

• 综 述 •

# 脑胶质瘤临床分子诊断的研究进展

付朝泓 综述,李 艳<sup>△</sup>审校

(武汉大学人民医院检验科,湖北武汉 430060)

**关键词:**脑胶质瘤; 分子诊断; 综述

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.18.036

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2013)18-2429-03

胶质瘤是最常见的脑原发性肿瘤,占颅内原发肿瘤的 35.26%~60.96%。2007 年世界卫生组织(WHO)将脑胶质瘤划分为:成人星形细胞恶性胶质瘤、恶性程度最高的胶质母细胞瘤、少突胶质细胞瘤和少突星形细胞瘤<sup>[1]</sup>。近年来,脑胶质瘤的诊断与治疗越来越依赖于临床分子诊断。如 1p/19q 杂合性缺失、6-氧-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶(MGMT)启动子甲基化和异柠檬酸脱氢酶(IDH)基因突变等分子的检测不仅用于脑胶质瘤的诊断与鉴别诊断,也用于脑胶质瘤的预测疗效和评价预后等。本文结合近几年脑胶质瘤分子靶标研究进展和 NCCN 中枢神经系统临床诊疗指南等对脑胶质瘤的临床分子诊断进行综述。

## 1 1p/19q 杂合性缺失

**1.1 1p/19q 杂合性缺失的研究进展** Griffin 等<sup>[2]</sup>研究发现少突胶质细胞肿瘤中 1p/19q 杂合性缺失是由一种非平衡的染色体易位 t(1;19)(q10;p10)引起,1p 和 19q 着丝粒区具有同源性,在少突胶质细胞瘤前体细胞进行核型构建过程中,可能发生染色体易位。大部分情况下,缺失是代表完整的染色体臂丢失,这可能造成 1p/19q 着丝粒的转运形成一个不平衡的结果<sup>[3]</sup>。尽管 1p/19q 区域的许多基因已经被估为肿瘤抑制基因,但没有最终确定有关联的致癌基因。不同类型胶质瘤组织的 1p/19q 杂合性缺失率存在差异。在Ⅱ级少突胶质瘤中被估算约 80%~90%,在Ⅲ级少突胶质瘤中约 50%~70%<sup>[4]</sup>。在混合型脑胶质瘤中(少突星形细胞瘤)被估算约 7.5%~17%<sup>[5]</sup>。染色体的 1p/19q 杂合性缺失是大多数少突胶质细胞瘤所具有的,以 1p/19q 杂合性缺失作为少突胶质瘤诊断依据的观点被越来越多的研究所证实<sup>[6]</sup>。1p/19q 杂合性缺失和肿瘤的位置也有关联。在额部、顶部及枕叶部的低等级少突胶质瘤和间质型少突胶质瘤比出现在颞叶、脑岛及间脑的肿瘤更可能表现出 1p/19q 杂合性缺失<sup>[7]</sup>。Kaloshi 等<sup>[8]</sup>研究发现在低级别胶质瘤和间变型少突胶质细胞瘤中,发生 1p/19q 杂合性缺失的中位生存期分别为 12~15 年和 6~7 年,而没有发生 1p/19q 杂合性缺失的中位生存期分别为 5~8 年和 2~3 年。Snuderl 等<sup>[9]</sup>报道在间变少枝胶质细胞瘤中,1p/19q 杂合性缺失伴有 1 号和 19 号染色体多体共存的患者,无进展生存期短于 1p/19q 杂合性缺失不伴有 1 号和 19 号染色体多体患者,提示 1 号和 19 号染色体多体作为早期复发标记物的价值。故 1p/19q 杂合性缺失在 WHO Ⅱ级胶质瘤中是良好预后的重要标记。Cairncross 等<sup>[10]</sup>在对高比例复发的间质型少突胶质瘤的化疗反应进行观察之后分析发现,染色体 1 号短臂(1p)缺失的少突胶质瘤患者在进行 PLV 化疗方案进行治疗时有优先的化疗敏感性,1p 和 19q 杂合性缺失,对化疗敏感且化疗疗效持续时间长,中位生存时间超过 7 年,而且对 1p 和 19q 杂合性缺

