

· 胶质瘤专题 ·

RNA 甲基化识别蛋白 YTH N6- 甲基腺苷 RNA 结合蛋白 2 预测 O6- 甲基鸟嘌呤 -DNA 甲基转移酶甲基化的脑胶质瘤的化学治疗敏感性

王永志 常誉洲 柴睿超

100070 北京市神经外科研究所分子病理室(王永志、柴睿超); 100070 首都医科大学附属北京天坛医院神经外科(王永志、常誉洲)

通信作者: 柴睿超, Email: chairuichao_glia@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2021.05.003

【摘要】 目的 研究 RNA N6-腺苷酸甲基化(N6-methyladenosine, m6A) 识别蛋白 YTH N6 -甲基腺苷 RNA 结合蛋白 2(YTHDF2) 与 O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(MGMT) 甲基化胶质瘤化学治疗(简称化疗)抵抗的关联,并探索其潜在机制。方法 共纳入中国脑胶质瘤基因图谱计划(CGGA)数据库中的 325 例胶质瘤患者,收集其一般及临床信息(包括患者的组织学病理和分子病理信息、总生存期、术后辅助性治疗信息和包含 YTHDF2 在内的基因表达谱信息)。利用 Kaplan-Meier 生存曲线和 Log-rank 检验评价 YTHDF2 表达水平与替莫唑胺(TMZ) 治疗敏感性及其生存预后的关系。通过慢病毒感染体外构建 YTHDF2 稳定敲低的胶质瘤细胞模型,利用细胞活性检测试剂盒 8(CCK-8 试剂盒)检测不同 YTHDF2 表达水平细胞在 TMZ 处理后的存活率。通过基因集合富集分析(GSEA)和基因本体(GO)功能注释,分析 YTHDF2 表达升高参与 TMZ 治疗抵抗的潜在机制。结果 临床数据库队列分析发现, m6A 识别蛋白 YTHDF2 表达水平高的胶质母细胞瘤化疗治疗后总生存期显著短于 YTHDF2 表达水平低者 ($P < 0.01$)。经 800、1 500、2 000 $\mu\text{mol/L}$ 的 TMZ 处理 48 h 后,与对照 shRNA 比较, YTHDF2 shRNA1 (800 $\mu\text{mol/L}$ 的 TMZ 除外)和 YTHDF2 shRNA2 的细胞相对存活比例均明显降低,差异均具有统计学意义(均 $P < 0.01$)。生存分析结果表明,在 MGMT 甲基化组中, YTHDF2 低表达水平患者的总体生存率明显高于 YTHDF2 高表达水平患者 ($P < 0.05$); 在 MGMT 非甲基化组中, YTHDF2 低高表达水平患者的总体生存率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路注释结果显示,表达升高的基因主要富集在与细胞因子介导的细胞间相互作用、细胞周期以及 Janus 激酶-信号转导和转录激活因子信号通路,而表达降低的基因主要富集在正常神经活动相关的信号通路。GSEA 分析结果显示, YTHDF2 高表达的胶质母细胞瘤基因富集与上皮间质转化、细胞分裂活动和核因子 κB 介导的肿瘤坏死因子 α 等特征密切相关。GO 功能注释结果显示,在 YTHDF2 高表达组中,高表达的基因功能主要聚集在细胞周期和细胞因子相关的生物学过程中。结论 RNA 甲基化识别蛋白 YTHDF2 表达可用作预测和评估 MGMT 甲基化的胶质瘤化疗敏感性的分子指标。

【关键词】 胶质瘤; RNA 甲基化调控; 化学治疗; O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶; YTH N6-甲基腺苷 RNA 结合蛋白 2

基金项目: 国家自然科学基金项目(81773208, 81903078); 北京市科技新星计划(Z201100006820118)

RNA methylation recognition protein YTHDF2 predicts chemotherapeutic sensitivity of O6-methylguanine methyltransferase promoter methylated glioma Wang Yongzhi, Chang Yuzhou, Chai Ruichao
Department of Molecular Neuropathology, Beijing Neurosurgical Institute, Beijing 100070, China (Wang YZ, Chai RC); Department of Neurosurgery, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100070, China (Wang YZ, Chang YZ)

Corresponding author: Chai Ruichao, Email: chairuichao_glia@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the association between RNA methylation recognition protein, YTH N6- methyladenosine RNA binding protein 2 (YTHDF2), and the chemotherapy resistance in O6-methylguanine-DNA- methyltransferase (MGMT) methylated glioma, and to reveal the underlying mechanism.

Methods A total of 325 patients from Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA) were included in this study. General and clinical information (including histopathological and molecular pathological information, overall survival, postoperative adjuvant therapy information and gene expression profile information including YTHDF2) were collected. The Kaplan-Meier curves and Log-rank testing were used to study the relationship among YTHDF2 expression level, the sensitivity of temozolomide (TMZ) treatment and the prognosis of glioma. A glioma cell model was established with stable YTHDF2 knockout by lentivirus infection. The cytoviability of glioma cells with different expression levels of YTHDF2 was detected by cell cytoviability kit 8 (CCK-8) after TMZ treatment. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) and gene ontology (GO) functional annotation were used to study the potential mechanism underlying the role of YTHDF2 in the resistance of glioblastoma to TMZ. **Results** Clinical database cohort analysis showed that the overall survival of gliomas patients with high expression level of m6A recognition protein YTHDF2 after chemotherapy was significantly shorter than those with low expression level of YTHDF2 ($P < 0.01$). After 48 hours of TMZ treatment with 800, 1 500 and 2 000 $\mu\text{mol/l}$, the relative survival ratio of YTHDF2 shRNA (except TMZ of 800 $\mu\text{mol/l}$) and YTHDF2 shRNA were significantly reduced compared with the control shRNA, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Survival analysis showed that the overall survival rate of patients with low expression of YTHDF2 was significantly higher than that of patients with high expression of YTHDF2 in MGMT methylation group ($P < 0.05$). In MGMT demethylation group, there was no significant difference in the overall survival rate of patients with low and high expression of YTHDF2 ($P > 0.05$). Kyoto Encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway annotation results showed that genes with increased expression were mainly enriched in cytokine mediated intercellular interaction, cell cycle and Janus kinase signal transducer and activator of transcription signaling pathway, while genes with decreased expression were mainly enriched in normal neural activity related signaling pathway. GSEA analysis showed that the high expression of YTHDF2 in gliomas was closely related to epithelial mesenchymal transition, cell division and tumor necrosis factor- α mediated by nuclear factor- κB . The results of GO functional annotation showed that in the high expression group of YTHDF2, the high expression genes mainly concentrated in the biological processes related to cell cycle and cytokines. **Conclusions** RNA methylation recognition protein YTHDF2 can be used as a molecular marker to predict and evaluate the chemosensitivity of gliomas with MGMT methylation.

【Key words】 Glioma; RNA methylation; Chemotherapy; MGMT; YTHDF2

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81773208, 81903078); Beijing Nova Program (Z201100006820118)

弥漫性胶质瘤是颅内最常见的恶性原发性肿瘤,由于其浸润性的生长方式,手术往往难以完全切除。恶性度最高的胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM, 世界卫生组织IV级)约占胶质瘤的30%,当前术后标准化治疗方案是放射治疗联合替莫唑胺(Temozolomide, TMZ)化学治疗(简称化疗)^[1-2]。然而由于瘤间高度的异质性,不同GBM个体对TMZ化疗的敏感性差异巨大^[3]。研究已证实, O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(O6-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)启动子区甲基化的胶质瘤对TMZ化疗敏感,因此,目前临床已将MGMT作为预测胶质瘤化疗敏感的关键分子标志物^[4]。然而在实际临床中发现,部分MGMT启动子区甲基化的GBM仍表现为对TMZ化疗原发性耐药,提示其他分子调控参与了这些胶质瘤的耐药机制。

表观遗传学改变是胶质瘤恶性进展及化疗抵抗的重要原因,其相关的调控机制一直是胶质瘤研究关注热点^[5-6]。近年来, RNA N6-腺苷酸甲基化(N6-methyladenosine, m6A)修饰在肿瘤的发生、发展中的作用不断被揭示,被认为是除DNA和蛋白修饰外的表观遗传学的重要组成和研究新方向^[7]。

RNA的m6A修饰依赖m6A甲基化酶和去甲基化酶动态调节,可被m6A识别蛋白识别^[8]。m6A甲基化酶和去甲基化酶在胶质瘤细胞化疗抵抗中的关键作用已被揭示^[9]。本课题组近期数据库挖掘分析发现,由多个m6A修饰调控蛋白构建的预测模型可以有效预测胶质瘤的恶性进展,其预测的高风险和低风险肿瘤对TMZ化疗的敏感性也存在差异^[7]。本研究中,数据库分析发现, m6A识别蛋白YTH N6-甲基腺苷RNA结合蛋白2(YTH N6-methyladenosine RNA binding protein 2, YTHDF2)的表达水平可以预测MGMT启动子区甲基化GBM对TMZ化疗的敏感性;体外实验发现,敲低GBM细胞中的YTHDF2表达可增加其对TMZ的敏感性;临床队列分析及转录组数据揭示, YTHDF2表达增高与胶质瘤细胞分裂、细胞增殖及核因子- κB (nuclear factor kappa-B, NF- κB)通路的激活呈显著正相关,这些发现为进一步分层胶质瘤患者和预测化疗效果提供理论依据。

一、材料与方法

1. 数据库资料: 临床队列数据来自所在课题组建立的“中国脑胶质瘤基因组图谱计划(Chinese Glioma Genome Atlas, CGGA)”数据库中的325例胶

质瘤患者,具体信息从CGGA的官网(<http://www.cgga.org.cn>)获得,包括患者的组织学病理与分子病理信息、总生存期、术后辅助性治疗信息和包含YTHDF2在内的基因表达谱信息。患者的随访从初次确诊为脑胶质瘤开始,末次随访时间为2020年1月1日,随访信息包括:年龄、性别、诊断、治疗、疾病状态、存活状态。

纳入具有上述完整随访信息的309例患者进行预后相关因素分析,其中男194例,女115例;年龄8~71岁,中位年龄43岁。在接受TMZ治疗的100例GBM肿瘤中,MGMT甲基化32例,MGMT非甲基化38例,早期未检测MGMT甲基化状态者30例。

纳入标准:(1)大脑半球弥漫性胶质瘤(WHO II~IV级),至少接受过1次的术后随访;(2)经手术治疗后,获得明确的术后病理诊断。排除标准:病理信息不全的患者;失访患者。

