

· 脑胶质瘤分子病理研究专题 ·

IDH野生型胶质母细胞瘤的组织病理特征及分子病理特征分析

刘国鸣 肖梦麟 徐灿 徐江龙 田少辉 方川

071000 保定, 河北大学附属医院神经外科 河北大学临床医学院; 071000 保定, 河北省脑胶质瘤精准诊断与治疗重点实验室

通信作者: 方川, Email: chuanfang@hbu.edu.cn

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2024.05.004

【摘要】目的 研究异柠檬酸脱氢酶(*IDH*)野生型胶质母细胞瘤(GBM)的组织病理及分子病理特征。**方法** 选取2021年9月—2023年8月于河北大学附属医院神经外科接受手术治疗的74例GBM患者为研究对象,采用苏木精-伊红染色观察组织病理学特点;采用免疫组织化学染色及二代测序方法研究分子病理学特征;采用Kaplan-Meier法绘制生存分析曲线,分析患者生存期与*IDH1*突变之间的关系。**结果** 74例GBM患者中男性占60.81%(45/74),患者年龄为(55.23 ± 4.58)岁。58例为额叶肿瘤,16例为颞叶肿瘤。苏木精-伊红染色组织形态学结果显示,82.43%(61/74)的肿瘤组织可见典型的栅栏状坏死、血管增生、肿瘤异型性显著,符合典型GBM组织形态特点,其余肿瘤组织形态学符合2级或3级星形细胞瘤的形态特征。免疫组织化学染色结果显示,所有肿瘤*IDH1* R132H染色均为阴性,Ki-67染色示平均阳性率为38%。二代测序分子病理结果显示,所有组织*IDH1/2*均为阴性,表皮生长因子受体(*EGFR*)扩增阳性占74.32%(55/74),端粒酶逆转录酶(TERT)启动子区域突变占59.46%(44/74)。细胞周期素依赖性激酶抑制因子2A/B(*CDKN2A/B*)发生纯合性缺失的比例为33.78%(25/74)。O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(MGMT)启动子区甲基化水平高表达占47.30%(35/74)。**结论** GBM具有*IDH*野生型的分子特征,部分病例伴有*EGFR*扩增、TERT启动子区突变、*CDKN2A/B*纯和缺失、MGMT启动子区高甲基化的分子改变。

【关键词】 胶质母细胞瘤; 病理学; *IDH*野生型; 组织病理学; 分子病理学**基金项目:** 河北省自然科学基金项目(H2022201008);河北省研究生创新资助项目(CXZZBS2023001)**Analysis of histopathological features and molecular pathological features of *IDH* wild-type glioblastoma**

Liu Guoming, Xiao Menglin, Xu Can, Xu Jianglong, Tian Shaohui, Fang Chuan

Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Hebei University & School of Clinical Medicine, Hebei University, Baoding 071000, China; Hebei Key Laboratory of Precise Diagnosis and Treatment of Glioma, Baoding 071000, China

Corresponding author: Fang Chuan, Email: chuanfang@hbu.edu.cn

【Abstract】Objective To explore the histopathological and molecular pathological features of isocitrate dehydrogenase (*IDH*) wild-type glioblastoma (GBM). **Methods** From September 2021 to August 2023, 74 GBM patients with surgery at the Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Hebei University were selected as the study subject. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological characteristics of tissues. Immunohistochemical staining and next-generation sequencing were used to analyze molecular pathological features. Kaplan-Meier method was used to plot survival analysis curves to analyze the relationship between patient survival and *IDH1* mutations. **Results** Among 74 cases of GBM, males accounted for 60.81% (45/74), and the age was (55.23 ± 4.58) years old. Fifty-eight cases of tumors were located in the frontal lobe and 16 cases were located in the temporal lobe. The histological results of hematoxylin-eosin staining showed that 82.43% (61/74) of tumor tissues showed typical palisade necrosis, vascular proliferation, and significant tumor atypia, consistent with the typical GBM tissue morphological characteristics. The morphology of other tumor tissues matched the morphological characteristics of grade 2 or 3 astrocytoma. Immunohistochemical staining showed that all tumors were negative for *IDH1* R132H staining, while Ki-67 staining showed an average positive rate of 38%. Results of the next-generation sequencing molecular pathology showed that all tissues were negative for *IDH1/2*, with positive amplification of epidermal growth factor receptor (*EGFR*) accounting for 74.32% (55/74) and telomerase reverse transcriptase (TERT) promoter region mutations accounting for 59.46% (44/74).

