

染色体 1p、19q 缺失检测在胶质瘤病理诊断中的意义

孙靖驰^{1,2}, 许在华¹, 王 振¹, 刘 强¹, 黄 欣³

(1. 沈阳军区总医院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 大连医科大学研究生院, 辽宁 大连 110044; 3. 辽宁省营口经济技术开发区民康医院, 辽宁 营口 115007)

摘要: [目的] 研究染色体 1p 和 19q 的缺失在不同病理类型胶质瘤中的分布差异, 评价其在胶质瘤病理鉴别诊断中的价值。[方法] 选取经术后病理确诊的Ⅱ~Ⅲ级胶质瘤患者共 134 例。采用特异性扩增片段分析法检测肿瘤组织染色体 1p、19q 缺失情况。[结果] 134 例患者中, 组织病理学认定为间变性少突胶质细胞瘤(anaplastic oligodendroglioma, AO, WHO Ⅲ级) 9 例(6.7%), 少突胶质细胞瘤(oligodendroglial tumor, OT, WHO Ⅱ级) 15 例(11.2%), 混合型胶质瘤(星形+少突) 32 例(23.9%), 星形细胞瘤(astrocytoma, AA) 78 例(58.2%)。少突胶质细胞瘤、间变性少突胶质细胞瘤、混合型胶质瘤、星形细胞瘤的 1p、19q 缺失率分别为 73.3% (11/15) 和 66.7% (10/15)、66.7% (6/9) 和 77.8% (7/9)、53.1% (17/32) 和 59.4% (19/32)、43.6% (34/78) 和 41.0% (32/78)。染色体 1p 和 19q 的缺失情况(包括完整, 杂合性缺失, 联合缺失)在少突胶质细胞瘤、混合型胶质瘤、星形细胞瘤的分布差异有统计学意义($P < 0.05$), 但在不同级别少突胶质细胞瘤中, 染色体缺失差异无统计学意义。[结论] 染色体 1p、19q 的缺失与胶质瘤病理类型相关。单纯依靠组织病理学诊断难以准确判断胶质瘤类型, 检测染色体 1p、19q 缺失情况可作为胶质瘤病理诊断的重要参考指标。

关键词: 1p; 19q; 共缺失; 杂合性缺失; 胶质瘤

中图分类号: R739.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)10-0973-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.10.B007

Detection of Chromosome 1p and 19q Deletions in Pathological Diagnosis of Glioma Types

SUN Jing-chi^{1,2}, XU Zai-hua¹, WANG Zhen¹, LIU Qiang¹, HUANG Xin³

(1. General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110016, China; 2. Graduate School, Dalian Medical University, Dalian 110044, China; 3. Minkang Hospital of Liaoning Yingkou Economic and Technological Zone, Yingkou 115007, China)

Abstract: [Objective] To evaluate the chromosome 1p and 19q deletion in pathological diagnosis of glioma types. [Methods] One hundred and thirty four patients with pathologically confirmed grade Ⅱ~Ⅲ glioma were included in the study. The deletion of chromosome 1p and 19q in tumor tissues were detected by specific amplification fragment analysis. [Results] Histopathology demonstrated that of 134 patients, there were 9 cases (6.7%) of anaplastic oligodendroglioma (AO, WHO Ⅲ), 15 cases (11.2%) of oligodendroglioma (OT, WHO Ⅱ), 32 cases (23.9%) of mixed glioma (oligodendrocytes with astrocytic ingredients), 78 cases (58.2%) of astrocytoma (AA). Heterozygous deletion rates of 1p and 19q in OT, AO, mixed glioma, AA were 73.3% (11/15) and 66.7% (10/15), 66.7% (6/9) and 77.8% (7/9), 53.1% (17/32) and 59.4% (19/32), 43.6% (34/78) and 41.0% (32/78), respectively. There were significant differences in distribution of chromosome 1p and 19q status (intact, loss of heterozygosity, co-deletion) among OT+AO, mixed glioma and AA ($P < 0.05$), while there was no significant difference between OT and AO. [Conclusion] The deletion of chromosome 1p and 19q is related to the pathological types of glioma, indicating that it might be of value for diagnosis of glioma types.

