

## • 临床论著 •

## 脑胶质母细胞瘤 MR 增强形态与 Toll 样受体 9 表达水平的影像基因学研究

范亦龙 江涛 艾林 陈谦 陈绪珠

**【摘要】 目的** 研究脑胶质母细胞瘤常规 MRI 表现与 Toll 样受体 9 (TLR9) 表达水平间的关系。**方法** 对 63 例原发性胶质母细胞瘤术前常规 MRI 检查, 测量肿瘤体积和水肿体积, 计算水肿指数, 根据病灶强化形态, 将肿瘤分为 2 组: I 型(环形强化)和 II 型(非环形强化)。根据病理标本分析 TLR9 表达水平, 比较高低表达组间患者年龄、性别、肿瘤体积、水肿指数和强化类型间的区别。**结果** I 型强化占胶质母细胞瘤的 97.5% (39/40), 该型肿瘤的 TLR9 高表达率为 65.22% (15/23), 与 II 型强化肿瘤的 TLR9 表达水平有明显差别。Logistic 回归分析显示, 强化形态是影响 TLR9 表达水平的独立影像学因素 ( $OR = 0.068, P = 0.022$ )。**结论** 胶质母细胞瘤的强化形态对 TLR9 表达水平影响较大。TLR9 高表达的胶质母细胞瘤倾向于完整的环形强化。

**【关键词】** 胶质母细胞瘤; Toll 样受体 9; 磁共振成像

**MR enhanced patterns of cerebral glioblastoma and the TLR9 expression: a radiogenomic study** FAN Yi-long, JIANG Tao, AI Lin, CHEN Qian, CHEN Xu-zhu. Department of Neuroradiology, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Corresponding author: CHEN Xu-zhu, Email: radiology888@yahoo.com.cn

**【Abstract】 Objective** To explore relationship between routine MRI findings and Toll like receptor 9 (TLR9) expression of cerebral glioblastoma. **Methods** Sixty-three patients with glioblastoma multiforme (GBM) were retrospectively identified with their preoperative routine MRI. Tumor volume and edema index (edema volume/tumor volume) were measured and calculated, respectively. According to the enhanced patterns of the lesion, the tumors were classified into type I (complete ring enhancement) and type II (incomplete ring enhancement or other shaped enhancement). TLR9 expression was analyzed. Based on the expression levels of TLR9, the 63 cases were divided into two groups with patients' age and sex, tumor volume, edema index, and enhanced patterns compared. **Results** Type I enhancement was 97.5% (39/40) in GBMs with high TLR9 expression and 65.22% (15/23) in GBMs with low TLR9 expression. The difference was significant ( $\chi^2 = 9.932, P = 0.002$ ). Enhanced patterns were independent radiological factors for TLR9 expression ( $OR = 0.068, P = 0.022$ ). **Conclusions** The enhanced patterns show an important influence upon TLR9 expression in cerebral glioblastomas. Glioblastomas with high TLR9 expression tend to be in a complete ring enhancement.

**【Key words】** Glioblastoma; Toll-like receptor 9; Magnetic resonance imaging

胶质母细胞瘤是成人最常见的原发性脑肿瘤<sup>[1]</sup>, 常表现为影像学 and 基因学上的多形性<sup>[2-4]</sup>。当前研究的主要目的是通过非侵袭性影像学方法评价活体肿瘤组织的生物化学和基因学标记物<sup>[5]</sup>, 磁共振成像是重要的影像学手段<sup>[6-7]</sup>。当病变的影像学表现与特定的基因和 RNA 微阵列表达特征相关联时, 病变的影像学表现可作为肿瘤基因表达的非侵入性评价方法, 进而为肿瘤的诊断、预后判断及优化治疗提供参考<sup>[8]</sup>。最

近的研究显示, 这在临床上是可行的<sup>[1-3, 5-6, 9-12]</sup>。因此, 一个新的词汇——影像基因学 (radiogenomic) 出现了, 它将特定的影像学表现与某些基因表达特征联系起来<sup>[13]</sup>。