The proportion of pure deletion of cyclin dependent kinase inhibitor 2A/B (*CDKN2A/B*) was 33.78% (25/74). The high expression level of methylation in the promoter region of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) accounted for 47.30% (35/74). **Conclusions** GBM exhibits molecular features of *IDH* wild-type, with some cases accompanied by *EGFR* amplification, TERT promoter region mutations, *CDKN2A/B* homozygous deletion, and MGMT promoter region hypermethylation.

【Key words】 Glioblastoma; Pathology; *IDH* wild-type; Histopathology; Molecular pathology

Fund programs: Natural Science Foundation of Hebei Province (H2022201008); Graduate Innovation Fund Project of Hebei Province (CXZZBS2023001)

随着分子时代的到来,胶质瘤的分子病理学特征已被研究人员广泛重视。在2021版中枢神经系统肿瘤分类中,异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, *IDH*)突变型肿瘤正式更名为星形细胞瘤,而*IDH*野生型这一分子特点被专用于描述胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)^[1]。GBM占原发性中枢神经系统肿瘤的14.5%,占恶性原发性中枢神经系统肿瘤的48.6%,发病率为3.23/10万人,平均诊断年龄为65岁^[2]。GBM的诊断需结合组织病理学和分子病理学信息,传统的分级方法严重依赖光镜下观察到的肿瘤组织病理学特征,研究人员的主观差异和肿瘤自身的异质性会影响诊断的准确性。目前,越来越多的肿瘤已明确了相应的分子特点,结合分子病理学的肿瘤分级方法,有助于更精准地认识肿瘤,对进一步明确诊断有重要的意义,同时也为个体化治疗方案的制订提供了依据^[3-4]。*IDH*基因野生状态是诊断GBM的重要前提,在*H3*未突变的情况下,*IDH*野生型胶质瘤若存在1个或以上形态学或分子遗传学特征:微血管增生或坏死、第7号染色体获得和第10号染色体丢失、端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)启动子区突变、表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, *EGFR*)扩增,则诊断为WHO 4级GBM,*IDH*野生型^[3, 5-6],在这3种分子特征(微血管增生或坏死为形态学特征)中,只要存在1个,即诊断为分子GBM (molGBM),最新的中枢神经系统肿瘤分类将molGBM归为“*IDH*-wt GBM(WHO 4级)”^[7]。分析病理诊断为GBM病例的基因表达状态,对肿瘤的分类与诊断及肿瘤分子特点的进一步阐述具有重要意义^[8]。本研究分析了74例病理学诊断为GBM的病例资料,旨在分析各病例的分子病理学特征,整合*IDH*野生型GBM组织及分子病理学特征,为临床治疗方案的制定提供支持。

一、对象与方法

1. 研究对象: 选取2021年9月—2023年8月于河北大学附属医院神经外科接受手术治疗的74例

GBM患者为研究对象。纳入标准: 根据2021版WHO中枢神经系统肿瘤分类^[1], 术后病理学整合诊断为*IDH*野生型GBM。排除标准: (1) 年龄 < 18岁; (2) 合并其他类型脑肿瘤; (3) 患者标本量不足以进行分子病理学检测。本研究已获得河北大学附属医院伦理委员会审核通过(批件号: HDFYLL-KY-2023-109)。

2. 研究方法: (1) 收集患者的一般资料及肿瘤相关资料。包括发病年龄、性别、脑胶质瘤病史、肿瘤部位。脑胶质瘤病史判定依据第四版WHO分级, 较低级别为WHO 1~2级, 较高级别为WHO 3~4级^[9]。(2) 肿瘤组织靶向测序。使用DNA提取试剂盒(德国Qiagen公司)从经过石蜡固定的患者肿瘤组织中获取DNA样本, 使用微量分光光度计检测核酸浓度和纯度, 将提取的DNA反转录成cDNA, 然后构建测序文库, 使用PCR进行扩增, 采用二代测序方法检测包含*IDH*在内的一系列基因, 采用焦磷酸测序方法检测O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(O6-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)启动子区甲基化状态。将二代测序结果与人类参考基因组进行比对并分析相关变异, 根据识别变异的位置、类型等特征进行分类和过滤。(3) 苏木精-伊红染色。肿瘤组织标本经常规4%多聚甲醛固定、脱水、石蜡包埋后切成3~5 μm的切片。经过一系列脱蜡、梯度酒精复水, 将切片放入苏木精溶液中染色30~60 min。将苏木精染色后的切片放入伊红溶液中, 染色30~60 min。使用95%的乙醇对染色后的切片进行两次脱水处理, 每次10~15 min。使用透明剂(如二甲苯)对切片进行透明处理2~3次, 每次30 min。将透明处理后的切片封片。(4) 免疫组织化学染色。切片准备过程同苏木精-伊红染色。将脱蜡、复水后的切片放入抗原修复液中, 进行高温处理后在碱性乙二胺四乙酸中微波处理30 min。抗原修复后, 加入适量的内源性过氧化物酶阻断剂, 室温孵育10 min; PBS缓冲液冲洗3 min, 共3次。一抗*IDH1*处理特异性抗原[(mutated R132G)] (Abcam

