

基于多灶性胶质母细胞瘤整合基因组分析脑胶质瘤复发相关生物标志物的研究

保肇实 王嘉义 李守巍 游赣

100050 首都医科大学附属北京天坛医院神经外科(保肇实、游赣); 100093 北京, 首都医科大学三博脑科医院神经外科(王嘉义、李守巍)

通信作者: 保肇实, Email: baozhaoshi@bjtth.org

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2022.12.005

【摘要】目的 基于多灶性胶质母细胞瘤(M-GBM)基因组分析脑胶质瘤复发相关生物标志物, 为了解潜在的发病机制和制订针对性的治疗策略提供依据。**方法** 选择中国脑胶质瘤基因组图谱(CGGA)中1例胶质母细胞瘤患者的原发性和非同步性肿瘤样本的基因组进行高通量测序, 并通过单核苷酸变异(SNV)和基因组重排进行验证。对差异基因进行筛选, 并将所测序数据的差异基因纳入CGGA_325和CGGA_693两个数据库中进行Kaplan-Meier生存曲线分析。**结果** 在原发性和非同步性肿瘤中分别检测到14 322、16 464个SNV, 其中4 744个(33.1%)SNV是共有的。1组基因重排存在于原发性和非同步性肿瘤中, 3组基因重排存在于原发性肿瘤中但不存在于非同步性肿瘤中, 1组重排存在于非同步性肿瘤中但不存在于原发性肿瘤中。生存曲线分析结果显示, 总生存期和无进展生存期的差异有统计学意义($P < 0.01$), 低风险组患者的生存优于高风险组。**结论** 祖先克隆的子代细胞可能较早发生分化, 然后平行进化产生M-GBM, 尽管在重排全景图上存在总体差异, 但两个病变有共同的祖先。一组生物标志物可能与M-GBM的复发和级别进展相关。临床可根据靶向治疗策略独立分析M-GBM患者不同位置的病变, 指导精准治疗。

【关键词】 多发灶灶; 胶质母细胞瘤; 发病机制; 深度测序

基金项目: 国家自然科学基金项目(81972337); 北京市自然科学基金杰出青年科学基金项目(JQ20030)

Identification of biomarkers study related to glioma recurrence based on integrated genomic analysis of multifocal glioblastoma

Bao Zhaoshi, Wang Jiayi, Li Shouwei, You Gan

Department of Neurosurgery, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China (Bao ZS, You G); Department of Neurosurgery, Beijing Sanbo Brain Hospital, Capital Medical University, Beijing 100093, China (Wang JY, Li SW)

Corresponding author: Bao Zhaoshi, Email: baozhaoshi@bjtth.org

【Abstract】Objective Biomarkers related to glioma recurrence were analyzed based on the genome of multifocal glioblastoma (M-GBM) to provide a basis for understanding the potential pathogenesis and formulating targeted treatment strategies. **Methods** The genome of a primary and asynchronous tumor sample from a glioblastoma patient in the Chinese Glioma Genome Map (CGGA) was selected for high-throughput sequencing, and verified by single nucleotide variation (SNV) and genome rearrangement. The differential genes are screened, and the differential genes of the sequenced data are included in CGGA_325 and CGGA_693 Kaplan Meier survival curve analysis was conducted in two databases. **Results** 14 322 and 16 464 SNVs were detected in primary and asynchronous tumors, respectively, of which 4 744 (33.1%) were common. One group of gene rearrangements exists in primary and asynchronous tumors, three groups of gene rearrangements exist in primary tumors but not in asynchronous tumors, and one group of gene rearrangements exists in asynchronous tumors but not in primary tumors. The results of survival curve analysis showed that the difference between total survival and progression free survival was statistically significant ($P < 0.01$). The survival of low-risk group was better than that of high-risk group. **Conclusions** The progeny cells cloned by ancestors may differentiate earlier and then evolve in parallel to produce M-GBM, that is, although there are overall differences in the rearrangement panorama, the two lesions have a common ancestor. A set of biomarkers that may be related to the recurrence

and grade progression of glioma. The clinic can independently analyze the lesions at different positions of M-GBM patients according to the targeted treatment strategy to guide the precise treatment.

【Key words】 Multiple lesions; Glioblastoma; Pathogenesis; Deep sequencing

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81972337); Beijing Municipal Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholar (JQ20030)

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是常见和致命的原发性脑肿瘤,大多数患者在确诊后1年内死于该疾病^[1-2]。尽管联合手术切除、放疗和化疗等治疗措施,中位生存期仍仅为14~16个月^[3-4]。大部分GBM患者的死亡是由于肿瘤在大脑中的播散以及对标准化疗或靶向治疗的不良反应导致。GBM易复发^[5-6],大约10%的GBM患者复发时表现为大脑多处病变,这种现象称为多灶性胶质母细胞瘤(M-GBM)^[7-9]。M-GBM可以以同步方式(在疾病初期,多个病变同时出现)或非同步方式(病变在诊断后出现)出现^[10]。非同步性病变可能是由单亲克隆或独立基因克隆产生的侵袭性子细胞导致,而非同步发生的M-GBM的发病机制目前尚不清楚。为更好地了解M-GBM潜在的发病机制并制定针对性的治疗策略,本研究对1例M-GBM患者2个不同病变位置的基因组进行了测序。

一、对象与方法

1. 研究对象:患者男,39岁,以头痛和呕吐为主要症状。MRI显示左侧顶叶增强病变延伸至胼胝体。患者在签署知情同意后接受病灶切除术(部分切除,切除左枕病灶,病理学显示为GBM),随后进行替莫唑胺+放射治疗(Stupp方案)。在该方案完成时进行的MRI检查结果显示,患者右颞部出现一个新的病变。尽管替莫唑胺持续治疗,但病变仍有进展。由于神经功能恶化,需要第2次手术切除(近全切除右颞病灶)。见图1。

2. 组织样本和DNA提取:从中国脑胶质瘤基因组图谱(Chinese Glioma Genome Atlas, CGGA)中提取该GBM患者的原发和复发样本。根据2007年WHO的中枢神经系统肿瘤分类,样本的肿瘤组织学由2名神经病理学专家独立确认。手术后立即在液氮中快速冷冻该患者的组织样本。在提取DNA之前,用苏木精-伊红对所有肿瘤冰冻切片染色,以评估肿瘤细胞所占的百分比。根据癌症基因组图谱计划(the Cancer Genome Atlas, TCGA)标准,选择样本中80%以上的肿瘤细胞进行基因组分析。使用DNA分离试剂盒(Qiagen,德国)从冷冻肿瘤组织中提取肿瘤DNA。使用NanoDrop ND-1000分光光

