

儿童髓母细胞瘤 *FAT1* 基因表达及预后分析

余建忠 施伟 杨逸飞 詹丹旒 孙安 李昊

【摘要】 目的 探讨 *FAT1* 基因在儿童髓母细胞瘤中表达变化及其对预后的影响。方法 收集2004年1月至2016年12月58例儿童髓母细胞瘤标本,全外显子组测序分析其基因变异位点并行 Sanger 测序验证,实时荧光定量聚合酶链反应和免疫组化染色检测髓母细胞瘤 *FAT1* 表达变化、RNA 干扰技术敲减其中 *FAT1* 基因的表达,MTS 法检测细胞增殖率,Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,Log-Rank 检验比较 *FAT1* 基因表达变化对总生存期和生存率的影响,并分析 *FAT1* 基因表达变化与各项临床因素之间的关系。结果 (1) 8 例患儿存在 *FAT1* 基因致病性错义突变共 7 个变异位点(187517703C>G、187521337T>C、187524503A>T、187541859C>T、187584610C>G、187628338G>A、187630615G>A),均通过 Sanger 测序验证。(2) 髓母细胞瘤 *FAT1* 表达水平低于正常脑组织($P=0.012$)。(3) 2 个靶点(sh*FAT1* 和 sh*FAT2*)的 *FAT1* 基因敲减率均>70%;敲减 *FAT1* 基因表达后,髓母细胞瘤细胞增殖率明显增加(均 $P<0.01$)。(4) 髓母细胞瘤细胞 *FAT1* 低表达组(*FAT1* 阳性细胞比例 $\leq 50\%$, 38 例)患儿总生存期短于($P=0.009$)、生存率低于($P=0.009$)高表达组(*FAT1* 阳性细胞比例 $>50\%$, 20 例)。(5) *FAT1* 低表达组患儿年龄 <3 岁比例($P=0.037$)、肿瘤囊性变比例($P=0.002$)高于高表达组;而性别、肿瘤钙化、Chang 氏肿瘤分期组间差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。结论 *FAT1* 基因呈低表达的髓母细胞瘤患儿预后较差,*FAT1* 基因表达变化可预测髓母细胞瘤患儿预后。

【关键词】 髓母细胞瘤; 儿童; 基因; 预后; 细胞, 培养的

The expression of *FAT1* gene in children medulloblastoma and its prognostic role

YU Jian-zhong¹, SHI Wei¹, YANG Yi-fei¹, ZHAN Dan-ni¹, SUN An², LI Hao¹

¹Department of Neurosurgery, Children's Hospital of Fudan University, Shanghai 201102, China

²Department of Neurosurgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

Corresponding authors: LI Hao (Email: lihao7272@163.com); SUN An (Email: sunan1996@sina.com)

【Abstract】 **Objective** To detect the expression of *FAT1* gene in children with medulloblastoma and analyze the role of *FAT1* gene in prognosis. **Methods** A total of 58 cases with medulloblastoma were collected from January 2004 to December 2016. The mutation in *FAT1* gene was determined by whole exome sequencing (WES) and confirmed by Sanger sequencing. The expression of *FAT1* in medulloblastoma tissues was determined by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) technology and immunohistochemistry assay. RNA interference (RNAi) technology was used to reduce *FAT1* gene expression in tumor cells and cell viability was detected by MTS method. Kaplan-Meier analysis was used to draw survival curve. Log-Rank test was used to assess the association of *FAT1* gene expression with overall survival (OS) and survival rate and clinical factors of different groups of expression. **Results** 1) WES indicated 7 missense mutations in 8 tissues including 187517703C>G, 187521337T>C, 187524503A>T, 187541859C>T, 187584610C>G, 187628338G>A, 187630615G>A, and the mutations were confirmed by Sanger sequencing. 2) By real-time FQ-PCR assay and immunohistochemistry, the expression of *FAT1* in tumor tissues was significantly lower than in normal brain tissue ($P=0.012$). 3) The knockdown efficiency of two targets (sh*FAT1* and sh*FAT2*) was over 70%. Cell proliferation rate was increased significantly after *FAT1* gene knockdown ($P<0.01$). 4) Based on the expression of *FAT1* by

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2020.04.011

基金项目:上海市卫生和计划生育委员会科研课题青年基金资助项目(项目编号:20164Y0086);上海市抗癌协会青年医生“雏鹰”项目(项目编号:SACA-CY1C03)

作者单位:201102 上海,复旦大学附属儿科医院神经外科(余建忠,施伟,杨逸飞,詹丹旒,李昊);200040 上海,复旦大学附属华山医院神经外科(孙安)

通讯作者:李昊,Email:lihao7272@163.com;孙安,Email:sunan1996@sina.com

immunohistochemistry, 20 cases demonstrated high FAT1 expression (positive staining > 50%) and 38 cases demonstrated low FAT1 expression (positive staining ≤ 50%). The OS and survival rate of patients with low FAT1 expression was significantly shorter than high FAT1 expression group ($P = 0.009$, for all). 5) The ratio of patients less than 3-years old ($P = 0.037$) and cystic change ($P = 0.002$) in low FAT1 patients was higher than the control. But no difference was found in sex, tumor calcification and Chang's tumor classification. **Conclusions** Children with low FAT1 gene expression displayed worse prognosis. FAT1 gene expression could predict the prognosis of patient.

