

脑胶质瘤分子标志物 IDH1R132 突变、MGMT 和 Ki-67 与病理分级及预后关系的研究

杜希越, 薛晓英, 盖晓惠, 田磊, 韩雪涛, 刘会芝, 李彦格, 常晓静, 周欢娣

摘要 **目的** 联合检测脑胶质瘤中异柠檬酸脱氢酶 1R132 位点核苷酸突变 (IDH1R132 突变)、O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶 (MGMT) 和 Ki-67 蛋白的表达, 探讨其表达与胶质瘤病理分级的相关性及对预后的影响。**方法** 收集脑胶质瘤病理标本 135 例, 采用免疫组织化学方法检测病理标本中 IDH1R132 突变、MGMT 和 Ki-67 蛋白的表达情况, 并对此部分患者进行长期随访, 从而分析这 3 种分子标志物的表达与病理分级及预后的相关性。**结果** 135 例脑胶质瘤标本中 IDH1R132 突变总阳性表达率为 31.1% (42/135), II 级、III 级及 IV 级脑胶质瘤标本中 IDH1R132 突变阳性表达率分别为 49.1%、22.2%、11.8%, 三者间表达差异有统计学意义 ($P < 0.01$); IDH1R132 突变阳性表达者中位生存时间明显高于阴性表达者, 分别为 27 个月和 13 个月 ($P < 0.01$)。MGMT 总体阳性表达率为 42.2%, 不同级别的胶质瘤之间 MGMT 阳性表达率差异无统计学意义; MGMT 阳性表达者中位生存时间 (12 个月) 低于阴性者 (23 个月) ($P < 0.01$)。所有患者 Ki-67 呈阳性表达, II - IV 级胶质瘤中 Ki-67 的表达率呈上升趋势, 不同级别的胶质瘤之间 Ki-67 阳性表达程度差异有统计学意义 ($P < 0.001$); Ki-67 表达程度与患者中位生存时间无显著差异。**结论** IDH1R132 突变、Ki-67 的表达水平与肿瘤的恶性程度密切相关, IDH1R132 突变、MGMT 在不同级别胶质瘤的预后评价中具有重要意义, 可作为预后的独立预测指标。

关键词 胶质瘤; IDH1R132; MGMT; Ki-67

中图分类号 R 73

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)03-0417-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.025

脑胶质瘤是中枢神经系统恶性程度最高的原发性肿瘤, 约占颅内原发肿瘤的 50%, 高级别脑胶质瘤具有高侵袭性, 与周围脑组织无明显分界, 复发率较高, 预后极差。目前 WHO 主要通过临床及组织形态特点将胶质瘤进行分级和分类, 然而越来越多研

究证明, 根据组织形态学的病理分类并不能很准确的反映一些胶质瘤的生物学特征, 因此如何更加准确的对胶质瘤患者的预后进行预测, 同时对胶质瘤患者进行个体化治疗, 是目前基础研究及临床工作的重点。随着分子生物学的发展, 目前已经显示了一些分子标志物能够预测胶质瘤患者预后及治疗效果, 依据分子标志物的表达情况给予胶质瘤患者个体化治疗已成为新的治疗模式。目前常见的胶质瘤分子标志物包括异柠檬酸脱氢酶 1 (isocitrate dehydrogenase gene-1, IDH1)、O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶 (O⁶-methylguanine-DNA methyl transferase, MGMT) 以及 Ki-67。IDH1 是细胞三羧酸循环能量代谢过程中的一种关键酶, 其可能发挥抑癌作用; MGMT 在不同级别胶质瘤的表达高低可以影响患者放疗后化疗方案的选择。Ki-67 是目前反映肿瘤细胞增殖程度的可靠指标, 常用来评价肿瘤的恶性程度。目前国内鲜见胶质瘤中同时检测 IDH1 突变、MGMT 及 Ki-67 表达与生存相关的研究报道。该研究拟通过在 135 例不同级别胶质瘤标本中同时检测 IDH1R132 突变及 MGMT、Ki-67 的表达情况, 分析其表达与病理分级及预后的关系, 为制定胶质瘤的个体化治疗方案提供依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集河北医科大学第二医院 2010 年 1 月 ~ 2013 年 12 月在神经外科行手术切除, 于放疗科进行术后同步放化疗的神经胶质瘤患者 135 例。其中, 男 85 例、女 50 例, 20 ~ 70 岁, 中位年龄 45 岁。根据 WHO (2007 版) 中枢神经系统肿瘤的分类标准分为: 低级别组 53 例 (II 级), 高级别组 82 例: 其中 III 级 65 例、IV 级 17 例。