失的少突胶质细胞瘤患者能大幅地提高生存期时间。

**1.2 1p/19q 杂合性缺失的实验检测进展** 传统常用的技术是以 PCR 技术为基础来检测血液中 1p/19q 杂合性缺失,是建立在以血液中 DNA 作为阴性质控与肿瘤中的 DNA 多形态的等位基因作为对照的基础上的。荧光原位杂交技术(FISH)是应用荧光标记探针直接对组织切片中的染色体进行研究。LOH 实验需要有效的血 DNA,可能要延迟实验结果,这些缺点限制了 LOH 实验在 1p/19q 杂合性缺失研究中的应用。FISH 实验组织样本的准备比较耗时,但组织的体系结构得到了保存。此外,即时荧光定量 PCR 微卫星分析(QuMA)技术对染色体的 1p/19q 杂合性缺失进行检测。此方法与传统的 PCR 方法相比,不需要患者血液的 DNA 作为对照,适用于石蜡包埋组织的回顾性研究,闭管检测不需 PCR 后处理避免扩增产物污染而导致假阳性的可能性,用时短、特异性强、定量准确。但是 QuMA 方法也有不足之处,首先 QuMA 需要足够的肿瘤组织 DNA,其次存在正常细胞 DNA 的污染,DNA 样品中混入大于 70%正常细胞 DNA 时可能会造成假阴性结果。

## 2 MGMT 启动子甲基化状态

**2.1 MGMT 启动子甲基化的研究进展** 烷基化化疗药物在恶性脑胶质瘤的治疗上有长期的应用。MGMT 作为一种 DNA 修复蛋白,能够移除 DNA 上鸟嘌呤 O6 位点的能致突变性和细胞毒性的烷基化加合物,使损伤的鸟嘌呤恢复,从而能够保护细胞对抗烷化基团的损害,一些研究资料已经证实 O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移能够迅速修复由烷化剂药物引起的 DNA 烷基化损伤,从而使细胞对烷化剂产生耐受<sup>[11]</sup>。MGMT 在正常组织和肿瘤组织中都有表达,且 MGMT 表达容易受到烷化剂药物、放疗以及糖皮质激素等因素的诱导,因此对 MGMT 的检测受到许多因素的干扰而很困难<sup>[12]</sup>。而只有在肿瘤组织中才有 MGMT 启动子甲基化的等位基因,即使有非肿瘤组织的污染也不会影响 MGMT 启动子甲基化的检测结果。因此,MGMT 基因甲基化的检测在预测肿瘤对烷化剂药物耐药性中具有重要意义。对在单独放疗的胶质母细胞瘤的患者检测中发现,MGMT 启动子甲基化对放疗有预后价值<sup>[13]</sup>。在胶质母细胞瘤中 MGMT 启动子甲基化的效果在烷基化药物治疗后和放疗后对无进展生存期有预后的价值<sup>[14]</sup>。MGMT 甲基化的检测除了预测脑胶质瘤对烷化剂药物的敏感性外,对胶质母细胞瘤的假性进展期的判断和治疗也有一定的价值<sup>[15]</sup>。有 MGMT 启动子甲基化的胶质母细胞瘤的患者比没有甲基化的患者被报告当用替莫唑胺治疗时有放射期假性进展期<sup>[15]</sup>。在假性进展期,在神经影像上尽管有恶化的表现,有 MGMT 启动子甲基化的胶质母细胞瘤的患者通常可以继续使用替莫唑胺进行治疗。相反地,没有 MGMT 启动子甲

基化的胶质母细胞瘤患者中出现神经影像学上的恶化表现时可能提示要考虑改变治疗方式<sup>[15]</sup>。

**2.2 MGMT 启动子甲基化的实验检测进展** 蛋白印迹和免疫组化法用来测定 MGMT 启动子甲基化中合成的蛋白质或细胞通道中表达的蛋白质,这种检测可受到正常组织和肿瘤浸润淋巴细胞的影响,从而可导致对 MGMT 启动子甲基化的基因和蛋白质的评价结果不一致。而甲基化特异性 PCR(MSP)法检测脑胶质瘤中 MGMT 启动子甲基化更为可靠和方便。这个试验能够用石蜡切片来做,缺点是要依赖大量的有特异性的切片。其他的影响因素包括是否适量的亚硫酸盐处理、特异性引物和 PCR 条件等对试验结果的有效性都有影响。其他的以亚硫酸盐为基础的技术比如亚硫酸盐排序、甲基化敏感的单链构造多态性分析和分光光度计为基础的定量分析等和不以亚硫酸盐为基础的半定量技术如焦磷酸测序、甲基化标记多通道配体依赖探针扩增(MS-MLPA)技术等也为 MGMT 启动子甲基化提供有效的检测。