【Key words】 Medulloblastoma; Child; Genes; Prognosis; Cells, cultures

This study was supported by Scientific Research Project of Shanghai Health and Family Planning Commission (Youth Project, No. 20164Y0086) and Shanghai Anticancer Association EYAS PROJECT (No. SACA-CY1C03).

Conflicts of interest: none declared

髓母细胞瘤是一种发生于小脑或第四脑室的恶性侵袭性胚胎性肿瘤,发病高峰年龄为 4~7 岁,是儿童期最为常见的恶性脑肿瘤,占儿童中枢神经系统肿瘤的 12%~25%,在 15 岁以下儿童中的年发病率约为 5/10 万^[1-2]。目前所采取的针对性治疗方法首选外科手术,但手术切除程度对预后的作用尚无定论,尤其是与脑干粘连严重的肿瘤难以达到全切除,且易通过脑脊液途径种植播散,总体预后较差,病死率较高,5 年平均生存率为 50%~75%^[3-5]。最新研究显示,基因突变和细胞内信号传导异常是导致髓母细胞瘤发生与发展的重要原因^[6-7]。因此,探寻髓母细胞瘤发生发展过程中的关键作用分子,有助于发现新的治疗方法,对完善疾病危险分层、制定合理治疗方案、评估患儿预后具有极其重要的临床意义^[8-9]。我们课题组在前期研究中,对 26 例髓母细胞瘤患儿进行肿瘤相关基因的全外显子组测序(WES),发现多个候选基因突变,其中 8 例经蛋白预测软件 SIFT 和 PolyPhen-2 预测存在 FAT1 基因错义突变,该基因有 7 个突变点,经 Sanger 测序验证为致病突变^[10]。FAT1 基因定位于第 4 号染色体长臂,是果蝇脂肪同源基因,众多类型的肿瘤患者常存在染色体 4q35 缺失,该区域被认为包含一个抑癌基因^[11],我们课题组发现, FAT1 基因错义突变位点亦位于 4q35.2^[10]。既往研究显示, FAT1 是脑胶质瘤、结肠癌等肿瘤的抑癌基因,在肿瘤发生以及肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭中发挥重要调节作用^[12-14],但迄今尚无 FAT1 基因在髓母细胞瘤中作用机制的研究报道,本研究采用第二代测序技术(NGS)筛选出致病基因 FAT1,检测髓母细胞瘤患儿 FAT1 基因表达变化并分析其表达变化对预后的影响,以探讨 FAT1 基因表达变化评价儿童髓母细胞瘤预后的可

行性。

材料与方 法

一、实验材料

1. 实验标本来源与分组 收集 2004 年 1 月至 2016 年 12 月复旦大学附属儿科医院神经外科手术切除并经病理证实的髓母细胞瘤标本共 58 例,经 10% 甲醛溶液固定并石蜡包埋。所纳入标本均为首次手术标本,无复发和放化疗后标本,男性 41 例,女性 17 例;年龄为 10 个月至 13 岁,平均为 (6.00 ± 0.50) 岁。同时随机留取其中 26 例患儿的新鲜脑肿瘤组织标本,以及 8 例患儿行髓母细胞瘤切除术时切除的脑组织标本。本研究经复旦大学附属儿科医院道德伦理委员会审核批准,所有患儿家属对实验内容知情并签署知情同意书。

2. 细胞系来源 人髓母细胞瘤细胞系 Daoy 购自上海碧云天生物技术有限公司(信息号:3111C0001CCC000218),传代至第 4 代。

3. 试剂与仪器 (1) 主要试剂:RNA 抽提试剂盒、cDNA 第 1 链合成试剂盒和 MTS 溶液由上海碧云天生物技术有限公司提供,EnVision 二步法检测试剂盒为美国 Santa Cruz 公司产品,二氨基联苯胺(DAB)由苏州亚科科技股份有限公司提供,检测所用抗体 FAT1(1:100)购自艾博抗(上海)贸易有限公司,Lipofectamine[®]3000 为美国 Invitrogen 公司产品,RPMI1640 培养基和 10% 胎牛血清(FBS)购自瓊萨(上海)生物技术有限公司。(2) 主要仪器:Onedrop OD1000 紫外分光光度计购自上海吉盛医学科技有限公司,LineGene9600Plus 实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)仪为杭州博日科技有限公司产品,Nikon 300 光学显微镜由日本 Nikon 公司提