Subject words: 1p; 19q; co-deletion; loss of heterozygosity; glioma

胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤,占

颅内肿瘤整体发病率的半数以上。胶质瘤的组织学分类复杂,特别是在传统的组织学为基础的病理诊断中,常可发现多种组织成分,难以对其病理分型进行准确判断,而被归类为混合型胶质瘤。特别是在

通讯作者: 许在华, 主任, 主任医师, 博士; 沈阳军区总医院神经外科, 辽宁省沈阳市沈河区文化路 83 号沈阳军区总医院 (110016); E-mail: xuzaihua@hotmail.com
收稿日期: 2017-12-14; **修回日期:** 2018-03-14

2016 年 WHO 重新对之前的 2007 版中枢神经系统肿瘤分类进行了修订,将基因组学引入了传统的组织学病理诊断中,开创了病理诊断的新时代。

在依据形态学改变对脑胶质瘤作出病理诊断后,进一步行分子遗传学检测后我们发现,相同组织学病理结果的患者,基因型和染色体缺失情况存在不一致。精准的诊断决定了对患者预后、放化疗敏感性的预测。现有文献有关 1p、19q 的研究多集中于 1p/19q 的联合缺失上,对于杂合性缺失的研究较少,现就染色体 1p 和 19q 在不同组织类型的 II~III 级胶质瘤中的突变情况加以总结,以期评价其在胶质瘤病理诊断中的鉴别作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取经本医疗组手术治疗,病理为 II~III 级的胶质瘤患者共 134 例,其中男性 72 例(53.7%),女性 62 例(46.3%)。年龄 5~78 岁,平均年龄 46.25 岁。所有患者肿瘤组织的病理检查均由病理科两名神经病理专科医师进行阅片,按照 WHO 中枢神经系统肿瘤分类(第 4 版 2016 修订版)中的要求进行形态学分类,其中,间变性少突胶质细胞瘤 9 例(6.7%),少突胶质细胞瘤 15 例(11.2%),同时含有星形和少突胶质细胞瘤成分的混合型胶质瘤 32 例(23.9%),星形细胞瘤 78 例(58.2%)。

1.2 检测方法

采用多种方式对肿瘤组织分子遗传学改变进行判定,其中包括 *IDH1*、*IDH2* 基因突变, *MGMT* 启动子甲基化、*p53* 基因突变、*ATRX* 基因突变等等。其中 1p、19q 的缺失状态由特异性片段分析法完成。检测前由患者签署知情同意书,检测过程中,由单独的工作人员采用盲法测定。简要流程如下。

1.2.1 检测流程

DNA 提取:使用 Qigen DNA FFPE Tissue Kit 和天根外周血抽提试剂盒,按说明书对肿瘤组织和患者外周血样本进行初步处理,抽提 DNA,以备扩增。外周血样本作为对照。

引物合成:在 1 号染色体短臂和 19 号染色体长臂上的常见缺失区域 1p36.1~36.3 和 19q13.3 各选择 3 个 STR 位点,分别为:D1S468,D1S548,

D1S1592,D19S219,D19S412,PLA2G4C。在引物合成过程中同时进行荧光标记。

PCR 扩增:2×Glodstar master Mix,10μl;引物混合液(10pmol/μl),1.0μl;DNA 模板,2.0μl;DdH₂O,7.0μl;95℃ 10min;(95℃ 30s,61℃ 40s,72℃ 30s),-1℃,各 2 个循环;95℃ 30s,53℃ 40s,72℃ 30s,25 个循环;72℃ 5min;4℃ 永久保存,以备外周血和组织扩增。

毛细管电泳:3730 测序仪片段分析毛细管电泳。

1.2.2 结果判定

待毛细管电泳结束后,观察组织各 STR 位点峰图情况并与外周血各 STR 位点峰图进行比较,主峰消失或者峰值减少 50% 以上可判定为该 STR 位点存在缺失。

Figure 1 所示的是 1 例患者的 1p、19q 缺失情况结果,通过肿瘤组织和外周血样本之间的对照可以看出,在 D1S468 和 D19S412 位点上的峰值存在明显差异。肿瘤组织中 D1S468 位点主峰下降超过 50%,D19S412 位点峰值亦明显下降,且主峰消失。从而可以判定该患者存在 1p/19q 联合缺失。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,利用百分比法对患者临床资料组内数据进行初步描述,组间数据分析采用卡方检验或 Fisher 精确概率法; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