### 3 表皮生长因子受体(EGFR)基因突变或过度表达

**3.1 EGFR 基因突变或过度表达的研究进展** EGFR 是一种位于细胞膜上的酪氨酸激酶受体,EGFR 与其配体结合后,通过自身磷酸化介导细胞内一系列信号传递,促进细胞增殖、分化、迁移。EGFR 过度表达具有抑制细胞凋亡和促进肿瘤内血管增生的作用,因此它能够促进肿瘤发生、转移和侵袭。60%的胶质母细胞瘤<sup>[16]</sup>中 EGFR 基因调停信号都是正调节。在胶质母细胞瘤中通常由 EGFR 基因驱动过度表达<sup>[17]</sup>。韩影等<sup>[18]</sup>研究表明 EGFR 的过度表达与胶质瘤的恶性度呈正相关,是胶质瘤分化不良的重要标志,EGFR 过度表达的肿瘤可能具有更强的分裂增殖活性,EGFR 的过度表达可作为胶质瘤恶性程度的生物学指标及判断预后的重要参数之一。此外,从大量浸润的脑胶质瘤细胞中发现 EGFRvIII 提示胶质母细胞瘤的存在<sup>[19]</sup>。有 EGFR 过度表达或 EGFRvIII 突变和有完整的 PTEN-AKT 通路的胶质母细胞瘤对小分子激酶抑制剂敏感<sup>[20]</sup>。

**3.2 EGFR 基因突变或过度表达的实验检测进展** 在脑胶质瘤中,对 EGFR 基因过度表达的检测可用免疫组织化学的方法在蛋白质水平上进行检测,但结果可能会受到正常组织的影响。而 FISH 技术是对 EGFR 基因过表达和突变的主要检测技术。FISH 维持切片的组织结构的完整及提供组织切片中基因杂合的信息,减少了假阴性试验的可能。定量 PCR 和 RT-PCR 及以此为基础的基因测序也被应用来鉴定 EGFR 过表达及鉴定 EGFR 的突变。基因测序技术能够准确地对 EGFR 的突变进行分析,但其对胶质瘤中有效的 DNA 有一定的需求,此外 PCR 的实验条件等对其结果也有影响。

### 4 IDH 基因突变

**4.1 IDH 基因突变的研究进展** 2008 年 Parsons 等<sup>[21]</sup>对胶质母细胞瘤的 20661 个蛋白基因编码进行测序时首先发现了异柠檬酸脱氢酶 1(IDH1)编码基因,实验发现在 149 位胶质母细胞瘤患者中有 18 位(12%)存 IDH1 基因突变,且所有的 IDH1 基因突变都是发生在第四外显子的 Arg(R132)的氨基酸序列上。IDH1 突变可能导致 R-2-羟戊二酸增加,可能直接导致肿瘤的形成或降低催化能力,IDH2 可能导致  $\alpha$ -缺氧诱导因子转录因子的增加,它是已知的促进肿瘤生长的因子<sup>[22]</sup>。初级的胶质母细胞瘤中 IDH1 和 IDH2 基因突变发生率较低(0.05%),在中级的胶质母细胞瘤中有较高的频率(84.6%)在低等级神经胶质细胞瘤中也有较高的频率(扩散性星形细胞瘤