供, YT-MB96A 酶标仪由山东蓝虹光电科技有限公司提供。

二、实验方法

1. 全外显子组测序及生物信息学分析 (1) 检测与分析方法: 髓母细胞瘤 DNA 测序由深圳华大基因科技有限公司完成。每例样本经 GATK 变异检测 (<https://software.broadinstitute.org/gatk/>), 获得 $(70 \sim 80) \times 10^3$ 个单核苷酸变异 (SNV), 采用 SIFT 软件 (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>) 和 PolyPhen-2 软件 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) 进行质量控制筛选, 以 SNV 质量 ≥ 20 、SNV 基因型质量 ≥ 20 、插入缺失标记 (INDEL) 质量 ≥ 50 、INDEL 基因型质量 ≥ 20 、变异读段覆盖数 ≥ 4 者作为入选基因, 筛选后每例样本有 1200 ~ 1500 个突变点。参照文献 [15] 中高通量测序临床诊断流程图, 通过不同软件和数据库对上述变异进行注释, 其中, 对突变类型的注释采用 SIFT 软件和 PolyPhen-2 软件以预测突变位点类型, 然后再根据突变频率 (碱基突变频率 $< 1\%$ 、碱基型突变频率 < 2) 和突变类型 (错义突变、无义突变、终止密码突变、移码突变、可变剪切突变) 筛选获得候选基因突变位点, 经筛选后每例样本计有 300 ~ 500 个突变点。WES 测序平均测序长度为 88 bp、深度 $70 \times$, 原始 reads 数目约为 95×10^6 , 经剔除低质量数据后获得有效 reads 数目约为 90×10^6 。(2) Sanger 测序验证: 针对 WES 测序获得的 *FAT1* 基因变异位点, 采用 Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) 进行在线引物设计, PCR 扩增产物由深圳华大基因科技有限公司进行 Sanger 测序验证。

2. 实时荧光定量聚合酶链反应 采用 RNA 抽提试剂盒提取髓母细胞瘤组织和髓母细胞瘤细胞总 RNA, 并以紫外分光光度计进行定量。取总 RNA 1 μg , 采用 cDNA 第 1 链合成试剂盒反转录合成 cDNA 第 1 链, 再取反转录产物 1 μl , SYBR Green 染色法行实时荧光定量聚合酶链反应, 检测 *FAT1* mRNA 表达量。*FAT1* 基因片段长度为 135 bp, 正向引物序列 5'-TCAGCAGATCCAAACGCCAT-3'、反向引物序列 5'-TCAGCAGATCCAAACGCCAT-3'; 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 作为内参照物, 片段长度为 69 bp, 正向引物序列为 5'-CTCTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC-3'、反向引物序列为 5'-TGAGCGATGTGGCTCGGCT-3'。实时荧光定量聚合酶链反应条件为: 95°C 10 s、 60°C 15 s, 共 40 个循环, 再延伸 95°C 2 min。*FAT1* 基因表达量

以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算, $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{待检基因}} - \text{Ct}_{\text{内参基因}})_{\text{检测组}} - (\text{Ct}_{\text{待检基因}} - \text{Ct}_{\text{内参基因}})_{\text{对照组}}$ 。

3. 免疫组化染色 将儿童髓母细胞瘤组织制备成层厚为 4 μm 的切片, 常规处理、FAT1 (1:100) 免疫组化染色, EnVision 二步法和 DAB 显色。组织切片经柠檬酸缓冲液 (0.05 mol/L, pH 值 6.0) 煮沸 5 ~ 10 min, 修复抗原。以既往儿童髓母细胞瘤 HE 染色切片作为空白对照, 由两位病理科医师双盲在光学显微镜下分别观察髓母细胞瘤组织标本 (56 例) 和正常脑组织标本 (10 例), 于中倍视野 (200 \times) 下半定量计数 5 个视野 FAT1 阳性细胞数, 取平均值, 以胞质或胞核呈棕色为 FAT1 阳性细胞; 选取 FAT1 强阳性区域进行观察, 在高倍视野 (400 \times) 下 FAT1 阳性细胞比例 $> 50\%$ 为高表达、 $\leq 50\%$ 为低表达。免疫组化染色结果由两位病理科医师共同核对, 意见不一致时协商解决。

4. 靶向 *FAT1* 基因的短发卡 RNA 靶点设计与合成 通过在线生物软件 (<http://sidirect2.rnai.jp/>) 设计 3 条靶向 *FAT1* 基因的短发夹 RNA (shRNA) 靶点, 并由通用生物系统 (安徽) 有限公司全基因合成 2 个靶点。靶向 *FAT1* 基因的 shRNA 靶点序列为, shFAT1: 5' - GCCTGTGGTTCCAGTGTAA - 3'、shFAT2: 5' - GCAACCGGCTCTCTCTATAC - 3', shFAT1 靶点的对照序列为 Scramble: 5' - GTTCCTATGGTACGTACGGG-3'。设计的 shRNA 可以在分子水平与 *FAT1* 基因转录产物的 mRNA 相结合, 启动 Dicer 复合物核酸酶活性, 进而降低 *FAT1* mRNA 表达量, 导致 *FAT1* 蛋白水平降低, 从而达到干扰 *FAT1* 基因表达的作用。