患者的 1p、19q 缺失情况在组织学病理类型上的分布如 Table 1 所示。少突胶质细胞瘤、间变性少突胶质细胞瘤、混合型胶质瘤、星形细胞瘤的 1p、19q 缺失率分别为 73.3% 和 66.7%,66.7% 和 66.7%,53.1% 和 59.4%,43.6% 和 41.0%。少突胶质细胞瘤总体(包括 OT 和 AO)的 1p、19q 缺失率为 70.8% 和 66.7% ($P = 0.039$)。WHO II~III 级胶质瘤中,少突胶质细胞瘤、混合型胶质瘤(少突+星型)、星形细胞瘤上的 1p、19q 的缺失总体分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$),含少突胶质细胞成分更多的肿瘤组织,有更高的 1p、19q 缺失率和 1p/19q 联合缺失率。

同时还比较了少突胶质细胞瘤(OT)和间变性少突胶质细胞瘤(AO)之间的 1p、19q 分布差异,结果表明,1p、19q 的缺失及 1p/19q 的联合缺失在 OT 和 AO 的分布差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

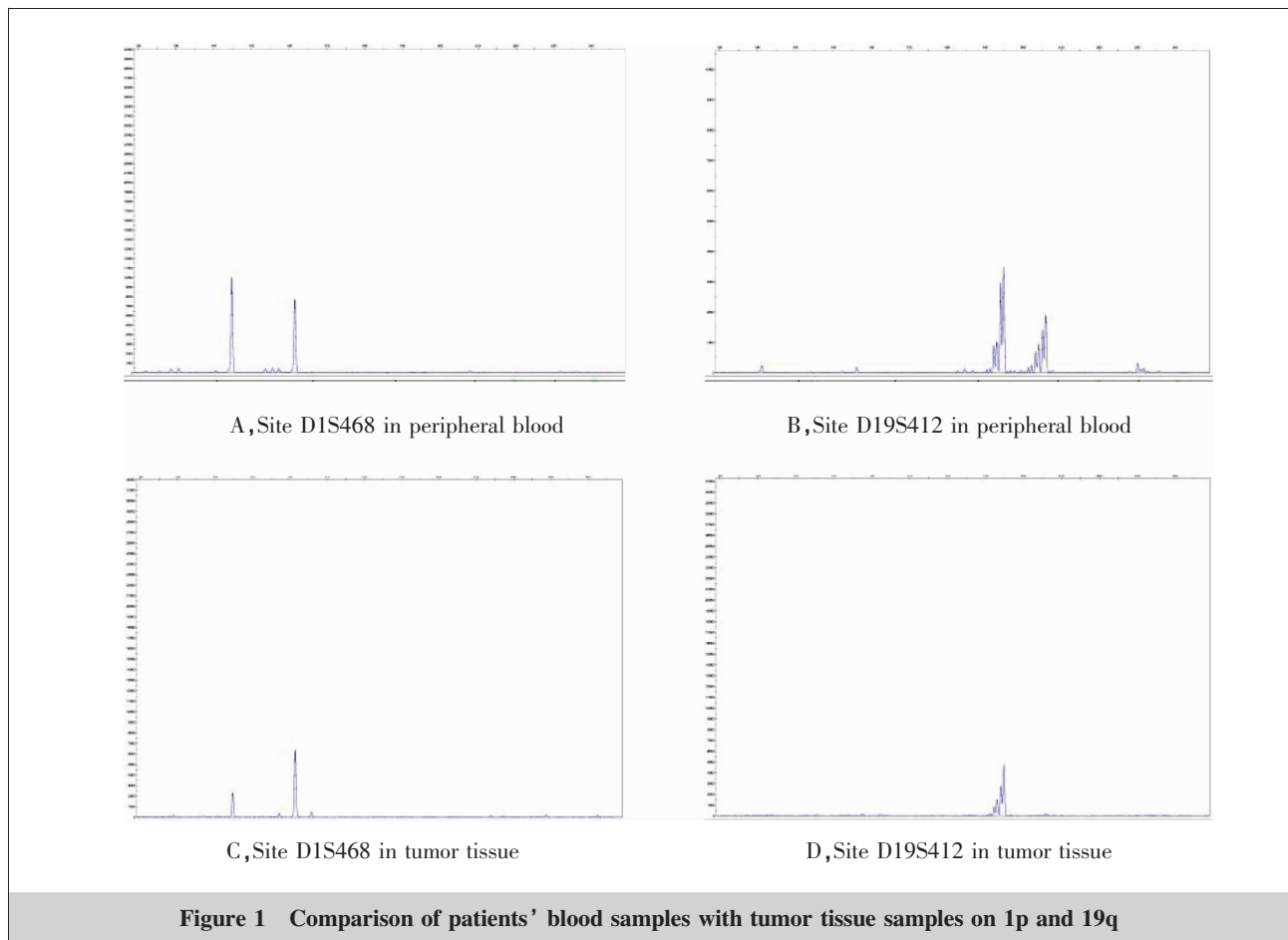


Table 1 Absence of 1p and 19q in gliomas with different histological types

Histological types	n	Intact 1p19q(%)	1p LOH (%)	19q LOH (%)	1p/19q co-deletion(%)
Oligo total group	24	2(8.3)	6(25.0)	5(20.8)	11(45.8)
OT(grade II)	15	1(6.7)	4(26.7)	3(20.0)	7(46.7)
AO (grade III)	9	1(11.1)	2(22.2)	2(22.2)	4(44.5)
Mixed glioma(Oligo and astro)	32	9(28.1)	4(12.5)	6(18.8)	13(40.6)
Astrocytoma	78	34(41.0)	12(15.4)	10(12.8)	22(28.2)

3 讨 论