1.2 试剂及方法 IDH1R132H、MGMT 及 Ki-67 单克隆抗体即用型均购自北京中山金桥生物公司。标本检测方法: 将标本制成厚 4 μm 切片, 经脱蜡后, 抗原修复, 3% 双氧水消除内源性过氧化物酶, 加一抗孵育过夜后冲洗, 滴加二抗, DAB 显色, 苏木精复染。IDH1R132、MGMT 及 Ki-67 单克隆抗体均行高

2016-12-12 接收

基金项目: 河北省医学科学研究重点课题计划 (编号: 20150255)

作者单位: 河北医科大学第二医院放疗科, 石家庄 050000

作者简介: 杜希越, 男, 硕士研究生;

薛晓英, 女, 博士, 主任医师, 责任作者, E-mail: xxy0636@163.com

温抗原修复 15 min, 抗体稀释浓度均为 1 : 100。

治疗方法: 所有患者行手术及术后放疗, 高级别胶质瘤行同步放化疗。低级别组术后放疗剂量为 54 Gy/27 f, 高级别组放疗剂量为 60 Gy/30 f, 同步口服替莫唑胺胶囊化疗 (75 mg/m²)。

1.3 免疫组化判断标准 每张病理切片随机选取 3 个高倍 (×400) 视野, IDH1 突变染色以细胞质为主, 高倍镜下细胞质着黄褐色, 明显高于背景的为 IDH1 突变阳性; MGMT 为细胞质或细胞核染色, 在高倍视野下计数 100 个细胞的阳性细胞数, 超过 10% 为阳性, 反之为阴性; Ki-67 染色为细胞核染色为主, 高倍镜下 100 个细胞的阳性细胞比例 < 25% 为 +, 25% ~ 50% 为 ++, > 50% 为 +++。全部检测结果由 3 位以上的研究人员及专业人员在双盲情况下分别阅片评估。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 用 χ^2 检验分析三者表达是否相关, 用 Kaplan-Meier 法计算中位生存时间、生存率并采用 Log-rank 方法进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IDH1R132 突变阳性率及其中位生存时间

135 例脑胶质瘤病理标本中 IDH1R132 突变阳性率分别为: II 级 49.1% (26/53)、III 级 21.5% (14/65)、IV 级 11.8% (2/17), 其总体阳性率 31.1% (42/135), 不同级别胶质瘤之间的 IDH1 突变阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 13.712, P = 0.001$), 且 IDH1 突变阳性率从低级别胶质瘤到高级别胶质瘤呈下降趋势。突变阳性者中位生存时间为 30 个月, 高于突变阴性者的 17 个月 ($P < 0.01$), 见图 1。IDH1 免疫组化突变状态见图 2, 表达情况见表 1。

2.2 MGMT 表达阳性率及其中位生存时间 MGMT 总体阳性表达率 42.2% (57/135), 不同级别胶质瘤中 MGMT 阳性表达率分别为: II 级 45.3% (24/53)、III 级 41.5% (27/65)、IV 级 35.3% (6/17), MGMT 的表达在不同级别胶质瘤之间差异无统计学意义。MGMT 阳性表达者中位生存时间为 12 个月, 明显低于阴性表达者的 23 个月 ($P < 0.01$), 见图 3。MGMT 免疫组化表达状态见图 4, 表达情况见表 1。

2.3 Ki-67 表达阳性率及其中位生存时间 不同级别胶质瘤中 Ki-67 均呈阳性表达, III-IV 级胶质瘤中 Ki-67 的表达率较 II 级胶质瘤明显升高, 不同级别胶质瘤 Ki-67 阳性表达程度差异有统计学意义 ($\chi^2 = 56.728, P < 0.001$)。但统计学结果未显示