本研究方案经首都医科大学附属北京天坛医院医学伦理委员会批准(伦理号:KY2019-143-02),患者或家属均签署知情同意书。

2. 病理学分群及YTHDF2表达分组:按照WHO《中枢神经系统分类指南》(2016)标准可分为5个病理学亚群:少突胶质细胞瘤,IDH突变和1p/19q联合缺失型;星形细胞瘤,IDH突变型;星形细胞瘤,IDH野生型;胶质母细胞瘤,IDH突变型;胶质母细胞瘤,IDH野生型^[10]。以YTHDF2在各个病理亚群中的中位表达值为阈值,将患者分为高表达组和低表达组,并在各亚群中进行生存分析。

在接受TMZ化疗的GBM患者中,应用生存曲线比较YTHDF2高表达的前20例患者与YTHDF2低表达的前20例患者对TMZ的敏感性。

3. 细胞和试剂:人胶质母细胞瘤细胞系U87细胞购买于中国医学科学院基础研究所,并在液氮中冻存。细胞学实验前,通过短串联重复序列分析进行了验证分析。实验过程中,细胞在添加10%胎牛血清(Hyclone,美国)的杜氏改良培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)进行培养,培养条件为37℃、5% CO₂。实验所需的TMZ原料药购买于美国默克公司。

4. 细胞慢病毒感染及实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)实验:包含YTHDF2特异敲低的短发夹RNA(Short Hairpin RNA, shRNA)序列和对照shRNA序列的慢病毒订购于合生基因(北京)。YTHDF2特异敲低和对照shRNA序列为:YTHDF2 shRNA1, 5'-GCCCAATAATGCATATACTTTCAAGAGAAGTATATGCATTATTGGGC-3';YTHDF2 shRNA2, 5'-GCTCTGGATATAGTAGCAATTC AAGAGATTGCTACTATATCCAGAGC-3';

对照shRNA, 5'-CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCCGAAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGG-3'。取10 μl浓度为1×10⁸个病毒/μl的慢病毒液,加入接种有U87细胞的6孔板中,并添加终浓度为8 μg/ml的促感染试剂Polybrene(合生基因,北京),将培养液混匀后置于37℃、5% CO₂中培养48~72 h,之后用0.5 μg/ml的嘌呤霉素筛选2周,筛选出稳定感染YTHDF2的细胞株。通过焦磷酸测序,检验U87细胞转染病毒后MGMT甲基化水平,临床判读甲基化和非甲基化阈值为10%^[11]。

使用实时荧光PCR仪器(ThermoFisher,美国),采用含SYBR Green的PCR扩增试剂盒(ThermoFisher,美国)对感染不同病毒的细胞株中的YTHDF2的表达水平进行检测。上游引物序列:5'-CCCTCACAGGCTTTGGTTCA-3',下游引物序列:5'-GCTGTGTC TGTTCCTACT-3'。

5. YTHDF2影响胶质瘤TMZ敏感性:将U87对照组、shRNA1和shRNA2组的1500个稳定感染的U87细胞铺在96孔板中,生长12 h后给不同的孔中添加200~2000 μmol/L浓度的TMZ处理48 h,通过细胞活性检测试剂盒8(cell counting Kit-8, CCK-8试剂盒;同仁化学研究所,日本)检测细胞的存活比例。

考虑到MGMT启动子甲基化状态影响胶质瘤对TMZ治疗的反应,在CGGA数据库队列中按照MGMT启动子区甲基化的状态,可将接受TMZ化疗的GBM患者分为MGMT甲基化组和非甲基化组,并根据YTHDF2表达水平高低在这两个组中分别绘制生存曲线。

6. 基因本体(gene ontology, GO)功能富集分析和基因集合富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA):在MGMT启动子区甲基化的GBM样品中,根据YTHDF2表达的中位数将样品分组,高于YTHDF2表达中位数者为高表达组,低于YTHDF2表达中位数者为低表达组。对比YTHDF2高表达组与低表达组的基因表达,通过*t*检验计算高低表达组间表达具有差异的基因,将与YTHDF2表达呈正相关的基因组成激活的差异基因集合,将与YTHDF2表达呈负相关的基因组成抑制的差异基因集合。GO分析:根据组间挑选出的差异基因,计算这些差异基因同GO分类中细胞功能或特点信号通路的超几何分布关系,GO分析会对每个有差异基因存在的GO分类算出一个特定的*P*值,*P*<0.05表示差异基因集中的基因在特定的GO分类中出现了有意义的富集。GSEA:首先是输入表达差异基因集,在输入表达矩阵,GSEA软件对基因根据其于表型的关联度排序,然后判断基因集内每条注释下的

基因与特定表型相关度排序后与基因表的上、下关系,从而判断此基因集内各基因对特定表型或信号通路变化的影响。然后使用R语言(版本3.6.1)中的“tidyverse”“ggplot2”“enrichplot”程序包分别对激活和抑制的差异基因集进行分析,获得激活和抑制的差异基因集主要富集的功能和信号通路,完成绘图。

7. 统计学方法:应用SPSS 22.0软件进行统计学分析。采用Kaplan-Meier进行生存曲线绘制,应用Log-rank进行生存差异的分析。实验分析中,通过KS检验方法验证数据是否符合正态分布,服从正态分布的连续性变量以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验;不服从正态分布的连续性变量以中位数和四分位数 $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示,两组间比较采用秩和检验。分类变量以例数和百分比表示,两组间比较采用 χ^2 检验。试验重复3次,数据取平均值。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

二、结果

1. YTHDF2表达水平的预后价值:提取CGGA数据中具备临床预后信息和分子病理信息的309例胶质瘤病例,见图1。结果显示,在星形细胞瘤/IDH突变、星形细胞瘤/IDH野生、GBM/IDH突变的3个病理学亚群中,YTHDF2高表达组患者的总体生存率均明显差于低表达组(均 $P < 0.05$,图1B、1C、1E)。在接受TMZ化疗的GBM患者中,YTHDF2高表达患者的平均总生存期显著短于YTHDF2低表达患者($P < 0.01$,图1F)。

2. 敲低胶质瘤细胞YTHDF2表达对TMZ化疗敏感性的影响:焦磷酸测序结果显示,病毒感染前后U87细胞MGMT启动子区甲基化平均水平分别占MGMT启动子区均处于高甲基化水平。PCR结果显示,感染YTHDF2特异shRNA1和shRNA2的细胞中,YTHDF2的mRNA表达水平均较对照shRNA明显降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$,图2A)。

经800、1 500、2 000 $\mu\text{mol/L}$ 的TMZ处理48 h后,与对照shRNA比较,YTHDF2 shRNA1(800 $\mu\text{mol/L}$ 的TMZ除外)和YTHDF2 shRNA2的细胞相对存活比例均明显降低,差异均具有统计学意义(均 $P < 0.01$,图2B),表现为敲低的YTHDF2的胶质瘤细胞对TMZ化疗增敏;经200、400、600、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的TMZ处理48 h后,与对照shRNA比较,YTHDF2敲低的胶质瘤细胞的相对存活比例差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

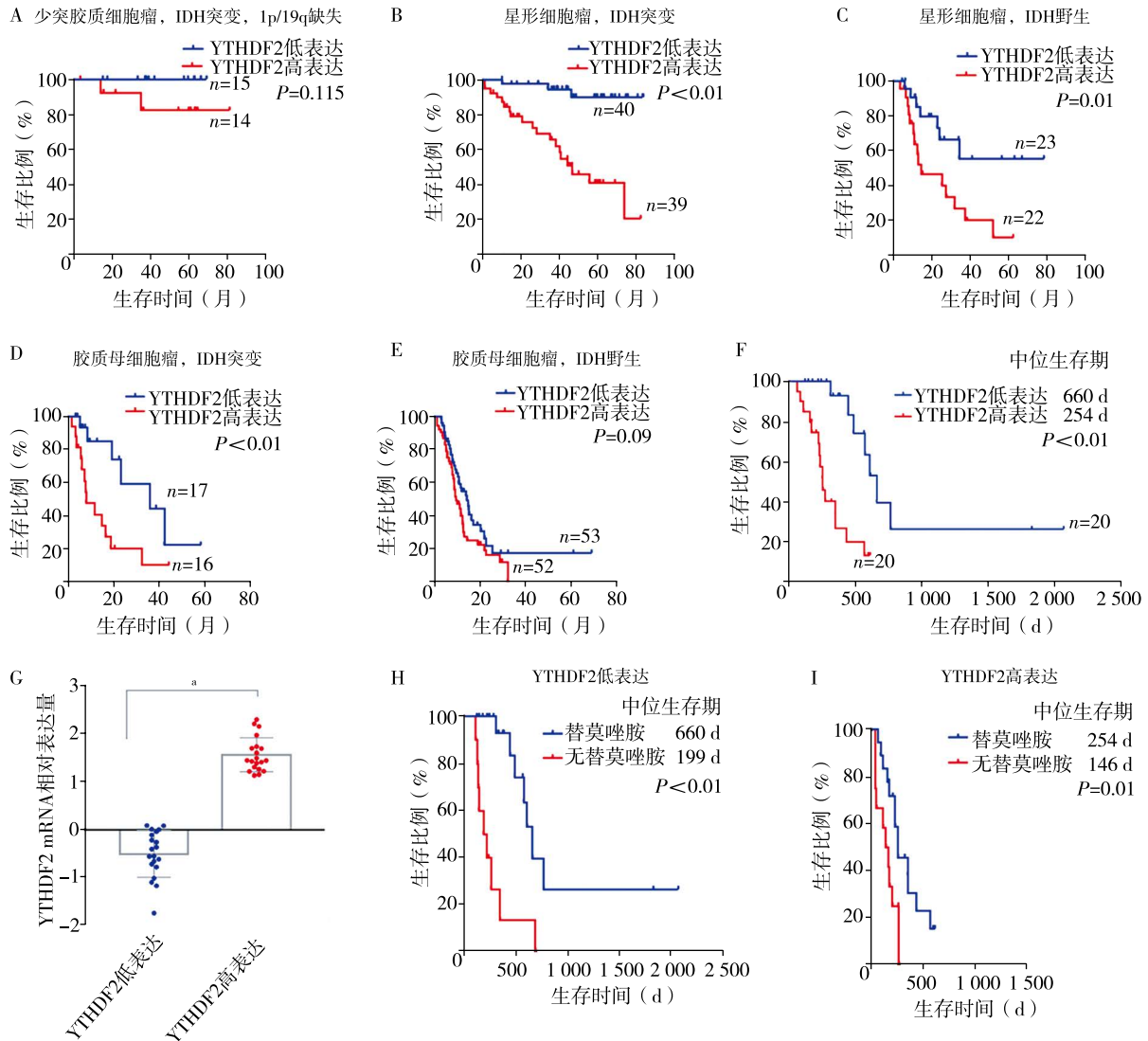
3. YTHDF2预测MGMT甲基化的胶质母细胞瘤对TMZ化疗的生存获益:在MGMT甲基化组中,YTHDF2低表达水平患者的总体生存率明显高于YTHDF2高表达水平患者($P < 0.05$);在MGMT非甲