5. 细胞增殖实验 将人髓母细胞瘤细胞系 Daoy 置于直径 100 mm 的培养板, 滴加含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基约 10 ml, 混匀细胞, 置 37°C 、含 5% 二氧化碳的细胞培养箱中培养, 观察细胞生长状态和密度, 待细胞覆盖率达 100% 时, 按照 1:3 传代培养。取呈指数生长的髓母细胞瘤细胞, 以 Lipofectamine[®]3000 脂质体分别将 2 个 shFAT1 靶点和对照靶点 Scramble 转染髓母细胞瘤细胞, 继续在 37°C 、含 5% 二氧化碳细胞培养箱中培养 24 h。将肿瘤细胞以 3000 个/孔的密度种植于 96 孔板, 每孔滴加 MTS 溶液 20 μl , 于 37°C 恒温培养箱中孵育 2 h, 检测细胞增殖率, 连续检测 5 d, 采用酶标仪于 490 nm 处测定光密度值 (OD 值), 以时间 (d) 为横坐标、OD_{490nm} 值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

表 1 髓母细胞瘤组织与正常脑组织 *FAT1* mRNA 表达量的比较 [$M(P_{25}, P_{75})$]

Table 1. Comparison of *FAT1* mRNA expression in medulloblastoma tissues and normal brain tissues [$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	例数	<i>FAT1</i> mRNA	Z 值	P 值
髓母细胞瘤组织	17	0.21(0.03,0.70)	-2.521	0.012
正常脑组织	8	0.92(0.40,1.76)		

三、统计分析方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理与分析。计数资料以相对数构成比(%)或率(%)表示,采用 χ^2 检验。呈正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用两独立样本的 *t* 检验或单因素方差分析,两两比较行 LSD-*t* 检验;呈非正态分布的计量资料以中位数和四分位数间距 [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示,采用 Mann-Whitney *U* 检验。生存分析采用 Kaplan-Meier(K-M)法,绘制生存曲线,Log-Rank 检验比较 *FAT1* 基因表达变化对总生存期(OS)和生存率的影响。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、*FAT1* 基因错义突变

在筛选后的 300~500 个候选变异中,通过检索髓母细胞瘤相关基因文献,以及 COSMIC 数据库 (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/>) 中髓母细胞瘤相关报道,共计检出已报道基因和变异位点 32 个。本组 26 例中 8 例患儿存在 *FAT1* 基因错义突变,并在候选基因变异位点中发现 *FAT1* 基因存在 7 个变异位点,即 187517703C > G、187521337T > C、187524503A > T、187541859C > T、187584610C > G、187628338G > A、187630615G > A,其中,187524503A > T 和 187541859C > T 同时在 2 例患儿中重复出现。上述变异位点均通过 Sanger 测序进行验证。

二、髓母细胞瘤组织 *FAT1* 表达水平降低

实时荧光定量聚合酶链反应显示,髓母细胞瘤组织 *FAT1* mRNA 表达量低于正常脑组织且差异具有统计学意义($P = 0.012$,表 1),并经免疫组化染色证实(图 1)。