在脑组织, 免疫治疗为高度特异性肿瘤靶向治疗提供了可能, 同时能保护正常脑组织。Toll 样受体 (Toll like receptor, TLR) 激动剂已经应用于该领域并作为标准的癌症治疗方法单独应用<sup>[14]</sup>。在人 TLR 的 11 个成员中, TLR9 是中枢神经系统肿瘤免疫治疗中最有前景的 TLR 激动剂<sup>[14-15]</sup>。本研究的目的是通过回顾性分析探索胶质母细胞瘤的 TLR9 表达与常规 MRI 表现间的关系。

### 对象与方法

1. 研究对象:选择2010年3月至2012年5月来我院治疗的脑胶质母细胞瘤患者63例,男37例,女26例,年龄17~64岁,平均(47.5 ± 11.9)岁。所有病例均经手术及病理证实,以2007年世界卫生组织标准进行诊断<sup>[16]</sup>。术前均未接受放疗或化疗。

2. 影像学检查与分析:所有患者于术前2周内进行MRI检查。检查包括平扫及增强扫描,平扫包括轴位T1WI、T2WI和矢状位T1WI,平扫结束后,由专职护士马上经肘前静脉手推注射对比剂(Gd-DTPA, Magnevist, BayerHealthCare Pharmaceuticals, Wayne, NJ),剂量为0.2 ml/kg。注射完毕,立即开始增强扫描,得到轴位、矢状位和冠状位强化图像。扫描所用机器为3.0 T超导MR扫描仪,头部正交线圈(Magnetom, Trio; Siemens, Erlangen, Germany)。扫描参数:T1WI TR/TE 2000 ms/9.8 ms; T2WI TR/TE 4500 ms/84 ms; FOV 240 mm; 矩阵512 × 512; 层厚5 mm; 层间距6 mm。

根据病变强化形态,参考既往文献<sup>[11]</sup>,将肿瘤分为两个类型:I型,完整的环形强化;II型,不完整的环形强化或其他形态的强化。参考Mou等<sup>[17]</sup>的研究,用以下公式计算肿瘤体积和瘤周水肿体积: $V = \pi/6 \times L \times S \times N$ ,对于肿瘤体积,L为强化T1WI上肿瘤最大径,S为垂直于L的最大径,N是肿瘤轴位扫描图像的层数。对于瘤周水肿的体积,L代表瘤周水肿的最大径,N为水肿组织的层数。水肿指数 = 水肿体积/肿瘤体积,代表瘤周水肿程度。强化形态的判断、肿瘤体积、水肿体积的径线测量和计算、水肿指数的计算均由2位医师分别独立完成,他们对临床和病理信息均不知情。意见不一致时经协商解决。2人计算后平均值作为最后的分析数值。

3. 病理组织学检查和分析:常规病理确诊为胶质母细胞瘤后,参照既往的方法<sup>[18]</sup>,用微阵列分析仪(Beecher Instruments, USA)对病理组织进行分析。病理标本经甲醛固定、石蜡包埋、病理学诊断人员标记。每个瘤标本重复取样,总共126个组织块。应用抗TLR9(Img-305A, clone 26C593.2, Imgenex, San Diego, USA),浓度为1:100。免疫染色的程度结合阳性染色

瘤细胞数目和染色程度综合判断。将瘤细胞阳性染色比例分为:0级,无阳性细胞;1级,瘤细胞阳性率 < 10%;2级,瘤细胞阳性率10%~50%;3级,瘤细胞阳性率 > 50%。瘤细胞染色程度分为:0级,无染色;1级,弱染色,外观轻度变黄;2级,中度染色,呈棕黄色;3级,明显染色,呈棕色。染色指数计算为染色程度 × 瘤细胞阳性比率。TLR9高表达定义为染色指数 > 4,低表达定义为染色指数 ≤ 4。

