

· 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。

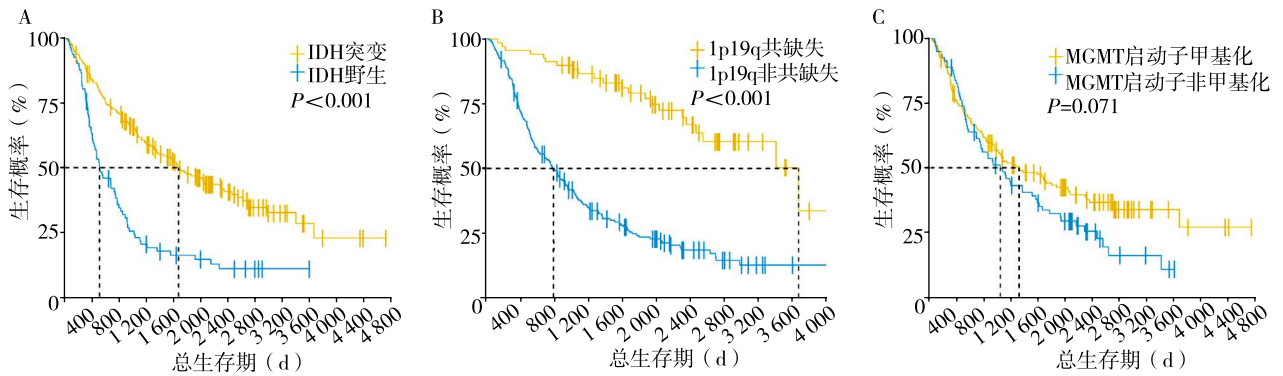
二、结果

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。

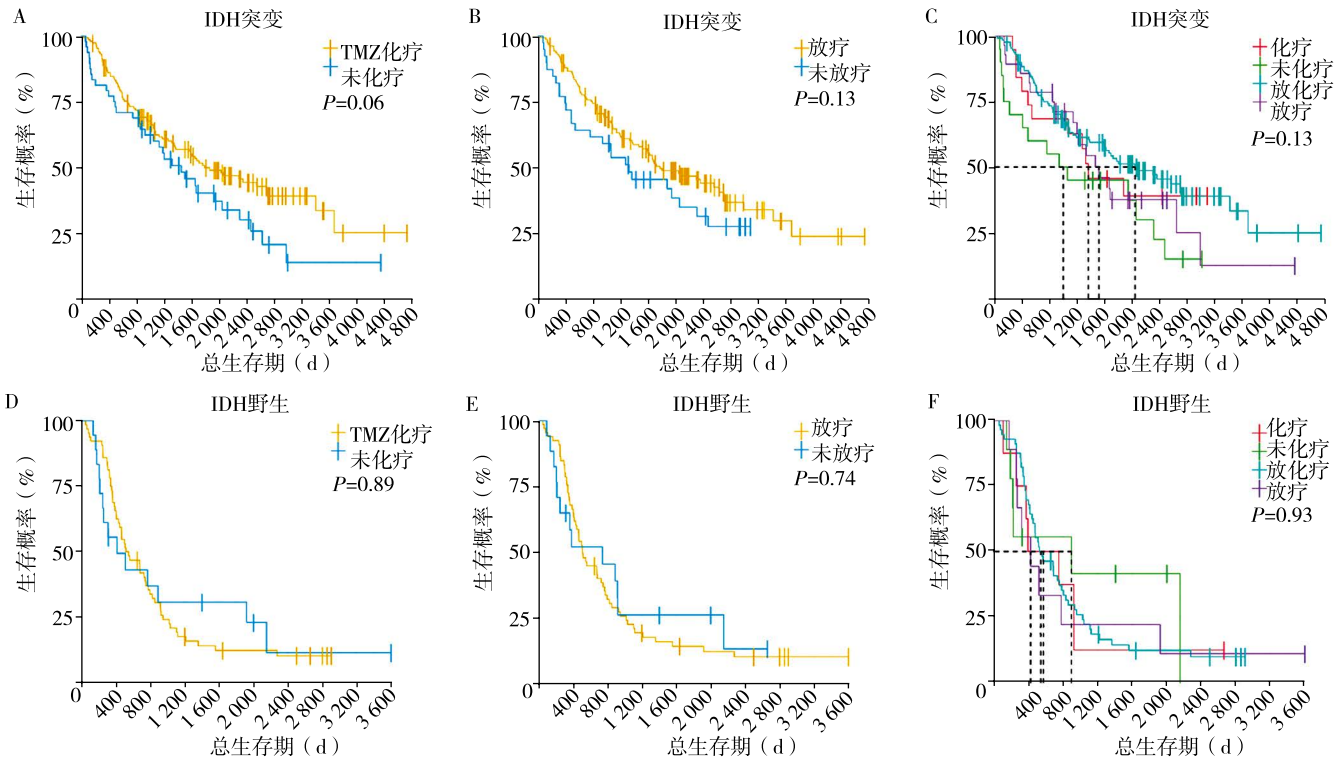
依据WHO分型标准,间变脑胶质瘤虽然统一归为Ⅲ级脑胶质瘤,但由于有较强的异质性而致其具有不同的生物学特征,因此,虽然同样诊断为间变脑胶质瘤,但不同患者的预后和对治疗的敏感性往往存在极大差异。

