

IDH1 基因突变及 MGMT 基因启动子甲基化在胶质瘤中的临床意义

Significance of IDH1 Gene Mutation and MGMT Gene Promoter Methylation in Prognosis and Treatment of Glioma // WANG Zhen, XU Zai-hua, SUN Jing-chi, LIU Qiang, HUANG Xin

王 振¹, 许在华¹, 孙靖驰^{1,2}, 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, 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] 探讨 IDH1 基因突变及 MGMT 基因启动子甲基化状态在指导胶质瘤患者临床化疗和预后判断的意义。[方法] 运用 PCR 测序和焦磷酸测序方法对 190 例胶质瘤患者的肿瘤标本分别进行 IDH1 基因突变和 MGMT 基因启动子甲基化状态分析; 分析两者与胶质瘤患者临床病理特征及预后的关系。[结果] 胶质瘤中 IDH1 基因突变在不同年龄 ($P=0.026$)、病理分级 ($P=0.020$)、KPS 评分 ($P=0.004$) 组间分布差异有统计学意义; 而在不同性别 ($P=0.900$)、p53 表达 ($P=0.878$)、肿瘤幕上幕下位置 ($P=0.106$) 组间分布差异无统计学意义。MGMT 基因启动子甲基化在不同年龄 ($P=0.488$)、性别 ($P=0.447$)、病理分级 ($P=0.287$)、KPS 评分 ($P=0.077$)、p53 表达 ($P=0.970$) 及肿瘤幕上与幕下位置不同 ($P=0.915$)。IDH1 基因突变型组与野生型组 30 个月总生存期差异有统计学意义 ($P=0.002$), 高级别胶质瘤术后化疗患者 MGMT 基因启动子甲基化组与非甲基化组 30 个月总生存期差异有统计学意义 ($P=0.049$)。[结论] IDH1 基因突变可作为判断胶质瘤患者预后的指标, 而 MGMT 基因启动子甲基化可作为指导化疗的重要指标。

关键词: 胶质瘤; IDH1 基因突变; O6-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶; 预后

中图分类号: R739.41 **文献标识码:** B **文章编号:** 1671-170X(2018)11-1118-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.11.B017

胶质瘤约占颅内原发恶性肿瘤的 80%^[1], 且临床发现同级别胶质瘤患者预后可能明显不同, 进一步的分子研究表明, 同级别的胶质瘤基因中也存在明显不同的基因表型, 这些基因表型的出现可能对患者的预后具有相应的提示作用。本文主要探讨其中的两种分子表现型 MGMT 基因启动子甲基化 (MGMT promoter methylation) 和 IDH1 基因突变 (IDH1 gene mutation) 的表达及临床意义, 以期对胶质瘤的治疗及预后评估提供指导。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2011 年 7 月至 2017 年 7 月在沈阳军区总医院神经外科行胶质瘤手术的 190 例患者, 年龄 5~78 岁; 男性 93 例, 女性 97 例; 星形胶质细胞瘤 96 例、少突胶质细胞瘤 10 例、髓母细胞瘤 4 例、室管膜瘤

3 例、混合型胶质细胞瘤 49 例、巨细胞型胶质母细胞瘤 5 例、多形性胶质母细胞瘤 23 例; 依据世界卫生组织 (WHO) 2007 年发布的中枢神经系统肿瘤分类标准分级: I 级 2 例, II 级 64 例, III 级 63 例, IV 级 61 例。入组患者术前无放化疗等特殊处理, 术后病理证实为标本肿瘤组织含量大于 80% 的胶质瘤病例, KPS 评分不小于 70 分, 患者及家属均知情同意, 并签署知情同意书。手术方式均为镜下全切或近全切, 切除 85% 以上肿瘤, 对于仅行姑息性切除者及术中仅取病理用者不纳入研究。术后留取新鲜肿瘤组织, 于 1h 内封存于 Zymo 保护液中, 并取患者新鲜血液标本置于液态氮中低温保存待测。

