的过表达或突变是 GBM 最重要的特点之一,但是,以 EGFR 作为靶标的 GBM 临床试验中的结果却不尽如人意。临床效果不理想的原因可能是由于研究的药物无法穿过血脑屏障以及突变带来的抗药性等。

1.3 异柠檬酸脱氢酶 1/2(IDH1/2)

异柠檬酸脱氢酶是柠檬酸循环中的组成成分,作为关键的代谢酶类,能够催化异柠檬酸和 NAD⁺ 发生反应并转化为二氧化碳、NADP 和 α -酮戊二酸。在多种肿瘤中均能够鉴定出 IDH1/2 的突变。Stancheva^[18] 首次在 GBM 中发现 IDH1/2 突变后,随后的研究表明在所有的 GBM 中,近 8%~13% 发生了 IDH 突变,其中包括了高于 80% 的继发性 GBM 的 IDH 突变。最常见的突变为 IDH1 R132 和 IDH2 R172 位点,该类突变占有 IDH 突变的 90%,而在由低等级发展而来的 II 级或 III 级胶质瘤以及 GBM 中,前者突变占 IDH 突变的 70%^[19]。IDH 突变使 α -酮戊二酸转化为肿瘤代谢物 D-2-羟戊二酸,由于依赖 α -酮戊二酸的组蛋白和 DNA 脱甲基酶受到抑制,积累的 D-2-羟戊二酸导致了表观遗传的调节发生异常,从而阻

碍细胞分化^[20]。同时,该突变也会减少 NADPH 的形成,促进氧化应激从而导致 DNA 的损伤^[7]。但是也有研究显示,在胶质瘤中 IDH 突变会延长 12~30 个月的生存期,提高 TMZ 和放疗的敏感性^[21]。同时,有研究表明与野生型相比,突变的 IDH1 可以通过手术最大化切除区域,达到延长生存期的目的^[22]。现今, IDH 突变的检测手段包括测序和免疫组织化学方法。临床前期研究证实 IDH 突变的小分子抑制剂能够降低细胞内 D-2-羟戊二酸的水平,调整表观遗传调节异常并促进细胞分化^[23]。抑制 IDH 突变显示其在血液肿瘤中作为治疗手段的可能性,并在实体瘤和胶质瘤中得到进一步研究。IDH 突变抑制剂作为单独药剂使用或联合其他治疗手段应用于肿瘤治疗中,在针对其他致癌通路的治疗中,也有一定的临床应用前景。

1.4 1p19q 共同缺失

染色体 1 断臂和染色体 19 长臂的缺失导致其整个染色体臂着丝粒的移位,被定义为 1p19q 共同缺失。在 GBM 研究中, Cairncross 等^[24] 首次在少突神经胶质瘤患者中发现 1p19q 共同缺失,并证明检测 1p19q 基因水平可以在临床上起到一定的疾病预测功能。2016 年 WHO 标准中, 1p19q 共同缺失与 IDH 突变共同出现的胶质瘤被定义为少突胶质瘤。大约 60%~80% 的 II 级或 III 级少突神经胶质瘤和 20%~50% 的 II 级或 III 级少突星形胶质瘤,以及低于 10% 的弥漫型胶质瘤中会出现 1p19q 共同缺失的情况^[25]。对于少突神经胶质瘤,如出现 1p19q 共同缺失,那么会有较好的生存率、化疗(甲基苄肼、环己亚硝脒和长春新碱联合化疗以及替莫唑胺)和放疗效果^[26],这种对于治疗手段敏感性的原因尚待研究。在 GBM 中, 1p19q 共同缺失的相关研究结果并不一致。Boots-Sprenger 等^[27] 的研究中弥漫性胶质瘤包括 GBM 患者的 1p19q 共同缺失、MGMT 启动子甲基化和 IDH 突变预示了更好的预后,但其中仍有 10 位病人的组织病理学结果表明 1p19q 共同缺失与此无关。而 Zhao 等^[28] 运用 Meta 方法分析了 28 篇研究中 3 408 个胶质瘤样品结果,他们提出 1p19q 共同缺失与生存期的延长有关,而与组织学分级无关。1p19q 共同缺失的检测方法包括微卫星序列分析、PCR 和基因组杂交技术等,其中 FISH 法最为常用。

1.5 α -地中海贫血伴智力低下综合征基因(α -X linked alpha thalassaemia/mental retardation, ATRX)

ATRX 基因首次在 X 染色体连锁精神发育迟滞综合征病人中被发现,该基因编码的蛋白参与遗传稳定、染色体重塑和 DNA 甲基化等过程^[29]。ATRX 基因失活与端粒替代延长(ALT)机制密切相关。在真核生物中,端粒是染色体末端的 DNA 重复序列,维持着染色体的完整性。ALT 作为一种调控端粒长度的机制对细胞的生存和增殖至关重要。近年来,ALT 在胶质瘤的生物活动中的作用才被发现。突变的 ATRX 基因经常伴随着 IDH 突变,但几乎不与 1p19q 共同缺失同时出现。生存曲线分析表明,ATRX 缺失的星形胶质瘤患者作为 IDH 突变中的一个子群,伴有更好的预后^[30]。Koschmann 等^[31]研究表明,ATRX 缺陷小鼠的 GBM 模型中,ATRX 突变会导致肿瘤基因不稳定,在没有任何治疗的情况下,肿瘤具有更高的侵袭性。但是,对小鼠的双链 DNA 损伤进行修复,与对照组相比,治疗后的小鼠生存期得到延长。ATRX 表达缺失通常使用免疫组织化学方法检测,其他检测方法还包括 PCR、测序和蛋白免疫印迹^[14]。