ab264050)、Ki67(中杉金桥TA800648)。4℃ 孵育过夜。PBS缓冲液冲洗3 min,共3次。滴加100 μl或适量的酶标羊抗小鼠/兔IgG聚合物,于37℃ 孵育20 min;PBS缓冲液冲洗3 min,共3次。加入适量新鲜配制的DAB显色液,室温孵育5~8 min。自来水冲洗,苏木素染色液孵育20 s;分化、冲洗返蓝。脱水、透明、封片。观察步骤同苏木精-伊红染色。

(5)IDH1基因生存分析。从中国脑胶质瘤基因组图谱(Chinese Glioma Genome Atlas, CGGA)和癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库^[10]下载IDH基因表达信息,在依据第四版WHO分级诊断为WHO 4级GBM的基础上,区分IDH1的状态,选用CGGA数据库45例IDH1突变型和182例IDH1野生型总计227例数据信息,及TCGA数据库11例IDH1突变型和149例IDH1野生型总计160例数据信息,进一步分析患者生存期与IDH1突变之间的关系。

3.统计学方法:使用R 4.0.5版ggsurvplot软件包对数据进行统计学分析。采用Kaplan-Meie法绘制生存分析曲线^[11],应用Log-Rank检验检测两组生存曲线生存期差异是否具有统计学意义。双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1.患者的一般资料及肿瘤相关资料:74例GBM患者年龄为(55.23 ± 4.58)岁,55~64岁和≥65岁患者较多,分别占37.84%和39.19%;男性患者占比高于女性;78.38%的肿瘤位于额叶。见表1。

2.公共数据库中GBM患者的生存预后分析:CGGA和TCGA数据库中IDH1突变型及野生型的生存分析结果显示,IDH1野生型的患者预后更差,差异具有统计学意义,其中CGGA数据库 $P=0.0034$,TCGA数据库 $P=0.0005$ 。见图1。

3.肿瘤的组织病理学特征:苏木精-伊红染色

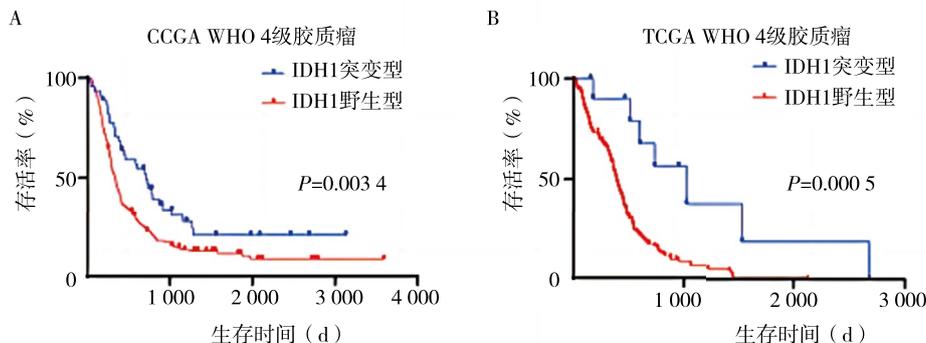
表1 74例胶质母细胞瘤患者的一般资料及肿瘤相关资料

项目	例数	构成比(%)
发病年龄(岁)		
< 50	1	1.35
50 ~ 54	16	21.62
55 ~ 64	28	37.84
≥ 65	29	39.19
性别		
男	45	60.81
女	29	39.19
脑胶质瘤病史		
无原发肿瘤,无病史	39	52.70
WHO 3~4级脑胶质瘤病史	6	8.11
WHO 1~2级脑胶质瘤病史	22	29.73
有病史但病理分级不明	7	9.46
肿瘤发生部位		
额叶	58	78.38
颞叶	16	21.62