度计(NanoDrop Technologies,美国)测量DNA浓度。GBM样本采集程序已获得首都医科大学附属北京天坛医院伦理审查委员会批准(编号:KY2014-002-02)。样本采集前已获得患者签署的知情同意书。

3. 全基因组测序:依照说明使用HiSeq 2000平台进行全基因组测序。用Covaris聚焦超声仪将从GBM样本中提取的基因组DNA剪切至平均大小为500 bp的片段。末端修复后,用MinElute PCR纯化试剂盒(Qiagen,德国)纯化钝端DNA片段。这些片段在3'端用一个“a”碱基进行腺苷酸化。然后将腺苷酸化片段连接到适配器序列。在琼脂糖凝胶上选择产生的DNA片段大小,并通过PCR扩增10~12个周期。将选择的库大小加载到HiSeq 2000平台上,并生成长度为100 bp的片段双端读取。为每个样本(血液、原发性肿瘤和非同步性肿瘤)准备4个库。比对缺失标记(insertion-deletion)、拷贝数变异(Copy Number Variation)、单核苷酸变异(single nucleotide variation, SNV)和基因组重排检测。使用BWA、SAMtools(<http://samtools.sourceforge.net>)、ANNOVAR、CREST等工具进行注释和分析。双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

4. SNV验证:对初次和第2次手术的组织标本以及来自患者血液的基因组DNA进行40~50倍的测序。编码序列中的非同义SNV通过使用预测突变位点两侧区域的特异性引物进行PCR扩增验证。使用Primer 3.0软件设计正向和反向引物,所有引物序列见表1。

5. 基因组重排验证:参考文献[11]进行更大规模的基因组事件(如染色体重排)以证实结果。利用PCR扩增和CREST鉴定的假定断点侧翼区域特异性引物验证结构变异。使用引物5.0设计正向和反向引物。反应和产物处理方法与SNV相同。通过在线软件BLAT分析Sanger测序的结果(<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>),将人类基因组(Hg19)作为参考并检查断点。

6. 差异基因筛选、signature的组建及预后分析:得到所测序数据的差异基因后,将其纳入CGGA_325以及CGGA_693这2个数据库进行验证。

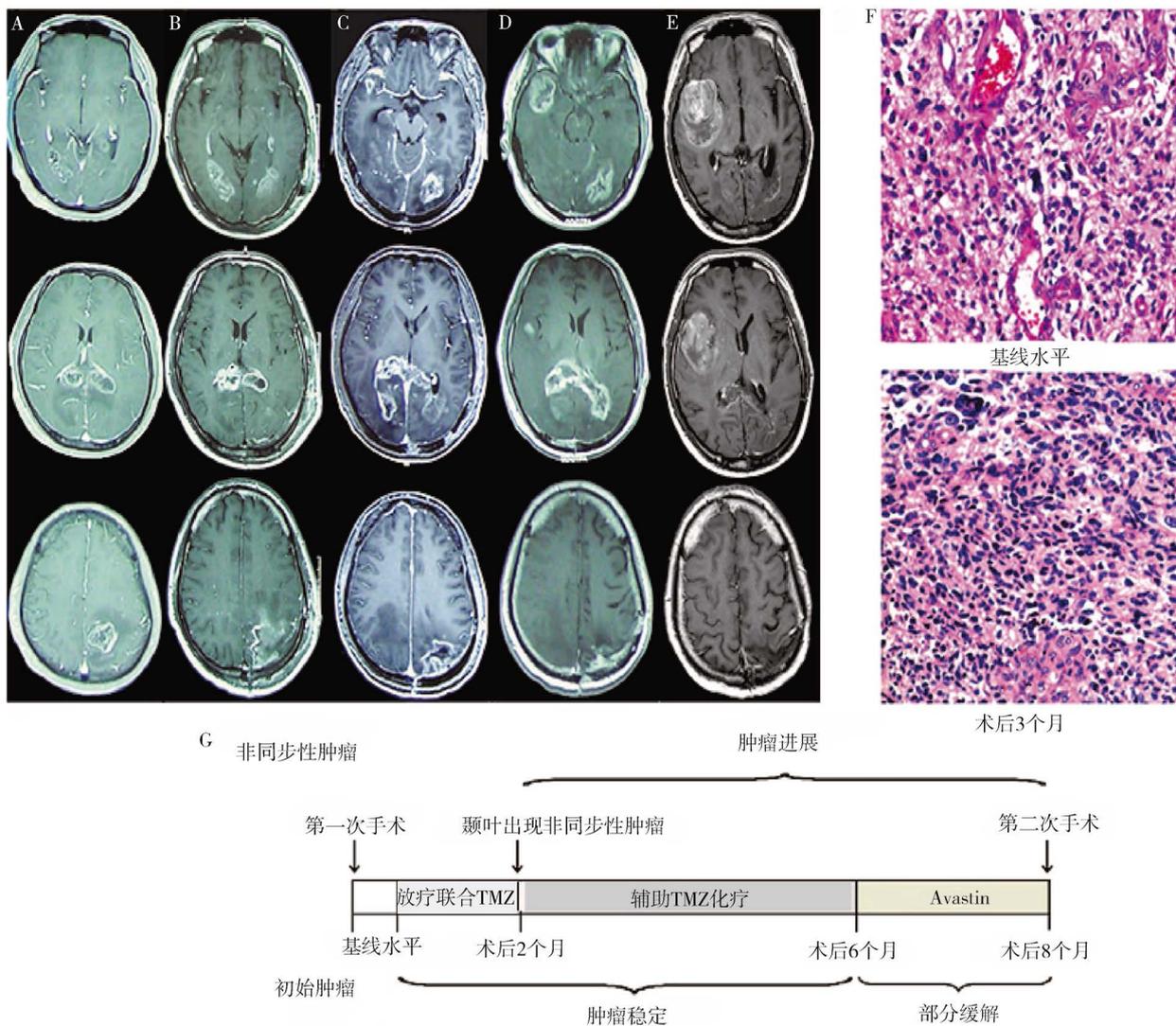


图1 多灶性胶质母细胞瘤患者不同时期磁共振成像检查结果(代表性轴位图像)及临床病程进展

注: A为术前磁共振成像检查图像; B为术后3 d的磁共振成像检查图像; C为术后2个月替莫唑胺放疗结束后患者的磁共振成像检查图像; D为术后6个月开始阿瓦斯汀治疗前的磁共振成像检查图像; E为术后8个月在神经系统恶化时患者的磁共振成像检查图像; F为经苏木精-伊红染色后, 两次手术切除后的肿瘤样本的镜下病理切片; G为患者病情进展过程示意图; TMZ替莫唑胺; Avastin阿瓦斯汀