1.6 端粒酶反转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)

染色体末端的端粒重复序列产生的帽子结构由几百个核酸组成,当缺少端粒酶活性时,端粒会随着每一次细胞分裂过程被缩短^[32],随着细胞的不断分裂,端粒被逐渐消耗,最终导致细胞的休眠或死亡。端粒不仅对细胞的生存十分重要,与肿瘤的生成也密不可分。癌症的标志之一就是端粒维持的调控异常,而这一过程正是由端粒酶调控的。90%的晚期恶性肿瘤中,都能检测到端粒酶的活性。TERT 是端粒酶的一个催化亚基,能够将额外的 DNA 序列插入至端粒中^[32]。TERT 的表达与多种肿瘤相关。在 IV 级星形胶质瘤中,TERT 启动子突变活化的情况经常被报道。突变的 TERT 与 1p19q 共同缺失密切相关,而与 IDH 突变或 ATRX 无明显关联^[32]。Killela 等^[32]在多种类型的胶质瘤中开展了 IDH1/2 突变与 TERT 突变的相关性研究。结果表明,在 GBM 中,没有 IDH1/2 突变的情况下,TERT 突变预示着更低的

整体生存率。此外,Simon 等^[33]和 Labussiere 等^[34]的研究也表明 TERT 突变可以作为一种独立的预后讯号,在原发性 GBM 中预示着较差的预后。Eckel 等^[35]基于 IDH、1p19q 和 TERT 的水平进行各组比较得出结论,在出现 IDH 突变和 1p19q 共同缺失的胶质瘤中,TERT 突变预示着相对较好的治疗结果,但是在只有 IDH 突变而没有 1p19q 共同缺失的 GBM 中,TERT 突变却预示了较低的生存率。如今,TERT 突变水平可通过甲基化特异性 PCR 检测,此外,也有研究报道通过术中快速测试的方法检测 TERT 突变^[36]。

1.7 MicroRNA

MicroRNA 是一类长度约为 20~25 个核酸的非编码 RNA 片段,通过结合 mRNA 引起 mRNA 的降解并最终抑制蛋白质的合成。研究认为 microRNA 与多种癌症的起始和发展有关,因而 microRNA 具有巨大的潜力成为一种诊断和治疗工具。如今,已经有超过 1 500 种人类 microRNA 被鉴定出来,其中许多 microRNA 的表达水平在多种癌症中均检测到不同程度的上调或下调。研究表明一些 microRNA 与 GBM 的发生、发展密切相关,可以作为一种预后标志物^[37]应用在临床治疗或诊断中。同时,通过检测得到的 microRNA 表达水平也能够帮助人们将 GBM 更准确地分类。此外,瘤内或微循环中的 microRNA 也可以作为 GBM 检测、诊断、使用药物如替莫唑胺治疗或放疗的预后或预测标志物。

针对 GBM 分类,Henriksen 等^[37]通过对应临床数据与 161 个 microRNA 进行分析,根据结果将 GBM 患者分为两类,分别对应长期和短期生存期。另外,Kim 等^[38]根据癌症基因图谱(TCGA)中胶质瘤相关的 261 个 microRNA 表达水平的分析结果,鉴定出临床上截然不同的 5 组 GBM 亚群,每组亚群分别对应不同的神经前体细胞,这些细胞亚型包括放射状胶质细胞、少突胶质或神经元前体细胞、神经元前体细胞、星形胶质细胞前体和神经间质细胞前体。同时,Li 等^[39]使用基因芯片和非负矩阵分解法分析了 TCGA 中 RNASeqV2 数据,其中包含了 169 个 GBM 样品和 5 个对照组样品数据。不仅如此,其他研究中通过 microRNA 帮助肿瘤分类的作用也得到了验证。由于在组织学上难以分辨,一些研究者也致力于通过 microRNA 表达特征区分原发性与继发性 GBM。

通过对比原发性和继发性 GBM 样品, Rao 等^[40]筛选出 7 个 microRNA 来帮助鉴定不同类型的 GBM。

根据 microRNA 表达差异可以帮助 GBM 分类,不仅如此,随着近年来对 microRNA 在 GBM 中表达水平的深入研究,鉴定出了一些能够对患者的预后进行一定程度上预测的 microRNA。Srinivasan 等^[41]通过对 TCGA 数据与对应的 222 位 GBM 患者生存期的 microRNA 表达水平进行比对,鉴定出一组 microRNA,包括的 10 个 microRNA 被认为具有帮助预测 GBM 患者生存期的作用。其中 7 种 microRNA (包括 miR-31、miR-146b、miR-148a、miR-193a、miR-200b、miR-221 和 miR-222) 在生存期较短的患者中处于过表达水平,另外 3 个 microRNA (包括 miR-17-5p、miR-20a 和 miR-106a) 的表达水平则较低。另外,也有一些相互矛盾的研究结果。Guan 等^[42]研究表明 miR-196a 和 miR-196b 的表达与较短的生存期有关,而 Lakomy^[43]的研究却认为 miR-196b 与较长的生存期呈正相关关系。除此之外,其他研究报道了处于高表达水平的 miR-326 和 miR-130a,低水平表达的 miR-323、miR-329、miR-155 和 miR-210,与更长的 GBM 患者生存期密切相关。