三、*FAT1* 低表达促进髓母细胞瘤细胞增殖

通过 RNA 干扰(RNAi)技术敲减髓母细胞瘤细胞中 *FAT1* 基因的表达,与 Scramble 组相比,2 个靶

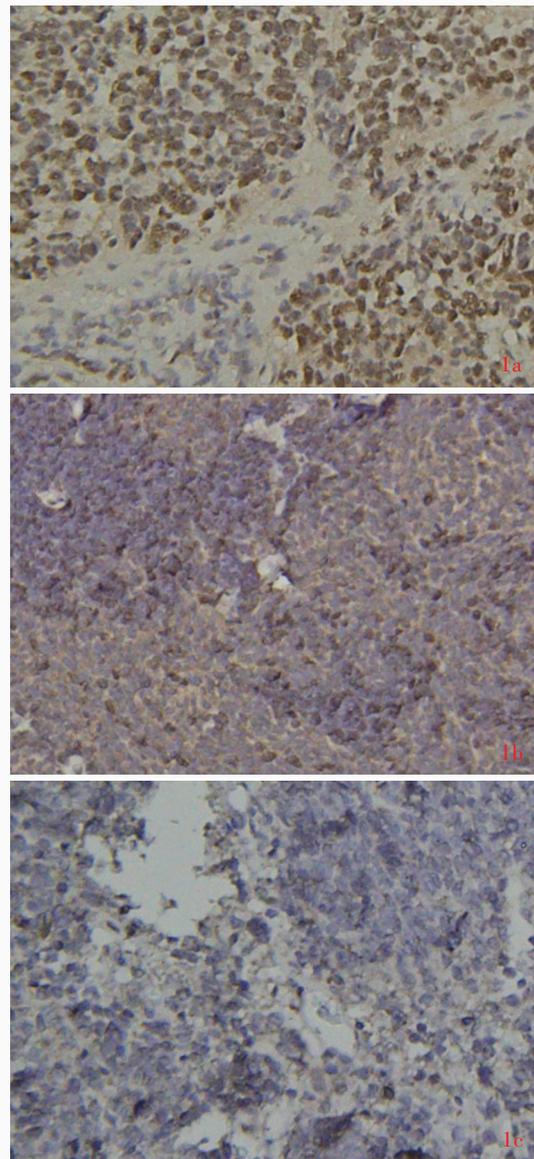


图 1 光学显微镜观察所见 免疫组化染色(EnVision 二步法) $\times 400$ 1a 大量肿瘤细胞胞质和胞核表达 *FAT1*(*FAT1* 阳性细胞比例 >70%) 1b 肿瘤细胞胞质和少量胞核表达 *FAT1*(*FAT1* 阳性细胞比例 <10%) 1c 肿瘤细胞不表达 *FAT1*

Figure 1 Optical microscopy findings Immunohistochemical staining (EnVision) $\times 400$ *FAT1* was expressed in cytoplasm and nucleus in a large number of tumor cells (the positive cells was more than 70%, Panel 1a). *FAT1* was expressed in cytoplasm and few nucleus of tumor cells (the positive cells was less than 10%, Panel 1b). No *FAT1* was expressed in tumor cells (Panel 1c).

点(sh*FAT1* 和 sh*FAT2*) 的敲减率 > 70%, *FAT1* mRNA 表达量均降低($P = 0.001, 0.003$;表 2, 3)。MTS 法显示,敲减 *FAT1* 基因表达后,髓母细胞瘤细胞增殖率明显增加(均 $P < 0.01$;表 4, 5),表明 *FAT1* 基因在髓母细胞瘤细胞中可能发挥抑癌基因作用。

表 2 敲减髓母细胞瘤细胞中 *FAT1* 基因后不同处理组 *FAT1* mRNA 表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Comparison of *FAT1* mRNA expression in Daoy cells after *FAT1* gene knockdown ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	<i>FAT1</i> mRNA	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
Scramble(1)	3	1.00 ± 0.19		
sh <i>FAT1</i> (2)	3	0.10 ± 0.03	47.890	0.000
sh <i>FAT2</i> (3)	3	0.25 ± 0.07		

表 3 敲减髓母细胞瘤细胞中 *FAT1* 基因后不同处理组 *FAT1* mRNA 表达量的两两比较

Table 3. Pairwise comparison of *FAT1* mRNA expression in Daoy cells after *FAT1* gene knockdown

组间两两比	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
(1) vs (2)	7.968	0.001
(1) vs (3)	6.264	0.003

表 4 敲减髓母细胞瘤细胞中 *FAT1* 基因后不同处理组肿瘤细胞增殖率的比较($\bar{x} \pm s, OD_{490nm}$)

Table 4. Comparison of cell proliferation rate in Daoy cells after *FAT1* gene knockdown ($\bar{x} \pm s, OD_{490nm}$)

组别	例数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
Scramble(1)	3	0.15 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.37 ± 0.03	0.50 ± 0.01
sh <i>FAT1</i> (2)	3	0.13 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.52 ± 0.04	0.55 ± 0.06	0.69 ± 0.05
sh <i>FAT2</i> (3)	3	0.13 ± 0.01	0.41 ± 0.02	0.49 ± 0.03	0.59 ± 0.07	0.81 ± 0.08
<i>F</i> 值		1.434	72.272	41.445	12.575	25.917
<i>P</i> 值		0.310	0.000	0.000	0.007	0.001

表 5 敲减髓母细胞瘤细胞中 *FAT1* 基因后不同处理组肿瘤细胞增殖率的两两比较

Table 5. Pairwise comparison of cell proliferation rate in Daoy cells after *FAT1* gene knockdown

组间两两比	第 2 天		第 3 天		第 4 天		第 5 天	
	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值						
(1) vs (2)	-7.627	0.002	-7.817	0.001	-4.568	0.010	-6.869	0.002
(1) vs (3)	-15.391	0.000	-10.765	0.000	-4.972	0.008	-6.747	0.003

四、*FAT1* 基因在髓母细胞瘤中的表达变化与总生存期的关系

经上述研究证实, *FAT1* 基因在儿童髓母细胞瘤患者中普遍呈低表达, 且发挥抑癌基因作用。根据免疫组化染色显示的 *FAT1* 在髓母细胞瘤细胞中的表达量, 将 58 例患儿分为 *FAT1* 高表达(*FAT1* 阳性细胞比例 > 50%) 组(20 例) 和低表达(*FAT1* 阳性细胞比例 < 50%) 组(38 例), 结果显示, 低表达组患儿总生存期短于高表达组且差异有统计学意义($P = 0.009$, 表 6)。生存分析显示, 低表达组患儿生存率低于高表达组($P = 0.009$, 图 2)。

