

. 实验研究 .

人脑胶质瘤 IDH1 突变状态与 MGMT 启动子甲基化、P53 和 TERT 突变相关性

赵宇航 王泽芬 徐成仕 李 凯 李志强

【摘要】目的 探讨脑胶质瘤异柠檬脱氢酶 1(IDH1)突变与 O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶 (MGMT)启动子甲基化状态、P53 和端粒酶逆转录酶(TERT)突变之间的相关性。方法 收集 2016 年 6 月至 2017 年 9 月手术切除并经病理诊断为胶质瘤标本 72 例(WHO Ⅱ级 14 例,Ⅲ级 19 例,Ⅳ级 39 例)。采用 PCR 荧光探针法检测 MGMT 基因启动子甲基化状态,毛细管电泳法检测基因 IDH1、P53、TERT 突变情况;采用列联系数分析 IDH1 突变与 MGMT 基因启动子甲基化、P53、TERT 突变状态的相关性。采用多因素 Logistic 回归分析检验 IDH1 突变的相关因素。结果 72 例中, IDH1 突变率为 29.2%,MGMT 启动子甲基化率为 47.2%,P53 突变率为 41.4%,TERT 突变率为 50%。相关性分析发现 IDH1 突变与 MGMT 启动子甲基化(列联系数=0.44; $P<0.001$ )、P53 突变(列联系数=0.32; $P<0.05$ )均有显著相关性,但与 TERT 启动子突变无明显相关性( $P>0.05$ )。IDH1 野生型胶质瘤中 MGMT 启动子甲基化与 TERT 启动子基因突变具有相关性(列联系数=0.28, $P<0.05$ )。IDH1 突变型胶质瘤中 MGMT 启动子甲基化与 P53 基因突变具有相关性(列联系数=0.27, $P<0.05$ )。多因素 Logistic 回归分析,结果显示病人年龄、MGMT 启动子甲基化是 IDH1 突变独立相关因素( $P<0.05$ )。结论 胶质瘤 IDH1 突变可能与 MGMT 启动子甲基化、P53 和 TERT 突变之间存在复杂的相互调节作用。

【关键词】胶质瘤;异柠檬脱氢酶 1;O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶;P53;端粒酶逆转录酶

【文章编号】1009-153X(2018)05-0339-04 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41; Q 754

Correlativity of IDH1 mutation with MGMT promoter methylation and P53 and TERT mutations in gliomas

ZHAO Yu-hang<sup>1</sup>, WANG Ze-fen<sup>2</sup>, XU Cheng-shi<sup>1</sup>, LI-Kai<sup>1</sup>, LI Zhi-qiang<sup>1</sup>. 1. Department of Neurosurgery, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China; 2. Department of Physiology, School of Basic Medicine Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, China

【Abstract】Objective To explore the relationship of isocitrate dehydrogenase (IDH1) mutation with O6-alkylguanine DNA alkyltransferase (MGMT) promoter methylation status and P53 and telomerase reverse transcriptase (TERT) mutations in gliomas. Methods The status of MGMT promoter methylation was determined by PCR-fluorescence probe and IDH1, P53 and TERT mutations were detected by capillary electrophoresis in 72 specimens of gliomas. The relationship of IDH1 mutation with MGMT promoter methylation and P53 and TERT mutations was statistically analyzed. Results The rates of IDH1, P53 and TERT promoter mutations were 28.2%, 41.4% and 50% respectively in 72 specimens of gliomas, in which the positive rates of MGMT promoter methylation was 47.2%. The IDH1 mutation was significantly related positively with MGMT promoter methylation ( $P<0.01$ ). The significantly positive relationship was also observed between MGMT promoter methylation and P53 mutation ( $P<0.05$ ) in the primary gliomas and between MGMT promoter methylation and TERT mutation ( $P<0.05$ ) in wild-type IDH1 gliomas. Conclusions It is suggested that complex interactions may exist among IDH1 mutation, MGMT promoter methylation and P53 and TERT mutations. Further study of their mechanism should be performed for future exploring the targeted therapy of the gliomas.