83.3%、未分化星形细胞瘤 69.2%、少突胶质细胞瘤 80.4%、未分化少突胶质细胞瘤 86.1%、少突星形细胞瘤 100%)<sup>[23]</sup>。IDH 基因突变在低等级胶质细胞瘤中的高突变率为低等级胶质细胞瘤的鉴别诊断提供了评估的价值。大部分的(>60%)低级别胶质瘤有 P53 突变和 IDH1 突变,大多数(>60%)少突胶质细胞瘤中有 IDH1 突变和 1P/19q 杂合性缺失<sup>[24]</sup>。这对于低级别胶质瘤和少突胶质细胞瘤的鉴别提供了一种在分子水平上的途径,并有可能取代传统的组织学方法。随后发现的一种 132 密码子变异 IDH1 蛋白的抗体,它能区分单个浸润细胞表达的全型和 IDH1 突变,间接地帮助了对浸润性胶质细胞瘤的鉴定和特异性的诊断<sup>[24]</sup>。在近来的全基因调查中,中级胶质细胞瘤中较年轻患者(首次发现胶质细胞瘤的年龄在 45~60 岁)的 IDH 基因的突变有很高的检出频率<sup>[21]</sup>。故 IDH 基因突变对较年轻患者的少突胶质细胞瘤和胶质母细胞瘤有良好的预后价值<sup>[25]</sup>。

**4.2 IDH 基因突变的实验检测进展** 免疫组化技术检测胶质瘤中 IDH 基因突变相关联的蛋白的表达,即时定量 RT-PCR 技术和 Western Blot 技术同样也能检测脑胶质瘤中 IDH 基因突变相关联的蛋白的表达,免疫组化法需要的石蜡包埋的组织切片可长期保存,操作过程相对简单,但不能保证切片全部具有所需要的组织学特征。而即时定量 RT-PCR 技术和 Western Blot 法需要冰冻的新鲜组织,扩增和培养的过程易受到正常组织和 DNA 的干扰,直接基因测序法可检测出脑胶质瘤中 IDH 基因突变的基因序列,它是建立在 PCR 技术基础之上的,各种检测技术的相互结合才能对所检测的结果进行综合分析,更加准确地为研究对象服务。

### 5 小 结

临床上不同患者与不同类型脑胶质瘤、相同类型不同患者的脑胶质瘤、接受与未接受放疗的脑胶质瘤均具有不同的细胞与分子生物学特征。因此,在分子诊断方面尽管 1p/19q 区域的基因序列已经被普遍地绘制,许多的基因已经被估作为候选的肿瘤抑制基因,但没有最终确定有关联的致瘤基因。目前,这种应用 1p/19q 杂合性缺失状态来鉴别和治疗低等级少突胶质瘤的办法仍然有局限性。MGMT 启动子甲基化影响临床结局的具体机制仍不清楚。胶质母细胞瘤的标准治疗方案并非针对 EGFR 信号通路,尚不能准确评估 EGFR 状态在制定胶质母细胞瘤治疗方案的作用。IDH 突变能否作为预后判断指标尚需进一步确认。随着分子诊断的快速发展,通过获取临床上手术患者肿瘤标本,进行较全面的细胞与分子生物学的检测、耐药基因与放化疗敏感的研究。结合专业软件进行治疗方案优化制定个体化综合治疗,将是未来胶质瘤分子诊断的发展方向。如:对 1p/19q 杂合性缺失的研究会结合其他相关联的分子标记如 IDH 基因突变、EGFR 基因过表达和突变等共同对恶性胶质母细胞瘤的治疗进行指导。MGMT 启动子甲基化的检测可能会作为新的化疗药的开发和效果评估的标准。EGFR 基因过表达和突变将结合 MGMT 启动子甲基化、同源性磷酸酶(PTEN)等其他分子标记对脑胶质瘤及胶质母细胞瘤的亚型进行鉴别诊断。

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] Griffin CA, Burger P, Morsberger L, et al. Identification of der(1;