1.2 方法及结果判定

MGMT 基因启动子甲基化采取焦磷酸测序方法, 测序使用 PyroMark Q24 焦磷酸测序仪 (Qiagen 公司), 经过组织加工→重亚硫酸盐转化反应→DNA 纯化→PCR 扩增和凝胶电泳→焦磷酸测序仪测序对组织标本进行 MGMT 启动子甲基化检测。检测序列为 10 号染色体 CGACGCCCCGAGGTCCTCG 序列中的 4 个位点 (下划线标识), 此为 MGMT 基因启动

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 (110016); E-mail: xuzaihua459461@126.com

收稿日期: 2017-12-20; 修回日期: 2018-08-15

子中重要的 CpG 岛序列。检测利用酶级联化学光反应将标本组织中的被检测位点出现甲基化频率以峰值形式表现出来, 峰值高度与标本组织中被检测位点甲基化的含量呈正比。检测位点甲基化比例平均值在 10% 以上, 视为甲基化阳性。

IDH1 基因突变采用 PCR 测序分析法检测进行, 测序使用 Bio-Rad qPCR 仪, 经过组织加工→DNA 提取及纯化后, 通过荧光定量 PCR 仪对 *IDH1* 基因序列进行 PCR 扩增及同步测序。样本突变信号有典型的 S 型扩增曲线升起, 并且通过 ΔCt 值来判读, 阳性样本 $\Delta Ct \leq 9$, 阴性样本 $\Delta Ct > 9$ 。

1.3 术后辅助治疗方案

低级别胶质瘤患者中 *MGMT* 启动子甲基化表现阴性者均仅在术后辅以常规放疗, *MGMT* 启动子甲基化阳性者行放疗化疗同步治疗; 高级别胶质瘤患者均行同步放疗化疗治疗。

1.4 随访及统计学处理

自 2011 年 7 月起每半年行电话随访, 末次随访时间 2017 年 7 月, 期间记录患者生存状态。失访患者以生存计。

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 临床特征资料用百分比描述; 不同组间的临床特征比较采用 χ^2 检验, Log-rank 检验分析组间生存曲线。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *MGMT* 基因启动子甲基化及 *IDH1* 基因突变与胶质瘤患者临床特征的关系

190 例胶质瘤患者中, *MGMT* 基因启动子甲基化阳性 105 例 (55.26%), 阴性 85 例 (44.74%); *MGMT* 基因启动子甲基化在不同年龄 ($P=0.488$)、性别 ($P=0.447$)、病理分级 ($P=0.287$)、KPS 评分 ($P=0.077$)、p53 表达 ($P=0.970$) 及肿瘤幕上与幕下位置不同 ($P=0.001$) 组间分布差异均无统计学意义。

190 例患者中 *IDH1* 基因突变阳性患者 30 例 (15.79%), 阴性患者 160 例 (84.21%); *IDH1* 基因突变在不同年龄 ($P=0.026$)、病理分级 ($P=0.020$)、KPS 评分 ($P=0.004$) 组间分布差异均有统计学意义, 而在不同性别 ($P=0.900$)、p53 表达 ($P=0.878$)、肿瘤幕上与幕下位置不同 ($P=0.106$) 组间分布差异均无统计学意义 (Table 1)。

2.2 生存情况

本组中 KPS 评分 ≥ 70 , 且随访时限超过 30 个月的 105 例患者, *IDH1* 基因突变阳性组与阴性组的 30 个月生存率差异有统计学意义 ($P=0.002$) (Figure 1)。

高级别胶质瘤患者中 KPS 评分 ≥ 70 , 且随访时限超过 30 个月的 50 例患者中, *MGMT* 基因启动子

Table 1 Relationship between clinical data with *IDH1* gene mutation and *MGMT* promoter methylation in gliomas