基化组中,YTHDF2低高表达水平患者的总体生存率差异无统计学意义($P > 0.05$,图3B)。

4. YTHDF2表达相关的分子生物学特征挖掘与分析:在YTHDF2高表达组中有636个基因表达升高,161个基因表达降低(图4A)。进一步对这些差异基因进行KEGG通路注释,结果显示,表达升高的基因主要富集到与细胞因子介导的细胞间相互作用、细胞周期以及Janus激酶-信号转导和转录激活因子(Janus kinase- signal transducer and activator of transcription, JAK-STAT)信号通路,而表达降低的基因主要富集在正常神经活动相关的信号通路(图4B)。GSEA显示,YTHDF2高表达的GBM基因富集与上皮间质转化、细胞分裂活动和NF- κ B介导的TNF- α 等特征密切相关(图4C)。GO功能注释结果显示,在YTHDF2高表达组中,高表达的基因功能主要聚集在细胞周期和细胞因子相关的生物学过程中(图4D)。这些生物信息分析结果表明,RNA甲基化调控相关的细胞周期的改变、细胞因子介导的细胞微环境和细胞间相互作用的变化,可能是导致MGMT甲基化的胶质瘤化疗抵抗的潜在重要的分子机制。

讨论 口服烷化剂TMZ作为恶性胶质瘤术后化疗的一线用药,有效改善了GBM的总体生存预后^[1]。MGMT是重要的DNA损伤修复酶,可快速“自杀式”地修复烷化剂对DNA的烷基化修饰,是细胞抵抗化疗杀伤力的重要机制^[12],也因而MGMT启动子甲基化状态成为当前临床上广为认可的预测TMZ化疗敏感性的分子标志物。然而,临床也发现,即便在MGMT启动子甲基化的胶质瘤中,部分胶质瘤对TMZ治疗表现为天然耐药^[13],说明还存在其他的分子机制参与耐药过程。进一步挖掘化疗敏感性相关的分子标志物对进一步分层胶质瘤患者治疗具有重要的临床意义,并可为揭示胶质瘤耐药机制和打破化疗抵抗提供重要的理论基础。本研究发现, RNA甲基化调控蛋白YTHDF2的表达水平,可以作为进一步预测MGMT启动子区甲基化GBM患者对TMZ治疗敏感性的分子指标,通过临床样本转录组数据分析,探索了YTHDF2参与胶质瘤化疗耐药的潜在分子生物学机制。

除基因组变异和DNA甲基化修饰相外,研究也表明,胶质瘤RNA表达水平与肿瘤化疗敏感性及生存预后相关^[14]。RNA的表达受到表观遗传学的严密调控,除DNA和蛋白质存在表观遗传修饰外,还受到RNA表观遗传修饰的调控^[15],当前发现的超过80%的mRNA修饰为m6A甲基化,研究已证实长链非编码RNA和小RNA中也普遍存在m6A修饰,



注: 1A ~ 1C 较低级别胶质瘤中不同 YTHDF2 表达水平在 IDH 突变型少突胶质细胞(A)、IDH 突变型星形细胞瘤(B) 和 IDH 野生型星形细胞瘤(C) 中患者的生存差异; 1D ~ 1E 胶质母细胞瘤不同 YTHDF2 表达水平在 IDH 突变型(D) 和 IDH 野生型(E) 患者的生存差异; 1F ~ 1G 接受替莫唑胺治疗的胶质母细胞瘤 YTHDF2 表达水平前 20 例患者和表达水平后 20 例患者的生存期差异(F), 以及 mRNA 的表达差异(G); 1H ~ 1I 胶质母细胞瘤 YTHDF2 表达水平前 20 例患者和表达水平后 20 例患者的生存期差异(H), 以及 mRNA 的表达差异(I); CGGA 中国脑胶质瘤基因组图谱计划, YTHDF2 YTH N6-甲基腺苷 RNA 结合蛋白 2, IDH 异柠檬酸脱氢酶; *P < 0.05

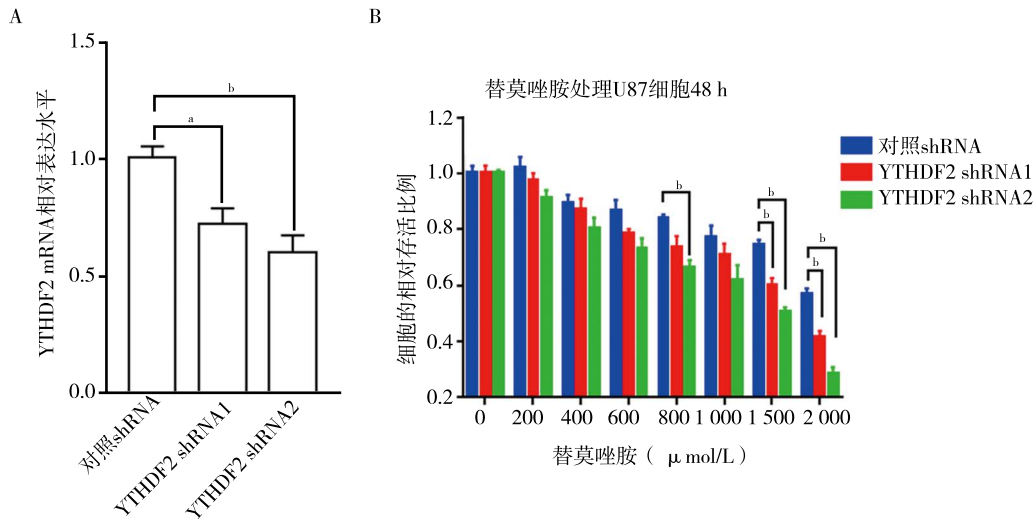
图 1 CGGA 数据库中 YTHDF2 表达与胶质瘤的生存期相关性

RNA 的 m6A 修饰与肿瘤的发生、发展以及治疗抵抗均密切相关^[7-8, 16]。Visvanathan 等^[17] 研究发现, 在胶质瘤干细胞中的 RNA m6A 修饰水平显著高于其配对的分化的胶质瘤细胞, 而敲低胶质瘤干细胞中 METTL3 的表达会导致 SRY 相关高迁移率族蛋白-2 的表达降低, 进而抑制胶质瘤干细胞的自我更新和肿瘤恶性进展, 并可增加肿瘤的化疗敏感性。我们近期发表的研究表明, RNA m6A 修饰阅读器 YTHDF2 表达随着胶质瘤的恶性级别升高而表达升高^[18]。本研究进一步揭示 YTHDF2 的表达也参与了胶质瘤的化疗抵抗, 为揭示 RNA m6A 修饰和胶质瘤的化疗抵抗之间的关系提供了新的视角。

NF-κB 信号通路激活与胶质瘤的恶性进展和 TMZ 抵抗均密切相关, 常伴随着胶质瘤的分子表型恶性转化和放疗抵抗^[19-20]。本研究发现, 细胞因子介导的细胞间的相互作用和 NF-κB 信号通路激活是 MGMT 启动子区甲基化伴 YTHDF2 高表达胶质瘤的显著特征, 推测可能是 YTHDF2 表达水平可预测 MGMT 甲基化胶质瘤 TMZ 化疗敏感性的潜在分子机制。

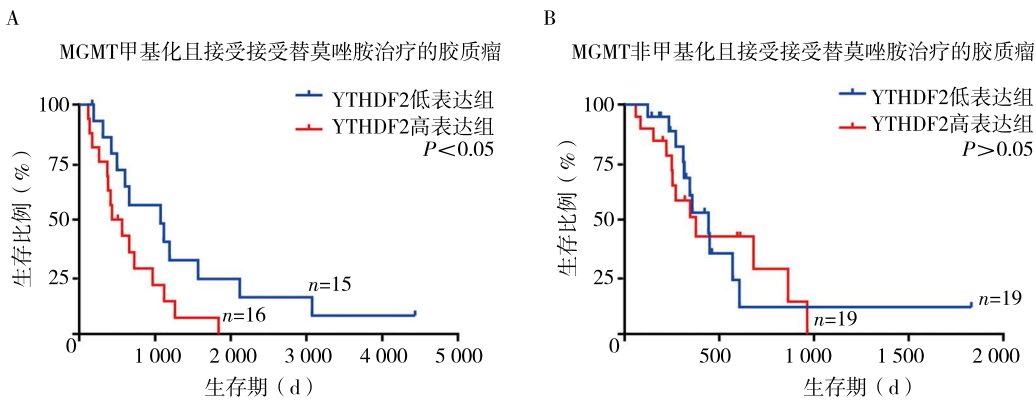
利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 试验设计为柴睿超、王永志; 实验分析和操作为王永志、常誉洲和柴睿超; 论文撰写为王永志和柴睿超; 论文修订为柴睿超



注: 2A 感染不同 shRNA 细胞的 YTHDF2 mRNA 的相对表达水平变化; 2B 感染不同 shRNA 细胞对不同浓度替莫唑胺治疗的药物反应; YTHDF2 为 YTH N6-甲基腺苷 RNA 结合蛋白 2, shRNA 为短双链 RNA, YTHDF2 shRNA1 YTHDF2 的编号为 1 的 shRNA, YTHDF2 shRNA2 YTHDF2 的编号为 2 的 shRNA; 与对照 shRNA 比较, ^a*P* < 0.05; ^b*P* < 0.01

图2 在胶质母细胞瘤细胞系 U87 中敲低 YTHDF2 的表达增加其对替莫唑胺治疗的敏感性



注: 3A 接受替莫唑胺治疗且 MGMT 甲基化的胶质母细胞瘤; 3B 接受替莫唑胺治疗且 MGMT 非甲基化的胶质母细胞瘤; YTHDF2 YTH N6-甲基腺苷 RNA 结合蛋白 2; MGMT O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶

图3 不同 YTHDF2 表达水平在 MGMT 甲基化与非甲基化胶质母细胞瘤中的生存曲线分析

参 考 文 献

[1] Jiang T, Mao Y, Ma W, et al. CGCG clinical practice guidelines for the management of adult diffuse gliomas[J]. Cancer Lett, 2016, 375(2): 263-273. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.01.024.

[2] Draaisma K, Chatzipli A, Taphoorn M, et al. Molecular evolution of IDH wild-type glioblastomas treated with standard of care affects survival and design of precision medicine trials: areport from the EORTC 1542 study[J]. J Clin Oncol, 2020, 38(1): 81-99. DOI: 10.1200/JCO.19.00367.

[3] Chai RC, Liu YQ, Zhang KN, et al. A novel analytical model of MGMT methylation pyrosequencing offers improved predictive performance in patients with gliomas[J]. Mod Pathol, 2019, 32(1): 4-15. DOI: 10.1038/s41379-018-0143-2.

[4] Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma[J]. N Engl J Med, 2005, 352(10): 997-1003. DOI: 10.1056/NEJMoa043331.