Ki-67 的表达与胶质瘤患者预后具有显著相关性, 见图 5。不同级别胶质瘤中 Ki-67 的表达状态见图 6, 表达情况见表 2。

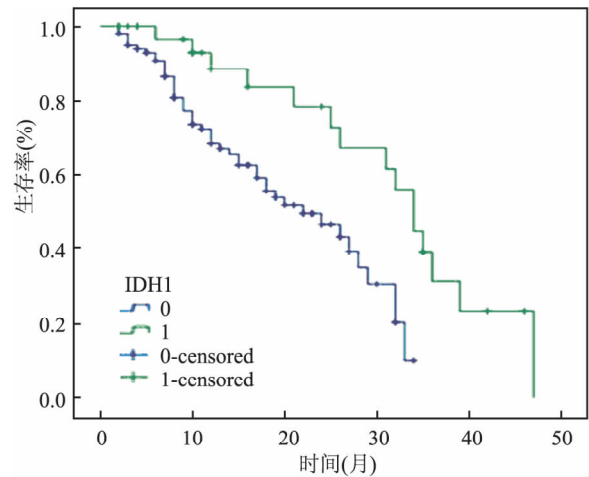


图 1 IDH1 突变与预后相关性分析结果

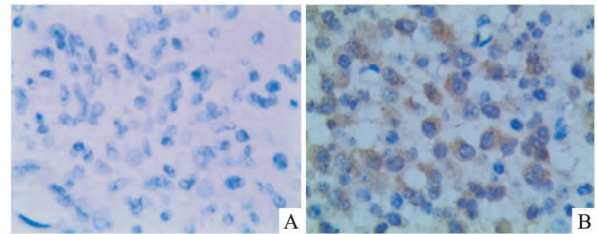


图 2 IDH1 突变的表达 ×400

A: IDH1 突变阴性; B: IDH1 突变阳性

表 1 IDH1 基因突变和 MGMT 在不同级别胶质瘤中的表达

项目	IDH1 突变表达(例)			MGMT 表达(例)		
	II 级	III 级	IV 级	II 级	III 级	IV 级
-	27	51	15	29	38	11
+	26	14	2	24	27	6
合计	53	65	17	53	65	17

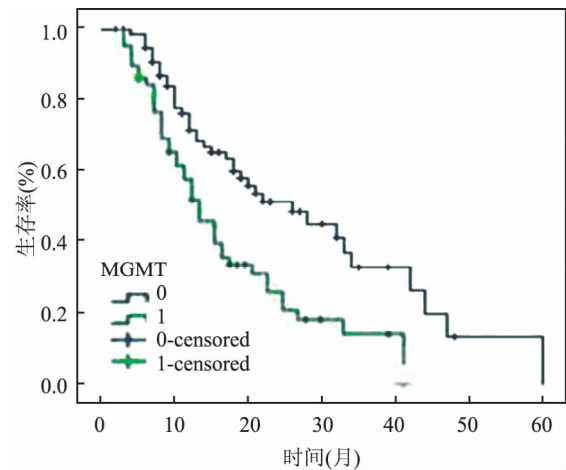


图 3 MGMT 与预后相关性分析结果

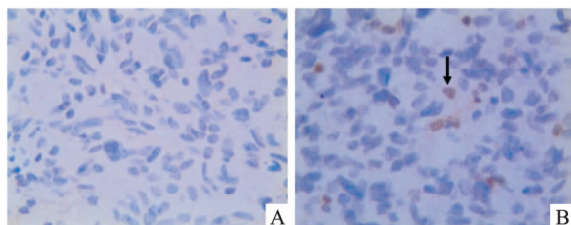


图4 MGMT蛋白的表达 ×400

A: MGMT蛋白表达阴性; B: MGMT蛋白表达阳性(箭头所指)

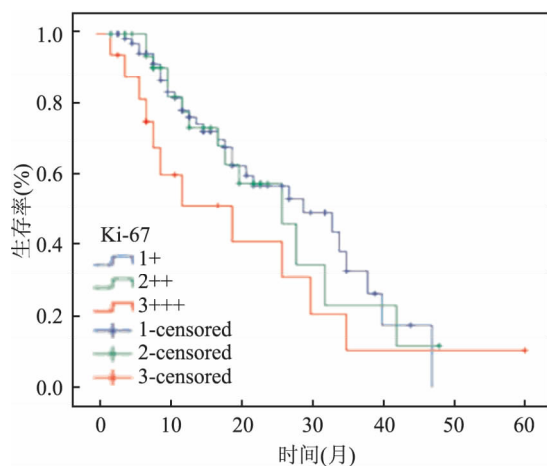


图5 Ki-67与预后相关性分析结果

表2 Ki-67在不同级别胶质瘤中的表达 [n(%)]

Ki-67 表达	Ⅱ级 (n=53)	Ⅲ级 (n=65)	Ⅳ级 (n=17)
+	45 (84.9)	29 (44.6)	6 (35.3)
++	7 (13.2)	23 (35.4)	6 (35.3)
+++	1 (1.9)	13 (20.0)	5 (29.4)