Index	MGMT				IDH1			
	+(%)	-(%)	χ^2	P	+(%)	-(%)	χ^2	P
Gender								
Male	54(28.4)	39(20.5)	0.578	0.447	15(7.9)	78(41.1)	0.016	0.900
Female	51(26.8)	46(24.2)			15(7.9)	82(43.1)		
Age(years old)								
≥ 46	59(31.1)	52(27.4)	0.481	0.488	12(6.3)	99(52.1)	4.977	0.026
<46	46(24.2)	33(17.4)			18(9.5)	61(32.1)		
Grade								
Low-grade	33(17.4)	33(17.4)	1.133	0.287	16(8.4)	50(26.3)	5.434	0.020
High-grade	72(37.9)	52(27.4)			14(7.4)	110(57.9)		
KPS								
≥ 90	58(30.5)	36(19.0)	3.120	0.077	22(11.6)	72(37.9)	8.113	0.004
<90	47(24.7)	49(25.8)			8(4.2)	88(46.3)		
p53								
Low-expression	83(43.7)	67(35.3)	0.001	0.970	24(12.6)	126(66.3)	0.024	0.878
High-expression	22(11.5)	18(9.5)			6(3.2)	34(17.9)		
Tumor site								
Supratentorial	98(51.6)	79(41.5)	0.011	0.915	30(15.8)	147(77.4)	2.617	0.106
Subtentorial	7(3.7)	6(3.2)			0(0)	13(6.8)		

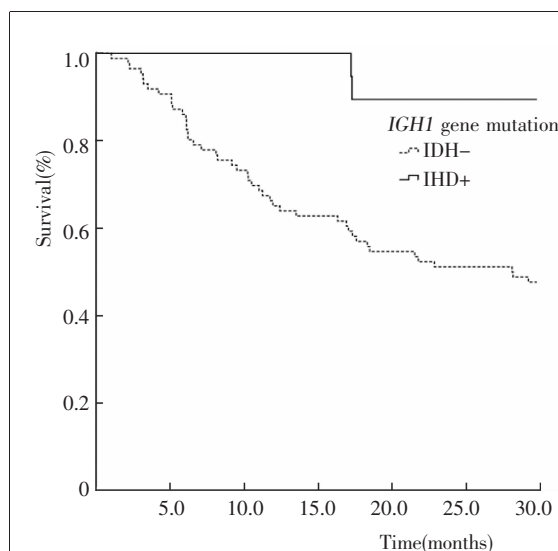


Figure 1 Relationship between *IDH1* gene mutation and 30-months overall survival

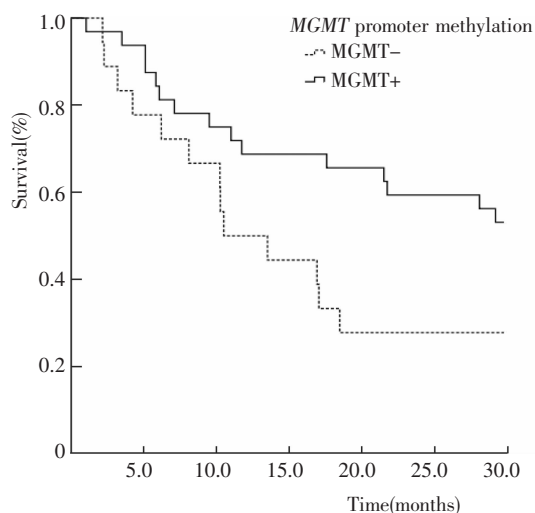


Figure 2 Relationship between *MGMT* promoter methylation and 30-months overall survival