治疗 GBM 的传统手段仍为放化疗后进行手术切除,但收效甚微。而 GBM 耐药性的机制在分子水平上也仍需更深入地研究。近年来,许多研究通过不同的治疗效果与 microRNA 表达差异相对应进行比较分析,这一方法为发展更好的预测疗效和针对性治疗带来了新的思路。许多研究检测了药物处理后 GBM 样品中的 microRNA 水平,为进一步的分析提供了数据基础。例如有研究检测了 60 位经过放疗和替莫唑胺治疗的 GBM 患者的 miR-125b 的表达,发现患者中高水平表达的 miR-125b 的中位生存时间仅为 9 个月,而低水平表达 miR-125b 的患者生存时间为 18 个月^[44]。同时,Zhang 等^[45]对有无替莫唑胺治疗的 GBM 患者的 microRNA 表达水平进行比较,鉴定得到一组包含 5 种 microRNA 的特性指标,该指标能够预测病人的生存期和替莫唑胺治疗的效果。类似地,有研究根据 9 种 microRNA 表达特征建立了一种风险指数分析方法,对使用替莫唑胺治疗的 GBM 患者也能起到一定的疗效预测作用^[46]。

大量研究表明 microRNA 在未来能够作为重

要的诊断和预后标志物,但是如今 microRNA 作为标志物并不能为临床治疗决策提供充分的分析依据。随着对 microRNA 在 GBM 的发生发展中的影响以及不同的 microRNA 表达特性的更深入研究,能够促进人们对 GBM 进行更完善更准确的分类,并对疾病的发展模式进行更深入的理解,最终使患者的生存期得到延长,生存条件得到改善。

1.8 免疫相关标志物

除了在细胞信号通路和蛋白质中发生突变,GBM 肿瘤发展恶化的另一部分原因是其能够逃脱免疫系统的监控。通过表达免疫抑制细胞因子和强化调节 T 细胞的活性,GBM 形成了一套抑制免疫应答机制。这种免疫被抑制的微环境中,两种重要的免疫关卡蛋白细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4 (CTLA-4) 和程序性细胞死亡蛋白 (PD-1) 起着重要的作用^[47]。CTLA-4 仅在常规 T 细胞中上调表达,通过与协同刺激分子 CD28 竞争,CTLA-4 与 B7 配体相结合,进而负调控早期处于活化状态的 T 淋巴细胞。而 PD-1 在多种细胞中均能表达,包括 B 细胞、自然杀伤细胞、树突细胞、处于活化状态的单核细胞、巨噬细胞以及 T 细胞。同时,PD-1 在免疫应答的多个阶段中起到了调节作用,从而改变外周组织中 T 淋巴细胞的活性^[48]。TCGA 数据表明 PD-1 的配体 PD-L1 和 CTLA-4 的 mRNA 在 GBM 中大量表达,这一结果也反映了这些免疫关卡蛋白和 GBM 恶性程度的相关性^[49]。但是,在 GBM 中这些免疫关卡与预后是否相关仍存有争议。Bergho 等^[50]研究了 117 例 GBM 患者的样品,并没有发现 PD-L1 与病人生存期具有相关性。同时,Liu 等^[51]研究显示 PD-L1 对 GBM 患者生存期具有正面和负面的不同影响,产生两种截然相反的结果归因于胶质瘤亚群的不同以及 PD-L1 调控分子表达水平的差异等,其中最重要的决定因素为肿瘤微环境中表达 PD-L1 的细胞类型。而近期大量临床研究表明在多数 GBM 样品中,PD-1 以及 PD-L1 均可以通过免疫组织化学方法检测出来,PD-L1 基因的表达水平也与 GBM 亚型密切相关。最近的研究显示 PD-L1 在一小部分 GBM 患者中过表达,而高水平表达的 PD-L1 与较差的预后结果具有一定相关性^[52]。

免疫关卡抑制剂成功应用在黑色素瘤、脑转移瘤、肺癌和肾脏肿瘤的治疗,为这些抑制剂能够

成功应用于胶质瘤临床治疗带来了希望。多种针对 GBM 及复发的低等级胶质瘤的免疫关卡抑制剂的临床实验正在进行中。这些研究将会验证这种方法对胶质瘤是否有效。目前,树突细胞疫苗的三期临床实验数据显示,对 CTLA-4 表达进行监控也许能够预测 GBM 患者的生存期,同时表明 CTLA-4 可能成为一种新的治疗预后生物标志物^[53]。然而这些研究结果表明在 GBM 的免疫治疗发展中,复杂的肿瘤微环境仍是一个极大的挑战,针对不同 CTLA-4、PD-1 和 PD-L1 水平的患者进行鉴定分类也将在 GBM 临床中为制定重要的治疗决策提供依据。