3 讨论

IDH 是柠檬酸循环中的一种酶,将异柠檬酸催化生成 α -酮戊二酸 (α -KG) 及二氧化碳,生成还原型辅酶 II^[1-2]。IDH1 突变发生于胶质瘤发展的早期阶段,并且频繁发生于一些特定亚型的胶质瘤,有研究^[3,4]表明,大部分Ⅱ-Ⅲ级胶质瘤均发生 IDH1

突变,这种突变更常见于青年(中位年龄 33.2 岁,野生型 55.3 岁)和继发性胶质母细胞瘤(WHO Ⅳ级)患者。本研究结果表明,Ⅱ-Ⅲ级胶质瘤 IDH1 突变阳性率为 70.6%,与以上研究结论一致。此外,有研究^[5]表明 IDH1 基因突变与胶质瘤患者总体生存率呈正相关性,这提示胶质瘤患者的预后与 IDH1 基因突变存在密切联系。本研究观察到胶质瘤患者中 IDH1 突变阳性率从低级别到高级别显著下降,且 IDH1 突变与患者的生存期呈正相关性,与上述研究^[5]报道相符。由此进一步说明 IDH1 突变可作为胶质瘤预后的独立预测指标。因此, IDH1 突变与胶质瘤病理分级、恶性程度及预后密切相关,若在疾病早期检测 IDH1 基因突变情况,可协助临床医师制定合理治疗方案,防止其进一步向恶性转化,从而提高胶质瘤治愈率。

MGMT 是一种普遍存在的 DNA 修复蛋白,能转移 O^6 -烷基鸟嘌呤 O^6 位的烷基,此位点也是烷化剂作用的主要位点^[6]。因此 MGMT 可修复烷化剂对 DNA 的损伤、致突变和细胞毒作用,是肿瘤细胞对化疗药物尤其是烷化剂耐药的主要原因。有研究^[7]表明胶质瘤组织中 MGMT 蛋白的表达与患者生存期有关,且 MGMT 表达阴性的患者对化疗药物敏感,所以 MGMT 可作为化疗敏感性和预后判断的检测指标。本研究显示 MGMT 蛋白表达在不同级别胶质瘤之间差异无统计学意义,但观察到其与生存期呈负相关性。研究^[8]显示, MGMT 启动子甲基化可以抑制基因转录,从而使 MGMT 的表达水平下降。因此, MGMT 启动子甲基化水平与 MGMT 蛋白表达水平呈负相关性。大量的体内和临床试验证明,许多烷化剂化疗药物(如替莫唑胺)仅能对 MGMT 表达水平较低或 MGMT 启动子甲基化的胶质瘤患者有效。然而,临床上约 50% 以上的胶质瘤患者 MGMT 为阳性表达。因此,在 MGMT 表达水平较高

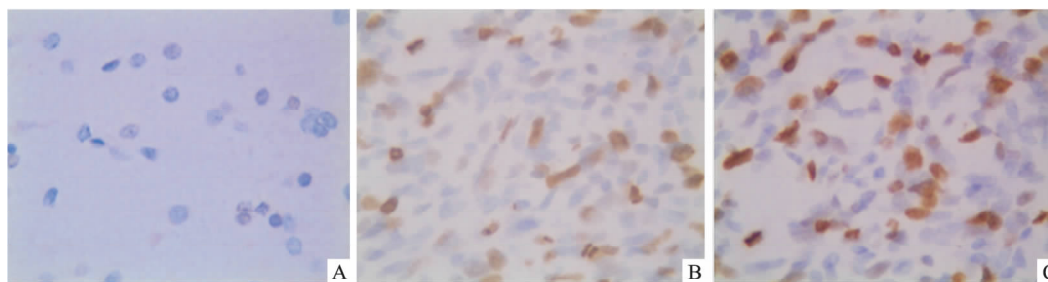


图6 Ki-67蛋白的表达 ×400

A: Ki-67 蛋白表达(+); B: Ki-67 蛋白表达(++); C: Ki-67 蛋白表达(+++)

的患者中,应尽量避免使用烷化剂进行化疗,或与MGMT抑制剂(如链脲菌素)联合化疗,以取得最佳的疗效,改善患者预后。因此,检测MGMT表达水平,有助于制定胶质瘤患者个体化治疗方案,预测患者的化疗疗效及预后。