甲基化突变,两组 30 个月生存率差异有统计学意义 ($P=0.049$) (Figure 2)。

3 讨论

异柠檬酸脱氢酶,简称 IDH,目前发现有 3 型,其中以 IDH1 研究最为广泛和深入。IDH1 存在于胞质、线粒体及过氧化物酶体内,是细胞三羧酸循环中重要的限速酶。催化异柠檬酸氧化脱羧产生 α -KG 和 NADPH。*IDH1* 基因突变最早在 2008 年由 Parsons 等^[2]在胶质母细胞瘤中发现,*IDH* 基因突变后,突变产物变为 2-HG,因与 α -KG 形态结构相似,与 α -KG 依赖的双加氧酶类结合而不能发挥正常 α -KG 的激活作用,导致双加氧酶类失活,其中的脯氨酰羟化酶(PHD)可调节缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)的表达,使其水平下降;PHD 失活后 HIF-1 α 表达升高,进而诱导 Glut1、VEGF 等多种肿瘤相关因子表达上调,致使肿瘤发生。另外,突变后催化产物 2-HG 能影响 TET2 的活性,抑制其调节 DNA 去甲基化的功能,致使整个基因组 DNA 产生广泛的异常甲基化,亦可导致肿瘤的发生。本文分析 *MGMT* 基因启动子发生甲基化突变可能即源于此,且已有学者^[3]通过实验数据也得出了低级别胶质瘤中,*IDH1* 基因突变与 *MGMT* 基因启动子甲基化具有相关性。近来也有研究证明,*IDH* 突变可导致胶质瘤染色体三维

构象发生改变,进而干扰染色体正常的拓扑结构,对促癌基因的表达起到促进作用^[4]。因而有学者认为,*IDH* 基因突变可能是细胞癌变初期发生的重要突变事件,但具体如何导致肿瘤的形成,仍未明确^[5,6]。

另一方面,也有研究表明在肿瘤细胞中,供能重要通过两种途径,其一为 NAHPT 途径,其二为 IDH1 途径。*IDH1* 突变发生后,其中一条供能途径被封锁,可使细胞处于低能量状态表现惰性,因而生长相对不活跃。另外,*IDH1* 基因突变后,作为细胞内重要抗氧化物的原产物 NADPH 下降,使得细胞更容易受到外界的氧化侵蚀,表现为脆弱的肿瘤细胞,也相应提示了较好的预后。因 PHD 的失活,细胞产生的广泛甲基化中不乏致命性突变,也同样诱导肿瘤细胞的凋亡。因而 *IDH1* 基因突变在一定意义上可以提示患者相对良好的预后。本研究中,低龄组较高龄组表现为更高的 *IDH1* 基因突变发生率,低级别胶质瘤患者 *IDH1* 基因突变的发生率高于高级别者,也有学者认为,低级别胶质瘤患者生存期长于高级别胶质瘤患者的原因或与此有关;且本组中 IDH 表现为阳性的患者状态偏于良好。本组 *IDH1* 基因突变型患者总生存时间长于野生型患者。这与相关研究^[7]的统计结果相同,有研究提出 *IDH1* 基因突变中若同时存在端粒酶逆转录酶 (telomerase reverse transcriptase, TERT),患者总体生存期将有更加明显的延长。Zhang 等^[8]也发现脑胶质瘤中 *IDH* 突变组中术后行同步化疗患者的无进展生存期明显长于