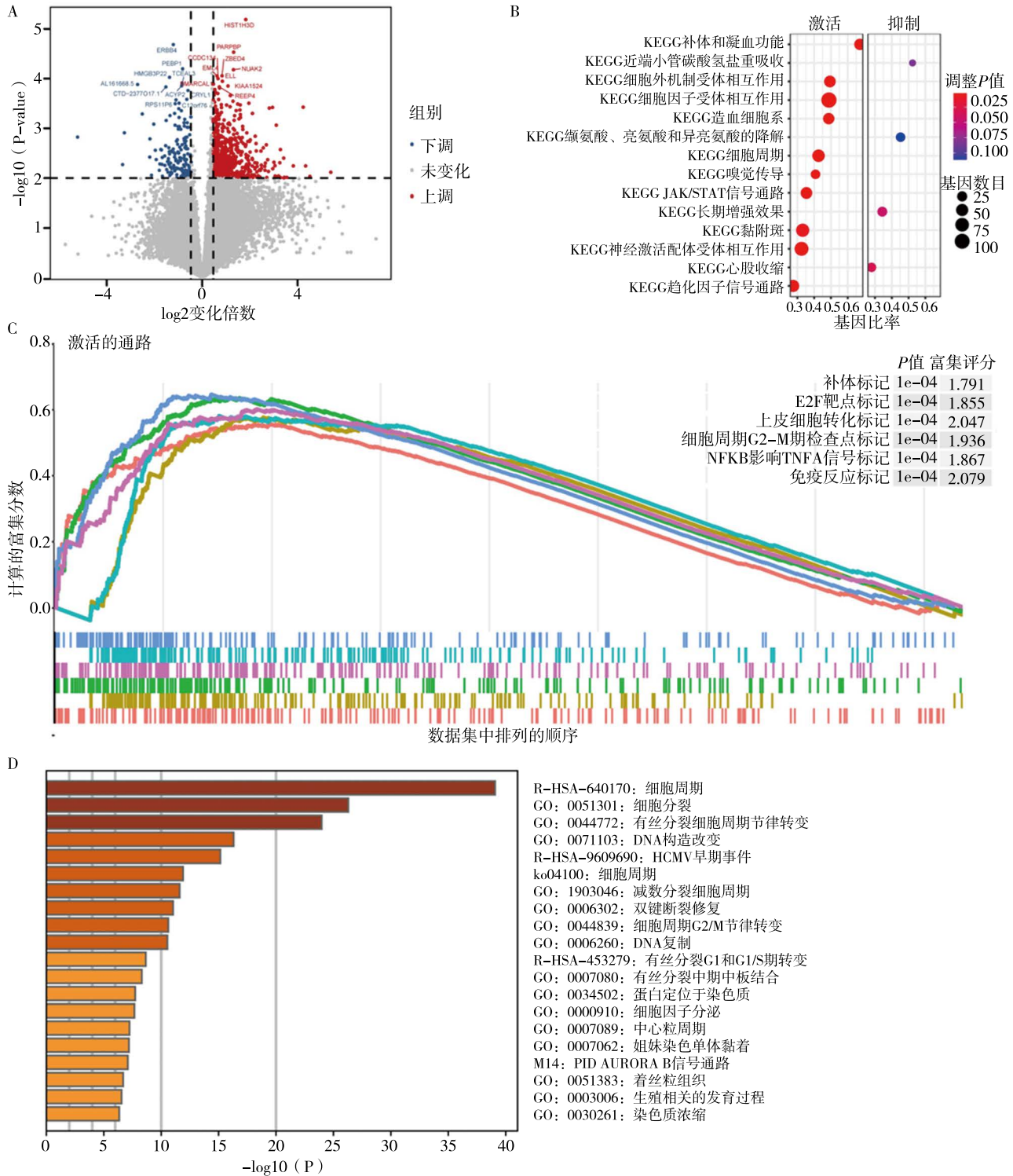
[5] Yamashita K, Hosoda K, Nishizawa N, et al. Epigenetic biomarkers of promoter DNA methylation in the new era of cancer treatment[J]. Cancer Sci, 2018, 109(12): 3695-3706. DOI: 10.1111/cas.13812.

[6] Chai RC, Chang YZ, Wang QW, et al. A novel DNA methylation-based signature can predict the responses of MGMT promoter unmethylated glioblastomas to temozolomide[J]. Front Genet, 2019, 10: 910. DOI: 10.3389/fgene.2019.00910.

[7] Chai RC, Wu F, Wang QX, et al. m(6)A RNA methylation regulators contribute to malignant progression and have clinical prognostic impact in gliomas[J]. Aging, 2019, 11(4): 1204-1225. DOI: 10.18632/aging.101829.

[8] Deng X, Su R, Weng H, et al. RNA N(6)-methyladenosine modification in cancers: current status and perspectives[J]. Cell Res, 2018, 28(5): 507-517. DOI: 10.1038/s41422-018-0034-6.

[9] Cui Q, Shi H, Ye P, et al. m(6)A RNA methylation regulates the self-renewal and tumorigenesis of glioblastoma stem cells[J]. Cell Rep, 2017, 18(11): 2622-2634. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.02.059.



注: 4A 火山图展示 YTHDF2 高表达和低表达组的差异基因; 4B YTHDF2 高表达组和低表达组差异基因的功能分析; 4C YTHDF2 高表达组中富集基因的生物特征; 4D YTHDF2 高表达组中上调基因的功能注释; CGGA 中国脑胶质瘤基因组图谱计划, MGMT O6-甲基鸟嘌呤转移酶, YTHDF2 YTH N6-甲基腺苷 RNA 结合蛋白 2, GO 基因功能分析, KEGG 基因集合富集分析, NES 标准化富集分数, HCMV 人巨细胞病毒, JAK/STAT Janus 激酶-信号转导和转录激活因子

图 4 CGGA 数据库中 MGMT 甲基化且接受替莫唑胺治疗的胶质母细胞瘤 YTHDF2 表达水平相关的生物信息分析

[10] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary[J]. Acta Neuropathol, 2016, 131(6): 803-820. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1.

[11] Chai RC, Li G, Liu YQ, et al. Predictive value of MGMT promoter methylation on the survival of TMZ treated IDH-mutant glioblastoma[J]. Cancer Biol Med, 2021, 18(1): 272-282. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0179.

· 胶质瘤专题 ·

间变脑胶质瘤中异柠檬酸脱氢酶突变对患者术后替莫唑胺化学治疗及预后的影响: 285例单中心回顾性研究

杨沛 王宽宇 张传宝 王政 游赣 单侠

100070 首都医科大学附属北京天坛医院神经外科(杨沛、张传宝、王政、游赣), 伽玛刀治疗中心(王宽宇), 放疗中心(单侠); 100070 北京市神经外科研究所(杨沛、王宽宇、张传宝、王政、游赣、单侠)

通信作者: 单侠, Email: xiashan92@126.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2021.05.004

【摘要】目的 分析间变脑胶质瘤中异柠檬酸脱氢酶(IDH)突变与患者临床病理学因素的相关性及对术后化学治疗敏感性的影响。**方法** 回顾性连续纳入中国胶质瘤基因图谱计划(CGGA)数据库中接受开颅手术且术后病理诊断为间变脑胶质瘤(世界卫生组织Ⅲ级)患者, 术后接受放射治疗和(或)替莫唑胺(TMZ)化学治疗。肿瘤组织标本在放射治疗和(或)化学治疗前通过手术切除获得, 使用QIAamp DNA Mini试剂盒按照说明书从冷冻肿瘤组织中提取基因组DNA, 使用纳米滴ND-1000分光光度计测定DNA浓度和质量, 进行IDH1/2突变、1p/19q缺失、MGMT启动子甲基化的检测。应用SPSS 16.0软件通过单因素和多因素Cox生存分析分析临床及分子病理因素与患者总生存期的相关性以及对术后放射治疗和替莫唑胺化学治疗敏感性的影响; 使用GraphpadPrism 8软件进行Kaplan-Meier曲线生存分析。**结果** 共纳入285例间变脑胶质瘤患者, 其中201例(70.5%)表现为IDH突变, 84例(29.5%)表现为IDH野生。多因素Cox回归分析显示, IDH突变($HR=0.531$, $95\%CI: 0.385 \sim 0.733$, $P < 0.001$)及1p/19q联合缺失($HR=0.352$, $95\%CI: 0.179 \sim 0.691$, $P=0.002$)均可独立预测患者总生存期, 而O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(MGMT)启动子甲基化的预测价值差异无统计学意义($P=0.071$)。IDH突变组中, 接受术后TMZ化学治疗的患者较未接受者预后有所改善, 但差异无统计学意义(中位生存期: 1 793 d比1 455 d, $P=0.059$), 而在IDH野生组中, TMZ化学治疗对患者预后改善不明显(中位生存期: 535 d比415 d, $P=0.890$)。**结论** 本研究发现IDH突变型间变脑胶质瘤在接受术后TMZ化疗后, 预后有所改善趋势, 相关结果可能为今后WHO Ⅲ级脑胶质瘤术后化疗的研究提供思路。

【关键词】 间变脑胶质瘤; 异柠檬酸脱氢酶; 突变; 替莫唑胺; 化学治疗; 生存预后

基金项目: 国家自然科学基金项目(81903060)

- [12] Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents[J]. N Engl J Med, 2000, 343(19): 1350-1354. DOI: 10.1056/NEJM200011093431901.
- [13] Yi GZ, Huang G, Guo M, et al. Acquired temozolomide resistance in MGMT-deficient glioblastoma cells is associated with regulation of DNA repair by DHC2 [J]. Brain, 2019, 142(8): 2352-2366. DOI: 10.1093/brain/awz202.
- [14] Zhang W, Zhang J, Hoadley K, et al. miR-181d: a predictive glioblastoma biomarker that downregulates MGMT expression[J]. NeuroOncology, 2012, 14(6): 712-719. DOI: 10.1093/neuonc/nos089.
- [15] Yang Y, Hsu PJ, Chen YS, et al. Dynamic transcriptomic m6A decoration: writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism[J]. Cell Res, 2018, 28(6): 616-624. DOI: 10.1038/s41422-018-0040-8.
- [16] Roundtree IA, Evans ME, Pan T, et al. Dynamic RNA modifications in gene expression regulation[J]. Cell, 2017, 169(7): 1187-1200. DOI: 10.1016/j.cell.2017.05.045.
- [17] Visvanathan A, Patil V, Arora A, et al. Essential role of METTL3-mediated m(6)A modification in glioma stem-like cells maintenance and radioresistance[J]. Oncogene, 2018, 37(4): 522-533. DOI: 10.1038/onc.2017.351.
- [18] Yang F, Liu X, Liu Y, et al. miR-181d/MALT1 regulatory axis attenuates mesenchymal phenotype through NF-kappaB pathways in glioblastoma[J]. Cancer Lett, 2017, 396: 1-9. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.03.002.
- [19] Ius T, Ciani Y, Ruaro ME, et al. An NF-kappaB signature predicts low-grade glioma prognosis: a precision medicine approach based on patient-derived stem cells[J]. Neuro Oncol, 2018, 20(6): 776-787. DOI: 10.1093/neuonc/fox234.
- [20] Bhat KPL, Balasubramanian V, Vaillant B, et al. Mesenchymal differentiation mediated by NF-kappaB promotes radiation resistance in glioblastoma[J]. Cancer cell, 2013, 24(3): 331-346. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.08.001.

