

IDH1 基因检测联合 CD-DST 药敏指导胶质瘤术后辅助化疗的临床应用分析

张 烨, 孙佩欣, 隋 锐, 梁海洋, 张桂荣, 朴浩哲

(中国医科大学附属肿瘤医院, 辽宁省肿瘤医院, 辽宁 沈阳 110042)

摘 要: [目的] 研究胶质瘤中异柠檬酸脱氢酶 1 (isocitrate dehydrogenase 1, IDH1) 突变和胶质瘤药敏检测技术 (CD-DST) 结果的关联性及其指导术后辅助化疗方案的疗效分析。[方法] 收集手术切除并经病理证实的高级别脑胶质瘤组织 57 例, 新鲜标本分别对替莫唑胺等 5 种化疗药物进行 CD-DST 检测指导治疗方案, 同时采用直接测序法检测肿瘤组织中 IDH1 基因突变情况, 分析两者相关性。以 CD-DST 检测结果为指导治疗患者 57 例, 比较 16 例行指导规范治疗与未行指导规范治疗患者的生存情况。[结果] 57 例高级别脑胶质瘤患者中 IDH1 突变 13 例 (22.8%), IDH1 突变患者中位总生存时间显著性优于 IDH1 未突变患者 (12.0 个月 vs 7.5 个月, $P=0.002$)。IDH1 突变患者的替莫唑胺、Vp-16、卡铂和卡莫司汀的体外敏感率高于无 IDH1 突变的患者, 而顺铂敏感性在有无突变组差异无统计学意义。CD-DST 指导的行规范治疗与未行规范治疗患者的中位总生存时间分别为 12 个月和 8 个月, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。IDH1 突变联合 CD-DST 敏感指导规范治疗患者的中位总生存时间为 14 个月, 显著性优于其他组别 ($P=0.019$)。[结论] IDH1 基因检测联合 CD-DST 技术对于高级别脑胶质瘤术后辅助化疗方案具有一定的临床指导价值。

关键词: 胶质瘤; 异柠檬酸脱氢酶 1; 胶质瘤药敏检测技术; 替莫唑胺

中图分类号: R739.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)03-0226-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.03.B010

Clinical Application of IDH1 Mutations and CD-DST Technology in Adjuvant Chemotherapy in Gliomas

ZHANG Ye, SUN Pei-xin, SUI Rui, et al.

(Cancer Hospital of China Medical University, Liaoning Cancer Hospital & Institute, Shenyang 110042, China)

Abstract: [Objective] To investigate the relationship between isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutations and the feasibility of collagen gel droplet-embedded culture drug sensitivity test (CD-DST) in adjuvant chemotherapy in gliomas. [Methods] The surgery specimens of 57 patients with high grade gliomas were collected and carried out the CD-DST test for temozolomide and other drugs. IDH1 mutations were detected by direct sequencing method. Compared with control, 16 patients were included in pilot group receiving chemotherapy guided by CD-DST. Overall survival was compared between the pilot group and control group. [Results] IDH1 mutations were demonstrated in 13 of 57 cases (22.8%). Median overall survival was superior in IDH1 mutant group than that in IDH1 wild group (12.0 months vs 7.5 months, $P=0.002$). The sensitivity of temozolomide, Vp-16, carboplatin and carmustine were higher in IDH1 mutant group than that in IDH1 wild group. No difference was found in sensitivity of cisplatin between the two groups. The median overall survival were 12 months and 8 months in pilot and control group ($P>0.05$). The median overall survival were longest in patients with guided by IDH1 mutation combined with CD-DST (14 months) than other groups. [Conclusion] IDH1 mutant detection combined with CD-DST technology has a certain value in adjuvant chemotherapy in high grade gliomas.

Subject words: glioma; isocitrate dehydrogenase 1; CD-DST; temozolomide

神经胶质瘤简称胶质瘤, 是发生于神经外胚层的肿瘤, 约占所有颅内肿瘤的 45% 左右, 年发病率

约 3.5/10 万~4.5/10 万。自 NCCN 指南提出以手术结合辅助放化疗的综合治疗作为恶性胶质瘤的标准治疗策略以来, 其治疗效果取得了一定的改善, 但总体生存获益仍不乐观, 我国胶质瘤的临床诊疗水平总体仍滞后于发达国家^[1,2]。临床医生对高级别胶质瘤术后辅助化疗大多参照 NCCN 指南推荐, 同一类型和同一阶段的患者采用相同化疗方案后的临床疗效