表1 多灶性胶质母细胞瘤患者原发性和非同步性肿瘤中的单核苷酸变异序列(个)

引物序列	原发性肿瘤	非同步性肿瘤
G->A	13	18
G->C	8	6
G->T	11	12
T->A	5	7
T->C	7	10
T->G	9	12
总计	53	65

先后通过单因素Cox分析以及LASSO回归对差异基因进行降维筛选, 得到每个基因的评分系数, 筛选所得的若干差异基因即视为1个signature, 每个差

异基因的表达量与对应的评分系数相乘之后求和, 即为该患者的风险评分。按照脑胶质瘤分子分型对2个数据库中的患者进行分类, 每类患者按照风险评分, 取其中位数, 分为高风险及低风险, 并依此进行Kaplan-Meier生存曲线分析。

二、结果

1. 原发性和非同步性肿瘤的SNV鉴定: 在原发性肿瘤中检测到14 322个独特的SNV, 在非同步性肿瘤中检测到16 464个SNV, 原发性和非同步性肿瘤之间只有4 744个(33.1%)SNV是共有的, 有66.9%的SNV仅存在于原发性肿瘤中, 而不存在于非同步性肿瘤中, 见图2。分析118个非同义突变后发现, 这些突变发生在原发性或非同步性肿瘤的编码区。

所有118个高通量测序均通过Sanger测序确认了突变。在118个突变中,只有17个(14.4%)在原发性肿瘤和非同步性肿瘤之间都存在, 占有原发性非同义突变的37.8%。比较非同步性肿瘤中特异性突变和TMZ诱导突变的差异, 未发现非同步性肿瘤特异性突变中含有TMZ诱导突变。

2. 原发性和非同步性肿瘤的基因组重排鉴定: 在原发性肿瘤中鉴定31个插入, 43个缺失, 16个染

色体间重排和58个染色体内重排, 见图3A。在非同步性肿瘤中发现一个独特的全景图, 有25个插入, 42个缺失, 163个染色体间重组和38个染色体内重排, 见图3B。

为了证实这些重排, 进一步鉴定易位断点, 该断点在原发性和非同步性肿瘤之间共享, 但在血液基因组DNA中不存在。采用PCR证实重排的连接以及C6-orf145-NFS1融合。直接测序发现原发性肿

