

· 论 著 ·

ATRX 及 Ki-67 在脑胶质瘤中表达及临床意义

胡志民 刘金霞 姜金峰

【摘要】目的 探讨 ATRX 及 Ki-67 在人脑胶质瘤中表达情况及临床意义。方法 收集 2018 年 1 月至 2023 年 1 月手术切除并经术后病理检查确诊的 51 例脑胶质瘤标本,采用免疫组化染色检测 ATRX 及 Ki-67 的表达。术后随访 0.5~50 个月,中位数 16 个月(IQR:5~28 个月),记录病人生存情况。结果 51 例胶质瘤中,WHO 分级 I 级 3 例,II 级 13 例,III 级 16 例,IV 级 19 例。WHO 分级 III、IV 级胶质瘤 Ki-67 阳性率(80.0%,28/35)明显高于 WHO 分级 I、II 级胶质瘤(50.0%,8/16; $P=0.029$);WHO 分级 III、IV 级胶质瘤 ATRX 阳性率(68.6%,24/35)低于 WHO 分级 I、II 级胶质瘤(87.5%,14/16),但无统计学差异($P=0.185$)。多因素 Cox 回归分析显示,Ki-67 阴性表达($RR=0.408$;95% CI 0.214~0.778; $P=0.006$)是胶质瘤生存预后不良的独立保护因素,ATRX 阴性表达($RR=2.189$;95% CI 0.082~4.431; $P=0.029$)是胶质瘤生存预后不良的独立影响因素。Kaplan-Meier 生存曲线分析显示,Ki-67 阴性表达、ATRX 阳性表达胶质瘤中位生存期明显延长($P<0.05$)。结论 ATRX 及 Ki-67 表达与胶质瘤病理级别和病人预后相关,可作为胶质瘤病人病理分级及预后评估的参考指标。

【关键词】胶质瘤;ATRX;Ki-67;基因表达;预后

【文章编号】1009-153X(2024)09-0544-04 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41; Q 786

Expression of ATRX and Ki-67 in glioma and their clinical significance

HU Zhi-min¹, LIU Jin-xia², LOU Jin-feng³. 1. Department of Neurosurgery, Puyang People's Hospital, Puyang 457000, China; 2. Department of Pathology, Puyang People's Hospital, Puyang 457000, China; 3. Department of Neurosurgery, Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

【Abstract】Objective To investigate the expression of ATRX and Ki-67 in human gliomas and their clinical significance. Methods Fifty-one specimens of gliomas that were surgically resected and diagnosed by postoperative pathological examination from January 2018 to January 2023 were collected. The expression of ATRX and Ki-67 was detected by immunohistochemical staining. The postoperative follow-up period ranged from 0.5 to 50 months, with a median of 16 months (IQR: 5~28 months), and the survival status of the patients was recorded. Results Of the 51 glioma patients, 3 were WHO grade I, 13 were grade II, 16 were grade III, and 19 were grade IV. The positive rate of Ki-67 in WHO grade III and IV gliomas (80.0%, 28/35) was significantly higher than that in WHO grade I and II gliomas (50.0%, 8/16; $P=0.029$); the positive rate of ATRX in WHO grade III and IV gliomas (68.6%, 24/35) was lower than that in WHO grade I and II gliomas (87.5%, 14/16), but without statistical significance ($P=0.185$). Multivariate Cox regression analysis revealed that negative expression of Ki-67 ($RR=0.408$; 95% CI 0.214~0.778; $P=0.006$) was an independent protective factor for poor prognosis of glioma, and negative expression of ATRX ($RR=2.189$; 95% CI 0.082~4.431; $P=0.029$) was an independent risk factor for poor prognosis of glioma. Kaplan-Meier survival curve analysis demonstrated that the median survival times of gliomas with negative expression of Ki-67 and positive expression of ATRX were significantly prolonged ($P<0.05$). Conclusion The expressions of ATRX and Ki-67 are correlated with the pathological grade and prognosis of glioma patients and can serve as reference indicators for pathological classification and prognosis evaluation of glioma patients.