基金项目: 辽宁省省直临床建设项目 (LNCCC-B04-2015); 辽宁省科学事业公益研究基金 (2014001008); 辽宁省中央引导地方科技发展专项项目 (2017106014)

通讯作者: 朴浩哲, 院长, 主任医师, 博士; 辽宁省肿瘤医院神经外科, 辽宁省沈阳市大东区小河沿路 44 号 (110042); E-mail: pzpy@163.com

收稿日期: 2017-11-08; **修回日期:** 2017-12-29

差异较大,与肿瘤异质性相关。胶滴肿瘤药敏检测技术(collagen gel droplet-embedded culture drug sensitivity test, CD-DST) 是一种三维立体的化疗药物体外药敏检测技术,较传统 MTT 法检测准确率更高,广泛应用于肺癌、乳腺癌等实体肿瘤的体外药敏指导临床化疗策略^[3]。CD-DST 在 40 例晚期结直肠癌患者针对氟尿嘧啶和顺铂评价疗效,显示两者具有协同作用,增幅达 2 倍^[4]。CD-DST 在肺癌和妇科肿瘤中具有较高临床预测价值。

异柠檬酸脱氢酶 1 (isocitrate dehydrogenase 1, IDH1)是真核生物三羧酸循环中关键酶之一,其基因突变具有胶质瘤特异性,且与胶质瘤的诊断和预后密切相关^[5]。最新研究报道 IDH1 基因突变介导 PARP 通路 DNA 修复增加胶质瘤细胞株对替莫唑胺的化疗敏感性^[6],在体肿瘤组织的 IDH1 基因突变与替莫唑胺等化疗药物的敏感相关性较少报道。本研究旨在通过分析 57 例高级别胶质瘤患者术后体外药敏试验联合 IDH1 基因检测结果,以指导术后辅助化疗治疗,建立高级别胶质瘤个体化规范化治疗体系。

1 资料与方法

1.1 标本来源

2015 年 1 月至 2017 年 2 月在中国医科大学肿瘤医院/辽宁省肿瘤医院就诊的高级别胶质瘤患者 57 例,手术切取癌组织块行体外 CD-DST 药敏试验和 IDH1 基因突变检测。切取的标本 2h 内送实验室处理,余均送病理学检查确诊。57 例患者中男性 32 例,女性 25 例;年龄 40~78 岁,平均 60.6 岁。病理分级:胶质瘤 3 级 22 例,4 级 35 例。采用电话方式随访,中位随访时间 18 个月(2~32 个月)。

1.2 基因组 DNA 提取

按照 DNA 抽提试剂盒操作说明进行 DNA 的提取,Nanodrop1000 核酸定量仪测定 DNA 浓度,要求光密度(OD)值(A260nm/280nm)在 1.7~1.9 之间,符合纯度要求,凝胶电泳检测 DNA 的质量,-20℃保存备用。

1.3 直接测序法

取每个样本 60ng DNA,采用 PCR 方法对 IDH1 基因的 4 号外显子进行扩增。采用 ABI3700 测序仪

对扩增产物测序,基因突变结果分析采用 Sequencher4.7 软件。

1.4 胶滴肿瘤药敏检测(CD-DST)

试验药物:替莫唑胺、Vp-16、顺铂、卡铂和卡莫司汀。各试验药物分别为:替莫唑胺 2mg/L、Vp-16 1.6mg/L、顺铂 0.5mg/L、卡铂 3mg/L 和卡莫司汀 0.6mg/L。试验步骤:先修剪标本,剪去脂肪组织和纤维组织。标本以除菌洗涤液浸洗 10min 共 2 次,切成 0.5mm³~1.0mm³ 组织块,切碎成泥状,加入培养基移入胶原凝胶包被培养瓶,培养并制成胶原原液,滴注到 6 孔板制成胶原凝胶滴,每孔接种 3 滴。待药物处理后进行固定染色,测定光密度值。T 值为药物处理后的光密度值,C 为对照的光密度值,T/C 值表示相对增殖率,其数值越低表明抑制越强,试验药物越敏感。

1.5 统计学处理

数据分析采用 SPSS21.0 软件进行分析,计数资料使用 χ^2 检验,Kaplan-Meier 法绘制生存曲线。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高级别脑胶质瘤 IDH1 突变分布及总生存期

57 例高级别脑胶质瘤患者中 IDH1 突变 13 例,占 22.8%。IDH1 突变患者与 IDH1 未突变患者的年龄分布、病理分级差异有统计学意义,而两组性别和放疗情况差异无统计学意义(Table 1)。IDH1 突变的高级别胶质瘤患者的中位总生存时间显著性优于 IDH1 未突变患者(12.0 个月 vs 7.5 个月, $P=0.002$)(Figure 1)。