五、*FAT1* 基因表达变化与各项临床因素之间的关系

为探讨 *FAT1* 基因表达变化与各项临床因素之间的关系, 选择性别、年龄、肿瘤囊性变、肿瘤钙化、肿瘤分期等项因素作为影响因素。结果显示, *FAT1* 低表达组患儿年龄 < 3 岁($P = 0.037$) 和肿瘤囊性变($P = 0.002$) 比例均高于高表达组, 且差异有统计学意义; 而性别、肿瘤钙化、Chang 氏肿瘤分期(M 分期和 T 分期) 则组间差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),

提示 *FAT1* 基因低表达主要集中于婴幼儿(< 3 岁), 易发生肿瘤囊性变(表 7)。

讨 论

随着分子生物学和细胞遗传学的发展, 目前一致认为基因突变和细胞内信号传导异常是导致髓母细胞瘤发生与发展的重要原因, 并与其预后密切相关^[7,16]。既往研究显示, 髓母细胞瘤患者存在抑癌基因 *PTEN* 缺失、*p53* 突变, 以及 *SHH* 和 *WNT* 信号转导通路异常等一系列分子遗传模式的改变^[8,17]。髓母细胞瘤包含多种分子亚型, 目前最新的分子分型研究将髓母细胞瘤大致分为 4 种亚型, 分别为 *WNT* 型、*SHH* 型、Group3 型和 Group4 型, 不同分子亚型导致不同预后, 因此分子分型成为疾病危险分层的重要依据, 然而新的更细化的分子分型仍在不断深入研究中^[17-18], 信号转导通路和分子分型的引入给儿童髓母细胞瘤的个体化治疗和精确判断预后提供了新的思路。

随着 NGS 技术的成熟, 短时、高通量的全基因组检测已经成为最有效的分子遗传学研究方法, 不

表 6 FAT1 低表达组与高表达组患儿总生存期的比较($\bar{x} \pm s$, 月)

Table 6. Comparison of OS between children with high and low expression of FAT1 ($\bar{x} \pm s$, month)

组别	例数	总生存期	t 值	P 值
FAT1 低表达组	38	18.92 ± 3.20	-2.340	0.009
FAT1 高表达组	20	45.33 ± 7.47		

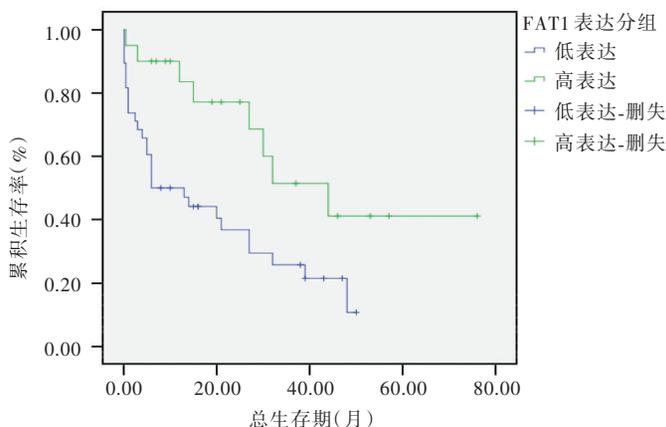


图 2 生存分析显示, FAT1 低表达组患儿生存率低于高表达组患儿 (Log-Rank 检验, $P = 0.009$)

Figure 2 Survival analysis showed the survival rate of patients with low FAT1 expression was significantly lower than that of patients with high FAT1 expression (Log-Rank test, $P = 0.009$).

表 7 FAT1 低表达组与高表达组患儿各项临床因素的比较 [例(%)]

Table 7. Comparison of clinical factors between children with high and low expression of FAT1 [case (%)]

项目	FAT1 低表达组 (n=38)	FAT1 高表达组 (n=20)	χ^2 值	P 值
性别			0.274	0.601
男性	26(68.42)	15(75.00)		
女性	12(31.58)	5(25.00)		
年龄			4.370	0.037
< 3 岁	16(42.11)	3(15.00)		
≥ 3 岁	22(57.89)	17(85.00)		
肿瘤囊性变	22(57.89)	3(15.00)	9.482*	0.002
肿瘤钙化	16(42.11)	5(25.00)	1.660	0.198
M 分期			3.274*	0.070
M0 期	30(78.95)	20(100.00)		
M1~4 期	8(21.05)	0(0.00)		
T 分期			0.454*	0.500
T1~2 期	7(18.42)	6(30.00)		
T3~4 期	31(81.58)	14(70.00)		