【Key words】Gliomas; IDH1; MGMT; P53; TERT; Mutation; Correlativity

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤,替莫唑胺的应用延长病人生存期,但高度恶性胶质瘤预后仍然较差<sup>[1,2]</sup>。2008 年,Parsons 等<sup>[3]</sup>首次证实异柠檬酸脱氢酶 1(isocitrate dehydrogenase 1, IDH1)

在胶质瘤等多种恶性肿瘤异常表达。随后研究发现, >70% 的低级别胶质瘤存在 IDH1 突变<sup>[4]</sup>,而且 IDH1 突变型胶质瘤预后较野生型好,能作为胶质瘤预后的独立预测指标<sup>[5]</sup>。进一步研究表明, IDH1 突变导致代谢产物 2-羟戊二酸积累,可能在细胞表观遗传学和基因组 DNA 甲基化中具有重要作用<sup>[6]</sup>。O6-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶(O6-alkylguanine DNA alkyltransferase, MGMT)是一种 DNA 修复蛋白,目前证实 MGMT 启动子甲基化状态可预测胶质瘤对替莫唑胺治疗的敏感性<sup>[7]</sup>。端粒酶逆转录酶

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2018.05.012  
基金项目:国家自然科学基金(81573459)  
作者单位:430071 武汉,武汉大学中南医院神经外科(赵宇航、徐成仕、李 凯、李志强);430071 武汉,武汉大学医学部基础医学院生理教研室(王泽芬)  
通讯作者:李志强, E-mail: lizhiqiang@whu.edu.cn

(telomerase reverse transcriptase, TERT)能激活端粒酶保持自身端粒完整,进而促进细胞增殖,伴随 TERT 启动子突变的 IDH1 突变型胶质瘤预后好<sup>[8]</sup>。抑癌基因 P53 在胶质瘤发生发展中也具有重要作用,而且 IDH1 突变可能早于 P53 基因突变<sup>[9]</sup>。本文分析 IDH1 突变与 MGMT 启动子甲基化、TERT 和 P53 突变的相关性。

1 材料和方法

1.1 标本来源 收集武汉大学中南医院神经外科 2016 年 6 月至 2017 年 9 月手术切除并经病理诊断为胶质瘤标本 72 例,根据 WHO 中枢神经系统肿瘤分级分类,Ⅱ级 14 例,Ⅲ级 19 例,Ⅳ级 39 例(其中继发性胶质母细胞瘤 2 例)。

1.2 PCR 荧光探针法检测 MGMT 基因启动子甲基化用 DNA 抽提试剂盒提取石蜡包埋组织标本 DNA (QIAGEN, 中国),具体操作步骤按试剂盒说明书进行。按照 DNA 重亚硫酸盐转化试剂盒(TIANGEN, 中国)要求,将 DNA 样本进行重亚硫酸盐转化甲基化修饰及转化产物的纯化,之后采用 PCR 结合实时荧光探针试剂盒(YUANQI, 中国),检测样本是否存在甲基化。

1.3 毛细管电泳法检测基因 IDH1、P53、TERT 突变取石蜡包埋胶质瘤组织抽提的 DNA 样本,按照 IDH1、P53、TERT 基因突变检测试剂盒(YUANQI, 中国)说明书进行操作,采用 Applied Biosystems 3500/3500 XL 测序仪(美国应用生物系统公司)进行测序。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行分析;计数资料用 $\chi^2$ 检验;采用 Logistic 回归分析检验 IDH1 突变相关因素;检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 IDH1 突变情况 72 例中, IDH1 突变 21 例,均为 IDH1 的 R132H 突变,总突变率为 29.2%。IDH1 突变型组年龄较 IDH1 野生型组年轻化( $P<0.05$ )、MGMT 启动子甲基化突变率和 P53 突变率明显高于 IDH1 野生型组( $P<0.05$ )。详见表 1。WHO Ⅱ、Ⅲ级胶质瘤和继发性胶质母细胞瘤 IDH1 突变率显著高于原发性胶质母细胞瘤( $P<0.05$ )。见表 2。