注:WHO 世界卫生组织

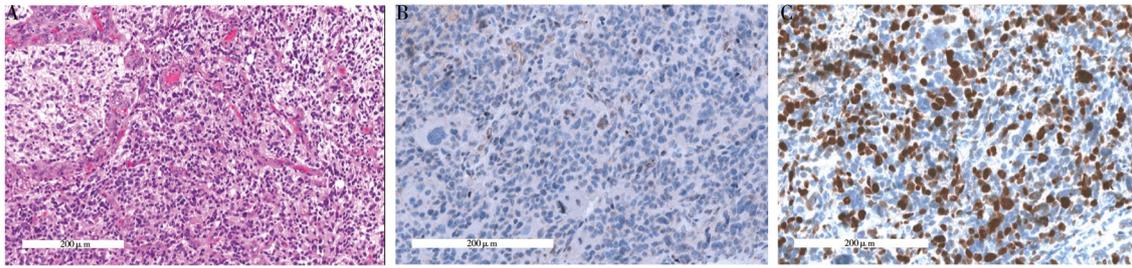
结果显示,82.43%(61/74)的肿瘤组织可见典型的栅栏状坏死、血管增生、肿瘤异型性显著,核分裂较活跃,符合典型GBM组织形态特点,其余肿瘤组织形态学符合2级或3级星形细胞瘤的形态特征。图2A为1例典型病例苏木精-伊红染色图。

4.肿瘤的分子病理学特征:免疫组化染色结果显示,所有病例肿瘤IDH1 R132H染色均为阴性,Ki-67染色平均阳性率为38%。图2B、2C为1例典型病例免疫组化染色图,可见IDH1 R132H染色为阴性,Ki-67阳性率为60%。二代测序分子病理结果显示,所有肿瘤组织IDH1/2均为阴性,EGFR扩增阳性的比例为74.32%(55/74),TERT启动子区域突变的比例为59.46%(44/74)。细胞周期素依赖性激酶抑制因子2A/B(CDKN2A/B)发生纯合性缺失的比例



注: A为CGGA数据库; B为TCGA数据库; CGGA 中国脑胶质瘤基因组图谱; TCGA 癌症基因组图谱; WHO 世界卫生组织; IDH 异柠檬酸脱氢酶

图1 CGGA和TCGA数据库中胶质母细胞瘤患者IDH1突变型及野生型生存分析曲线



注: A 苏木精-伊红染色; B 免疫组化染色; C Ki-67 免疫组化染色; IDH 异柠檬酸脱氢酶; 比例尺均为 200 μm

图2 1例IDH野生型胶质母细胞瘤组织病理学特征及免疫组织化学染色图

为 33.78%(25/74)。MGMT 启动子区甲基化水平高表达的比例为 47.30%(35/74)。见表 2。图 3 为 1 例典型 IDH 野生型 GBM 的分子病理学及免疫表型免疫组化染色图。

讨论 IDH 野生型 GBM 多见于老年人, 年龄 < 55 岁的患者较少见, 侵袭性强, 大多数患者即使接受放化疗, 生存期也仅为 15 ~ 18 个月^[12]。本研究结果显示, 74 例 GBM 患者中年龄 > 55 岁的患者占比较大, 肿瘤发生部位主要在额叶, IDH 野生型肿瘤预后也更差。