【Key words】Glioma; ATRX; Ki-67; Gene expression; Prognosis

目前,中枢神经系统肿瘤已成为影响人类健康和生存的最常见的恶性肿瘤之一,其中神经胶质瘤

是中枢神经系统最具侵袭性、致死性原发性肿瘤,尤其是胶质母细胞瘤,预后极差^[1]。近年来,随着分子生物学的发展,许多胶质细胞瘤诊断和预后的生物标志物相继被发现,为了解神经胶质瘤的发病机制提供了有价值的信息,并已成为新的治疗靶点。本研究通过免疫组化染色检测胶质瘤阿尔法地中海贫血/智力迟钝综合征 X-连锁(alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked, ATRX)及 Ki-67 的表达情况,分析其临床意义。

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2024.09.008

基金项目:2022 年河南省医学科技攻关联合共建项目(LHGJ20220467)

作者单位:457000 河南,濮阳市人民医院神经外科(胡志民),病理科(刘金霞);450000 郑州,郑州大学第二附属医院神经外科(姜金峰)

通信作者,姜金峰,Email:huzm2023@163.com

1 资料与方法

1.1 标本来源 收集 2018 年 1 月至 2023 年 1 月手术切除并经术后病理检查确诊的脑胶质瘤标本 51 例,其中男性 30 例,女性 21 例;年龄 29~71 岁,平均(53.4±11.0)岁;按照 2021 年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)中枢神经系统肿瘤分类方法^[2]:WHO 分级 I 级 3 例,II 级 13 例,III 级 16 例,IV 级 19 例;弥漫性星形细胞瘤 10 例,间变型星形细胞瘤 12 例,胶质母细胞瘤 19 例,少突胶质细胞瘤 7 例,毛细胞型星形细胞瘤 3 例。

1.2 标本处理 术中切除的肿瘤标本,立即进行 10% 中性福尔马林液固定 12~24 h。病理医师在组织标本上选取部位,避开坏死组织、血管和间质,保证肿瘤细胞比例高于 80%,经脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋程序并制成蜡块待用。

1.3 免疫组化染色方法 先将组织标本蜡块切成厚度为 4 μm 的切片,避光、室温保存。经全自动免疫组化染色系统完成免疫组化染色。结果解释:ATRX 及 Ki-67 定位在细胞核内,细胞核呈棕色为阳性表达(图 1)。阳性:组织切片中预期细胞的细胞核部位呈棕色,无背景染色。阴性:组织切片中预期细胞核无棕色染色。在高倍显微镜(×400)下选择肿瘤细胞密集区 5 个视野,计数每个视野的阳性细胞数,计算

阳性细胞所占百分比,取均值作为阳性率。阳性率>10%为阳性表达,≤10%为阴性表达。

1.4 随访 所有病人随访至 2023 年 10 月 31 日。生存时间是指明确病理诊断之日起至病人死亡、失访或随访结束之日。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 25.0 软件处理;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验;计数资料采用 χ^2 检验;多因素 Cox 比例回归风险模型分析生存预后影响因素;用 Kaplan-Meier 法进行生存分析,用 Log-rank 检验;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胶质瘤 ATRX 和 Ki-67 表达情况 WHO 分级 III~IV 级胶质瘤 Ki-67 阳性率(80.0%, 28/35)明显高于 WHO 分级 I~II 级胶质瘤(50.0%, 8/16; *P*=0.029);WHO 分级 III~IV 级胶质瘤 ATRX 阳性率(68.6%, 24/35)低于 WHO 分级 I~II 级胶质瘤(87.5%, 14/16),但无统计学差异(*P*=0.185)。

2.2 随访结果 术后随访 0.5~50.0 个月,中位随访时间 16 个月(四分位间距 5~28 个月),死亡 37 例,存活 14 例。

2.3 胶质瘤生存预后的影响因素 多因素 Cox 回归分析显示,Ki-67 阴性表达是胶质瘤生存预后不良的独立保护因素(*P*<0.05,表 1),ATRX 阴性表达是胶质