2.2 MGMT 启动子甲基化与 P53 和 TERT 突变情况 72 例中, MGMT 启动子甲基化率为 47.2%。P53 突变 29 例(2 例检测重复性差未纳入分析),总突变率为 41.4%。TERT 启动子突变 36 例,总突变率为 50%。不同级别胶质瘤 MGMT 甲基化、P53 和 TERT 突变率

无统计学差异( $P>0.05$ )。见表 2。

2.3 IDH1 突变与 MGMT 启动子甲基化、TERT 和 P53 突变间的相关性 IDH1 突变与 MGMT 启动子甲基化(列联系数=0.44;  $P<0.001$ )、P53 突变(列联系数=0.32;  $P<0.05$ )均有显著相关性,但与 TERT 启动子突变无明显相关性( $P>0.05$ )。

2.4 IDH1 野生型胶质瘤 MGMT 启动子甲基化与 TERT 的关系 在 51 例 IDH1 野生型胶质瘤中, MGMT 启动子甲基化 16 例,同时伴有 TERT 突变 11 例; MGMT 启动子非甲基化 35 例,同时伴 TERT 突变 13 例。IDH1 野生型胶质瘤中 MGMT 启动子甲基化与 TERT 启动子基因突变具有相关性(列联系数=0.28,  $P<0.05$ )。

2.5 IDH1 突变型胶质瘤 MGMT 启动子甲基化与 P53 突变的关系 在 51 例 IDH1 突变型胶质瘤中, MGMT 启动子甲基化 34 例,同时伴 P53 突变 19 例; MGMT 启动子非甲基化 36 例,同时伴 P53 突变 10 例。IDH1 突变型胶质瘤中 MGMT 启动子甲基化与 P53 基因突变具有相关性(列联系数=0.27,  $P<0.05$ )。

2.6 IDH1 突变的相关因素分析 根据表 1 单因素分析结果,将病人年龄、MGMT 启动子甲基化和 P53 突变纳入多因素 Logistic 回归分析,结果显示病人年龄、MGMT 启动子甲基化是 IDH1 突变独立相关因素

表 1 IDH1 突变型与野生型胶质瘤病人一般资料对比		
一般资料	IDH1 突变型	IDH1 野生型
性别(例,男/女)	15/6	35/16
年龄(岁)	41.62±7.09*	51.76±16.48
部位(例)		
脑叶	19	43
小脑	0	3
脑室	1	2
脑干	0	1
基底节	0	1
海马区	1	1
吸烟史(例,有/无)	16/5	43/8
饮酒史(例,有/无)	19/2	44/7
糖尿病史(例,有/无)	20/1	46/5
MGMT 启动子(例)		
甲基化	18(85.7%)*	16(31.4%)
非甲基化	3	35
P53(例,突变/非突变)	13/6*	16/35
TERT(例突变/非突变)	12/9	24/27

注:与 IDH1 野生型组相应比值,\*  $P<0.05$ ; IDH1. 异柠檬酸脱氢酶 1; MGMT. O6- 甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶; TERT. 端粒酶逆转录酶

表 2 不同级别胶质瘤 IDH1 突变、MGMT 启动子甲基化、P53 突变以及 TERT 启动子突变情况

胶质瘤级别	IDH1 突变率	MGMT 启动子甲基化率	P53 突变率	TERT 启动子
WHO II 级	71.4%(10/14)*	57.1%(8/14)	61.5%(8/12)	64.3%(9/14)
WHO III 级	42.1%(8/19)*	63.2%(12/19)	36.8%(7/19)	47.4%(9/19)
WHO IV 级(原发性)	2.7%(1/37)	35.1%(13/37)	35.1%(13/37)	48.6%(18/37)
WHO IV 级(继发性)	100%(2/2)*	50%(1/2)	50%(1/2)	0(0/2)

注:与 WHO IV 原发性胶质瘤相应值比,\* P<0.05

(P<0.05)。详见表 3。

3 讨论

2016 年 WHO 中枢神经系统肿瘤分类分级标准的制定采取了传统组织形态学和分子标志物相结合的方法,进一步明确了相关基因在胶质瘤病理诊断中的作用,也使研究者更加关注这些分子标志物之间的内在联系和治疗价值。