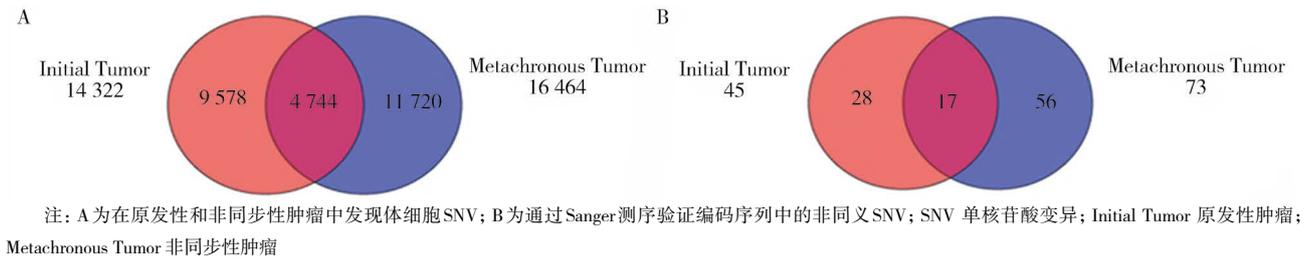


图2 在多灶性胶质母细胞瘤患者的原发性和非同步性肿瘤中发现的SNV

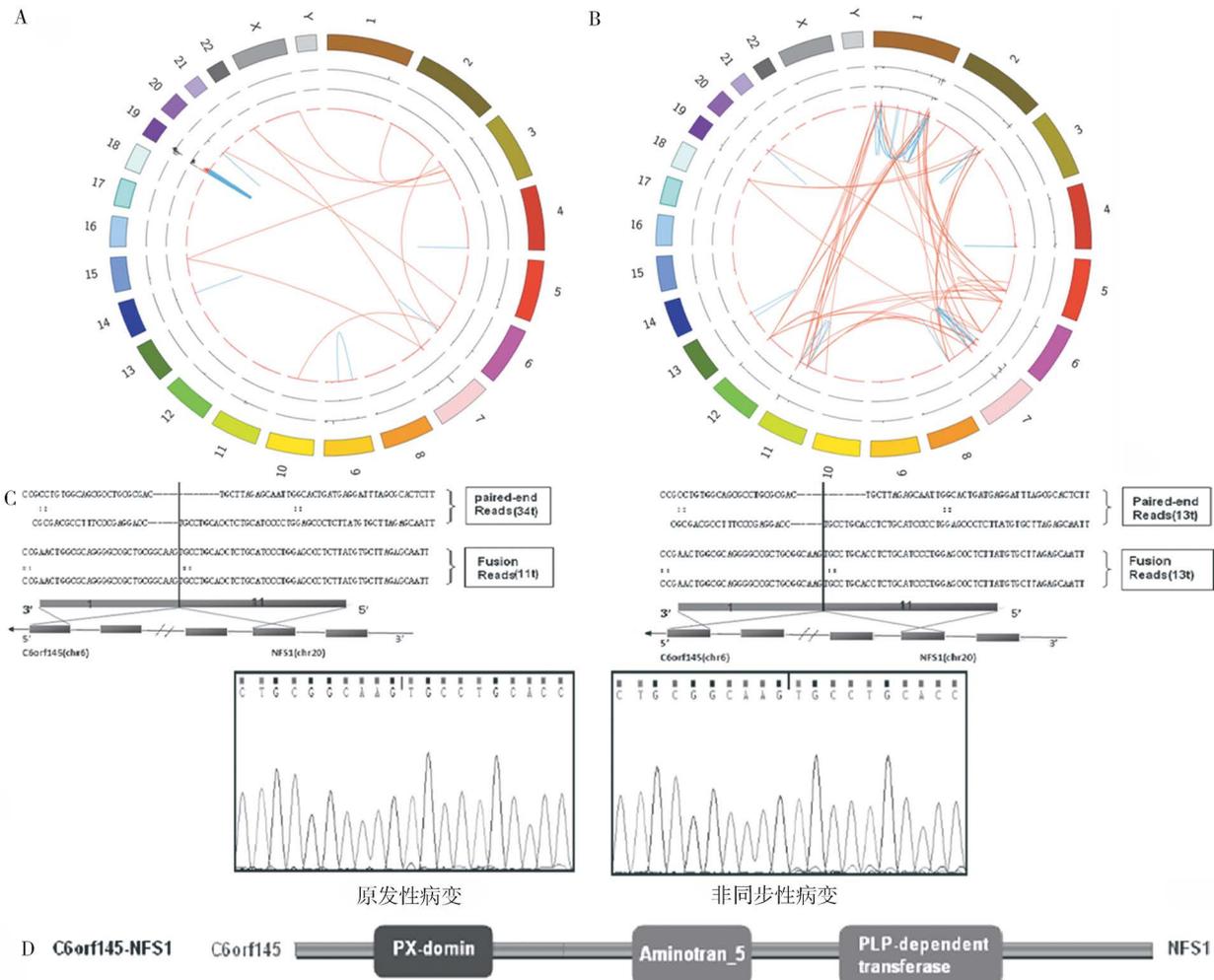


图3 在多灶性胶质母细胞瘤患者原发性和非同步性肿瘤中重排基因组鉴定

表2 在多灶性胶质母细胞瘤患者原发性和非同步性肿瘤中确定的重排基因组

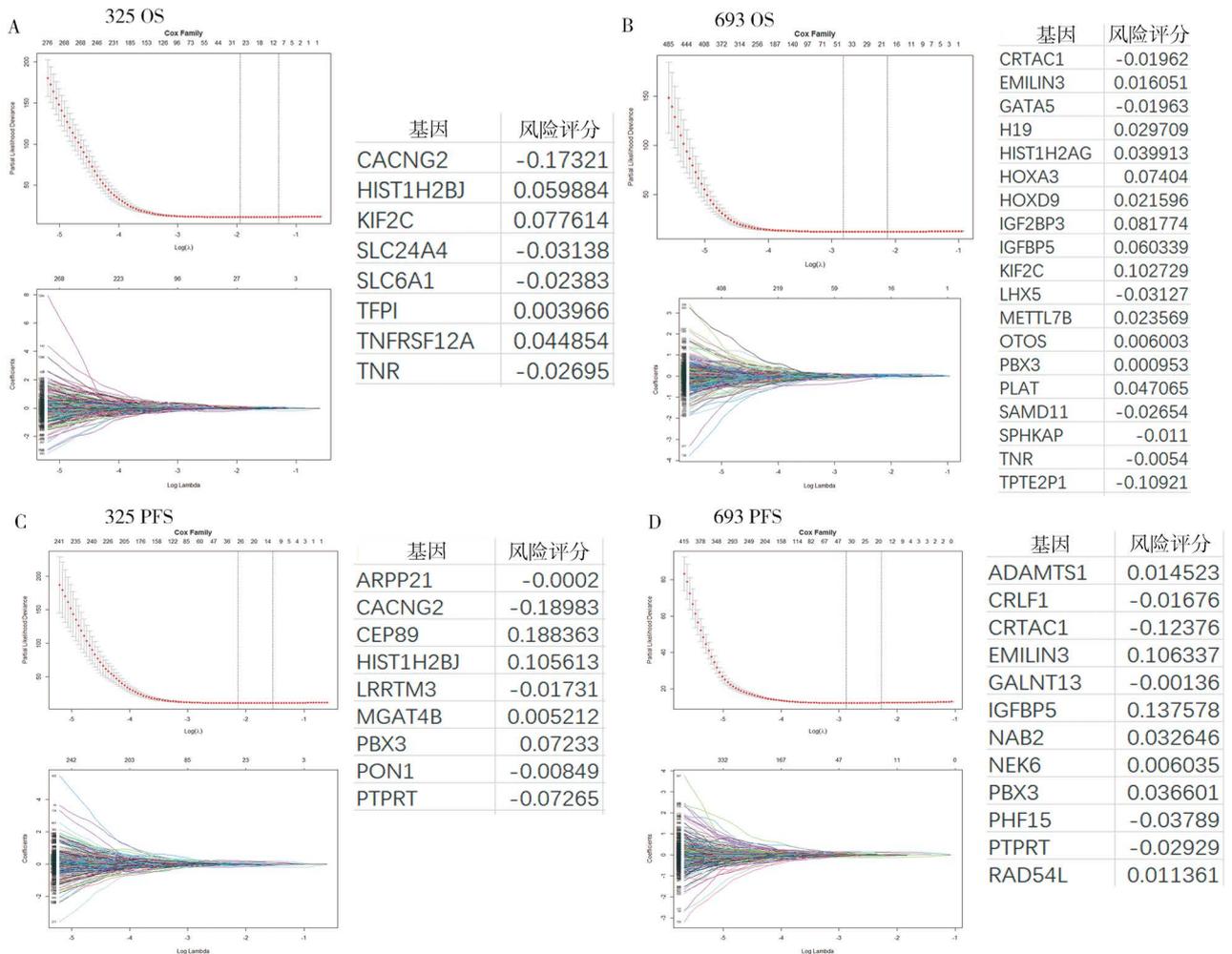
确定的重排基因组	原发性肿瘤	非同步性肿瘤
C6orf145/chr6_3751510/NFS1/chr20_34261606	+	+
MINPP1/chr10_89268290/NCRNA0027/chr6_135963331	+	-
MRPL4/chr19_10365316/FDXIL/chr19_10421616	+	-
SCAPER/chr15_76763553/RBM6/chr3_50085678	+	-
LANCL2/chr7_55479782/DNAH11/chr7_21840755	-	+

注：+为发生基因重排；-为未发生基因重排

瘤和非同步性肿瘤的基因组DNA中的断点连接是相同的, 见图3C。此外, PCR扩增片段测序结果显示, 这些片段包含原发性肿瘤和非同步性肿瘤特有的重排。证实3种重排存在于原发性肿瘤中但不存在于非同步性肿瘤中, 以及1种重排存在于非同步性肿瘤中但不存在于原发性肿瘤中, 见表2。