Ki-67是一种相对分子量为36 ku的核抗原,与细胞周期关系密切^[9]。Ki-67的半衰期较短,与DNAP、PCNA相比更能直接反映细胞的增殖情况。Ki-67在正常脑组织中不表达,却在脑胶质瘤中异常高表达^[10],这也反映了较差的预后。Arshad et al^[11]研究显示,Ki-67水平与胶质瘤的病理分级密切相关。在本研究中,脑胶质瘤患者Ki-67均有不同程度的阳性表达,且其阳性表达程度越高恶性程度越高,这与以往国外的相关研究^[12]结果相符。理论上Ki-67表达越高肿瘤恶性程度越高预后越差,但本研究中Ki-67的阳性表达率与预后相关性分析中未显示明显关联,这与本研究中Ki-67高表达例数较少有关,还是二者确不相关,需扩大样本量进一步研究。

国内外对于胶质瘤的研究中,尚无同时检测IDH1R132突变、MGMT以及Ki-67的表达并进行相关分析。本研究选择135例较大样本量的脑胶质瘤患者,同时进行IDH1R132突变、MGMT以及Ki-67表达水平的检测,显示IDH1R132突变、Ki-67的表达水平与肿瘤的恶性程度密切相关,IDH1R132突变、MGMT对于不同级别胶质瘤的预后评价中有重要意义,可作为预后的独立预测指标。而检测MGMT表达对制定胶质瘤患者化疗方案及指导下一步临床决策有重要价值。然而,IDH1R132突变、MGMT以及Ki-67三者之间是否存在内在联系及其临床意义,尚需进一步研究。

参考文献

[1] Molenaar R J, Radivoyevitch T, Maciejewski J P, et al. The driv-

- er and passenger effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in oncogenesis and survival prolongation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014,1846(2):326-41.
- [2] Pusch S, Schweizer L, Beck A C, et al. D-2-Hydroxyglutarate producing neo-enzymatic activity inversely correlates with frequency of the type of isocitrate dehydrogenase 1 mutations found in glioma [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2014,2:19.
- [3] Balss J, Meyer J, Mueller W, et al. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors [J]. *Acta Neuropathol*, 2008,116(6):597-602.
- [4] Dunn G P, Andronesi O C, Cahill D P. From genomics to the clinic: biological and translational insights of mutant IDH1/2 in glioma [J]. *Neurosurg Focus*, 2013,34(2):245-50.
- [5] Zou P, Xu H, Chen P, et al. IDH1/IDH2 mutations define the prognosis and molecular profiles of patients with gliomas: a meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2013,8(7):e68782.
- [6] 郑长青,季守平,宫锋,等. MGMT、hMLH1和hMSH2基因启动子甲基化状态对脑胶质瘤预后的影响 [J]. *山东医药*, 2009,49(1):23-5.
- [7] Hu X, Miao W, Zou Y, et al. Expression of p53, epidermal growth factor receptor, Ki-67 and O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in human gliomas [J]. *Oncol Lett*, 2013,6(1):130-4.
- [8] Tang K, Jin Q, Yan W, et al. Clinical correlation of MGMT protein expression and promoter methylation in Chinese glioblastoma patients [J]. *Med Oncol*, 2012,29(2):1292-6.
- [9] Chen W J, He D S, Tang R X, et al. Ki-67 is a valuable prognostic factor in gliomas: evidence from a systematic review and meta-analysis [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015,16(2):411-20.
- [10] Jin Q, Zhang W, Qiu X G, et al. Gene expression profiling reveals Ki-67 associated proliferation signature in human glioblastoma [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011,124(17):2584-8.
- [11] Arshad H, Ahmad Z, Hasan S H. Gliomas: correlation of histologic grade, Ki67 and p53 expression with patient survival [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2010,11(6):1637-40.
- [12] Manasa L P, Uppin M S, Sundaram C. Correlation of p53 and Ki-67 expression with grade and subtype of ependymoma [J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2012,55(3):308-13.