目前,在 MGMT 甲基化状态指导下的替莫唑胺化疗已广为接受,但作为独立预后指标 IDH1/2 突变与 MGMT 之间是否相关尚不明确。最新研究表明,根据基因组 CpG 岛甲基化状态把胶质瘤分成 CpG 岛甲基化表型(CpG island methylation phenotype, CIMP)和非甲基化表型(CpG island non-methylation phenotype, CIMP, non-CIMP),CIMP 型病人相对于 non-CIMP 型具有较长的生存期<sup>[10]</sup>,且 IDH1 突变率也较高,同时 IDH1 突变产生高浓度 2-羟戊二酸又可促进 DNA 甲基化<sup>[11,12]</sup>。本研究结果证实 IDH1 突变与 MGMT 启动子甲基化存在明显关联。最近有学者发现,将 IDH1 突变与 MGMT 启动子甲基化结合对胶质瘤病人预后的预测明显优于单独 MGMT 启动子甲基化或 IDH1 突变<sup>[13,14]</sup>。但是,两者之间的具体影响机制还有待进一步研究。

P53 是较早确认的抑癌基因。之前研究表明胶质瘤 IDH1 突变可能早于 P53 突变<sup>[15]</sup>。本研究多因素 Logistic 回归分析结果进一步说明 IDH1 突变与 P53 突变之间不具有相关性,可能是独立的突变事件。本研究还发现原发性胶质瘤 MGMT 启动子甲基化与 P53 突变具有显著相关性。结合前期报道干扰素通过 P53 抑制 MGMT 基因活性、增强替莫唑胺的敏感性<sup>[16]</sup>,我们推测 MGMT 活性可能受 P53 调节。所以,深入开展三者间的调节机制研究,对阐明胶质瘤的发生发展具有重要理论价值。

TERT 突变是近年发现的胶质瘤分子标志物,TERT 启动子区 C228T 和 C250T 突变可增加其活性,该突变在原发性胶质母细胞瘤中发生率在 60%~

表 3 IDH1 突变的多因素相关性分析

危险因素	比值比(95%可信区间)	P 值
年龄	0.898(0.833~0.967)	0.004
MGMT 启动子甲基化	0.004(0.000~0.105)	0.001
P53 突变	0.432(0.092~2.031)	0.288

83%<sup>[17]</sup>,但与 IDH1 突变明显相斥<sup>[18]</sup>。本研究 TERT 启动子在原发性胶质母细胞瘤突变率为 47.2%,也未证明 IDH1 突变与 TERT 突变具有相关性。我们的结果还发现 IDH1 野生型胶质瘤中,MGMT 甲基化与 TERT 突变具有显著相关性。最近亦有报道在 IDH1 野生型胶质母细胞瘤中,将 MGMT 启动子甲基化和 TERT 启动子突变结合能更好预测病人预后<sup>[19]</sup>。

综上所述,胶质瘤 IDH1 突变与 MGMT 甲基化存在明显相关性;在 IDH1 野生型胶质瘤中,MGMT 甲基化与 TERT 突变也存在相关性。据此,我们推测,在胶质瘤发生发展过程中,IDH1 突变可能调节 MGMT 甲基化,MGMT 甲基化与 P53 和 TERT 突变间也可能相互影响。

【参考文献】

[1] Gorlia T, Mj VDB, Hegi ME, *et al.* Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial [J]. *Lancet Oncol*, 2008, 9(1): 29-38.

[2] Killela PJ, Pirozzi CJ, Healy P, *et al.* Mutations in IDH1, IDH2, and in the TERT promoter define clinically distinct subgroups of adult malignant gliomas [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(6): 1515-1525.

[3] Parsons DW, Jones S, Zhang X, *et al.* An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme [J]. *Science*, 2016, 321(5897): 1807-1812.

[4] Kos I, Batinihaberle I. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(8): 2248-2249.

[5] Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase

mutations in gliomas [J]. *Neuro Oncol*, 2016, 18(1): 16–26.