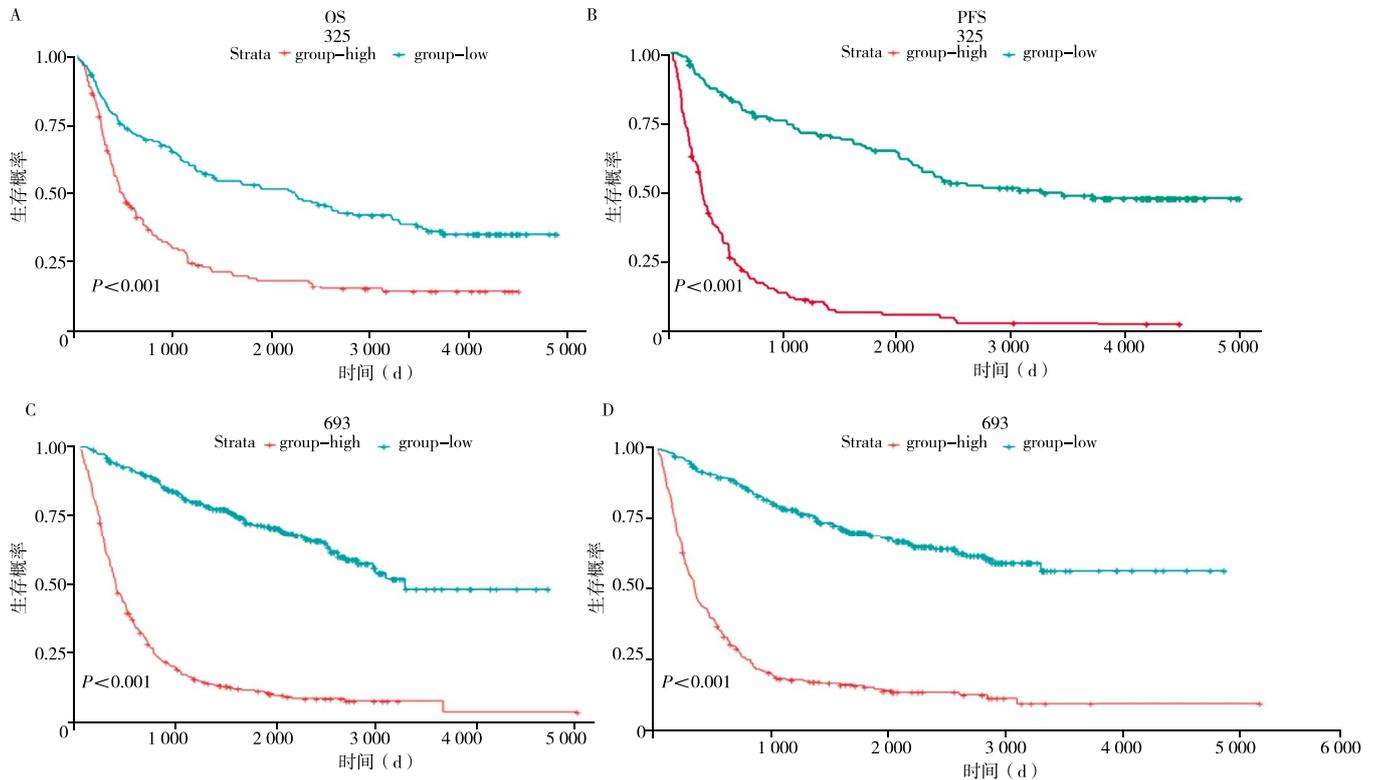
3. 差异基因筛选后的signature及预后分析结果: 差异基因的signature见图4, 以此为依据进行风险评估预后分析, 发现在CGGA_325(325例全级别脑胶质瘤样本)以及CGGA_693(693例全级别脑胶质瘤样本)2个数据库中, 总生存期(overall survival, OS)与无进展生存期(progress free survival, PFS)均差异有统计学意义($P < 0.001$), 低风险组患者的生存优于高风险组患者, 表明通过差异基因所得到的signature可以有效预测患者预后, 见图5。按照脑胶质瘤的分子分型将患者分类, 并分别对其进行预后分析, 见图6、7。

讨论 对M-GBM患者的2个不同位置的基因组进行了测序, 发现祖先克隆的子代细胞先早期分化, 然后平行进化, 产生M-GBM。并且基于M-GBM遗传学变异所发现的一组生物标志物, 与脑胶质瘤的复发和级别进展密切相关。因此, 可根据靶向治



注: A为在CGGA_325数据库中以OS为终点所得的一组差异基因; B为在CGGA_693数据库中以OS为终点所得的一组差异基因; C为在CGGA_325数据库中以PFS为终点所得的一组差异基因; D为在CGGA_693数据库中以PFS为终点所得的一组差异基因; CGGA 中国脑胶质瘤基因组图谱; OS 总生存期; PFS 无进展生存期

图4 CGGA_325和CGGA_693数据库中胶质母细胞瘤样本的差异基因筛选结果



注: A为在CGGA_325数据库中的OS生存曲线; B为在CGGA_325数据库中PFS的生存曲线; C为在CGGA_693数据库中OS的生存曲线; D为在CGGA_693数据库中PFS的生存曲线; CGGA 中国脑胶质瘤基因组图谱; OS 总生存期; PFS 无进展生存期