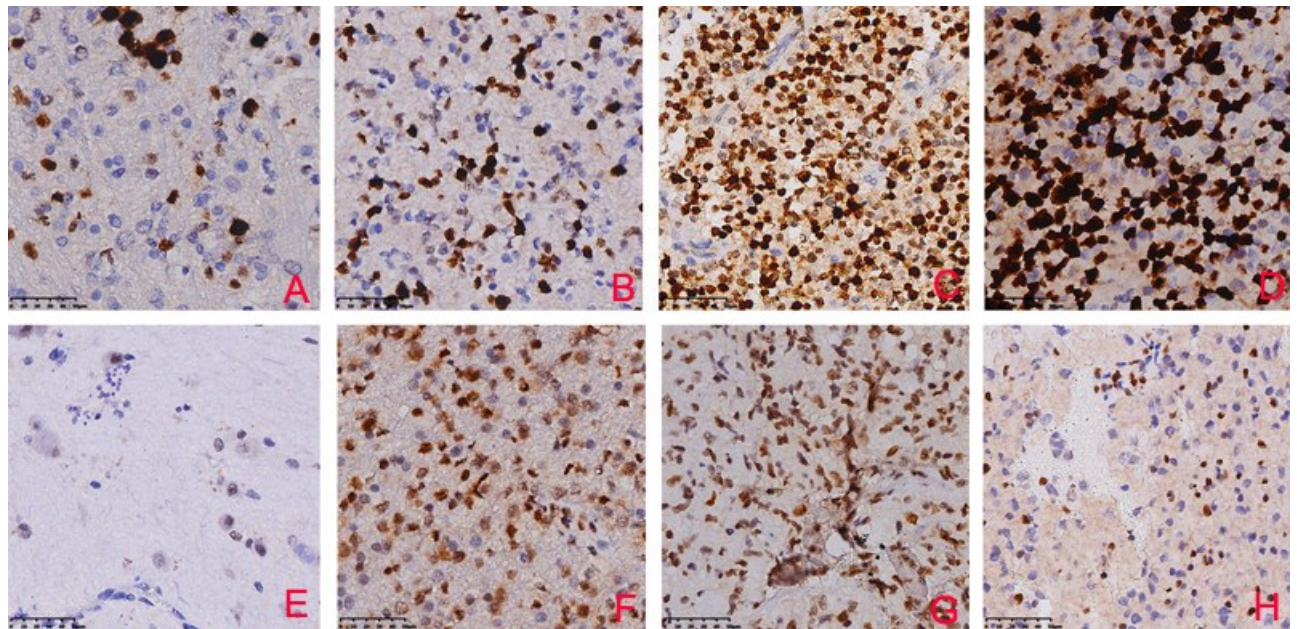


图 1 胶质瘤组织 ATRX 及 Ki-67 免疫组化染色图(×400)

A~D. 胶质瘤组织 Ki-67 表达;E~H. 胶质瘤组织 ATRX 表达;A、E. WHO 分级 I 胶质瘤组织;B、F. WHO 分级 II 胶质瘤组织;C、G. WHO 分级 III 胶质瘤组织;D、H. WHO 分级 IV 胶质瘤组织

Figure 1 Immunohistochemical staining of glioma tissues for ATRX and Ki-67 (×400)

A~D: Expression of Ki-67 in glioma tissues. E~H: Expression of ATRX in glioma tissues. A, E: Glioma tissues of WHO grade I. B, F: Glioma tissues of WHO grade II. C, G: Glioma tissues of WHO grade III. D, H: Glioma tissues of WHO grade IV.

瘤生存预后不良的独立影响因素($P<0.05$,表1)。Kaplan-Meier生存曲线分析显示,Ki-67阴性表达、ATRX阳性表达胶质瘤中位生存期明显延长($P<0.05$,图2)。

3 讨论

ATRX是一种肿瘤抑制因子,与肿瘤的发生、进展、治疗和治疗耐药性密切相关。ATRX由定位于染色体Xq13的ATRX基因编码,ATRX的缺失可导致端粒不稳定和延长,引起遗传不稳定。ATRX作为端粒维持基因,与肿瘤细胞发生端粒替代延长机制有关。人类弥漫性胶质瘤的端粒功能的维持,一种情况是端粒酶再次激活,或者是一种被称为端粒替代延长机制的激活^[3,4]。ATRX蛋白与死亡结构域相关蛋白形成复合体,可与组蛋白变体H3.3相互作用,并聚集于染色质和端粒。ATRX基因突变引起ATRX蛋白的表达缺失,将导致端粒的不稳定,使细胞出现无限分裂。ATRX表达缺失有利于保持端粒长度,提升端粒酶活性,导致发展成高级别胶质瘤,这可能是其影响胶质瘤病人预后的重要机制^[5]。基因组学的综合分析显示,ATRX表达缺失与胶质瘤

病人的预后密切相关。胶质瘤ATRX缺失促进肿瘤生长,影响DNA修复。受到转录调控和染色质重塑的严格调控,肿瘤细胞通常通过维持端粒长度而获得无限的分裂能力^[6]。