1.9 影像学相关标志物

组织学、蛋白组学以及下一代测序技术作为 GBM 诊断和预后的参考标准不断受到挑战,并且由于肿瘤侵袭性和样品抽样的偏差,这些方法并不能更好的分析瘤内和瘤外的异质性特征。因此,不同于传统方法,近年来逐渐应用于治疗性干预后肿瘤情况监测的影像学相关标志物,极大地改善了病人的个性化管理。虽然当下 GBM 影像学相关标志物应用于临床的条件还不充分,但是近年来先进的影像学技术包括弥散加权磁共振成像(DW-MRI)、动态磁敏感对比增强灌注加权成像、频谱成像(MRS)和电子成像术(PET)在鉴定不同的 GBM 肿瘤表型方面显示出巨大的潜力。已有研究认为针对 GBM 独特的生物学特性,将基因组学和影像学数据相结合进行分析,或许能够提高早期诊断的正确率并制定更合适的治疗手段。有报道应用 MRS 对 2-羟戊二酸(2-HG)水平进行评估,结果表明在发生 IDH 突变的胶质瘤中,检测到了 2-HG 表达水平上调,将两种检测结果相对应,通过更深入的研究,能够为未来的肿瘤诊断和预后提供更多的数据支持^[54]。同时,研究证明众多的 GBM 相关核磁共振(MRI)参数指标,如降低的表观扩散系数(ADC)和升高的相对脑血容量(rCBV)等,能够预测体内 EGFR 表达水平增强,对肿瘤的发展进行一定程度的评估^[55]。在低等级胶质瘤中,rCBV 检测水平已经可以作为一个有效的预测指标应用于肿瘤恶性程度、无病进展生存期和肿瘤复发等情况的评估。

除了 MRI,许多 PET 放射性示踪剂也被作为潜在的影像学生物标志物,促进人们更加深入的了解脑部肿瘤的病理学特征。现今,虽然 18F-

FDG 是 PET 最常使用的放射性示踪剂,但是由于与其他组织相比,脑部具有较高的葡萄糖摄取量,导致低等级肿瘤、肿瘤组织较小或复发肿瘤早期的 18F-FDG 无法被检测,使得在 GBM 的影像学中 18F-FDG 的应用十分有限。因此,近年来其他的 PET 配体应用于影像学检测中,如放射性标记氨基酸及其芳香族类似物,这类标记物能够克服 18F-FDG 的局限性,它们的 PET 影像学结果中,肿瘤组织与背景对比更强,易被观察。PET 氨基酸示踪剂得到广泛关注的重要原因是它们能够通过氨基酸转运穿过血脑屏障进入脑部,得到从低等级到高等级的胶质瘤可视化影像。同时,Kim 等^[56]的研究证明了在临床上,PET 氨基酸示踪剂¹¹C-蛋氨酸(C-MET)的摄入与胶质瘤患者较短的生存期密切相关,表明了该示踪剂可以帮助预测患者的预后情况。Pauleit 等^[57]发现另一个 PET 示踪剂¹⁸F-FRT 在肿瘤的非增强区域摄取升高,因而不适用于肿瘤的影像学检测。虽然如今许多研究表明分子成像标志物在评估治疗效果和生存曲线中具有一定的发展前景,但是若想真正将影像学分析应用于临床,仍然需要更加深入的研究,将全面的基因组数据与影像学结果整合分析,不仅能够帮助研究者更好地理解 GBM 在遗传学、代谢组学或表观遗传学等方面的异质性,同时为鉴定出更加准确的预测生物标志物创造了可能。

2 治疗靶点相关研究进展

2.1 酸性神经酰胺酶

酸性神经酰胺酶(ASAH1)首次发现于大鼠脑组织匀浆中,随后从人体尿液中被分离纯化出来。ASAH1 是一种溶酶体半胱氨酸酰胺酶,通过催化作用将神经酰胺转化为鞘氨醇和游离脂肪酸。之后,鞘氨醇被鞘氨醇激酶 1(SPHK1)或 2(SPHK2)磷酸化生成鞘氨醇磷酸酯(S1P),该物质通过上调尿激酶纤溶酶原激活物及其受体和侵袭促进分子 CEN1(富含半胱氨酸血管生成蛋白 61)促使 GBM 侵袭周围组织^[58]。另一方面,神经酰胺合成酶生成大量携带有 14~26 碳脂肪酸侧链的神经酰胺,伴随着放化疗后体内释放的细胞色素 C 活化 Caspase-9 和 Caspase-3,促进细胞的凋亡。由于 ASAH1 的多种产物与细胞增殖调控

相关,许多 ASAH1 与不同癌症的相关研究被陆续报道。研究表明 ASAH1 在 AML 中能够作为一种新型的药物作用靶点进行进一步探究^[59]。而在前列腺癌中过表达 ASAH1 却会引起化疗的耐药性。研究认为放疗后前列腺癌中上调的 ASAH1 表达水平能够帮助肿瘤细胞在辐射后继续存活^[60]。因此,当 ASAH1 的活性被其抑制剂 B13 抑制后,细胞会对放、化疗更加敏感并通过不断积累胞内神经酰胺至细胞毒素水平最终诱导凋亡^[61]。ASAH1 的另一个抑制剂 Ceranib-2 同样能够通过抑制乳腺癌细胞系 MCF-7 和 MDA MB-231 的细胞生长产生相似的作用^[62]。最近发现了一种新型 ASAH1 抑制剂卡莫氟,用该抑制剂处理宫颈癌细胞,抑制了肿瘤细胞的增殖水平和代谢。其中,Wnt/ β -catenin 信号通路起到了重要的调控作用^[63]。临床上也尝试使用卡莫氟帮助治疗,有研究报道乳腺癌早期患者使用卡莫氟作为一种术后佐剂能够起到一定的作用^[64]。

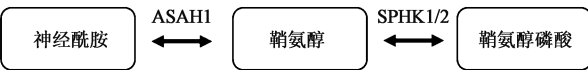


图1 鞘脂类信号通路示意图

Fig.1 A schematic diagram of the sphingolipid signaling pathway.