图5 在CGGA_325和CGGA_693数据库中分别以OS和PFS为标准所得的胶质母细胞瘤样本的Kaplan-Meier生存曲线

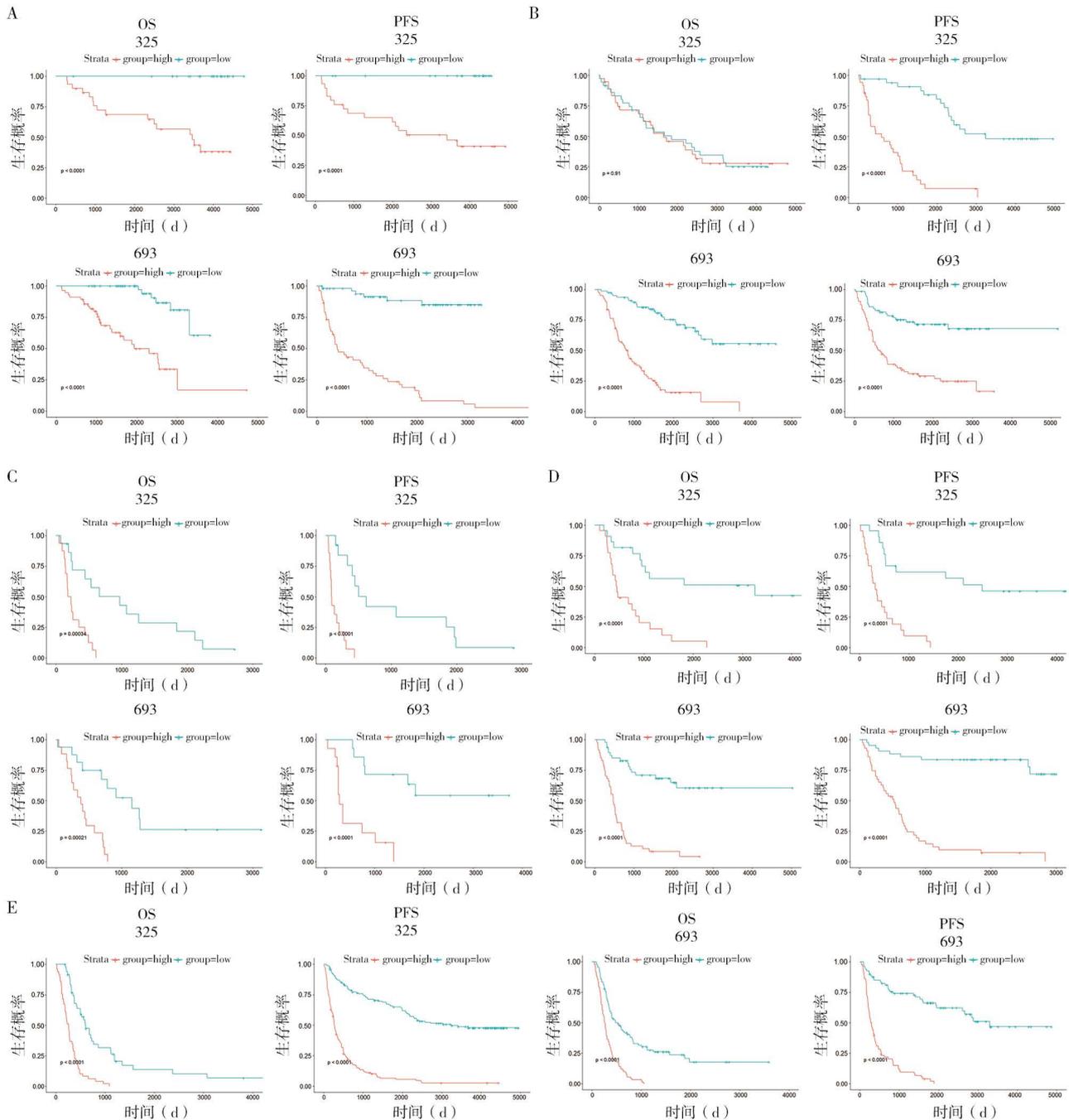
疗策略独立分析不同位置的病变。

目前由于肿瘤标本难以收集, 较少有文献报道异位复发性脑胶质瘤。目前, 系统性癌症进展有两种一般模式。一种模式为将肿瘤细胞置于原发病灶内, 并具有转移性生长所需的完整基因改变库(也称为“线性”或“渐进式”进展)。另一种模式为早期播散性肿瘤细胞引起的平行、独立的转移进展(也称为间断进展)^[5, 13-14]。本研究结果显示, 在遗传方面, 在原发性和非同步性肿瘤中发现了相似的突变谱以及一个共同的融合基因, 表明肿瘤从原发性转变为非同步性。而原发性肿瘤中只有37.8%的突变在复发突变中被发现。此外, Klein^[5]的临床研究未显示随着肿瘤大小变化和转移, 负荷血液中循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)的播散增加, 并且表明当渐进进化发生时, 转移肿瘤比原发肿瘤的畸变更少。鉴于脑脊液中存在CTC的可能性较小, 本研究结果显示, 患者复发肿瘤的大小比原发肿瘤大, 复发进展预测的差异比原发病变大, 强调基因和转录组改变位点的特异性选择。

相关研究在替莫唑胺+放射治疗和阿瓦斯丁治疗后对患者的非同步性病变进行了分析, 结果显示

病变最初的基因是相同的, 不同的突变谱是由治疗剂的诱变效应引起的^[15]。然而, 66.9%的原发性肿瘤中, 没有发现SNV在非同步性肿瘤存在。本研究将患者基线检查6个月后的MRI结果与基线期进行比较, 显示替莫唑胺+放射治疗后肿瘤持续生长的临床病史。通过TCGA对替莫唑胺+放射治疗的GBM标本进行直接测序以及模式生物中的突变谱分析表明, 放射治疗/替莫唑胺的主要致突变作用涉及G→A转换的积累^[16-20]。在非同步性病变中, 没有发现该事件的增加, 这表明肿瘤对替莫唑胺+放射治疗的作用有抵抗力。虽然与阿瓦斯丁有关的缺氧也可能导致突变, 但这种效应比放射治疗和替莫唑胺的效应低几个数量级^[21-24]。因此, 缺氧对原发性和非同步性肿瘤突变谱之间的差异无统计学意义。

一项使用基因定义的小鼠模型的研究表明, 在某些GBM的发病过程中, 侵袭过程先于肿瘤肿块的形成^[25]。Abou-El-Ardat等^[26]分析了6例新诊断为GBM多发性同步病变患者的12个病灶, 在所有患者中均发现PTEN和TERT启动子点突变的单拷贝缺失这2个早期事件, 表明M-GBM是通过平行遗传进化发展而来的。然而, 3条主要途径的晚期出现表