胶质瘤种类繁多,形态各异,特别是在镜下观察常可见到多种不同的组织类型成分,单纯依靠形态学准确鉴定肿瘤的组织类型是困难的。即使经多名具有丰富经验的病理科医师协同会诊,常仍难以取得一致意见,这部分患者往往依据肿瘤形态学特征而被诊断为混合型胶质瘤。

2016年WHO将第4版中枢神经系统肿瘤分类进行了修订,将基因组学参数引入了病理诊断,为胶质瘤的诊治注入了新的活力。多个遗传学靶点的加

入,使精准的病理诊断成为可能,也使得临床医生得以较为准确地判断患者预后,从而制定相应方案,染色体1p和19q即是其中的新指标。已有多篇文献报道,存在1p/19q联合缺失的胶质瘤患者对放化疗有较好的敏感性,预后较好^[1-3],同时还是OT与AA鉴别的关键。来自于美国脑肿瘤注册中心(Central Brain Tumor Registry of the United States, CBTRUS)的数据显示,OT和AO的发病率分别为0.26/10万、0.11/10万,两者共占全部原发性脑肿瘤的1.7%,占脑胶质瘤的5.9%^[4]。IDH(Isocitrate Dehydrogenase)基因突变合并有1p/19q联合缺失是OT和AO的特征性基因学改变^[5]。

本研究中,我们发现不同组织类型的肿瘤,1p、19q的缺失及联合缺失发生率存在差异。少突胶质细胞瘤1p、19q及联合缺失率较星型细胞瘤明显升高;而混合型胶质瘤(少突+星型)中,上述染色体的

缺失及联合缺失率仍明显高于星型细胞瘤；镜下对比这 3 种类型胶质瘤，可见肿瘤组织所含的少突胶质细胞成分逐渐增加；提示形态学上含有少突胶质细胞成分较多的肿瘤组织，可能更倾向于发生上述染色体的缺失。这与国内其他学者的研究观点相一致^[6,7]，这一点也有助于对混合型胶质瘤的鉴定。

对于混合型胶质瘤，进一步行分子遗传学检测，如发现 IDH 突变和 1p/19q 的联合缺失，则诊断为少突胶质细胞瘤（待划分），再依据形态学特征，进一步诊断为“OT/AO, IDH 突变 1p/19q 联合缺失”。如 IDH 基因存在突变，1p、19q 非联合缺失，则在 ATRX 缺失及 TP53 突变的基础上，诊断为“AA, IDH 突变型”。当检测结果为 IDH 为野生型，1p/19q 非联合缺失时，在除外其他类型胶质瘤后，可诊断为“弥漫性星型细胞瘤，IDH 野生型”。