未行放化疗患者,而此现象在 *IDH* 野生型组中未发现,提示 *IDH1* 基因突变型患者经正规治疗有较为良好的预后。

O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶,简称 MGMT,是人体正常存在的一种自我修复蛋白,也是人体众多甲基化转移酶中内唯一可以转移 O6 位点上的烷化加合物,以防止烷化剂对细胞内基因产生诱导突变,进而细胞凋亡的一类修复酶。目前临床上应用的替莫唑胺作用机理与烷化剂作用相似,可在体内分解释放活性的氯乙基氮离子,使 DNA 上 O6-甲基鸟嘌呤发生烷基化,使 DNA 复制停滞,从而杀灭胶质瘤细胞。通过诱导肿瘤细胞基因 O6 位点发生突变,使基因链上产生异于正常的 O6-甲基鸟嘌呤,从而无法形成成对的基因序列,随着基因缺口的逐步增大,DNA 失去原有的双螺旋正常结构而崩解,随之肿瘤细胞凋亡,达到治疗肿瘤的效果。在 MGMT 基因启动子发生突变的细胞中,基因因失去启动序列而处于停滞状态,无法正常转录翻译,因而细胞中的 MGMT 蛋白下降,甚至不能产生,在替莫唑胺攻击细胞时,基因序列不能得到 MGMT 蛋白的修复而变形失活,肿瘤细胞死亡。反之,MGMT 基因启动子无甲基化细胞中的 DNA 在受到替莫唑胺攻击后,MGMT 蛋白修复破坏的基因序列,使肿瘤细胞复活,减低甚至消除了化疗效果。最近的研究也证实了 MGMT 蛋白能很好地修复化疗造成的肿瘤细胞 DNA 的损伤^[9]。因而,MGMT 基因启动子甲基化的肿瘤细胞对替莫唑胺等烷化剂类药物化疗效果敏感,对于 MGMT 基因启动子非甲基化患者,临床上应避免选用烷化剂类药物,以降低肿瘤耐药的产生^[10]。本组患者 MGMT 基因启动子甲基化在幕上幕下的位置分布差异有统计学意义,值得后续进一步研究。另外,统计组内 50 例在访的高级别胶质瘤患者的总体生存期(OS)显示,甲基化组与非甲基化组间生存 OS 差异有统计学意义($P=0.049$),认为术后应用替莫唑胺进行辅助化疗的患者中,MGMT 基因启动子甲基化患者总体生存期明显长于非甲基化患者。

综上所述,*IDH1* 基因突变型患者术后的总生存时间明显长于野生型;术后行同步放化疗的高级别胶质瘤患者中,MGMT 基因启动子甲基化组患者的术后总体生存期也长于非甲基化组。*IDH1* 基因突变可作为人脑胶质瘤患者预后的重要判定标准,而

MGMT 基因启动子甲基化则可认为是判定人脑胶质瘤患者化疗敏感性的重要指标,对指导胶质瘤患者诊治有重要价值。

参考文献:

- [1] Compile Group of "guidelines for diagnosis and treatment of central nervous system gliomas in China". Guidelines for diagnosis and treatment of central nervous system gliomas in China [J]. National Medical Journal of China, 2016, 96 (7): 485-509. [中国中枢神经系统胶质瘤诊断和治疗指南]编写组.中国中枢神经系统胶质瘤诊断与治疗指南[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(7): 485-509.]
- [2] Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, et al. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia[J]. Nature, 2011, 481(7381): 380-384.
- [3] Leu S, von Felten S, Frank S, et al. IDH/MGMT-driven molecular classification of low-grade glioma is a strong predictor for long-term survival [J]. Neuro Oncol, 2013, 15 (4): 469-479.
- [4] Flavahan WA, Drier Y, Liau BB, et al. Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas[J]. Nature, 2016, 529 (7584): 110-114.
- [5] Labussière M, Boisselier B, Mokhtari K, et al. Combined analysis of TERT, EGFR, and IDH status defines distinct prognostic glioblastoma classes [J]. Neurology, 2014, 83 (13): 1200-1206.
- [6] Koh J, Cho H, Kim H, et al. IDH2 mutation in gliomas including novel mutation[J]. Neuropathology, 2015, 35(3): 236-244.
- [7] Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, et al. Glioma groups based on 1p/19q, IDH, and TERT promoter mutations in tumors[J]. N Engl J Med, 2015, 372(26): 2499-2508.
- [8] Zhang ZY, Chan AK, Ding XJ, et al. TERT promoter mutations contribute to IDH mutations in predicting differential responses to adjuvant therapies in WHO grade II and III diffuse gliomas[J]. Oncotarget, 2015, 6(28): 24871-24883.
- [9] Kohli P, Pito-Plata V, Divo M, et al. Functional capacity, health status, and inflammatory biomarker profile in a cohort of patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Cardiopulm Rehabil Prev, 2015, 35(5): 348-355.
- [10] Williams AE, Jos RJ, Brown JS, et al. Enhanced inflammation in axed mice following infection with streptococcus pneumoniae is associated with decreased IL-10 and augmented chemokine production[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015, 308(6): 539-549.