(收稿日期: 2020-11-16)

(本文编辑: 赵金鑫)

Effect of IDH mutation on postoperative temozolomide chemotherapy and prognosis in anaplastic gliomas: a single-center retrospective study of 285 patients Yang Pei, Wang Kuanyu, Zhang Chuanbao, Wang Zheng, You Gan, Shan Xia

Department of Neurosurgery, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100070, China (Yang P, Zhang CB, Wang Z, You G); Gamma Knife Treatment Center, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100070, China (Wang KY); Radiotherapy Center, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100070, China (Shan X); Beijing Neurosurgical Institute, Beijing 100070, China (Yang P, Wang KY, Zhang CB, Wang Z, You G, Shan X)
Corresponding author: Shan Xia, Email: xiashan92@126.com

【Abstract】 Objective To analyze the correlation between isocitrate dehydrogenase (IDH) mutation and clinicopathological factors in patients with anaplastic gliomas and its effect on the sensitivity of postoperative chemotherapy. **Methods** The patients from the Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA) database who underwent craniotomy, were pathologically diagnosed as anaplastic glioma (WHO Grade III), and received radiotherapy and/or temozolomide (TMZ) chemotherapy after surgery were retrospectively consecutively included. Tumor tissue samples were obtained by surgical resection before radiotherapy and/or chemotherapy. Genomic DNA was extracted from frozen tumor tissue by QIAamp DNA mini kit according to the instructions. The concentration and quality of DNA were determined by MD-1000 spectrophotometer. IDH1/2 mutation, 1p/19q deletion and Mgmt promoter methylation were detected. SPSS 16.0 software was used to analyze the correlation between clinical and molecular pathological factors and overall survival, and the effect on the sensitivity of postoperative radiotherapy and temozolomide chemotherapy. Kaplan-Meier curve survival analysis was performed using GraphpadPrism 8 software. **Results** A total of 285 patients with anaplastic gliomas were included. Among them, 201 (70.5%) showed IDH mutation and 84 (29.5%) showed IDH wild. Multivariate Cox regression analysis showed that IDH mutation ($HR=0.531$, 95% CI : 0.385–0.733, $P<0.001$) and 1p/19q deletion ($HR=0.352$, 95% CI : 0.179–0.691, $P=0.002$) were both independent predictors of overall survival, while the predictive value of O6 methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation had no significant difference ($P=0.071$). In IDH mutation group, the prognosis of patients receiving TMZ chemotherapy was improved, but the difference was not statistically significant (median survival: 1 793 d vs 1 455 d, $P=0.059$). In IDH wild group, TMZ chemotherapy did not significantly improve the prognosis (median survival: 535 d vs 415 d, $P=0.890$). **Conclusions** In this study, it is found that the prognosis of IDH mutant anaplastic glioma after TMZ chemotherapy was improved, but the difference was not statistically significant. The relevant results may provide ideas for the future research of who grade III glioma postoperative chemotherapy.

【Key words】 Anaplastic glioma; Isocitrate dehydrogenase; Mutation; Temozolomide; Chemotherapy; Prognosis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81903060)

恶性脑胶质瘤是目前成人颅内最常见的原发性肿瘤,约占原发性脑肿瘤的80%^[1]。间变性脑胶质瘤[世界卫生组织(World Health Organization, WHO) III级]异质性较强,根据WHO中枢神经系统肿瘤分级主要可分为间变性星形细胞瘤(anaplastic astrocytoma, AA 9401/3)、间变性少突星形细胞瘤(anaplastic oligoastrocytoma, AOA 9382/3)和间变性少突胶质细胞瘤(anaplastic oligodendroglioma, AO 9451/3),其中少突胶质细胞成分逐步增加^[2]。在美国,胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)占恶性脑胶质瘤的60%~70%,AA占10%~15%,AO和AOA约占10%^[3-4]。但在中国高级别脑胶质瘤患者人群中,间变脑胶质瘤所占比例相对较高^[5]。恶性脑胶质瘤标准化治疗包括手术治疗和术后放射治疗(简称放疗)或术后放疗联合化学治疗(简称化疗)^[6-7]。目前大多数回顾性研究或临床试验均将III级或IV级星形细胞瘤以及III级少突胶质细胞瘤定义为高级别恶性脑胶质瘤^[8-9]。

GBM术后放化疗可显著延长患者总生存期及无进展生存期^[10],但治疗效果是否可推及间变脑胶质瘤目前尚无明确定论。目前数项针对间变脑胶质瘤的队列研究或临床试验证实^[11-14],在使用一致治疗方案的前提下,AA、AO和AOA患者的生物行为和临床结果存在明显差异,这主要归因于间变脑胶质瘤的异质性。因此,根据已知的预后因素预测WHO III级胶质瘤患者的生存结果对治疗方案具有重要指导意义。

参照美国国家综合癌症网络(the National Comprehensive Cancer Network, NCCN)发布的中枢神经系统肿瘤治疗指南,间变脑胶质瘤目前标准化治疗主要包括最大安全范围切除联合术后标准放疗,同时可辅以替莫唑胺(temozolomide, TMZ)或洛莫司汀+丙卡巴肼+长春新碱(lomustine + procarbazine + vincristine, PCV)方案化疗^[15]。虽然与GBM治疗方式相近,但间变脑胶质瘤术后平均生存期对比GBM明显较长。

而不同间变脑胶质瘤患者在接受标准化治疗后预后常存在极大差异,这与间变脑胶质瘤的异质性及对术后放化疗敏感性的差异密切相关。大量研究均证实,GBM术后接受放疗辅以TMZ化疗可显著改善生存预后,延长患者生存期^[10,16]。尽管目前术后化疗广泛应用于治疗间变脑胶质瘤,同时也有大量针对间变脑胶质瘤术后化疗的临床试验正在进行,但除1p/19q联合缺失的AO被明确证实对PCV方案敏感以外^[17],其余分类仍无明确证据证实化疗对其预后改善的有效性。

分子病理学检测因其在诊断和指导治疗方面的优势,已广泛应用于胶质瘤的临床诊疗中,大量研究也都旨在讨论分子生物标志物与胶质瘤患者预后的相关性以及对治疗的指导意义^[18]。脑胶质瘤治疗中目前认为具有重大意义的分子标志物包括异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH)突变、O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基化转移酶(O6-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)启动子甲基化以及1p/19q杂合性缺失^[19-21]。早在2005年,Stupp团队就发现,MGMT启动子甲基化阳性的GBM对TMZ化疗敏感^[22];RTOG9402和EORTC26951两项临床试验的长期随访结果证实,含有少突成分的间变脑胶质瘤对PCV化疗方案敏感^[17,23]。目前研究证实,IDH基因突变发生在胶质瘤发生的极早期,突变结果导致酶活性的降低并产生具有活性的2-羟戊二酸,这些改变最终触发表观遗传改变消除了胶质瘤CpG岛甲基化表型(Glioma CpG island methylator phenotype, G-CIMP),同时导致患者预后的显著差异^[24]。

虽然目前临床治疗中普遍将IDH突变作为间变脑胶质瘤最重要的生物标志物之一,但其对化疗尤其是目前的一线化疗药物TMZ的敏感性的影响并不明确,本研究回顾性纳入了中国胶质瘤基因组图谱计划(the Chinese Glioma Genome Atlas, CGGA)数据库中间变脑胶质瘤病例,旨在分析IDH突变等标志性分子标志物变化对TMZ化疗敏感性的影响,以期可对间变胶质瘤的治疗起到一定的指导作用。

一、对象与方法

1. 研究对象:纳入病例均来自CGGA数据库:(1)年龄 ≥ 18 周岁;(2)入院并接受开颅肿瘤切除术,切除范围为全切除或次全切除,仅行开颅活检病例未纳入本研究;(3)病理诊断依据2016版WHO中枢神经系统肿瘤分类标准^[1],纳入患者术后病理诊断均为间变脑胶质瘤(WHO III级;由至少2名病理科医师诊断,且意见统一,如意见不统一则重新阅读病理

切片,直至意见统一)。从病历中获得患者诊断时的年龄、性别、病理等临床资料。总生存期(overall survival, OS),定义为手术时间至死亡的时间;无进展生存(progression-free survival, PFS)被定义为手术时间至影像学进展(出现新发病灶或残余灶增大体积 $\geq 25\%$)的时间^[5],随访主要通过患者复诊或电话随访。本研究方案经北京天坛医院伦理委员会批准(伦理号:KYSQ 2019-151-01),并获得所有患者的书面知情同意。本研究中少部分患者的术后治疗及分子病理学信息在随访或数据收集过程中缺失记录为不详。

2. 治疗方法:标准治疗包括手术和术后放疗,包括或不包括辅助化疗;肿瘤最大体积切除同时保留关键功能区皮层是手术的主要目标,在肿瘤涉及大脑功能区或深部重要结构时,使用术前功能磁共振成像结合术中唤醒手术或在MR手术室完成手术。术后72 h行增强MRI评估切除范围,分为全切除或次全切除。术后1个月内患者接受辅助放疗,总剂量为60 Gy(2 Gy, 30次)。对接受辅助化疗的患者在放疗后4周给予治疗,至少维持2个周期,辅助用药以TMZ为主,如无肿瘤进展或严重毒副作用,总共进行6个周期的化疗。

3. 肿瘤样本:肿瘤组织标本在放疗和(或)化疗治疗前通过手术切除获得,切除的标本被快速冷冻并保存在液氮中,后续进行用于DNA提取或石蜡包埋。

4. DNA提取:使用QIAamp DNA Mini试剂盒(QIAGEN, Germany, Cat No.: 51304)按照说明书从冷冻肿瘤组织中提取基因组DNA。使用纳米滴ND-1000分光光度计(NanoDrop Technologies, Houston, TX)测定DNA浓度和质量。

5. IDH1/2突变检测:IDH1/2检测通过DNA焦磷酸测序分析,R132 IDH1和R172 IDH2分别使用以下引物:IDH1,5'-GCTTGTGAGTGGATGGGTTAAAC-3',5'-生物素-TTGCCAACATGACTTACTTGATC-3';IDH2,5'-ATCCTGGGGGGGACTGTCTT-3',5'-生物素-CTCTCCACCCTGGCCTACCT-3'。PCR分析在40 ml反应体积中重复行,包含1 μ l的10 μ mol/L正向引物和反向引物,4 μ l 10 \times buffer, 3.2 μ l的2.5 mmol/L的三磷酸碱基脱氧核苷酸(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTPs), 2.5 U的hotstart Taq (Takara, Madison, WI)和2 μ l 10 μ mol/L DNA。聚合酶链式反应(PCR)条件如下:95 $^{\circ}$ C 3 min;40个周期95 $^{\circ}$ C 15 s, 56 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 5 min(ABI PCR系统9700)。从总PCR产物中纯化出单链DNA并在PyroMark