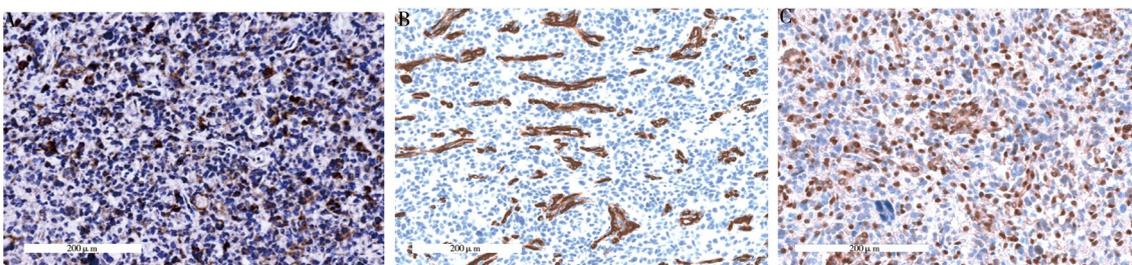
GBM 的组织病理学信息是其临床诊断分级过程中的重要内容, 组织坏死和微血管增生是 WHO 4 级 GBM 的组织学诊断标志, 一些 2 级或 3 级的弥漫性星形细胞瘤虽然不具备 GBM 标志性的栅栏状坏死和微血管增生, 但表现出类似于 4 级肿瘤的强侵袭性。本研究通过显微镜下观察肿瘤组织标本苏木精-伊红染色和免疫组织化学染色结果, 发现 GBM 具有以下特点: (1) 肿瘤细胞密度高。GBM 的肿瘤细胞尺寸差异性大且形态多样, 有时呈裸核形。(2) 细胞异型性明显。细胞核大, 核仁明显, 核质比例失调, 染色质增多, 排列紊乱。(3) 有丝分裂象增多。肿瘤细胞增殖能力强, 有丝分裂象多, 分裂期细胞常见。82.43%(61/74) 的肿瘤组织可见典型的栅栏状坏死、血管增生、肿瘤异型性显著, 核分裂较活跃, 符合典型 GBM 组织形态特点^[13], 其余肿瘤组织形态学符合 2 级或 3 级星形细胞瘤的形态特征。

表 2 74 例胶质母细胞瘤患者的二代测序遗传学特点

项目	例数	构成比(%)
<i>IDH1/2</i> 状态		
阴性	74	100.00
阳性	0	0
<i>EGFR</i> 状态		
扩增	55	74.32
未扩增	19	25.68
TERT 启动子区状态		
突变	44	59.46
未突变	30	40.54
<i>CDKN2A/B</i>		
纯合缺失	25	33.78
未纯合缺失	49	66.22
MGMT 启动子区状态		
甲基化	35	47.30
未甲基化	39	52.70

注: IDH 异柠檬酸脱氢酶; EGFR 表皮生长因子受体; TERT 端粒酶逆转录酶; CDKN2A/B 细胞周期素依赖性激酶抑制因子 2A/B; MGMT O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶

目前, 脑胶质瘤诊疗指南已指出了诊断胶质瘤时整合组织学分型与分子标志物的重要性^[14]。IDH 野生型 GBM 的分子病理学改变主要包括以下几点: (1) 无 IDH1 和 IDH2 突变。IDH 野生型肿瘤没有 IDH1 和 IDH2 的突变, IDH 基因在 GBM 的进展中发挥重要作用^[15]。(2) TERT 启动子突变。TERT 启动子突变发生在约 70% 的 IDH 野生型 GBM 患者中, 这种突变会导致端粒酶活性增加, 从而促进肿瘤增



注: A EGFR 免疫组化染色; B CD34 免疫组化染色; C MGMT 免疫组化染色; IDH 异柠檬酸脱氢酶; EGFR 表皮生长因子受体; MGMT O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶; 比例尺均为 200 μm

图3 1例IDH野生型胶质母细胞瘤分子病理学及免疫表型免疫组织化学染色图

殖。(3)*P53*突变。*P53*为肿瘤抑制基因,突变后会失去肿瘤抑制功能,进而促进肿瘤的发生和发展。在*IDH*野生型GBM中,约50%的患者存在*P53*突变^[16]。(4)*EGFR*扩增和突变。*EGFR*是一种表皮生长因子受体,其扩增和突变在*IDH*野生型GBM中常见,可能会影响肿瘤的生长和侵袭。(5)*MGMT*启动子甲基化。*MGMT*启动子区甲基化会抑制其表达,从而降低化疗效果,40%~50%的GBM存在*MGMT*启动子甲基化。(6)其他分子改变。如第10号染色体上缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10, *PTEN*)缺失、*CDKN2A*缺失等^[17]。这些分子病理学改变对*IDH*野生型GBM的诊断和治疗具有重要意义,本研究中的结果在治疗指南的基础上整合了*IDH*野生型GBM的组织及分子病理学特征,有助于临床医生为患者制定更精准的治疗方案^[18]。