4. 统计学分析:根据TLR9的表达水平,将病例分为两组:高表达组和低表达组。用两独立样本t检验比较组间患者年龄,用Fisher精确检验比较组间的性别差异。由于肿瘤体积、水肿体积和水肿指数数据为非正态分布,用非参数t检验比较其组间差异。用双变量和多变量Logistic回归比较患者年龄、性别、肿瘤体积、水肿体积和水肿指数对TLR9表达的影响情况。以P < 0.05为差异有统计学意义。应用统计学软件SPSS 13.0 for Windows(Chicago, IL.)进行分析。

### 结果

TLR9高低表达组患者的年龄和性别分布无统计学差异(表1)。40例胶质母细胞瘤为TLR9高表达(图1,2),其中39例(97.5%)表现为I型强化。23例胶质母细胞瘤为TLR9低表达(图3,4),其中15例(65.22%)为I型强化,组间差异有统计学意义( $\chi^2 = 9.932, P = 0.002$ ),提示TLR9高表达的胶质母细胞瘤倾向于表现为完整的环形强化。

进一步分析显示,TLR9表达与患者的年龄、性别、肿瘤水肿指数无关(表2)。双变量Logistic回归分析显示,肿瘤体积与TLR9表达有关,但多变量分析显示,两者无相关性,提示肿瘤体积不是TLR9表达的独立影响因素,但肿瘤强化类型是最明显的独立影响因素。

### 讨论

胶质母细胞瘤具有明显的基因、细胞、组织学及生物学行为异型性<sup>[19-20]</sup>。研究表明,胶质母细胞瘤的影像学多样性表现反映了肿瘤内、肿瘤间基因表达的差别<sup>[1]</sup>。进一步的研究表明,不同强化形态的胶质母细胞瘤其基因表达也有差异<sup>[3]</sup>。

表1 63例胶质母细胞瘤患者的性别、年龄、强化类型、肿瘤体积及水肿指数

TLR 表达	性别(例)		年龄(岁, $\bar{x} \pm s$ )	强化类型(例)		肿瘤体积[ $\text{cm}^3, M(Q_1 \sim Q_3)$ ]	水肿指数[ $M(Q_1 \sim Q_3)$ ]
	男	女		I	II		
高	24	16	49.40 ± 11.23	39	1	68.89(35.84 ~ 117.94)	0.795(0.4275 ~ 1.6025)
低	13	10	44.17 ± 12.56	15	8	89.11(47.44 ~ 190.49)	0.475(0.2900 ~ 1.6975)
P 值	0.787		0.094	0.002		0.083	0.248

表2 TLR9 表达的影响因素

变量	双变量 Logistic 回归			多变量 Logistic 回归		
	B 值	OR(95% CI)	P 值	B 值	OR(95% CI)	P 值
年龄	0.038	1.038(0.993~1.086)	0.097	-0.021	0.529(0.923~1.039)	0.481
性别	0.040	1.041(0.369~2.932)	0.940	-0.636	0.529(0.139~2.019)	0.352
水肿指数	0.055	1.057(0.734~1.520)	0.767	0.070	1.072(0.682~1.686)	0.763
肿瘤体积	-0.008	0.992(0.986~0.999)	0.031	0.007	1.007(0.998~1.017)	0.121
强化类型	3.035	20.80(2.393~180.804)	0.006	-2.693	0.068(0.007~0.680)	0.022