Study on the relationship between molecular markers IDH1R132 mutation, MGMT and Ki-67 and pathologic grade and prognosis of brain gliomas

Du Xiyue, Xue Xiaoying, Ge Xiaohui, et al

(Dept of Radiotherapy, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000)

Abstract Objective To investigate the expression of IDH1R132 mutation, MGMT and Ki-67 protein in glioma, and explore the correlation between the expression and the pathological grading and prognosis of gliomas. **Methods** A total of 135 glioma patients were collected. The expressions of IDH1R132, MGMT and Ki-67 in pathological specimens were detected by immunohistochemistry. We analyzed the relationship between the expression of three

网络出版时间: 2017-3-13 18:10 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170313.1810.052.html>

重症急性胰腺炎各期经皮穿刺置管引流疗效

贺 炜¹, 耿小平^{1,2}, 黄 帆³, 谢 坤³, 陈江明¹, 孙 昀²

摘要 目的 探讨重症急性胰腺炎经皮穿刺置管引流治疗的时机及临床价值。方法 回顾性分析采用经皮穿刺(置管)引流术治疗的125例重症急性胰腺炎病例资料。所有患者在CT及床边B超引导下经皮穿刺引流术。结果 首次穿刺引流时间距发病1~46(11.0±7.9)d, 每例置管次数0~11次, 平均3.2次, 留置引流管时间0~128(27.1±16.6)d。共107例(107/125, 85.6%)患者接受经皮穿刺(置管)引流或后期中转开腹手术治疗后康复, 18例(18/125, 14.4%)死亡。21例(21/117, 17.9%)在行经皮穿刺置管引流后3~32(19.8±9.0)d接受开放手术治疗, 16例(16/21, 76.2%)最终获得治愈, 5例(5/21, 23.8%)死亡。穿刺置管引流总体有效率为70.9%(83/117), 1周内为79.4%(27/34), 1~2周为75.9%(22/29), 2~4周为63.2%(24/38), 4周后为62.5%(10/16); 各阶段置管并发症发生例数分别为

5、8、7、4($P=0.595$); 各阶段死亡例数为5(14.7%)、4(13.7%)、7(18.4%)、2(12.5%)($P=0.932$)。结论 在遵循指南的基础上, 观察患者的临床表现、置管引流有效性等更为重要; 早期穿刺置管引流的最终有效率较高, 安全、不增加感染率, 但差异无统计学意义; 后期不排除中转开放手术治疗, 但指征需进一步探究。

关键词 重症急性胰腺炎; 经皮穿刺置管引流; 时机

中图分类号 R 657.5+1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)03-0421-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.026

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是常见高死亡率的危重疾病。虽然其总体治疗效果在近20年有一定提升, 但病死率仍然高达10%~30%^[1]。van Santvoort et al^[2]进行的多中心随机对照试验表明微创渐进式治疗方法较传统开腹手术能够降低新发器官功能衰竭及全身并发症后, SAP的治疗逐渐趋向于微创渐进式方法; 其核心即为经皮穿刺置管引流(percutaneous catheter drainage, PCD)。PCD的临床价值已得到认可, 但在治疗SAP过程中, 其介入时机及方法仍存在争议^[3-4]。

2016-12-12 接收

基金项目: 安徽省科技攻关项目(编号: 1301042206)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院¹ 普外科、² 重症医学科, 合肥 230601

³ 安徽医科大学第一附属医院肝胆胰外科, 合肥 230022

作者简介: 贺 炜, 男, 硕士研究生;

耿小平, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: xp_geng@163.net

molecular markers and the pathological grading and prognosis of gliomas through long-term follow-up of this part of patients. **Results** The total positive expression rate of IDH1R132 mutation was 31.1% (42/135) in 135 cases of brain glioma specimens, while in grade II, III and IV gliomas were 49.1%, 22.2% and 11.8% respectively. As a result, there were statistically significant differences among different grades of gliomas ($P < 0.01$). The median survival time of IDH1R132 mutation was significantly higher than that of negative expression, 27 months and 13 months respectively ($P < 0.01$). The overall positive expression rate of MGMT was 42.2%, and there was no statistically significant difference between different grades of gliomas ($P > 0.05$). The median survival time of MGMT positive expression was 23 months, which was lower than that of the negative group for 12 months ($P < 0.01$). Ki-67 expression was positive in all patients, and the expression level of Ki-67 was increased in the grade II - III gliomas. Though there were statistically significant differences in Ki-67 expression among different grades of gliomas ($P < 0.001$), the expression level of Ki-67 had no relationship with median survival time of the patients ($P > 0.05$). **Conclusion** The expression levels of IDH1R132 mutation and Ki-67 are closely related to the malignant degree of brain gliomas, while IDH1R132 mutation and MGMT have important significance in the evaluation of the prognosis of gliomas at different levels. In conclusion, they can be used as independent predictors of prognosis in glioma patients.

Key words brain glioma; IDH1R132 mutation; MGMT; Ki-67