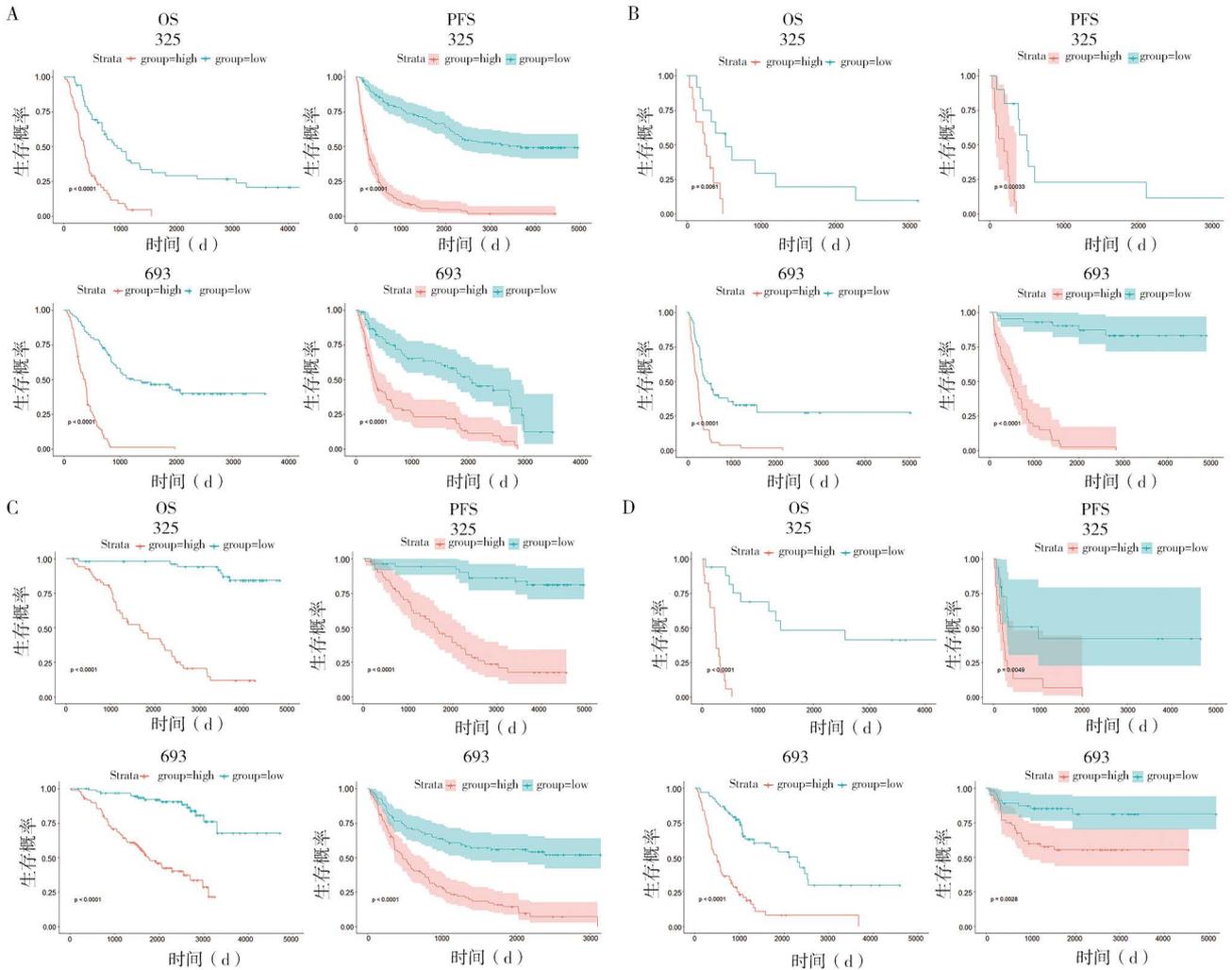


注：A为IDH突变型1p19q联合缺失的患者在2个数据库中的OS和PFS生存曲线；B为IDH突变型1p19q非联合缺失WHO 2~3级的患者在2个数据库中的OS和PFS生存曲线；C为IDH突变型1p19q非联合缺失WHO 4级的患者在2个数据库中的OS和PFS生存曲线；D为IDH野生型WHO 2~3级的患者在2个数据库中的OS和PFS生存曲线；E为IDH野生型WHO 4级的患者在2个数据库中的OS和PFS生存曲线；在CGGA_325数据库中IDH突变型1p19q非联合缺失WHO 2~3级患者的OS生存曲线比较， $P=0.91$ ；其他生存曲线比较，均 $P < 0.001$ ；CGGA中国脑胶质瘤基因组图谱；IDH异柠檬酸脱氢酶；OS总生存期；PFS无进展生存期；WHO世界卫生组织

图6 在CGGA_325和CGGA_693数据库中不同WHO分级的IDH突变型和野生型胶质母细胞瘤样本的Kaplan-Meier生存曲线

明它们是亚克隆驱动因素。本研究对同一患者的多位点标本进行了测序，显示只有约30%的SNV在原发性肿瘤和非同步性肿瘤之间共享。进一步对118个发生在原发性肿瘤或非同步性肿瘤编码区的非同义突变进行了测序，显示在118个突变中，只有14.4%的突变是肿瘤间的共同突变。Lee等^[27]和Koren等^[28]

研究了5例M-GBM患者13个样本的突变谱，发现PIK3CA的非同义突变丰富，可诱导乳腺肿瘤的多能性，表明其在肿瘤多样性中的关联作用。Liu等^[29]发现M-GBM没有IDH1、ATRX或PDGFRA突变，并且与间充质亚型存在相关性，而且CYB5R2基因在M-GBMs22中的低甲基化和高表达。相关融合基因



注: A为IDH野生型原发肿瘤的患者在2个数据库中的OS和PFS生存曲线; B为IDH野生型复发肿瘤的患者在2个数据库中的OS和PFS生存曲线; C为IDH突变型原发肿瘤的患者在2个数据库中的OS和PFS生存曲线; D为IDH突变型复发肿瘤的患者在2个数据库中的OS和PFS生存曲线; 生存曲线比较, 均 $P < 0.0001$; CCGA中国脑胶质瘤基因组图谱; IDH异柠檬酸脱氢酶; OS总生存期; PFS无进展生存期; WHO世界卫生组织

图7 在CGGA_325和CGGA_693数据库中不同IDH分型的原发和复发胶质母细胞瘤样本的Kaplan-Meier生存曲线

还需进一步的基因组学和机制分析。

其他研究也揭示了M-GBMs的一些基本特征。据报道, p53突变与多灶性GBM之间存在关联, p53突变模式与肿瘤转移和生长增强相关^[30]。在另一项研究中, GBM中高表达的生长因子受体c-Met与MRI初始成像的侵袭性和多灶性特征有关^[31]。Shakur等^[32]报道了1例M-GBM, 并在3个GBM样本中均发现强阳性的GFAP蛋白免疫染色。

本研究结果表明, M-GBM是由一个祖先克隆的子代起始细胞产生的, 该克隆在大脑内经历了地理位置的分离, 随后发生了平行进化^[33]。由于只分析了一对非同步性肿瘤, 不能排除其他M-GBM是由单亲克隆产生的侵袭性子细胞引起的可能性。然而, 本研究结果显示, 基于M-GBM的生物标志物谱可预

测肿瘤复发风险, 这些生物标志物可作为M-GBM或复发GBM的治疗靶点。从进化的角度来看, 非同步性肿瘤的不同突变模式是对不同的局部微环境和选择压力的反应^[13]。本研究阐明了不同位置、时序进展的M-GBM样本的遗传特征, 从而指导M-GBM靶向治疗的重要性。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 研究设计为保肇实、李守巍、游赣, 研究实施、资料收集、论文撰写、论文修订为保肇实、王嘉义

参 考 文 献

[1] Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial[J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(5): 459-466. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7.