随着对 GBM 的研究,鞘脂类代谢在 GBM 的作用逐渐被人们了解。研究表明,S1P 促进了 GBM 细胞系 U87MG 的迁移,与正常脑灰质组织相比,GBM 组织中的 S1P 水平显著升高^[65]。同时也有研究证实了 ASAH1 水平与 GBM 的生存期呈负相关^[66]。另外,为了研究 ASAH1 在 GBM 放疗抗性中的作用,人们发明了一种稳定的 GBM 放疗抗性研究模型,即通过辐射 U87 GBM 细胞筛选出存活的细胞并留存进行研究。在该模型中,成人 GBM 细胞系 U87 和小儿 GBM 细胞系 SJGBM2 的细胞内 ASAH1 水平以及它的胞外代谢分泌物水平同时上调,表明 ASAH1 加重了 GBM 的放疗抗性。GBM 患者的免疫组化结果显示,在放疗后的组织中具有更高的 ASAH1 水平。这些研究表明通过增加 GBM 肿瘤细胞化疗抗性,提高促进细胞存活的 S1P 分子水平,ASAH1 可能带来减少 GBM 生存期以及促进复发的结果。但是,不论这些细胞的化疗抗性如何,其对 ASAH1

抑制剂卡莫氟仍具有一定的敏感性^[67,68]。在 U87 细胞以及前列腺癌异种移植实验中同时使用常规放疗和 ASAH1 抑制剂,能够明显抑制肿瘤细胞的增殖,在此基础上,研究认为 ASAH1 抑制剂可以作为放射致敏剂应用于临床^[61,69]。临床上,ASAH1 抑制剂卡莫氟已被应用于治疗直肠癌患者^[70]。但是,在广泛应用卡莫氟前,仍有很多问题需要解决。如卡莫氟在水中的溶解度极低,这一特性使其难以应用于静脉注射,同时卡莫氟透过血脑屏障的程度仍不明确。最新解析的酸性酰胺酶晶体结构为提高卡莫氟溶解性提供了一种新思路,该技术可以帮助预测卡莫氟活性位点,并通过修饰使其溶解性增大从而产生更好的疗效^[71]。另一种可能的解决方法是诱导免疫系统产生自身抗体抵抗胞外的 ASAH1 分泌物,从而抑制 ASAH1 代谢物产生的放疗抗性,同时也能够缓解 GBM 放疗抗性引起的肿瘤细胞的增殖和浸润。ASAH1 的自身抗体的进一步研究为 GBM 的治疗带来了更多的可能性。

2.2 BRAF 突变

最常见的 BRAF 基因的热点密码子错义突变为 V600E 出现在多种神经上皮肿瘤中,包括多形性星形胶质细胞瘤、三分之一的神经节胶质瘤以及偶发性纤维状星形胶质瘤。近 5% 的 GBM 患者中能够检测到 BRAF V600E 突变^[72]。已有研究报道 GBM 中高频发生的 BRAF 突变常伴有上皮样细胞分化的组织学特征,如上皮样 GBM。2016 年 WHO 首次将上皮样 GBM 单独归类^[73],该类患者通常为儿童或青少年,其中 BRAF V600E 发生突变的患者超过 50%^[74]。索拉菲尼是一种多重激酶抑制剂,作用靶点包括 BRAF、VEGFR、PDGFR 和受体络氨酸激酶,最近有研究表明,使用 BRAF 抑制剂维莫非尼治疗后,小儿 GBM 患者的 BRAF V600E 突变能够得到回复^[75]。在黑色素瘤、非小细胞肺癌和甲状腺癌中已能靶向治疗 BRAF V600E 突变。因此,对 BRAF 突变进行分子检测或 DNA 测序以及使用 BRAF V600E 特异性抗体进行免疫组织化学检测等方法,也许能够发现一个针对一部分 GBM 患者的潜在治疗靶点。

3 展望

近年来,GBM 中研究发现的基因和分子通路

上的异常为建立可行的临床相关分子标志物提供了生物学基础,并为发展新的治疗手段提出了需求。对 GBM 在分子水平上分类的研究过程为发展出更有效的靶标治疗手段提供了重要的理论基础。许多临床相关分子标志物已经得到了深入的研究,并在胶质瘤患者的临床治疗判断标准中起到重要作用。如今,GBM 患者(特别是晚期患者)的 MGMT 启动子甲基化水平以及少突神经胶质瘤患者的 1p19q 共同缺失和 IDH1/2 突变水平,在肿瘤诊断或临床治疗中都扮演着重要角色^[7,9,26,37]。与此同时,包括基因学、表观遗传学和转录组学以及近年来发展较快的影像学的多平台分析为脑瘤的分类及预测病人预后提供了有效的分析研究手段。最近关于小儿 GBM 的研究表明该类肿瘤通常由组蛋白 H3.3 表观遗传变化诱导,除成人 IDH1/2 突变和 IDH1/2 野生型 GBM,小儿 GBM 可能代表了第三大类的 GBM。分子水平上的深入研究,为分子检测的进一步优化提供了可能,并服务于临床。这些技术有望被标准化和被更广泛的应用,并成为更有价值的技术手段。在不久的将来,分子诊断作为补充手段填补到如今以组织学为基础的脑部肿瘤诊断中,使基于生物学的肿瘤基础研究与针对肿瘤患者的治疗相结合,在分子水平上重新定义患者,使患者得到更精准匹配的治疗。在未来,分子水平上的研究理论得到实质上的进步后,将使治愈 GBM 成为可能。