Q96 ID系统上进行焦磷酸测序(Qiagen),使用引物 5'-TGGATGGGTAACCT-3'和EpiTect亚硫酸氢盐试剂盒(Qiagen)。具体检测方法参照文献[25]。

6. 1p/19q 缺失检测:肿瘤组织石蜡固定后切片,厚度为4 μm,使用苏木精和伊红染色。接下来用二甲苯脱蜡,用0.3%胃蛋白酶在10 mmol/L HCl中37℃条件下放置孵育10 min,然后在85℃的温度下变性10 min。双色荧光原位杂交采用1p36/1q25和19q13/19p13的LSI探针进行(光谱橙色标记1p36和19q13探测器;光谱绿色标记1q25和19p13探针);在至少200个完整形态且非重叠细胞核中进行评估,具体检测方法参照之前报道[26]。

7. MGMT启动子甲基化检测:DNA亚硫酸氢盐修饰使用EpiTect试剂盒(QIAGEN, Germany, Cat No.: 59104)。用两种引物扩增MGMT启动子区:5'-GTTTYGGATATGTTGGGATA-3'及反向:5'-生物素-ACCCAAACACTCACAATC-3'。PCR分析在40 ml反应体积中重复进行,包含0.5 μl的10 μmol/L正向引物和反向引物,4 μl 10×buffer,3.2 μl的2.5 mmol/L的dNTPs,2.5 U的hotstart Taq(Takara, Madison, WI)和2 μl的10 μmol/L亚硫酸氢盐处理的DNA。PCR条件如下:95℃3 min;40个周期

95℃15 s,52℃30 s,72℃30 s;72℃5 min(ABI PCR system 9700)。从总PCR产物中纯化DNA,使用QIAampDNA Min试剂盒(Qiagen)并按照制造商说明使用引物5'-GGATATGTTGGGATAGT-3'进行焦磷酸测序[PyroMark Q96 ID系统(Qiagen)]。甲基化值在MGMT启动子内7个CpG中取平均值,MGMT启动子甲基化平均值大于10%的样本定义为甲基化阳性。MGMT启动子甲基化状态具体检测参照之前的研究方法[25]。

8. 统计学方法:应用SPSS 16.0软件通过卡方检验统计分析自变量之间的相关性,通过单因素和多因素Cox生存分析探究临床及分子病理因素与患者OS的相关性;使用GraphpadPrism8软件进行Kaplan-Meier曲线生存分析;纳入因素的选择基于之前团队研究[5,27]及文献报道[28],纳入了可能与临床预后相关的因素。双侧P<0.05为差异具有统计学意义。

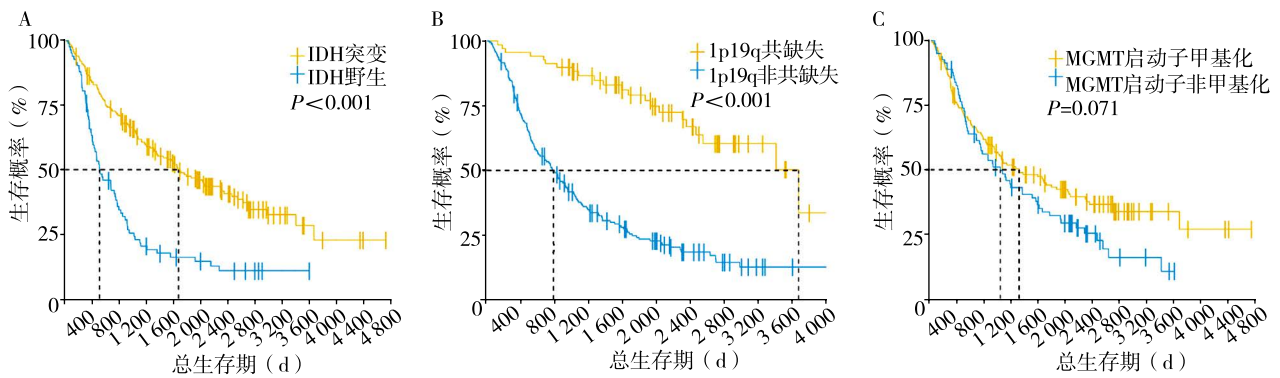
二、结果

1. 患者的临床及分子病理学特征:共纳入285例间变脑胶质瘤患者(WHO III级),其中IDH突变型201例,IDH野生型84例;年龄18~74岁,中位年龄为41.0岁,其中IDH突变组年龄22~67岁,中位年龄为40.0岁,野生组年龄18~74岁,中位年龄为

表1 285例间变脑胶质瘤(WHO III级)患者临床及分子病理特征

项目	总例数(n=285)	IDH突变(n=201)	IDH野生(n=84)	t/χ ² 值	P值
年龄[岁, M(P ₂₅ , P ₇₅)]	41.0(35.0, 48.0)	40.0(35.0, 46.0)	43.5(31.0, 55.0)	-1.754	0.082
男性[例(%)]	156(54.7)	110(54.7)	46(54.8)	0.000	0.996
病理类型[例(%)]					
AA	194(68.1)	117(58.2)	77(91.7)		
AO	83(29.1)	76(37.8)	7(8.3)	30.760	<0.001
AOA	8(2.8)	8(4.0)	0(0.0)		
1p/19q联合缺失[例(%)]					
是	71(24.9)	66(32.8)	5(6.0)		
否	193(67.7)	122(60.7)	71(84.5)	22.400	<0.001
不详	21(7.4)	13(6.5)	8(9.5)		
MGMT启动子甲基化[例(%)]					
是	153(53.7)	125(62.2)	28(33.3)		
否	83(29.1)	36(17.9)	47(56.0)	36.460	<0.001
不详	49(17.2)	40(19.9)	9(10.7)		
术后放疗[例(%)]					
有	227(79.6)	160(79.6)	67(79.8)		
无	56(19.6)	39(19.4)	17(20.2)	0.015	0.902
不详	2(0.7)	2(1.0)	0(0.0)		
术后替莫唑胺化疗[例(%)]					
有	216(75.8)	151(75.1)	65(77.4)		
无	69(24.2)	50(24.9)	19(22.6)	0.164	0.685

注:WHO 世界卫生组织, IDH 异柠檬酸脱氢酶, AA 间变性星形细胞瘤, AO 间变性少突胶质细胞瘤, AOA 间变性少突星形细胞瘤, MGMT O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基化转移酶, 放疗为放射治疗, 化疗为化学治疗



注：1A IDH突变对患者的总生存期的影响；1B 1p/19q联合缺失对患者的总生存期的影响；1C MGMT启动子甲基化对患者的总生存期的影响；IDH 异柠檬酸脱氢酶，MGMT O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基化转移酶，WHO 世界卫生组织

图1 IDH突变、1p/19q联合缺失及MGMT启动子甲基化对间变脑胶质瘤(WHO III级)患者总生存期影响的Kaplan-Meier生存曲线分析

表2 与间变脑胶质瘤(WHO III级)患者开颅肿瘤切除术预后相关因素的单因素及多因素生存分析

变量	单因素分析		多因素分析	
	HR (95%CI)	P值	HR (95%CI)	P值
病理类型(AO&AOA)				
AA	0.285 (0.196 ~ 0.416)	< 0.001	0.700 (0.386 ~ 1.271)	0.241
性别(女)				
男	1.183 (0.882 ~ 1.586)	0.261	-	-
年龄(> 40岁)				
≤ 40岁	1.018 (0.761 ~ 1.360)	0.906	-	-
放射治疗(否)				
是	0.819 (0.574 ~ 1.168)	0.270	-	-
TMZ(否)				
是	0.819 (0.588 ~ 1.141)	0.238	-	-
IDH突变(否)				
是	0.386 (0.285 ~ 0.523)	< 0.001	0.531 (0.385 ~ 0.733)	< 0.001
1p/19q联合缺失(否)				
是	0.220 (0.140 ~ 0.346)	< 0.001	0.352 (0.179 ~ 0.691)	0.002
MGMT启动子甲基化(否)				
是	0.742 (0.535 ~ 1.027)	0.063	-	-

注：括号内为对照；WHO 世界卫生组织，AA 间变性星形细胞瘤，AO 间变性少突胶质细胞瘤，AOA 间变性少突星形细胞瘤，IDH 异柠檬酸脱氢酶，MGMT O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基化转移酶；- 无数据

43.5岁；AA 194例，AO 83例和AOA 8例，其中IDH突变组中AO/AOA比例较高(41.8%)，而IDH野生组中比例较低(8.3%， $P < 0.001$)；1p/19q联合缺失占24.9%，IDH突变组中1p/19q联合缺失率较野生组明显高(32.8%比6.0%， $P < 0.001$)；MGMT启动子甲基化阳性比例为53.7%，IDH突变组对比野生组MGMT启动子甲基化比例明显较高(62.2%和33.3%， $P < 0.001$)；227例(79.6%)接受术后辅助放疗，216例(75.8%)接受了术后辅助TMZ化疗。见表1。

2. 临床及分子病理对患者预后的影响：将病理类型(是否包含少突胶质细胞成分，AA、AO和AOA)，性别、年龄、IDH突变情况、1p/19q联合缺失、MGMT启动子甲基化、术后放疗和术后TMZ化疗等

因素纳入单因素生存分析，其中病理类型、IDH突变及1p/19q联合缺失与术后OS显著相关(均 $P < 0.001$)，具有IDH突变或1p/19q联合缺失的患者其预后较野生型或1p/19q非共缺失患者显著提高(中位生存期：1680 d比514 d，图1A；中位生存期：3677 d比784 d，图1B)，具有MGMT启动子甲基化的患者预后较非甲基化患者略好，但差异无统计学意义(中位生存期：1314 d比1037 d， $P = 0.071$ ，图1C)。将病理类型、IDH突变及1p/19q联合缺失纳入多因素生存分析，发现IDH突变和1p/19q联合缺失是可独立预测患者预后的因素(表2)。

3. IDH突变对术后放疗及TMZ化疗敏感性的影响：IDH突变组中，术后使用TMZ化疗的患者预后

较术后未行化疗患者有所改善,但差异无统计学意义(中位生存期1 793 d比1 455 d, $P=0.059$, 图2A),接受术后放疗的患者预后较未接受放疗患者中位生存期稍长,但差异无统计学意义(1 765 d比1 314 d, $P=0.130$, 图2B)。在IDH野生组中,术后接受放疗($P=0.740$)或TMZ化疗($P=0.890$)均不能改善患者的生存预后(图2D, 2E)。随后在IDH突变组中对同时接受术后放疗加化疗、仅术后放疗、仅术后化疗和术后未接受放化疗的患者预后进行比较,各组间差异无明显统计学意义($P > 0.05$, 图2C),在IDH野生组中术后放化疗对患者预后的影响差异无统计学意义($P > 0.05$, 图2F)。