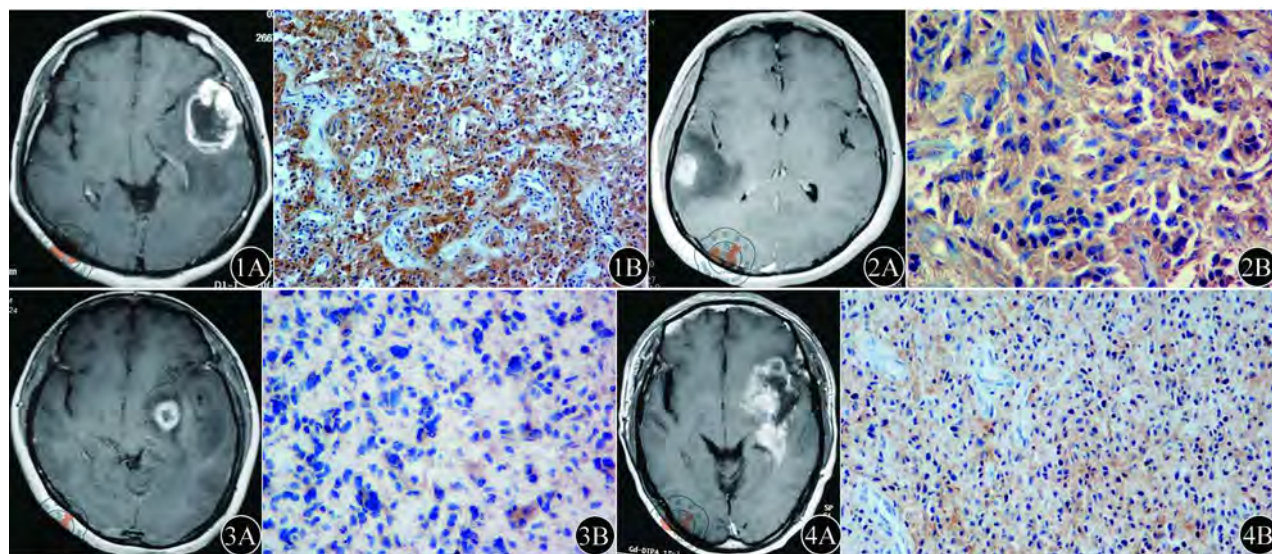


图1 1A: 轴位增强扫描MRI示I型强化(环形强化)的胶质母细胞瘤; 1B: 免疫组织化学染色检查示TLR9高表达( $\times 200$ ) 图2 2A: 轴位增强扫描MRI示II型强化(非环形强化)的胶质母细胞瘤; 2B: 免疫组织化学染色检查示TLR9高表达( $\times 400$ ) 图3 3A: 轴位增强扫描MRI示I型强化(环形强化)的胶质母细胞瘤; 3B: 免疫组织化学染色检查示TLR9低表达( $\times 400$ ) 图4 4A: 轴位增强扫描MRI示II型强化(非完整的环形强化)的胶质母细胞瘤; 4B: 免疫组织化学染色检查示TLR9低表达( $\times 200$ )

本研究表明,TLR9 表达水平在不同强化形态的胶质母细胞瘤也有差别。TLR9 高表达的胶质母细胞瘤倾向于完整的环形强化。已经证明,TLR9 高表达与胶质瘤的恶性度有关,TLR9 能明显增强胶质瘤的侵袭性<sup>[21-22]</sup>,另一方面,血脑屏障的破坏导致了胶质母细胞瘤的强化。因此,我们推测,TLR9 高表达的胶质母细胞瘤对血脑屏障的破坏更严重,从而导致明显的环形强化。

本研究也表明,TLR9 的表达与患者的年龄、性别无关,与以往的研究相一致<sup>[15]</sup>。本研究中,双因素 Logistic 回归分析显示,肿瘤体积与 TLR9 表达相关( $P = 0.031$ ),但在多因素分析中无相关性( $P = 0.121$ ),这说明肿瘤体积不是独立的 TLR9 表达影响因素。

TLR9 是胶质瘤免疫治疗的主要载体,我们的研究提示,在筛选免疫治疗的胶质瘤病例时,可选取完整环形强化的胶质瘤病例,这样的病例 TLR9 表达水平高,免疫治疗效果会更好。

本研究的不足之处:作为回顾性分析,难免有病例

选择性偏倚;其次,入选病例数较少,因此,所得结论尚需大样本进一步验证;第三,影像学研究仅限于常规 MRI 检查,未来尚需在更高级的成像模式,如 DWI、PWI、MRS 等进行进一步深入分析。