Ki-67存在于细胞核,编码基因位于10号染色体,反映细胞核增殖活性。报道显示,Ki-67主要用于判断肿瘤细胞的增殖活性,Ki-67阳性率越高,说明处于增殖周期的细胞比例越高,与胶质瘤的病理分级相关,而且,Ki-67阳性率越高,病人预后越差^[7-8]。本研究发现,WHO分级Ⅲ~Ⅳ级胶质瘤Ki-67阳性率明显高于WHO分级Ⅰ~Ⅱ级胶质瘤($P<0.05$)。部分低级别胶质瘤可迅速发展为胶质母细胞瘤,也有部分低级别胶质瘤对治疗敏感,并在数年内保持稳定。研究显示,Ki-67可以准确评价F98型大鼠胶质瘤模型肿瘤浸润程度^[9]。Ki-67被用于包括胶质母细胞瘤在内的各种肿瘤的组织病理学评估,Ki-67表达水平与胶质母细胞瘤病人的总生存率呈正相关,可作为胶质母细胞瘤预后标志物^[10,11]。研究发现,病理级别越高,KI-67阳性率愈高,细胞增殖活性越强^[12]。

免疫组化染色表明,ATRX缺失在异柠檬酸脱氢酶-1(isocitrate dehydrogenase, IDH-1)突变型胶质瘤中更为常见,但在IDH-1野生型胶质瘤中很少见^[13]。ATRX在IDH-1突变型胶质瘤中调节胶质细胞特性和肿瘤微环境^[14],ATRX缺失促进IDH-1突变型胶质瘤的免疫抑制机制缺失,增强IDH1R132H/p53mut细胞诱导T细胞凋亡、致瘤性/抗炎性巨噬细胞极化的能力,激活IDH1R132H/p53mut星形细胞瘤细胞免疫抑制转录和免疫逃逸机制^[15]。本研究为单中心研究,样本量小,得出的结果可能存在一定的偏差,一些影响预后的因素可能被忽视,存在假阴性

表1 胶质瘤死亡危险因素的多因素Cox比例回归风险模型分析
Table 1 Multivariate Cox proportional hazards regression model analysis of the risk factors for death in glioma patients

危险因素	P值	风险比(95%置信区间)
Ki-67阴性表达	0.006	0.408(0.214~0.778)
ATRX阴性表达	0.029	2.189(1.082~4.431)
肿瘤全切除	0.000	0.194(0.093~0.403)
WHO分级Ⅰ~Ⅱ级	0.001	0.296(0.144~0.606)

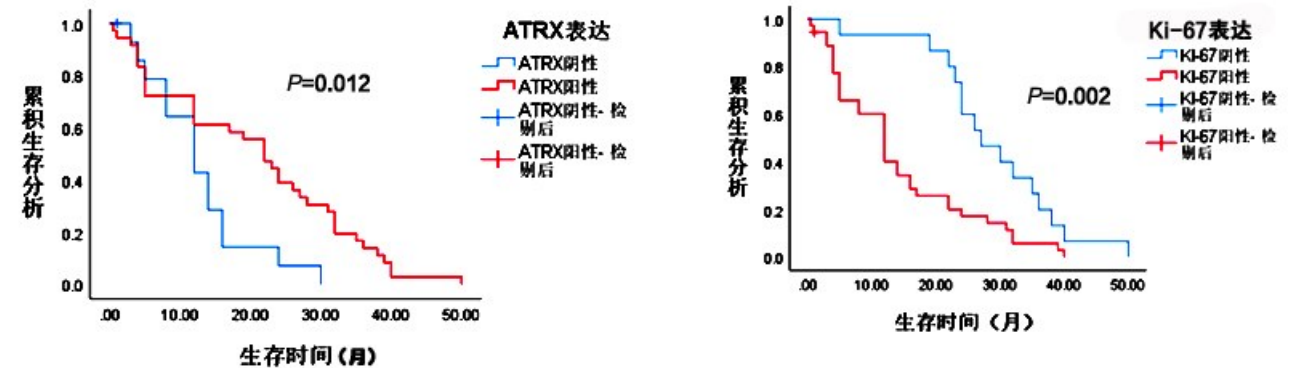


图2 生存曲线分析 ATRX 和 Ki-67 表达水平与胶质瘤病人生存预后的关系
Figure 2 Survival curve analysis of the correlation between the expression levels of ATRX and Ki-67 and the survival prognosis of patients with glioma