- 19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2006, 65(10):988-994.
- [3] Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma[J]. Cancer Res, 2006, 66(20):9852-9861.
- [4] Cairncross G, Jenkins R. Gliomas with 1p/19q codeletion: a. k. a. oligodendroglioma[J]. Cancer J, 2008, 14(6):352-357.
- [5] Aldape K, Burger PC, Perry A. Clinicopathologic aspects of 1p/19q loss and the diagnosis of oligodendroglioma[J]. Arch Pathol Lab Med, 2007, 131(2):242-251.
- [6] Li KK, Pang JC, Chung NY, et al. EMP3 overexpression is associated with oligodendroglial tumors retaining chromosome arms 1p and 19q[J]. Int J Cancer, 2007, 120(4):947-950.
- [7] Kouwenhoven MC, Gorlia T, Kros JM, et al. Molecular analysis of anaplastic oligodendroglial tumors in a prospective randomized study: A report from EORTC study 26951[J]. Neuro Oncol, 2009, 11(6):737-746.
- [8] Kaloshi G, Benouaich-Amiel A, Diakite F, et al. Temozolomide for low-grade gliomas: predictive impact of 1p/19q loss on response and outcome[J]. Neurology, 2007, 68(21):1831-1836.
- [9] Snuderl M, Eichler AF, Ligon KL, et al. Polysomy for chromosomes 1 and 19 predicts earlier recurrence in anaplastic oligodendrogliomas with concurrent 1p/19q loss[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(20):6430-6437.
- [10] Cairncross G, Berkey B, Shaw E, et al. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402[J]. Clin Oncol, 2006, 24(18):2707-2714.
- [11] Sabharwal A, Middleton MR. Exploiting the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) in cancer therapy[J]. Curr Opin Pharmacol, 2006, 6(4):355-363.
- [12] Gal-Yam EN, Saito Y, Egger G, et al. Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy[J]. Annu Rev Med, 2008, 59(1):267-280.
- [13] Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, et al. MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma[J]. Neuro Oncol, 2010, 12(2):116-121.
- [14] Lam N, Chambers CR. Temozolomide plus radiotherapy for glioblastoma in a Canadian province: efficacy versus effectiveness and the impact of O6-methylguanine-DNA-methyltransferase promoter methylation[J]. Oncol Pharm Pract, 2012, 18(2):229-238.
- [15] Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, et al. MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(13):2192-2197.
- [16] Omuro AM, Faivre S, Raymond E. Lessons learned in the development of targeted therapy for malignant gliomas[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(7):1909-1919.
- [17] McLendon RE, Turner K, Perkinson K, et al. Second messenger systems in human gliomas[J]. Arch Pathol Lab Med, 2007, 131(10):1585-1590.
- [18] 韩影, 刁文卓, 陈萍, 等. 脑胶质瘤中 VEGF, EGFR 表达意义研究[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(2):320-321.
- [19] Mott RT, Turner KC, Bigner DD, et al. Utility of EGFR and PTEN numerical aberrations in the evaluation of diffusely infiltrating astrocytomas. Laboratory investigation[J]. J Neurosurg, 2008, 108(2):330-335.
- [20] Lv S, Teugels E, Sadones J, et al. Correlation of EGFR, IDH1 and PTEN status with the outcome of patients with recurrent glioblastoma treated in a phase II clinical trial with the EGFR-blocking monoclonal antibody cetuximab[J]. Int J Oncol, 2012, 41(3):1029-1035.
- [21] Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme[J]. Science, 2008, 321(5897):1807-1812.
- [22] Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate[J]. Nature, 2009, 462(7274):739-744.
- [23] Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas[J]. N Engl J Med, 2009, 360(8):765-773.
- [24] Capper D, Weissert S, Balss J, et al. Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors[J]. Brain Pathol, 2010, 20(1):245-254.
- [25] Ha SY, Kang SY, Do IG, et al. Glioblastoma with oligodendroglial component represents a subgroup of glioblastoma with high prevalence of IDH1 mutation and association with younger age[J]. J Neurooncol, 2013, 112(3):439-448.

(收稿日期:2013-04-08)

• 综 述 •

## 复杂染色体重排

陈英剑<sup>1</sup>, 张海静<sup>2</sup>综述, 胡成进<sup>1△</sup>审校

(1. 济南军区总医院实验诊断科, 山东济南 250031; 2. 济南军区 71988 部队卫生队, 山东济南 250032)

**关键词:** 复杂染色体重排; 妊娠结局; 遗传咨询

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.18.037

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2013)18-2431-03

复杂染色体重排(CCR)是指涉及两条以上染色体、至少有三个断裂点的染色体结构重排。CCR 是非常罕见的事件,到 2011 年为止,国外仅有 255 例报告<sup>[1]</sup>,国内也不多<sup>[2]</sup>。尽管极

其罕见,由于 CCR 的携带者可有多种表现型,包括表型正常,男性不育和精神发育迟滞和/或先天性畸形,CCR 的临床诊断也非常重要。随着 FISH 等分子遗传学技术的应用,人类对