4.1p/19q共缺失及MGMT启动子甲基化对术后TMZ化疗敏感性的影响:在有1p/19q共缺失的患者中,术后使用TMZ化疗的患者其预后较术后未行化疗患者预后无明显改善($P=0.190$, 图3A);在非1p/19q共缺失患者中,术后TMZ化疗同样不能明显改善患者预后($P=0.820$, 图3B)。同样,无论在MGMT启动子甲基化患者中($P=0.500$, 图3C)还是在MGMT启动子非甲基化患者($P=0.310$, 图3D)中,术后TMZ化疗对患者总生存期无显著影响。

讨论 IDH基因家族突变多发生在脑胶质瘤发生的早期^[29],在其生物学进程中起到至关重要的作用,多项研究证实,IDH突变与高级别脑胶质瘤预后密切相关^[30-31]。相比之下,很少有研究详细区分肿瘤自然进程中的特征性分子标志物对预后的预测价值与对肿瘤对治疗的敏感性。本研究结果表明,在间变脑胶质瘤中,IDH突变是一个重要的独立有利预后因子,重要性与1p/19q联合缺失相当。更重要的是,本研究部分证据表明,IDH突变可能是间变脑胶质瘤对TMZ化疗敏感性的预测因子。

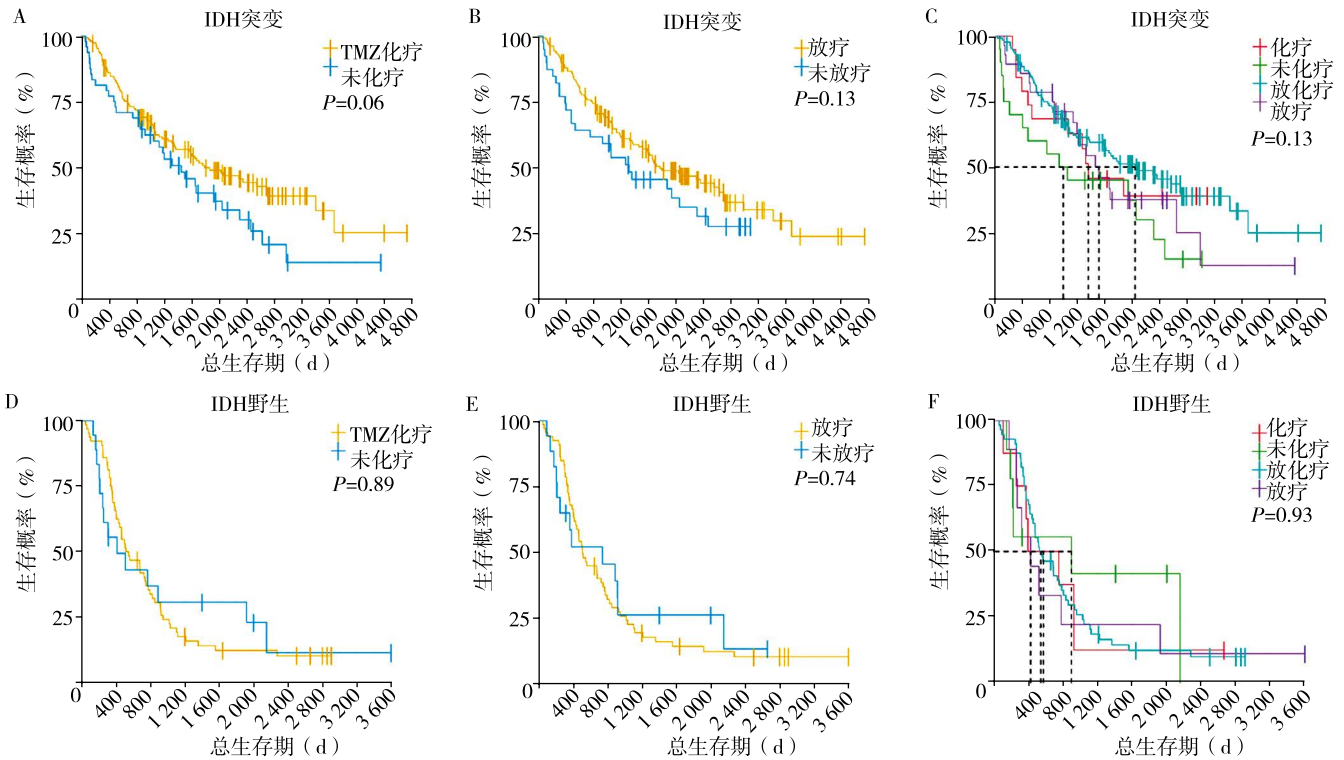
依据WHO分型标准,间变脑胶质瘤虽然统一归为Ⅲ级脑胶质瘤,但由于有较强的异质性而致其具有不同的生物学特征,因此,虽然同样诊断为间变脑胶质瘤,但不同患者的预后和对治疗的敏感性往往存在极大差异。

RTOG9402 Ⅲ期临床试验研究结果证实,含有少突胶质细胞成分的间变脑胶质瘤(AO/AOA),如存在1p/19q联合缺失即对PCV方案化疗较敏感^[13],该结论已纳入NCCN中枢神经系统肿瘤治疗指南用于指导临床治疗。NOA-04临床试验以及其验证组NOA-08临床试验证实,MGMT启动子甲基化与化疗敏感性密切相关,其对化疗敏感性的预测与是否接受放疗及IDH突变情况无明显相关性^[32]。

VendenBent教授团队对49例低级别星形细胞瘤的回顾性研究中并未发现IDH突变与TMZ化疗敏感性具有相关性^[33]。在另外一项发表于临床肿瘤学杂志的关于RTOG9402临床试验的研究中,Cairncross团队发现,在AO/AOA中,IDH突变型患者对PCV方案化疗敏感,且不受1p/19q联合缺失因素的影响^[34]。本团队在前期研究中回顾性纳入274例WHO Ⅳ级脑胶质瘤患者,发现IDH野生型患者接受术后放疗加TMZ化疗预后明显优于单纯接受术后放疗,而在IDH突变型患者中,接受术后放疗加TMZ化疗与单纯接受术后放疗组间预后无显著差异,同时在细胞系实验中同样发现,IDH过表达细胞系对TMZ表现出明显的耐药性^[27]。

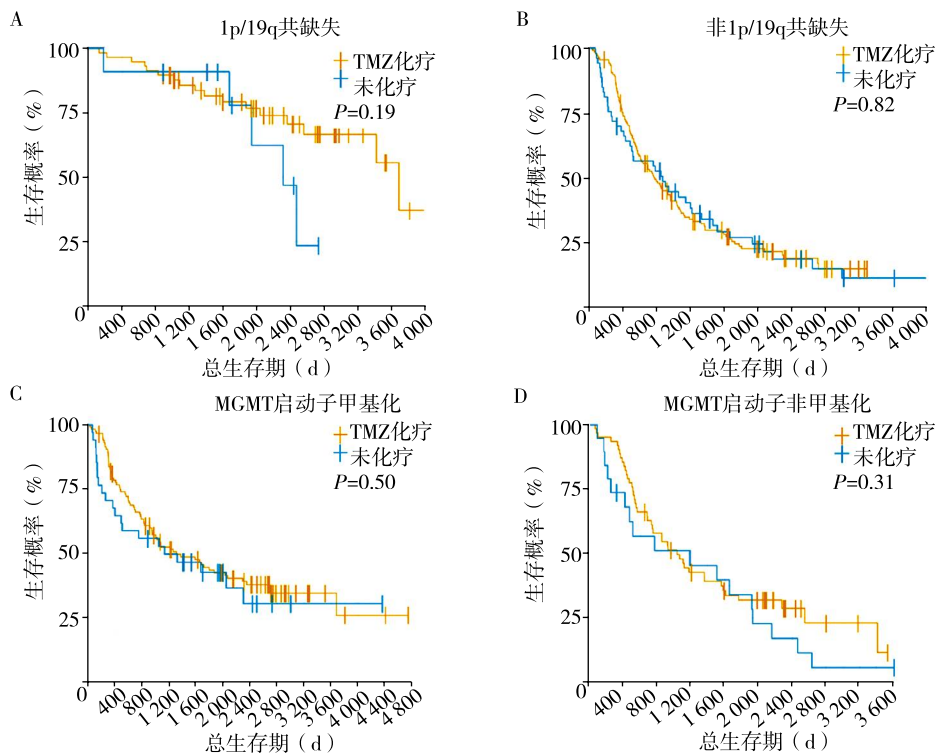
本次研究主要针对WHO Ⅲ级脑胶质瘤的TMZ化疗,发现IDH突变型患者术后接受TMZ化疗生存预后有所改善趋势,但差异无统计学意义,该结果与胶质母细胞瘤(WHO Ⅳ级)^[27]有所差异。这可能表明,在生物学行为和病原病理学方面,IDH野生型WHO Ⅲ级肿瘤更类似于GBM(WHO Ⅳ级),最近的一项针对133个NOA-04样本的研究中,将此类IDH野生型胶质瘤定义为具有“GBM分子表型”的肿瘤^[35]。与此相对应的WHO Ⅲ级IDH突变的肿瘤可能与生物学行为更偏良性、恶性程度相对较低的低级别胶质瘤(WHO Ⅱ级)更接近。接下来我们对纳入患者的1p/19q联合缺失以及MGMT启动子甲基化特征等因素进行了分析,发现虽然1p/19q联合缺失同IDH突变一样可以独立预测患者的生存预后,但MGMT的变化对患者预后影响并无统计学意义。

研究共纳入285例间变脑胶质瘤患者,其中IDH突变型201例,野生型84例,在IDH突变组及野生组中,1p/19q联合缺失、MGMT启动子甲基化均存在差异,在IDH突变组中,1p/19q联合缺失和MGMT甲基化率均较高,这与大部分以往文献报道一致;本研究同时分析了IDH突变等因素对患者术后TMZ化疗的影响,IDH突变型肿瘤在接受术后TMZ化疗后总生存期有所改善趋势,但差异无统计学意义($P=0.059$),IDH野生型肿瘤接受术后TMZ化疗后预后无明显改善($P=0.89$),考虑到1p/19q及MGMT与IDH的相关性,因此我们同样分析了1p/19q及MGMT对TMZ化疗敏感性的影响,但并未发现明显相关性。同时,病理类型在两组同样存在差异,IDH突变组中含有少突成分肿瘤(AO/AOA)占41.8%(84/201),而IDH野生组中比例则为8.3%(7/84),但受由于本研究纳入患者数量有限,IDH野生组中含