参 考 文 献

- [1] Davis M E. Epidemiology and Overview of Gliomas[C]. WB Saunders; Seminars in Oncology Nursing, 2018.
- [2] Ostrom Q T, Gittleman H, Stetson L, *et al.* Epidemiology of Intracranial Gliomas[M]. Karger Publishers, 2018, 1-11.
- [3] Burger P C, Green S B. Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme[J]. Cancer, 1987, 59(9): 1617-1625.
- [4] Saito T, Sugiyama K, Takeshima Y, *et al.* Prognostic implications of the subcellular localization of survivin in glioblastomas treated with radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide[J]. J. Neuro., 2018, 128(3): 679-684.
- [5] Amatya V J, Naumann U, Weller M, *et al.* TP53 promoter methylation in human gliomas[J]. Acta Neuropathol., 2005, 110(2): 178-184.
- [6] Baeza N, Weller M, Yonekawa Y, *et al.* PTEN methylation and expression in glioblastomas[J]. Acta Neuropathol., 2003, 106(5): 479-485.
- [7] Karsy M, Neil J A, Guan J, *et al.* A practical review of prognostic correlations of molecular biomarkers in glioblastoma[J]. Neuro. Focus, 2015, 38(3): E4.
- [8] Hegi M E, Diserens A C, Gorlia T, *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma[J]. New England J. Med., 2005, 352(10): 997-1003.
- [9] Gorlia T, van den Bent M J, Hegi M E, *et al.* Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: Prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE. 3[J]. Lancet Oncol., 2008, 9(1): 29-38.
- [10] Weller M, Tabatabai G, Kästner B, *et al.* MGMT promoter methylation is a strong prognostic biomarker for benefit from dose-intensified temozolomide rechallenge in progressive glioblastoma: The DIRECTOR trial[J]. Clin. Cancer Res., 2015, 21(9): 2057-2064.
- [11] Zarnett O J, Sahgal A, Gosio J, *et al.* Treatment of elderly patients with glioblastoma: A systematic evidence-based analysis[J]. JAMA Neurol., 2015, 72(5): 589-596.
- [12] Wick W, Meisner C, Hentschel B, *et al.* Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation[J]. Neurology, 2013, 81(17): 1515-1522.
- [13] Herbst R S. Review of epidermal growth factor receptor biology[J]. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 2004, 59(2): S21-S26.
- [14] Bush N A O, Butowski N. The effect of molecular diagnostics on the treatment of glioma[J]. Curr. Oncol. Rep., 2017, 19(4): 26-35.
- [15] Reardon D A, Wen P Y, Mellinghoff I K. Targeted molecular therapies against epidermal growth factor receptor: Past experiences and challenges[J]. Neuro. Oncol., 2014, 16(8): 7-13.
- [16] Westphal M, Maire C L, Lamszus K. EGFR as a target for glioblastoma treatment: An unfulfilled promise[J]. CNS Drugs, 2017, 31(9): 723-735.
- [17] Downward J, Yarden Y, Mayes E, *et al.* Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences[J]. Nature, 1984, 307(5951): 521-527.
- [18] Stancheva G, Goranova T, Laleva M, *et al.* IDH1/IDH2 but not TP53 mutations predict prognosis in Bulgarian glioblastoma patients[J]. Biol. Med. Res. Int., 2014, doi: 10.1155/2014/654727.
- [19] Yan H, Parsons D W, Jin G, *et al.* IDH1 and IDH2 mutations in gliomas[J]. New England J. Med., 2009, 360(8): 765-773.
- [20] Dang L, Yen K, Attar E C. IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics[J]. Ann. Oncol., 2016, 27(4): 599-608.
- [21] Leu S, von Felten S, Frank S, *et al.* IDH/MGMT-driven molecular classification of low-grade glioma is a strong predictor for long-term survival[J]. Neuro. Oncol., 2013, 15(4): 469-479.
- [22] Beiko J, Suki D, Hess K R, *et al.* IDH1 mutant malignant astrocytomas are more amenable to surgical resection and have a survival benefit associated with maximal surgical resection[J]. Neuro. Oncol., 2013, 16(1): 81-91.