*adjusted χ^2 value, 校正 χ^2 值

肿瘤患儿进行肿瘤相关基因的 WES 测序, 发现 *FAT1* 基因突变, 且突变位点均经 Sanger 测序验证, 提示 *FAT1* 可能是髓母细胞瘤新的致病基因, 进一步提取肿瘤组织和正常脑组织 RNA, 经实时荧光定量聚合酶链反应检测发现髓母细胞瘤 *FAT1* mRNA 表达量低于正常脑组织, 免疫组化染色亦进一步证实髓母细胞瘤 *FAT1* 蛋白表达低于正常脑组织。在细胞水平, *FAT1* 基因产物是钙黏蛋白超家族成员, 是一组通常表达于上皮组织的跨膜蛋白, 具有黏附分子和(或)信号传导受体功能^[17-18]。此外, *FAT1* 基因还参与细胞-细胞粘附的形成, 干扰 *FAT1* 基因表达则可降低细胞连接稳定性, 并破坏细胞极性^[19], 但该基因在髓母细胞瘤细胞中的功能尚不明确。我们课题组进一步在细胞水平进行研究, 通过 RNAi 技术敲减人髓母细胞瘤细胞系 Daoy 中 *FAT1* 基因的表达, 发现肿瘤细胞增殖能力显著增强, 提示 *FAT1* 基因在儿童髓母细胞瘤的发病中可能扮演抑癌基因作用, *FAT1* 基因表达变化可以影响儿童髓母细胞瘤的生物学行为, 进而影响患儿预后。本研究进一步对 *FAT1* 基因表达变化与代表肿瘤生长活跃的一系列临床因素之间的关系进行分析, 并结合生存分析, 判断 *FAT1* 基因表达变化对患儿总生存期和生存率的影响, 以探讨临床通过测定 *FAT1* 蛋白表达水平判断髓母细胞瘤患儿预后的可行性。结果显示, *FAT1* 低表达组患儿总生存期短于、生存率低于高表达组, 证实 *FAT1* 基因在儿童髓母细胞瘤中可能扮演抑癌基因的角色, 抑制 *FAT1* 基因表达可能促进肿瘤的发生发展。为评估 *FAT1* 表达变化与各项临床影响因素之间的关系, 我们选择常见的临床分层因素和临床常用的肿瘤生长活跃和转移相关因素作为观察指标, 发现 *FAT1* 低表达组患儿年龄 < 3 岁比例和肿瘤囊性变比例均高于高表达组, 提示 *FAT1* 基因低表达大多集中于婴幼儿 (< 3 岁), 易发生肿瘤囊性变。目前

仅可以通过全基因组测序(WGS)或 WES 测序进行全基因组检测, 而且可以对任意感兴趣的目标区域进行捕获, 然后进行高覆盖测序, 探寻特定基因与疾病之间的关系。本研究采用 NGS 技术对髓母细

普遍认为, 婴幼儿髓母细胞瘤患儿的整体预后较差, 年龄 < 3 岁是预后不良的影响因素, 本研究结论印证了这一点, 即 *FAT1* 基因低表达多集中于婴幼儿 (< 3 岁), 婴幼儿整体预后较差, 故认为 *FAT1* 低

表达病例预后较差。Chang氏肿瘤分期广泛应用于髓母细胞瘤的临床分期,是判断预后较为可靠的指标^[4]。在代表肿瘤生长的T分期方面,FAT1低表达组T3~4期比例占81.58%(31/38),尽管观察到FAT1低表达更集中于T3~4期的趋势,但遗憾的是并无统计学差异;在代表肿瘤转移的M分期方面,FAT1低表达组M1~4期比例占21.05%(8/38),尽管无统计学差异,但也从侧面反映了FAT1低表达患儿更易发生肿瘤转移,有待扩大样本量做进一步研究。影像学所观察到的髓母细胞瘤囊性变表明肿瘤细胞增殖能力较强,本研究FAT1低表达组患儿肿瘤囊性变比例占57.89%(22/38),高于FAT1高表达组的15%(3/20),表明FAT1低表达患儿更易发生肿瘤囊性变,进一步证实了FAT1基因可能参与对肿瘤细胞增殖的抑制过程。