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]。

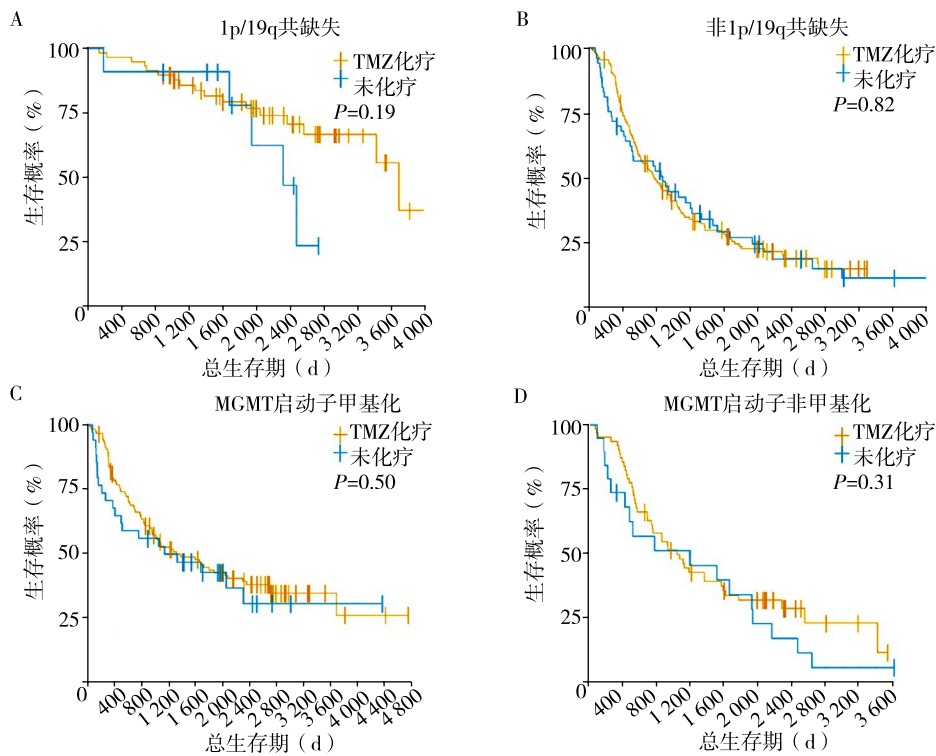
本次研究主要针对WHO Ⅲ级脑胶质瘤的TMZ化疗,发现IDH突变型患者术后接受TMZ化疗生存预后有所改善趋势,但差异无统计学意义,该结果与胶质母细胞瘤(WHO Ⅳ级)^[27]有所差异。这可能表明,在生物学行为和病原病理学方面,IDH野生型WHO Ⅲ级肿瘤更类似于GBM(WHO Ⅳ级),最近的一项针对133个NOA-04样本的研究中,将此类IDH野生型胶质瘤定义为具有“GBM分子表型”的肿瘤^[35]。与此相对应的WHO Ⅲ级IDH突变的肿瘤可能与生物学行为更偏良性、恶性程度相对较低的低级别胶质瘤(WHO Ⅱ级)更接近。接下来我们对纳入患者的1p/19q联合缺失以及MGMT启动子甲基化特征等因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