[6] Brennan CW, Verhaak RGW, Mckenna A, *et al.* The somatic genomic landscape of glioblastoma [J]. *Cell*, 2013, 155(2): 462–477.

[7] Wick W, Weller M, Van DBM, *et al.* MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment [J]. *Nat Rev Neurol*, 2014, 10(7): 372.

[8] Heidenreich B, Rachakonda PS, Hosen I, *et al.* TERT promoter mutations and telomere length in adult malignant gliomas and recurrences [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(12): 10617–10633.

[9] 崔晓敏,林 宁,刘彦伟,等. 基于IDH1/2和p53突变的初诊恶性脑胶质瘤预后分型[J]. 中国微侵袭神经外科杂志,2016,21(1):4–6.

[10] Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, *et al.* Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma [J]. *Cancer Cell*, 2010, 17(5): 510–522.

[11] Dang L, White DW, Gross S, *et al.* Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate [J]. *Nature*, 2009, 462(7274): 739–744.

[12] Turcan S, Rohle D, Goenka A, *et al.* IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype [J]. *Nature*, 2012, 483(7390): 479–483.

[13] Molenaar RJ, Verbaan D, Lamba S, *et al.* The combination of IDH1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone [J]. *Neuro Oncol*, 2014, 16(9): 1263–1273.

[14] Tanaka K, Sasayama T, Mizukawa K, *et al.* Combined IDH1 mutation and MGMT methylation status on long-term survival of patients with cerebral low-grade glioma [J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2015, 138: 37–44.

[15] Lai A, Kharbanda S, Pope WB, *et al.* Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(34): 4482–4490.

[16] Natsume A, Wakabayashi T, Ishii D, *et al.* A combination of IFN-beta and temozolomide in human glioma xenograft models: implication of p53-mediated MGMT downregulation [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, 61(4): 653–659.

[17] Arita H, Narita Y, Fukushima S, *et al.* Upregulating mutations in the TERT promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss [J]. *Acta Neuropathol*, 2013, 126(2): 267–276.

[18] Nonoguchi N, Ohta T, Oh JE, *et al.* TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas [J]. *Acta Neuropathol*, 2013, 126(6): 931–937.

[19] Nguyen H N, Lie A, Li T, *et al.* Human TERT promoter mutation enables survival advantage from MGMT promoter methylation in IDH1 wild-type primary glioblastoma treated by standard chemoradiotherapy [J]. *Neuro Oncol*, 2017, 19(3): 394–404.

(2017-11-18 收稿, 2018-01-28 修回)



(上接第330页)

【参考文献】

[1] 中国卒中学会,中国卒中学会神经介入分会,中华预防医学会卒中预防与控制专业委员会介入学. 急性缺血性卒中血管内治疗中国指南2015[J]. 中国卒中杂志,2015,10(7):590–607.

[2] 邢鹏飞,张永巍,杨鹏飞,等. Solumbra技术在急性大脑中动脉闭塞机械取栓中的应用[J]. 中华神经外科杂志, 2017,50(3):184–189.

[3] Brekenfeld C, Schroth G, Mattle HP, *et al.* Stent placement in acute cerebral artery occlusion: use of a self-expandable intracranial stent for acute stroke treatment [J]. *Stroke*, 2009, 40: 847–852.

[4] Mocco J, Hanel RA, Sharma J, *et al.* Use of a vascular reconstruction device to salvage acute ischemic occlusions refractory to traditional endovascular recanalization methods [J]. *J Neurosurg*, 2010, 112: 557–562.

[5] Osama O, Zaidat ,Viktor S, *et al.* Advancing neurologist directed endovascular surgical neuroradiology [J]. *Ann Neurol*, 2008, 112(4): 557–562.

[6] Nakano S, Wakisaka S, Yoneyama T, *et al.* Reperfusion therapy for acute middle cerebral artery trunk occlusion: direct percutaneous transluminal angioplasty versus intra-arterial thrombolysis [J]. *Interv Neuroradiol*, 2004, 10: 71–75.

(2018-01-30 收稿, 2018-04-09 修回)