2.2 高级别脑胶质瘤 CD-DST 检测药敏结果

IDH1 突变者的替莫唑胺、Vp-16、卡铂、卡莫司汀和顺铂的体外增殖率 T/C 值分别为 61.51%、61.83%、70.61%、68.99%和 69.64%,而 IDH1 未突变者的上述药物 T/C 值分别为 71.58%、79.31%、80.07%、81.47%和 67.76%。IDH1 突变者的替莫唑胺、Vp-16、卡铂和卡莫司汀的体外敏感率高于 IDH1 未突变者,而顺铂敏感性在 IDH1 突变和未突变两组间差异无统计学意义。IDH1 突变与 Vp-16 及卡莫司汀敏感性相关($P=0.004$, $P=0.012$),而与替莫唑胺、卡铂和顺铂敏感性无明显相关性($P=0.194$, $P=$

Table 1 Clinical characterictis in high-grade gliomas patients with mutant IDH1 and wild IDH1

Index	IDH1mutant (n=13)	IDH1wild (n=44)	χ^2	P
Age(years old)				
≥60	2	26	6.021	0.006
<60	11	18		
Gender				
Male	6	26	0.711	0.304
Female	7	18		
Grade				
Gilomas III	8	14	2.802	0.042
Gilomas IV	6	29		
Radiation				
Yes	8	24	0.196	0.347
No	5	20		

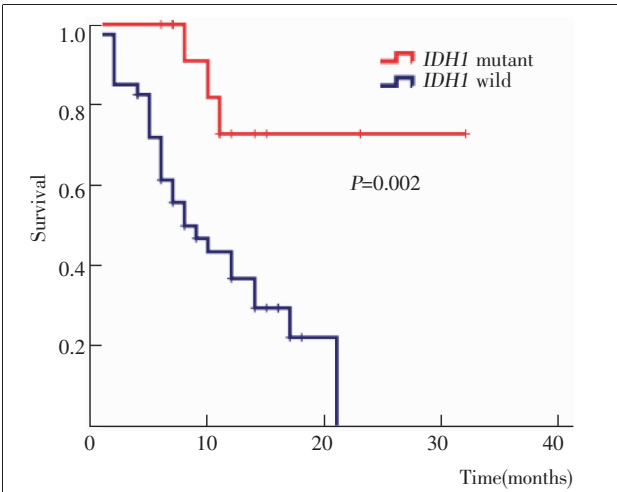


Figure 1 Overall survival curve in high-grade gliomas patients with IDH1 mutant and IDH1 wild

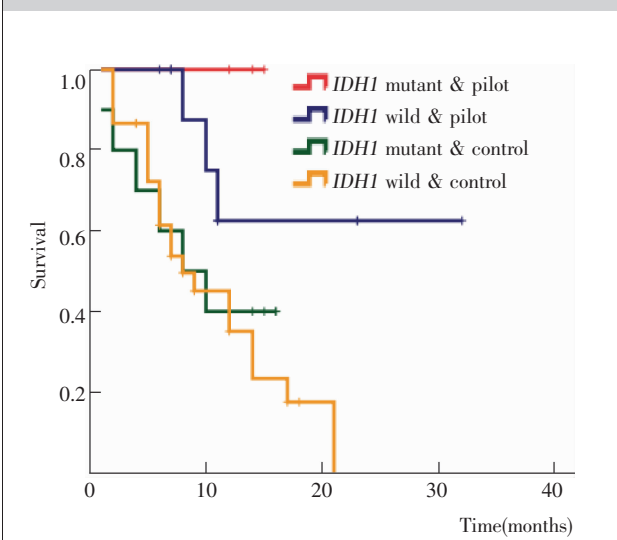


Figure 2 Overall survival curve in patients with IDH1 mutant/wild and pilot/control groups

0.056, $P=0.737$).