总之,本研究显示,胶质母细胞瘤的 TLR9 表达与强化形态有关,高表达的胶质母细胞瘤多呈环形强化。

#### 参考文献

- [1] Diehn M, Nardini C, Wang DS, et al. Identification of noninvasive imaging surrogates for brain tumor gene-expression modules. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 5213-5218.
- [2] Liang Y, Diehn M, Watson N, et al. Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 5814-5819.
- [3] Pope WB, Chen JH, Dong J, et al. Relationship between gene expression and enhancement in glioblastoma multiforme: exploratory DNA microarray analysis. Radiology, 2008, 249: 268-277.
- [4] Zheng H, Ying H, Yan H, et al. p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. Nature, 2008, 455: 1129-1133.
- [5] Segal E, Sirlin CB, Ooi C, et al. Decoding global gene expression programs in liver cancer by noninvasive imaging. Nat Biotechnol, 2007,

- 25:675-680.
- [6] Brown R, Zlatescu M, Sijben A, et al. The use of magnetic resonance imaging to noninvasively detect genetic signatures in oligodendroglioma. *Clin Cancer Res*, 2008, 14:2357-2362.
- [7] Henson JW, Gaviani P, Gonzalez RG. MRI in treatment of adult gliomas. *Lancet Oncol*, 2005, 6:167-175.
- [8] Zinn PO, Mahajan B, Sathyan P, et al. Radiogenomic mapping of edema/cellular invasion MRI-phenotypes in glioblastoma multiforme. *PLoS One*, 2011, 6: e25451.
- [9] Carrillo JA, Lai A, Nghiemphu PL, et al. Relationship between tumor enhancement, edema, IDH1 mutational status, MGMT promoter methylation, and survival in glioblastoma. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2012, 33:1349-1355.
- [10] Barajas RF Jr, Hodgson JG, Chang JS, et al. Glioblastoma multiforme regional genetic and cellular expression patterns; influence on anatomic and physiologic MR imaging. *Radiology*, 2010, 254:564-576.
- [11] Drabycz S, Roldán G, de Robles P, et al. An analysis of image texture, tumor location, and MGMT promoter methylation in glioblastoma using magnetic resonance imaging. *Neuroimage*, 2010, 49:1398-1405.
- [12] Stevenson CB, Ehtesham M, McMillan KM, et al. CXCR4 expression is elevated in glioblastoma multiforme and correlates with an increase in intensity and extent of peritumoral T2-weighted magnetic resonance imaging signal abnormalities. *Neurosurgery*, 2008, 63:560-569.
- [13] Rutman AM, Kuo MD. Radiogenomics: creating a link between molecular diagnostics and diagnostic imaging. *Eur J Radiol*, 2009, 70:232-241.
- [14] Marsh BJ, Stenzel-Poore MP. Toll-like receptors: novel pharmacological targets for the treatment of neurological diseases. *Curr Opin Pharmacol*, 2008, 8:8-13.
- [15] Meng Y, Kujas M, Marie Y, et al. Expression of TLR9 within human glioblastoma. *J Neurooncol*, 2008, 88:19-25.
- [16] Rousseau A, Mokhtari K, Duyckaerts C. The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system - what has changed? *Curr Opin Neurol*, 2008, 21:720-727.
- [17] Mou K, Chen M, Mao Q, et al. AQP-4 in peritumoral edematous tissue is correlated with the degree of glioma and with expression of VEGF and HIF-alpha. *J Neurooncol*, 2010, 100:375-383.
- [18] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 1998, 4:844-847.
- [19] Liang Y, Diehn M, Watson N, et al. Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102:5814-5819.
- [20] Pope WB, Sayre J, Perlina A, et al. MR imaging correlates of survival in patients with high-grade gliomas. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2005, 26:2466-2474.
- [21] Wang C, Cao S, Yan Y, et al. TLR9 expression in glioma tissues correlated to glioma progression and the prognosis of GBM patients. *BMC Cancer*, 2010, 10:415.
- [22] Merrell MA, Ilvesaro JM, Lehtonen N, et al. Toll-like receptor 9 agonists promote cellular invasion by increasing matrix metalloproteinase activity. *Mol Cancer Res*, 2006, 4:437-447.

(收稿日期:2012-08-16)

(本文编辑:吴莹)

范亦龙, 江涛, 艾林, 等. 脑胶质母细胞瘤 MR 增强形态与 Toll 样受体 9 表达水平的影像基因组学研究[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(1):109-112.

中华医学会