可能,有待后续大样本研究。我们认为 ATRX 阴性表达与肿瘤的发生、发展相关,有可能是被动调控,其保持端粒的稳定性,一定程度上限制了肿瘤细胞的无限分裂能力,而高级别胶质瘤表达缺失,可使转录调控和染色质修饰能力下调,从而肿瘤细胞扩散。本文多因素 Cox 比例回归风险模型分析结果显示,Ki-67 及 ATRX 是胶质瘤病人死亡的独立影响因素。我们认为,在胶质瘤的发展过程中,其表达水平反映了胶质瘤转归的趋向,具有预测预后的价值,可以作为判断胶质瘤预后的参考指标。

【伦理学声明】:本研究遵循《赫尔辛基宣言》,所有病人和/或家属均签署知情同意书。本研究方案于 2024 年 3 月 31 日经濮阳市人民医院伦理委员会审批,批号为 2024-F-03-014。

【利益相关声明】:本文不存在任何利益冲突。

【作者贡献说明】:胡志民负责研究设计、资料整理、数据分析、论文撰写;刘金霞负责病理检测;姜金峰指导、审阅论文。

【参考文献】

[1] CLOUGHESY TF, LANDOLFI J, VOGELBAUM MA, *et al.* Durable complete responses in some recurrent high-grade glioma patients treated with Toca 511 + Toca FC [J]. *NeuroOncol*, 2018, 20(10): 1383-1392.

[2] 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.

[3] JALAL JA, ROWANDIZY AIS, ISMAEL AT. Immunohistochemical expression of ATRX in gliomas [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2020, 66(7): 131-135.

[4] GRANDIN N, PEREIRA B, COHEN C, *et al.* The level of activity of the alternative lengthening of telomeres correlates with patient age in IDH-mutant ATRX-loss-of-expression anaplastic astrocytomas [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2019, 7(1): 175.

[5] SU YL, LI H, CHAO B, *et al.* Role of TERT promoter mutation and

ATRX expression level in prognosis assesement of patients with glioma [J]. *Chin J Clin Neurosurg*, 2021, 26(4): 246-249.

苏优勒, 李 昊, 朝 博, 等. TERT 启动子突变、ATRX 表达水平在脑胶质瘤病人预后评估中的作用[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2021, 26(4): 246-249.

[6] LIU J, ZHANG X, YAN X, *et al.* Significance of TERT and ATRX mutations in glioma [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(1): 95-102.

[7] DAHLROT RH, BANGS JA, PETERSEN JK, *et al.* Prognostic role of Ki-67 in glioblastomas excluding contribution from non-neoplastic cells [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 17918.

[8] XU G, LI C, WANG Y, *et al.* Correlation between preoperative inflammatory markers, Ki-67 and the pathological grade of glioma [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100(36): e26750.

[9] WANG K, HA T, CHEN X, *et al.* A combined diffusion tensor imaging and Ki-67 labeling index study for evaluating the extent of tumor infiltration using the F98 rat glioma model [J]. *J Neurooncol*, 2018, 137(2): 259-268.

[10] WONG E, NAHAR N, HAU E, *et al.* Cut-point for Ki-67 proliferation index as a prognostic marker for glioblastoma [J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2019, 15(1): 5-9.

[11] LI S, ZHENG Y, SUN W, *et al.* Glioma grading, molecular feature classification, and microstructural characterization using MR diffusional variance decomposition (DIVIDE) imaging [J]. *Eur Radiol*, 2021, 31(11): 8197-8207.

[12] CUI Y, ZENG W, JIANG H, *et al.* Higher Cho/NAA ratio in post-operative peritumoral edema zone is associated with earlier recurrence of glioblastoma [J]. *Front Neurol*, 2020, 11: 592155.

[13] XIE Y, TAN Y, YANG C, *et al.* Omics-based integrated analysis identified ATRX as a biomarker associated with glioma diagnosis and prognosis [J]. *Cancer Biol Med*, 2019, 16(4): 784-796.

[14] BABIKIR H, WANG L, SHAMARDANI K, *et al.* ATRX regulates glial identity and the tumor microenvironment in IDH-mutant glioma [J]. *Genome Biol*, 2021, 22(1): 311.

[15] HU C, WANG K, DAMON C, *et al.* ATRX loss promotes immunosuppressive mechanisms in IDH1 mutant glioma [J]. *Neuro Oncol*, 2022, 24(6): 888-900.

(2023-10-16 收稿, 2024-06-27 修回)