CD-DST 指导的行规范治疗患者共 16 例, IDH1 突变组 4 例, IDH1 未突变组 12 例。指导化疗方案以替莫唑胺单药为主, 共计 11 例, 其他方案包括替莫唑胺联合 Vp-16 1 例、顺铂联合卡莫司汀 2 例、卡莫司汀联合 Vp-16 1 例和卡莫司汀单药 1 例(Table 2)。

Table 2 Chemotherapy regimen guided by CD-DST in high-grade gliomas patients

Chemotherapy regimen	Total (n=16)	IDH1 mutant (n=4)	IDH wild (n=12)
Temozolomide	11	3	8
Temozolomide +Vp-16	1	0	1
Cisplatin+ carmustine	2	0	2
Carmustine +Vp-16	1	1	0
Carmustine	1	0	1

2.3 IDH1 突变联合 CD-DST 指导治疗者的生存情况

CD-DST 指导的行规范治疗者中位总生存时间为 12 个月, 略优于未行规范化治疗者 8 个月, 但差异无统计学意义 ($P=0.475$)。亚组分析中, IDH1 突变联合 CD-DST 敏感指导规范治疗者的中位总生存时间为 14 个月, 显著性优于其他组别 (IDH1 突变未行规范治疗者为 9 个月、IDH1 未突变且行规范治疗者为 11 个月和 IDH1 未突变且未行规范治疗者为 7 个月), 两组差异有统计学意义 ($P=0.019$) (Figure 2)。

3 讨 论

神经胶质瘤是颅内常见肿瘤之一, 占中枢神经系统肿瘤 32% 以上, 其中一半以上为恶性胶质瘤。研究报道术后辅助化疗联合全脑放疗的恶性神经胶质瘤的中位生存期仅 12~15 月, 5 年生存率不到 10%^[1,2]。化疗作为胶质瘤的主要治疗手段之一, 其在胶质瘤治疗中的地位是其他治疗手段无法替代的, 然而肿瘤细胞对化疗药物耐药是化疗治疗失败的最主要原因之一。IDH1 是真核生物三羧酸循环中关键酶之一, 其基因突变具有胶质瘤特异性, 且与胶质瘤的诊断和预后密切相关^[5,7]。IDH1 基因突变检测包括直接测序法和免疫组化法等, 两者存在一定差异, 由于免疫组化方法局限于热点突变, 直接测序法能提供更多的信息^[8]。本研究 57 例高级别脑胶质瘤患者中 IDH1 突变 13 例, 占 22.8%。IDH1 突变抑制 STAT1 和 CD8+T 细胞富集, 靶向 IDH1 突变可能增加患者的免疫功能^[9]。最新研究报道 IDH1 基因突变介导

PARP 通路 DNA 修复增加胶质瘤细胞株对替莫唑胺的化疗敏感性^[10]。抑制 PLK1 增加 *IDH1* 基因突变的胶质瘤细胞株对替莫唑胺的敏感度, 以及通过 AKT-mTOR 通路增加 5-Fu 的化疗敏感性^[11-13]。在高级别胶质瘤中 *IDH1* 基因突变沉默 XAF1 与改善生存相关^[5,14]。本研究中 *IDH1* 突变的高级别胶质瘤患者的中位总生存时间显著性优于 *IDH1* 未突变的患者(12.0 个月 vs 7.5 个月), 结果与上述研究相似。

靶向 *IDH1* 新突变体是胶质瘤在内的恶性肿瘤靶向治疗的研究热点^[15-17], 在临床前研究证实靶向抑制 *IDH1* 能降低细胞内代谢产物 2-HG 的蓄积, I 期临床试验在胶质瘤在内的存在 *IDH1* 突变的血液学和实体肿瘤体现出良好的临床疗效和安全性^[18,19]。*IDH1* 突变体可以作为靶标, 也能成为预后和预测疗效的生物标志物, 甚至 *IDH1* 突变体所致 2-HG 在血清和尿液中的高水平均有提示预后作用^[20,21]。

CD-DST 指导恶性肿瘤治疗在乳腺癌和结直肠癌都有数据报道, 本研究结果显示 CD-DST 指导的行规范治疗者中位总生存时间为 12 个月, 略优于未行规范化治疗者的 8 个月, 但差异无统计学意义 ($P=0.475$)。而在亚组分析中, *IDH1* 突变联合 CD-DST 敏感指导规范治疗者的中位总生存时间为 14 个月, 显著性优于其他组别 ($P=0.019$), 验证并显示 CD-DST 应用于高级别脑胶质瘤的指导意义, 尤其是联合 *IDH1* 突变在高级别脑胶质瘤中具有预后和预测作用。

总之, 本研究表明 *IDH1* 基因检测联合 CD-DST 技术对于指导高级别脑胶质瘤术后辅助化疗方案具有一定的临床指导价值, 具有预后和预测两方面作用, 为建立高级别胶质瘤个体化规范化治疗体系提供依据。

参考文献:

- [1] Wang X, Jia Y, Wang P, et al. Current status and future perspectives of sonodynamic therapy in glioma treatment [J]. Ultrason Sonochem, 2017, 37: 592-599.
- [2] Braunstein S, Raleigh D, Bindra R, et al. Pediatric high-grade glioma: current molecular landscape and therapeutic approaches [J]. J Neurooncol, 2017, 134(3): 574-579.
- [3] Miyazaki R, Anayama T, Hirohashi K, et al. In vitro drug sensitivity tests to predict molecular target drug responses in surgically resected lung cancer [J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0152665.
- [4] Mori S, Kunieda K, Sugiyama Y, et al. Prediction of 5-fluorouracil and cisplatin synergism for advanced gastrointestinal cancers using a collagen gel droplet embedded culture [J]. Surg Today, 2003, 33(8): 577-583.
- [5] Reich TR, Switzeny OJ, Renovanz M, et al. Epigenetic silencing of XAF1 in high-grade gliomas is associated with *IDH1* status and improved clinical outcome [J]. Oncotarget, 2017, 8(9): 15071-15084.
- [6] Lu Y, Kwintkiewicz J, Liu Y, et al. Chemosensitivity of *IDH1*-mutated gliomas due to an impairment in PARP1-mediated DNA repair [J]. Cancer Res, 2017, 77(7): 1709-1718.
- [7] Ohno M, Narita Y, Miyakita Y, et al. Glioblastomas with *IDH1/2* mutations have a short clinical history and have a favorable clinical outcome [J]. Jpn J Clin Oncol, 2016, 46(1): 31-39.
- [8] Agarwal S, Sharma MC, Jha P, et al. Comparative study of *IDH1* mutations in gliomas by immunohistochemistry and DNA sequencing [J]. Neuro Oncol, 2013, 15(6): 718-726.
- [9] Kohanbash G, Carrera DA, Shrivastav S, et al. Isocitrate dehydrogenase mutations suppress STAT1 and CD8+ T cell accumulation in gliomas [J]. J Clin Invest, 2017, 127(4): 1425-1437.
- [10] Koncar RF, Chu Z, Romick-Rosendale LE, et al. PLK1 inhibition enhances temozolomide efficacy in *IDH1* mutant gliomas [J]. Oncotarget, 2017, 8(9): 15827-15837.
- [11] Zhu H, Zhang Y, Chen J, et al. *IDH1* R132H mutation enhances cell migration by activating AKT-mTOR signaling pathway, but sensitizes cells to 5-Fu treatment as NADPH and GSH are reduced [J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0169038.
- [12] Bai H, Harmanci AS, Erson-Omay EZ, et al. Integrated genomic characterization of *IDH1*-mutant glioma malignant progression [J]. Nat Genet, 2016, 48(1): 59-66.
- [13] Park CK, Park I, Lee S, et al. Genomic dynamics associated with malignant transformation in *IDH1* mutated gliomas [J]. Oncotargets, 2015, 6(41): 43653-43666.
- [14] Wakimoto H, Tanaka S, Curry WT, et al. Targetable signaling pathway mutations are associated with malignant phenotype in *IDH*-mutant gliomas [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(11): 2898-2909.
- [15] Flavahan WA, Drier Y, Liao BB, et al. Insulator dysfunction and oncogene activation in *IDH* mutant gliomas [J]. Nature, 2016, 529(7584): 110-114.
- [16] Zhang C, Moore LM, Li X, et al. *IDH1/2* mutations target a key hallmark of cancer by deregulating cellular metabolism in glioma [J]. Neuro Oncol, 2013, 15(9): 1114-1126.
- [17] Clark O, Yen K, Mellinghoff IK. Molecular pathways: isocitrate dehydrogenase mutations in cancer [J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(8): 1837-1842.
- [18] Dang L, Yen K, Attar EC. *IDH* mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics [J]. Ann Oncol, 2016, 27(4): 599-608.
- [19] Fujii T, Khawaja MR, DiNardo CD, et al. Targeting isocitrate dehydrogenase (*IDH*) in cancer [J]. Discov Med, 2016, 21(117): 373-380.
- [20] Fathi AT, Nahed BV, Wander SA, et al. Elevation of urinary 2-hydroxyglutarate in *IDH*-mutant glioma [J]. Oncologist, 2016, 21(2): 214-219.
- [21] Lombardi G, Corona G, Bellu L, et al. Diagnostic value of plasma and urinary 2-hydroxyglutarate to identify patients with isocitrate dehydrogenase-mutated glioma [J]. Oncologist, 2015, 20(5): 562-567.