研究过程中，我们还发现，某些类型的肿瘤出现了 IDH 未突变，1p/19q 联合缺失的现象。这牵涉到了对于混合型胶质瘤，以及少突星型细胞瘤的组织学起源问题。国内外多位学者的研究均认为，1p、和 19q 的缺失，包括联合缺失，是起源于 IDH 基础之上的^[8,9]。也就是说，星型细胞瘤在 IDH 突变基础上发生了双向分化，其中一支以 IDH 突变伴 P53 突变为特点，向 AA 方向分化；另一支以 IDH 突变伴 1p/19q 联合缺失为特点，向 OT 方向分化^[10]。笔者认为此类基因型改变可能是 IDH 野生型的胶质瘤（大多数是高级别的）的亚型表现，但仍有待于进一步验证。

在少突胶质细胞瘤的级别上，WHO II 级和 III 级 1p、19q 的缺失率及联合缺失率差异无统计学意义，提示肿瘤级别的进展并不能进一步促使少突胶质细胞瘤的进一步分化。对 1p、19q 缺失率的检测在判断肿瘤级别上是无益的，这与部分学者的研究结果相一致^[11,12]。考虑其原因可能是上述染色体的缺失仅产生于少突胶质瘤发生和形成的早期，而在长期进展和分化中不再发挥作用。

从研究数据中我们可以看出，单一经由形态学对肿瘤组织进行病理分型是不可靠的。在组织病理学诊断为 OT 的病例中，有相当数量的（54.2%）的分子遗传学结果并不能支持形态学诊断。而依据 2016 年第 4 版修订版 WHO 肿瘤分类指南，IDH 突变和 1p/19q 的联合缺失是包括 OT 和 AO 的特征性遗传学改变，也是诊断所必须的。因此，准确的对 II ~ III

级胶质瘤患者的病理分型做出判定，必须获得组织病理学和分子遗传学的双重证据支持。检测染色体 1p、19q 缺失情况，能够辅助常规病理的组织学诊断^[13]，尤其可以将少突胶质细胞瘤与星型细胞瘤相鉴别，也有助于混合型胶质瘤真正的病理类型的鉴定，可作为胶质瘤病理诊断的重要参考指标。

参考文献：

- [1] Takahashi Y, Nakamura H, Makino K, et al. Prognostic value of isocitrate dehydrogenase 1, O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation, and 1p19q co-deletion in Japanese malignant glioma patients [J]. *World J Surg Oncol*, 2013, 11: 284-294.
- [2] Hayashi S, Sasaki H, Kimura T, et al. Molecular - genetic and clinical characteristics of gliomas with astrocytic appearance and total 1p19q loss in a single institutional consecutive cohort [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(18): 15871-15881.
- [3] Heather E, Leeper, Alissa A, et al. IDH mutation, 1p19q codeletion and ATRX loss in WHO grade II gliomas [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30): 30295-30305.
- [4] Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011 [J]. *Neuro Oncol*, 2014, 16, Suppl 4: iv1- iv63.
- [5] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. WHO Classification of Tumors of the central nervous system [M]. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2016.60.
- [6] Tanaka S, Sasaki H, Kimura T, et al. Molecular-genetic and clinical characteristics of the astrocytic gliomas with total 1p19q loss [J]. *Neuro Oncol*, 2014, 16: v96-106.
- [7] Li YX, Shi ZF, Aibaidula A, et al. Not all 1p/19q non-codeleted oligodendroglial tumors are astrocytic [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(40): 64615-64630.
- [8] Kim YH, Nobusawa S, Mittelbronn M, et al. Molecular classification of low-Grade diffuse gliomas [J]. *The American Journal of Pathology*, 2010, 177(6): 2708-2714.
- [9] Reddy KS. Assessment of 1p/19q deletions by fluorescence in situ hybridization in gliomas [J]. *Cancer Genetic Cytogenet*, 2008, 184(2): 77-86.
- [10] Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma [J]. *Cell*, 2013, 155(2): 462-477.
- [11] Horbinski C, Nikiforova MN, Hobbs J, et al. The importance of 10q status in an outcomes-based comparison between 1p/19q fluorescence in situ hybridization and polymerase chain reaction-based microsatellite loss of heterozygosity analysis of oligodendrogliomas [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2012, 71(1): 73-82.
- [12] Gorovets D, Kannan K, Shen R, et al. IDH mutation and neuroglial developmental features define clinically distinct subclasses of lower grade diffuse astrocytic glioma [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(9): 2490-2501.
- [13] Kamoun A, Idbaih A, Dehais C, et al. Integrated multi-omics analysis of oligodendroglial tumours identifies three subgroups of 1p/19q co-deleted gliomas [J]. *Nat Commun* 2016, 7: 11263.