注: 2A IDH 突变组中 TMZ 化学治疗对患者的总生存期的影响; 2B IDH 突变组中放射治疗对患者的总生存期的影响; 2C IDH 突变组中放射治疗、TMZ 化学治疗及放化疗联合对患者的总生存期的影响; 2D IDH 野生组中 TMZ 化学治疗对患者的总生存期的影响; 2E IDH 野生组中放射治疗对患者的总生存期的影响; 2F IDH 野生组中放射治疗、TMZ 化学治疗及放化疗联合对患者总生存期的影响; IDH 异柠檬酸脱氢酶, TMZ 替莫唑胺, MGMT O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基化转移酶

图2 IDH 突变组与 IDH 野生组 TMZ 化学治疗和放射治疗对间变脑胶质瘤(WHO Ⅲ级)患者总生存期影响的 Kaplan-Meier 生存曲线分析



注: 3A 1p/19q共缺失组中 TMZ 化学治疗对患者的总生存期的影响; 3B 1p/19q非共缺失组中 TMZ 化学治疗对患者的总生存期的影响; 3C MGMT 启动子甲基化组中 TMZ 化学治疗对患者的总生存期的影响; 3D MGMT 启动子非甲基化组中 TMZ 化学治疗对患者的总生存期的影响; IDH 异柠檬酸脱氢酶, MGMT O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基化转移酶

图3 1p/19q 共缺失及 MGMT 启动子甲基化间变脑胶质瘤(WHO Ⅲ级)患者 TMZ 化学治疗对总生存期影响的 Kaplan-Meier 生存曲线分析

少突成分肿瘤病例数较少(仅7例),我们未进行进一步的分层分析。随着数据库数据进一步积累,将会进一步在今后的研究中展开相关分析。最大安全范围切除是目前脑胶质瘤标准化治疗的第一步,手术切除程度以及术后肿瘤残余体积都均会直接影响患者术后化疗效果及生存预后^[28]。本研究旨在探究可能对间变脑胶质瘤术后TMZ化疗敏感性产生影响的分子病理学因素,因此在实验设计之初考虑到切除程度对患者预后的影响,将仅接受活检或部分切除的患者排除,以最大化减少手术切除程度导致的偏倚。

实际上,在GBM治疗中,MGMT启动子甲基化状态也并不能成为指导术后TMZ化疗的唯一标准,因为其并不能预测所有GBM患者对放疗加TMZ化疗的敏感性。根据本研究结果,间变脑胶质瘤中IDH突变状态同样并不能直接用于指导术后TMZ化疗,因此临床医师并不能仅根据IDH突变状态就对患者做出治疗决策。IDH突变型肿瘤在接受术后TMZ化疗后总生存期有改善趋势,但差异无统计学意义,提示IDH突变可能是定义间变性脑胶质瘤亚型的分子遗传改变的一个组成部分,其他的分子标志物还可能包括1p/19q联合缺失、MGMT启动子甲基化,以及FUBP1和CIC突变等^[36]。后续研究可能需要更大样本量以及在前瞻性随机对照研究中来更好地描述IDH突变在间变脑胶质瘤自然过程中的作用以及对治疗的影响。

综上所述,本研究回顾性地分析了285例间变脑胶质瘤患者IDH突变等分子标志物对生存预后及术后TMZ化疗的影响,相关结果可能对Ⅲ级胶质瘤术后治疗策略的制定具有一定的提示作用。

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 试验设计为单侠、杨沛,研究实施为杨沛、王宽宇,资料收集为王政、张传宝,论文撰写为杨沛,论文修订为单侠,游赣审校

参 考 文 献

- [1] Ricard D, Idhah A, Ducray F, et al. Primary brain tumours in adults[J]. *Lancet*, 2012, 379(9830): 1984-1996. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30990-5.
- [2] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary[J]. *Acta Neuropathol*, 2016, 131(6): 803-820. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- [3] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system[J]. *Acta Neuropathol*, 2007, 114(2): 97-109. DOI: 10.1007/s00401-007-0243-4.
- [4] Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009 [J]. *Neuro Oncol*, 2012, 14 Suppl 5: v1-v49. DOI: 10.1093/neuonc/nos218.
- [5] Yang P, Wang Y, Peng X, et al. Management and survival rates in patients with glioma in China (2004-2010): a retrospective study from a single-institution[J]. *J Neurooncol*, 2013, 113(2): 259-266. DOI: 10.1007/s11060-013-1103-9.
- [6] Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials[J]. *Lancet*, 2002, 359(9311): 1011-1018. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)08091-1.
- [7] Weller M, Muller B, Koch R, et al. Neuro-Oncology Working Group of the German Cancers. Neuro-Oncology Working Group 01 trial of nimustine plus teniposide versus nimustine plus cytarabine chemotherapy in addition to involved-field radiotherapy in the first-line treatment of malignant glioma [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(17): 3276-3284. DOI: 10.1200/JCO.2003.03.509.
- [8] Stupp R, Reni M, Gatta G, et al. Anaplastic astrocytoma in adults[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007, 63(1): 72-80. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2007.03.003.
- [9] vanden Bent MJ. Anaplastic oligodendroglioma and oligoastrocytoma[J]. *Neurol Clin*, 2007, 25(4): 1089-1109, IX - X. DOI: 10.1016/j.ncl.2007.07.013.
- [10] Stupp R, Mason WP, vanden 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.
- [11] Erdem-Eraslan L, Gravendeel LA, de Rooij J, et al. Intrinsic molecular subtypes of glioma are prognostic and predict benefit from adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in combination with other prognostic factors in anaplastic oligodendroglial brain tumors: a report from EORTC study 26951 [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(3): 328-336. DOI: 10.1200/JCO.2012.44.1444.
- [12] van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJ, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951 [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(3): 344-350. DOI: 10.1200/JCO.2012.43.2229.
- [13] Minniti G, Scaringi C, Arcella A, et al. IDH1 mutation and MGMT methylation status predict survival in patients with anaplastic astrocytoma treated with temozolomide-based chemoradiotherapy [J]. *J Neurooncol*, 2014, 118(2): 377-383. DOI: 10.1007/s11060-014-1443-0.
- [14] Shirai K, Suzuki Y, Okamoto M, et al. Influence of histological subtype on survival after combined therapy of surgery and radiation in WHO grade 3 glioma [J]. *J Radiat Res*, 2010, 51(5): 589-594. DOI: 10.1269/jrr.10055.
- [15] Nabors LB, Portnow J, Ammirati M, et al. NCCN guidelines insights: central nervous system cancers, Version 1.2017 [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2017, 15(11): 1331-1345. DOI: 10.6004/jnccn.2017.0166.
- [16] Minniti G, De Sanctis V, Muni R, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma in elderly patients [J]. *J Neurooncol*, 2008, 88(1): 97-103. DOI: 10.1007/s11060-008-9538-0.

- [17] Cairncross G, Wang M, Shaw E, et al. Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402 [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(3): 337-343. DOI: 10.1200/JCO.2012.43.2674.
- [18] Masui K, Cloughesy TF, Mischel PS. Review: molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostic to target therapies [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2012, 38(3): 271-291. DOI: 10.1111/j.1365-2990.2011.01238.x.
- [19] Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme [J]. *Science*, 2008, 321(5897): 1807-1812. DOI: 10.1126/science.1164382.
- [20] Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(8): 765-773. DOI: 10.1056/NEJMoa0808710.
- [21] vanden Bent MJ, Dubbink HJ, Marie Y, et al. IDH1 and IDH2 mutations are prognostic but not predictive for outcome in anaplastic oligodendroglial tumors: a report of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(5): 1597-1604. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2902.
- [22] Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(10): 997-1003. DOI: 10.1056/NEJMoa043331.
- [23] vanden Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(18): 2715-2722. DOI: 10.1200/JCO.2005.04.6078.
- [24] Christensen BC, Smith AA, Zheng S, et al. DNA methylation, isocitrate dehydrogenase mutation, and survival in glioma [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2011, 103(2): 143-153. DOI: 10.1093/jnci/djq497.
- [25] Yan W, Zhang W, You G, et al. Correlation of IDH1 mutation with clinicopathologic factors and prognosis in primary glioblastoma: a report of 118 patients from China [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30339. DOI: 10.1371/journal.pone.0030339.
- [26] Yang P, Cai J, Yan W, et al. Classification based on mutations of TERT promoter and IDH characterizes subtypes in grade II / III gliomas [J]. *Neuro Oncol*, 2016, 18(8): 1099-1108. DOI: 10.1093/neuonc/nov021.
- [27] Yang P, Zhang W, Wang Y, et al. IDH mutation and MGMT promoter methylation in glioblastoma: results of a prospective registry [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(38): 40896-40906. DOI: 10.18632/oncotarget.5683.
- [28] Navarria P, Pessina F, Clerici E, et al. Is IDH status the only factor predicting prognosis in newly diagnosed anaplastic glioma patients? Outcome evaluation and prognostic factor analysis in a single-institution large series [J]. *J Neurosurg*, 2020: 1-14. DOI: 10.18632/oncotarget.5683.
- [29] Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, et al. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendroglomas [J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(4): 1149-1153. DOI: 10.2353/ajpath.2009.080958.
- [30] Balsl 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. DOI: 10.1007/s00401-008-0455-2.
- [31] Li S, Yan C, Huang L, et al. Molecular prognostic factors of anaplastic oligodendroglial tumors and its relationship: a single institutional review of 77 patients from China [J]. *Neuro Oncol*, 2012, 14(1): 109-116. DOI: 10.1093/neuonc/nor185.
- [32] Wick W, Meisner C, Hentschel B, et al. Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation [J]. *Neurology*, 2013, 81(17): 1515-1522. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3182a95680.
- [33] Dubbink HJ, Taal W, van Marion R, et al. IDH1 mutations in low-grade astrocytomas predict survival but not response to temozolomide [J]. *Neurology*, 2009, 73(21): 1792-1795. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181c34ace.
- [34] Cairncross JG, Wang M, Jenkins RB, et al. Benefit from procarbazine, lomustine, and vincristine in oligodendroglial tumors is associated with mutation of IDH [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(8): 783-790. DOI: 10.1200/JCO.2013.49.3726.
- [35] Wiestler B, Capper D, Holland-Letz T, et al. ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis [J]. *Acta Neuropathol*, 2013, 126(3): 443-451. DOI: 10.1007/s00401-013-1156-z.
- [36] Yip S, Butterfield YS, Morozova O, et al. Concurrent CIC mutations, IDH mutations, and 1p/19q loss distinguish oligodendrogliomas from other cancers [J]. *J Pathol*, 2012, 226(1): 7-16. DOI: 10.1002/path.2995.

(收稿日期: 2020-11-05)

(本文编辑: 赵金鑫)