综上所述,通过检测儿童髓母细胞瘤标本FAT1基因表达变化,可对肿瘤进行初步危险分层,进而指导临床治疗。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Northcott PA, Robinson GW, Kratz CP, Mabbott DJ, Pomeroy SL, Clifford SC, Rutkowski S, Ellison DW, Malkin D, Taylor MD, Gajjar A, Pfister SM. Medulloblastoma [J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5:11.
- [2] Quinlan A, Rizzolo D. Understanding medulloblastoma [J]. JAAPA, 2017, 30:30-36.
- [3] Ramaswamy V, Remke M, Bouffet E, Bailey S, Clifford SC, Doz F, Kool M, Dufour C, Vassal G, Milde T, Witt O, von Hoff K, Pietsch T, Northcott PA, Gajjar A, Robinson GW, Padovani L, André N, Massimino M, Pizer B, Packer R, Rutkowski S, Pfister SM, Taylor MD, Pomeroy SL. Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus [J]. Acta Neuropathol, 2016, 131:821-831.
- [4] Gerber NU, Mynarek M, von Hoff K, Friedrich C, Resch A, Rutkowski S. Recent developments and current concepts in medulloblastoma [J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40:356-365.
- [5] Bleil CB, Bizzi JWJ, Bedin A, de Oliveira FH, Antunes AC. Survival and prognostic factors in childhood medulloblastoma: a Brazilian single center experience from 1995 to 2016 [J]. Surg Neurol Int, 2019, 10:120.
- [6] Cassia GS, Alves CA, Taranath A, López NS, Oztekin O, Goncalves FG, Patay Z. Childhood medulloblastoma revisited [J]. Top Magn Reson Imaging, 2018, 27:479-502.
- [7] Pugh TJ, Weeraratne SD, Archer TC, Pomeranz Krummel DA, Auclair D, Bochicchio J, Carneiro MO, Carter SL, Cibulskis K, Erlich RL, Greulich H, Lawrence MS, Lennon NJ, McKenna A, Meldrim J, Ramos AH, Ross MG, Russ C, Shefler E, Sivachenko A, Sogoloff B, Stojanov P, Tamayo P, Mesirov JP, Amani V, Teider N, Sengupta S, Francois JP, Northcott PA, Taylor MD, Yu F, Crabtree GR, Kautzman AG, Gabriel SB, Getz G, Jäger N, Jones DT, Lichter P, Pfister SM, Roberts TM, Meyerson M, Pomeroy SL, Cho YJ. Medulloblastoma exome sequencing uncovers subtype-specific somatic mutations [J]. Nature, 2012, 488:106-110.
- [8] Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC, Eberhart CG, Parsons DW, Rutkowski S, Gajjar A, Ellison DW, Lichter P, Gilbertson RJ, Pomeroy SL, Kool M, Pfister SM. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus [J]. Acta Neuropathol, 2012, 123:465-472.
- [9] Bouffet E. Management of high-risk medulloblastoma [J]. Neurochirurgie, 2019. [Epub ahead of print]
- [10] Yu JZ, Li H. The expression of FAT1 is associated with overall survival in children with medulloblastoma [J]. Tumori, 2017, 103:44-52.
- [11] Borkosky SS, Gunduz M, Nagatsuka H, Beder LB, Gunduz E, Ali MA, Rodriguez AP, Cilek MZ, Tominaga S, Yamanaka N, Shimizu K, Nagai N. Frequent deletion of ING2 locus at 4q35.1 associates with advanced tumor stage in head and neck squamous cell carcinoma [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135:703-713.
- [12] Morris LG, Kaufman AM, Gong Y, Ramaswami D, Walsh LA, Turcan S, Eng S, Kannan K, Zou Y, Peng L, Banuchi VE, Paty P, Zeng Z, Vakiani E, Solit D, Singh B, Ganly I, Liau L, Cloughesy TC, Mischel PS, Mellinghoff IK, Chan TA. Recurrent somatic mutation of FAT1 in multiple human cancers leads to aberrant Wnt activation [J]. Nat Genet, 2013, 45:253-261.
- [13] Katoh M. Function and cancer genomics of FAT family genes (review) [J]. Int J Oncol, 2012, 41:1913-1918.
- [14] Nishikawa Y, Miyazaki T, Nakashiro K, Yamagata H, Isokane M, Goda H, Tanaka H, Oka R, Hamakawa H. Human FAT1 cadherin controls cell migration and invasion of oral squamous cell carcinoma through the localization of beta-catenin [J]. Oncol Rep, 2011, 26:587-592.
- [15] Li ZX, Liu B, Yang L, Wang HJ, Zhou WH. Evaluation of diagnostic accuracy of the whole-exome data analysis pipeline of Children's Hospital of Fudan University [J]. Zhongguo Xun Zheng Er Ke Za Zhi, 2015, 10:25-28. [黎籽秀, 刘博, 杨琳, 王慧君, 周文浩. 高通量测序数据分析和临床诊断流程对新生儿多发畸形候选变异的筛选准确性研究 [J]. 中国循证儿科杂志, 2015, 10:25-28.]
- [16] Juraschka K, Taylor MD. Medulloblastoma in the age of molecular subgroups: a review [J]. J Neurosurg Pediatr, 2019, 24:353-363.
- [17] Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Eberhart CG, Mack S, Bouffet E, Clifford SC, Hawkins CE, French P, Rutka JT, Pfister S, Taylor MD. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants [J]. J Clin Oncol, 2011, 29:1408-1414.
- [18] Kijima N, Kanemura Y. Molecular classification of medulloblastoma [J]. Neurol Med Chir (Tokyo), 2016, 56:687-697.
- [19] Tanoue T, Takeichi M. Mammalian FAT1 cadherin regulates actin dynamics and cell-cell contact [J]. J Cell Biol, 2004, 165: 517-528.

(收稿日期:2020-04-05)

(本文编辑:彭一帆)