- [2] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(10): 987-996. DOI: 10.1056/NEJMoa043330.
- [3] Kotliarova S, Fine HA. SnapShot: glioblastoma multiforme[J]. *Cancer Cell*, 2012, 21 (5): 710-710, e1. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.04.031.
- [4] Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(5): 492-507. DOI: 10.1056/NEJMra0708126.
- [5] Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(4): 302-312. DOI: 10.1038/nrc2627.
- [6] Yates LR, Campbell PJ. Evolution of the cancer genome[J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(11): 795-806. DOI: 10.1038/nrg3317.
- [7] Hassaneen W, Levine NB, Suki D, et al. Multiple craniotomies in the management of multifocal and multicentric glioblastoma. Clinical article[J]. *J Neurosurg*, 2011, 114(3): 576-584. DOI: 10.3171/2010.6.JNS091326.
- [8] Parsa AT, Wachhorst S, Lamborn KR, et al. Prognostic significance of intracranial dissemination of glioblastoma multiforme in adults[J]. *J Neurosurg*, 2005, 102(4): 622-628. DOI: 10.3171/jns.2005.102.4.0622.
- [9] Patil CG, Yi A, Elramsisy A, et al. Prognosis of patients with multifocal glioblastoma: a case-control study[J]. *J Neurosurg*, 2012, 117(4): 705-711. DOI: 10.3171/2012.7.JNS12147.
- [10] Lafitte F, Morel-Precetti S, Martin-Duverneuil N, et al. Multiple glioblastomas: CT and MR features[J]. *Eur Radiol*, 2001, 11(1): 131-136. DOI: 10.1007/s003300000538.
- [11] Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ, et al. The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer[J]. *Nature*, 2010, 467(7319): 1109-1113. DOI: 10.1038/nature09460.
- [12] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(2): 195-201. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti770.
- [13] Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer[J]. *Nature*, 2012, 481(7381): 306-313. DOI: 10.1038/nature10762.
- [14] Navin N, Kendall J, Troge J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing[J]. *Nature*, 2011, 472(7341): 90-94. DOI: 10.1038/nature09807.
- [15] Friedberg E, Walker G, Siede WS. DNA repair and mutagenesis[M]. Washington DC: American Society for Microbiology, 1995.
- [16] Glassner BJ, Weeda G, Allan JM, et al. DNA repair methyltransferase (Mgmt) knockout mice are sensitive to the lethal effects of chemotherapeutic alkylating agents[J]. *Mutagenesis*, 1999, 14(3): 339-347. DOI: 10.1093/mutage/14.3.339.
- [17] Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways[J]. *Nature*, 2008, 455 (7216): 1061-1068. DOI: 10.1038/nature07385.
- [18] Vidal A, Abril N, Pueyo C. DNA sequence analysis of spontaneous lacI-d mutations in O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase-proficient and -deficient *Escherichia coli*[J]. *Mutagenesis*, 1998, 13(4): 367-373. DOI: 10.1093/mutage/13.4.367.
- [19] Wolf P, Hu YC, Doffek K, et al. O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase promoter hypermethylation shifts the p53 mutational spectrum in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(22): 8113-8117.
- [20] Chen CC, Motegi A, Hasegawa Y, et al. Genetic analysis of ionizing radiation-induced mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae* reveals TransLesion Synthesis (TLS) independent of PCNA K164 SUMOylation and ubiquitination[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2006, 5(12): 1475-1488. DOI: 10.1016/j.dnarep.2006.07.007.
- [21] Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(3): 180-192. DOI: 10.1038/nrc2344.
- [22] Keysar SB, Trncic N, Larue SM, et al. Hypoxia/reoxygenation-induced mutations in mammalian cells detected by the flow cytometry mutation assay and characterized by mutant spectrum[J]. *Radiat Res*, 2010, 173(1): 21-26. DOI: 10.1667/RR1838.1.
- [23] Li CY, Little JB, Hu K, et al. Persistent genetic instability in cancer cells induced by non-DNA-damaging stress exposures[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(2): 428-432.
- [24] Reynolds TY, Rockwell S, Glazer PM. Genetic instability induced by the tumor microenvironment[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(24): 5754-5757.
- [25] Sampetean O, Saga I, Nakanishi M, et al. Invasion precedes tumor mass formation in a malignant brain tumor model of genetically modified neural stem cells[J]. *Neoplasia*, 2011, 13(9): 784-791. DOI: 10.1593/neo.11624.
- [26] Abou-El-Ardat K, Seifert M, Becker K, et al. Comprehensive molecular characterization of multifocal glioblastoma proves its monoclonal origin and reveals novel insights into clonal evolution and heterogeneity of glioblastomas[J]. *Neuro Oncol*, 2017, 19(4): 546-557. DOI: 10.1093/neuonc/now231.
- [27] Lee JK, Wang J, Sa JK, et al. Spatiotemporal genomic architecture informs precision oncology in glioblastoma[J]. *Nat Genet*, 2017, 49(4): 594-599. DOI: 10.1038/ng.3806.
- [28] Koren S, Reavie L, Couto JP, et al. PIK3CA(H1047R) induces multipotency and multi-lineage mammary tumours[J]. *Nature*, 2015, 525(7567): 114-118. DOI: 10.1038/nature14669.
- [29] Liu Q, Liu Y, Li W, et al. Genetic, epigenetic, and molecular landscapes of multifocal and multicentric glioblastoma[J]. *Acta Neuropathol*, 2015, 130(4): 587-597. DOI: 10.1007/s00401-015-1470-8.
- [30] Krex D, Mohr B, Appelt H, et al. Genetic analysis of a multifocal glioblastoma multiforme: a suitable tool to gain new aspects in glioma development[J]. *Neurosurgery*, 2003, 53(6): 1377-1384. DOI: 10.1227/01.neu.0000093426.29236.86.
- [31] Kong DS, Song SY, Kim DH, et al. Prognostic significance of c-Met expression in glioblastomas[J]. *Cancer*, 2009, 115(1): 140-148. DOI: 10.1002/encr.23972.
- [32] Shakur SF, Bit-Ivan E, Watkin WG, et al. Multifocal and multicentric glioblastoma with leptomeningeal gliomatosis: a case report and review of the literature[J]. *Case Rep Med*, 2013, 2013: 132679. DOI: 10.1155/2013/132679.
- [33] Gray JW. Evidence emerges for early metastasis and parallel evolution of primary and metastatic tumors[J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(1): 4-6. DOI: 10.1016/s1535-6108(03)00167-3.

(收稿日期: 2022-04-11)

(本文编辑: 赵金鑫)