- [23] Dang L, Yen K, Attar E C. IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics [J]. *Ann. Oncol.*, 2016, 27(4): 599–608.
- [24] Louis D N, Holland E C, Cairncross J G. Glioma classification: A molecular reappraisal [J]. *Am. J. Pathol.*, 2001, 159(3): 779–786.
- [25] Riemenschneider M J, Jeuken J W M, Wesseling P, *et al.* Molecular diagnostics of gliomas: State of the art [J]. *Acta Neuropathol.*, 2010, 120(5): 567–584.
- [26] Smith J S, Perry A, Borell T J, *et al.* Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas [J]. *J. Clin. Oncol.*, 2000, 18(3): 636–636.
- [27] Boots-Sprenger S H E, Sijben A, Rijntjes J, *et al.* Significance of complete 1p/19q co-deletion, IDH1 mutation and MGMT promoter methylation in gliomas: Use with caution [J]. *Modern Pathol.*, 2013, 26(7): 922.
- [28] Zhao J, Ma W, Zhao H. Loss of heterozygosity 1p/19q and survival in glioma: A meta-analysis [J]. *Neuro. Oncol.*, 2013, 16(1): 103–112.
- [29] Nandakumar P, Mansouri A, Das S. The role of ATRX in glioma biology [J]. *Front. Oncol.*, 2017, 7: 236.
- [30] Wiestler B, Capper D, Holland-Letz T, *et al.* ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis [J]. *Acta Neuropathol.*, 2013, 126(3): 443–451.
- [31] Koschmann C, Calinescu A A, Nunez F J, *et al.* ATRX loss promotes tumor growth and impairs nonhomologous end joining DNA repair in glioma [J]. *Sci. Transl. Med.*, 2016, 8(328): 32828–32828.
- [32] Killela P J, Reitman Z J, Jiao Y, *et al.* TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, 110(15): 6021–6026.
- [33] Simon M, Hosen I, Gousias K, *et al.* TERT promoter mutations: A novel independent prognostic factor in primary glioblastomas [J]. *Neuro. Oncol.*, 2014, 17(1): 45–52.
- [34] Labussière M, Boisselier B, Mokhtari K, *et al.* Combined analysis of TERT, EGFR, and IDH status defines distinct prognostic glioblastoma classes [J]. *Neurology*, 2014, 83(13): 1200–1206.
- [35] Eckel-Passow J E, Lachance D H, Molinaro A M, *et al.* Glioma groups based on 1p/19q, IDH, and TERT promoter mutations in tumors [J]. *New England J. Med.*, 2015, 372(26): 2499–2508.
- [36] Shankar G M, Francis J M, Rinne M L, *et al.* Rapid intraoperative molecular characterization of glioma [J]. *JAMA Oncol.*, 2015, 1(5): 662–667.
- [37] Henriksen M, Johnsen K B, Olesen P, *et al.* MicroRNA expression signatures and their correlation with clinicopathological features in glioblastoma multiforme [J]. *Neuromol. Med.*, 2014, 16(3): 565–577.
- [38] Kim T M, Huang W, Park R, *et al.* A developmental taxonomy of glioblastoma defined and maintained by MicroRNAs [J]. *Cancer Res.*, 2011, 71(9): 3387–3399.
- [39] Li Y, Min W, Li M, *et al.* Identification of hub genes and regulatory factors of glioblastoma multiforme subgroups by RNA-seq data analysis [J]. *Int. J. Mol. Med.*, 2016, 38(4): 1170–1178.
- [40] Rao S A M, Santosh V, Somasundaram K. Genome-wide expression profiling identifies deregulated miRNAs in malignant astrocytoma [J]. *Modern Pathol.*, 2010, 23(10): 1404.
- [41] Srinivasan S, Patric I R P, Somasundaram K. A ten-microRNA expression signature predicts survival in glioblastoma [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(3): e17438.
- [42] Guan Y, Mizoguchi M, Yoshimoto K, *et al.* MiRNA-196 is upregulated in glioblastoma but not in anaplastic astrocytoma and has prognostic significance [J]. *Clin. Cancer Res.*, 2010, 16(16): 4289–4297.
- [43] Lakomy R, Sana J, Hankeova S, *et al.* MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients [J]. *Cancer Sci.*, 2011, 102(12): 2186–2190.
- [44] Haemmig S, Baumgartner U, Glück A, *et al.* miR-125b controls apoptosis and temozolomide resistance by targeting TNFAIP3 and NKIRAS2 in glioblastomas [J]. *Cell Death Disease*, 2014, 5(6): e1279.
- [45] Zhang W, Zhang J, Yan W, *et al.* Whole-genome microRNA expression profiling identifies a 5-microRNA signature as a prognostic biomarker in Chinese patients with primary glioblastoma multiforme [J]. *Cancer*, 2013, 119(4): 814–824.
- [46] Hayes J, Thygesen H, Tumilson C, *et al.* Prediction of clinical outcome in glioblastoma using a biologically relevant nine-microRNA signature [J]. *Mol. Oncol.*, 2015, 9(3): 704–714.
- [47] Liebelt B D, Shingu T, Zhou X, *et al.* Glioma stem cells: Signaling, microenvironment, and therapy [J]. *Stem Cells Int.*, 2016, doi: 10.1155/2016/7849890.
- [48] Bloch O, Crane C A, Kaur R, *et al.* Gliomas promote immunosuppression through induction of B7-H1 expression in tumor-associated macrophages [J]. *Clin. Cancer Res.*, 2013, 19(12): 3165–3175.
- [49] Doucette T, Rao G, Rao A, *et al.* Immune heterogeneity of glioblastoma subtypes: Extrapolation from the cancer genome atlas [J]. *Cancer Immunol. Res.*, 2013, 1(2): 112–122.
- [50] Simonelli M, Persico P, Perrino M, *et al.* Checkpoint inhibitors as treatment for malignant gliomas: “A long way to the top” [J]. *Cancer Treat. Rev.*, 2018, doi: 10.1016/j.ctrv.2018.06.016.
- [51] Liu Y, Carlsson R, Ambjørn M, *et al.* PD-L1 expression by neurons nearby tumors indicates better prognosis in glioblastoma patients [J]. *J. Neurosci.*, 2013, 33(35): 14231–14245.
- [52] Nduom E K, Wei J, Yaghi N K, *et al.* PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma [J]. *Neuro. oncol.*, 2015, 18(2): 195–205.
- [53] Tanaka S, Louis D N, Curry W T, *et al.* Diagnostic and therapeutic avenues for glioblastoma: No longer a dead end? [J]. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2013, 10(1): 14.
- [54] Choi C, Ganji S K, DeBerardinis R J, *et al.* 2-