本次研究中二代测序分子病理结果显示,所有组织*IDH1/2*均为阴性,*EGFR*扩增阳性占74.32%(55/74),*TERT*启动子区域突变占59.46%(44/74)。*CDKN2A/B*纯合缺失的比例为33.78%(25/74)。GBM的常规分子标志物检测目前已在临床工作中开展,而新的肿瘤分子靶点也在不断探索。研究发现,在*IDH*野生型GBM患者中还存在一系列基因的突变,其中包括与肿瘤生成和发展相关的基因^[19]。在根据nCounter®PanCancer免疫图谱划分的多免疫亚型GBM中,*CD27*、*PD-L1*、*CTLA4*是M2(预后最好)和M3(预后最差)亚型GBM中差异性最显著的3种基因,生存分析也表明,这3种基因的免疫应答作用存在预后意义,其高风险评分也与更差的预后相关,这为具有不同基因特点的GBM临床治疗提供了指导意义^[20]。

本研究通过统计分析74例*IDH*野生型GBM的组织学和分子病理学特点,进一步阐明了GBM具有*IDH*野生型的分子特征,栅栏状坏死、血管增生、肿瘤异型性显著等是其组织学特点,部分病例有2级或3级星形细胞瘤的形态特点。分子病理学检测为诊断GBM的必要条件,深入研究*IDH*野生型GBM的分子病理学特点,整合GBM的组织及分子病理学信息,有助于进一步了解肿瘤发病机制,以期为其治疗提供方向和策略。本研究纳入的样本量较小,作为回顾性观察研究,不能得出确切的因果关系,存在一定的局限性,未来将增加样本量,整合更多病例的组织及分子病理特点,进一步阐明GBM的分子病理学特征。

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 研究设计为刘国鸣、肖梦麟,研究实施、资料收集为刘国鸣、肖梦麟、徐灿、徐江龙、田少辉,论文撰写为刘国鸣、肖梦麟,论文修订为田少辉,方川审核

参 考 文 献

- [1] Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary[J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(8): 1231-1251. DOI: 10.1093/neuonc/noab106.
- [2] Melhem JM, Detsky J, Lim-Fat MJ, et al. Updates in *IDH*-wildtype glioblastoma[J]. *Neurotherapeutics*, 2022, 19(6): 1705-1723. DOI: 10.1007/s13311-022-01251-6.
- [3] Whitfield BT, Huse JT. Classification of adult-type diffuse gliomas: impact of the World Health Organization 2021 update[J]. *Brain Pathol*, 2022, 32(4): e13062. DOI: 10.1111/bpa.13062.
- [4] Horbinski C, Berger T, Packer RJ, et al. Clinical implications of the 2021 edition of the WHO classification of central nervous system tumours[J]. *Nat Rev Neurol*, 2022, 18(9): 515-529. DOI: 10.1038/s41582-022-00679-w.
- [5] Zakharova G, Efimov V, Raevskiy M, et al. Reclassification of TCGA diffuse glioma profiles linked to transcriptomic, epigenetic, genomic and clinical data, according to the 2021 WHO CNS Tumor Classification[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1): 157. DOI: 10.3390/ijms24010157.
- [6] 李德培,陈忠平.胶质瘤治疗现状与进展[J]. *实用医学杂志*, 2021, 37(18): 2312-2316. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2021.18.002.
- [7] Ramos-Fresnedo A, Pullen MW, Perez-Vega C, et al. The survival outcomes of molecular glioblastoma *IDH*-wildtype: a multicenter study[J]. *J Neurooncol*, 2022, 157(1): 177-185. DOI: 10.1007/s11060-022-03960-6.
- [8] 王晶,苏文.胶质母细胞瘤的发展历史及相关分子研究进展[J]. *实用医技杂志*, 2022, 29(12): 1237-1240. DOI: 10.19522/j.cnki.1671-5098.2022.12.001.
- [9] 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.
- [10] Zhao Z, Zhang KN, Wang Q, et al. Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA): a comprehensive resource with functional genomic data from Chinese glioma patients[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2021, 19(1): 1-12. DOI: 10.1016/j.gpb.2020.10.005.
- [11] R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.
- [12] Smith HL, Wadhvani N, Horbinski C. Major features of the 2021 WHO Classification of CNS Tumors[J]. *Neurotherapeutics*, 2022, 19(6): 1691-1704. DOI: 10.1007/s13311-022-01249-0.
- [13] 周福安,冯晨,张巍.胶质母细胞瘤115例临床病理分析[J]. *新疆医科大学学报*, 2011, 34(6): 598-601. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5551.2011.06.012.
- [14] 张伟,王政.中国抗癌协会脑胶质瘤整合诊治指南(精简版)[J]. *中国肿瘤临床*, 2022, 49(16): 811-818. DOI: 10.12354/j.issn.1000-8179.2022.20220728.