- hydroxyglutarate detection by magnetic resonance spectroscopy in IDH-mutated patients with gliomas [J]. *Nat. Med.*, 2012, 18(4): 624.
- [55] Szopa W, Burley T A, Kramer-Marek G, *et al.* Diagnostic and therapeutic biomarkers in glioblastoma: Current status and future perspectives [J]. *Biol. Med. Res. Int.*, 2017, doi: 10.1155/2017/8013575.
- [56] Caroli P, Nanni C, Rubello D, *et al.* Non-FDG PET in the practice of oncology [J]. *Indian J. Cancer*, 2010, 47(2): 120.
- [57] Pauleit D, Floeth F, Hamacher K, *et al.* O-(2-[¹⁸F] fluoroethyl)-L-tyrosine PET combined with MRI improves the diagnostic assessment of cerebral gliomas [J]. *Brain*, 2005, 128(3): 678–687.
- [58] Nguyen H, Shabani S, Awad A, *et al.* Molecular markers of therapy-resistant glioblastoma and potential strategy to combat resistance [J]. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, 19(6): 1765.
- [59] Tan S F, Pearson J M, Feith D J, *et al.* The emergence of acid ceramidase as a therapeutic target for acute myeloid leukemia [J]. *Exp. Opin. Ther. Targets*, 2017, 21(6): 583–590.
- [60] Mahdy A E M, Cheng J C, Li J, *et al.* Acid ceramidase up-regulation in prostate cancer cells confers resistance to radiation: AC inhibition, a potential radiosensitizer [J]. *Mol. Ther.*, 2009, 17(3): 430–438.
- [61] Samsel L, Zaidel G, Drumgoole H M, *et al.* The ceramide analog, B13, induces apoptosis in prostate cancer cell lines and inhibits tumor growth in prostate cancer xenografts [J]. *Prostate*, 2004, 58(4): 382–393.
- [62] Vethakanraj H S, Sesurajan B P, Padmanaban V P, *et al.* Anticancer effect of acid ceramidase inhibitor ceranib-2 in human breast cancer cell lines MCF-7, MDA MB-231 by the activation of SAPK/JNK, p38 MAPK apoptotic pathways, inhibition of the Akt pathway, downregulation of ER α [J]. *Anti. Cancer Drugs*, 2018, 29(1): 50–60.
- [63] Liu P, Ma S, Liu H, *et al.* HCFU inhibits cervical cancer cells growth and metastasis by inactivating Wnt/ β -catenin pathway [J]. *J. Cell. Biochem.*, 2017, doi: 10.1002/jcb.26570.
- [64] Morimoto K, Koh M. Postoperative adjuvant use of carmofer for early breast cancer [J]. *Osaka City Med. J.*, 2003, 49(2): 77–83.
- [65] Doan N B, Alhajala H, Al-Gizawiy M M, *et al.* Acid ceramidase and its inhibitors: A de novo drug target and a new class of drugs for killing glioblastoma cancer stem cells with high efficiency [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(68): 112662.
- [66] Doan N B, Nguyen H S, Al-Gizawiy M M, *et al.* Acid ceramidase confers radioresistance to glioblastoma cells [J]. *Oncol. Rep.*, 2017, 38(4): 1932–1940.
- [67] Doan N B, Nguyen H S, Montoure A, *et al.* Acid ceramidase is a novel drug target for pediatric brain tumors [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(15): 24753.
- [68] Hara S, Nakashima S, Kiyono T, *et al.* p53-independent ceramide formation in human glioma cells during γ -radiation-induced apoptosis [J]. *Cell Death Different.*, 2004, 11(8): 853.
- [69] Kubota T, Fujita S, Kodaira S, *et al.* Antitumor activity of fluoropyrimidines and thymidylate synthetase inhibition [J]. *J. Cancer Res.*, 1991, 82(4): 476–482.
- [70] Gebai A, Gorelik A, Li Z, *et al.* Structural basis for the activation of acid ceramidase [J]. *Nat. Commun.*, 2018, 9(1): 1621.
- [71] Schindler G, Capper D, Meyer J, *et al.* Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma [J]. *Acta Neuropathol.*, 2011, 121(3): 397–405.
- [72] Nakajima N, Nobusawa S, Nakata S, *et al.* BRAF V600E, TERT promoter mutations and CDKN2A/B homozygous deletions are frequent in epithelioid glioblastomas: A histological and molecular analysis focusing on intratumoral heterogeneity [J]. *Brain Pathol.*, 2018, 28(5): 663–673.
- [73] Kleinschmidt-DeMasters B K, Aisner D L, Birks D K, *et al.* Epithelioid GBMs show a high percentage of BRAF V600E mutation [J]. *Am. J. Surg. Pathol.*, 2013, 37(5): 685.
- [74] Robinson G W, Orr B A, Gajjar A. Complete clinical regression of a BRAF V600E-mutant pediatric glioblastoma multiforme after BRAF inhibitor therapy [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(1): 258.
- [75] Johanns T M, Ferguson C J, Grierson P M, *et al.* Rapid clinical and radiographic response with combined dabrafenib and trametinib in adults with BRAF-mutated high-grade glioma [J]. *J. Nat. Comp. Cancer Network*, 2018, 16(1): 4–10.