

• 基础研究 •

免疫组织化学法与 Sanger 测序法对 *IDH1* 基因突变检测的比较分析*吴小延, 刘小云, 邵琼, 龙亚康, 王芳, 李月[△]

510060 广州, 中山大学肿瘤防治中心, 华南肿瘤学国家重点实验室, 肿瘤医学协同创新中心

[摘要] 目的: 采用免疫组织化学法(immunohistochemistry, IHC)、Sanger 测序法分别对中枢神经系统肿瘤患者异柠檬酸脱氢酶 1(isocitrate dehydrogenase 1, *IDH1*) 基因进行突变检测, 并对结果的一致性进行分析, 为临床 *IDH1* 基因突变检测方法的选择提供指导依据。方法: 运用 IHC 和 Sanger 测序法检测 657 例人脑胶质瘤及其他中枢神经系统肿瘤中 *IDH1* 基因突变。结果: IHC 检测结果: 657 例样本中, 230 例发生 *IDH1* 基因突变, 49 例组织为少量阳、弱阳等可疑阳性; Sanger 测序法检测发现 255 例存在 *IDH1* 基因突变, 11 例因 DNA 质量不佳无法获得可评估结果。IHC 与 Sanger 测序法检测 *IDH1* 基因突变具有较好的一致性(Kappa = 0.88), 差异无统计学意义($P = 0.49$); *IDH1* 基因突变主要发生在 WHO II ~ III 级的星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤、间变星形细胞瘤、间变少突胶质细胞瘤以及 WHO IV 级的继发性胶质母细胞瘤中。结论: IHC 检测 *IDH1* 基因突变的结果与 Sanger 测序法检测结果具有较好的一致性, IHC 敏感性低于 Sanger 测序法, 但特异性较高, 且操作相对简单, 适于临床普遍开展和推广; Sanger 测序法敏感性高, 可检测未知突变位点, IHC 检测突变阴性及不确定的病例应进一步使用 Sanger 测序法验证。

[关键词] 脑肿瘤; 胶质瘤; *IDH1* 突变; 免疫组织化学法; Sanger 测序法

[中图分类号] R730.2 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2020.04.002

引文格式: Wu XY, Liu XY, Shao Q, et al. Comparative analysis of immunohistochemistry and Sanger sequencing for detection of *IDH1* gene mutations [J]. J Cancer Control Treat, 2020, 33(4): 291-299. [吴小延, 刘小云, 邵琼, 等. 免疫组织化学法与 Sanger 测序法对 *IDH1* 基因突变检测的比较分析[J]. 肿瘤预防与治疗, 2020, 33(4): 291-299.]

Comparative Analysis of Immunohistochemistry and Sanger Sequencing for Detection of *IDH1* Gene Mutations

Wu Xiaoyan, Liu Xiaoyun, Shao Qiong, Long Yakang, Wang Fang, Li Yue

State Key Laboratory of Oncology in South China, Collaborative Innovation Center for Cancer Medicine, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, Guangdong, China

Corresponding author: Li Yue, E-mail: liyue2@sysucc.org.cn

This study was supported by Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (NO. 2020A1515010098, NO. 2020A1515010314, NO. 2017A030310192) and by grants from Sun Yat-sen University (NO. 17ykpy84).

[Abstract] **Objective:** To analyze sensitivity and consistency of immunohistochemistry (IHC) and Sanger sequencing for detecting mutations in *IDH1* gene in patients with central nervous system tumors, and the consistency of the results, providing guidance for clinicians and pathologists to choose suitable methods for *IDH1* mutation detection. **Methods:** IHC and Sanger sequencing were separately performed to detect *IDH1* mutations in 657 cases of human gliomas and other central nervous system tumors. **Results:** IHC results showed that 230 out of 657 cases presented a definite positive staining pattern, while 49

cases presented an suspected positive staining pattern. Sanger sequencing results showed that *IDH1* mutations was identified in 255 cases, and that 11 samples could not be evaluated due to poor DNA quality. IHC was consistent with Sanger sequencing in *IDH1* mutation detection, and the difference is not significant (Kappa = 0.88, $P = 0.49$); *IDH1* mutations mainly

[收稿日期] 2020-01-03 **[修回日期]** 2020-02-14

[基金项目] * 广东省基础与应用基础研究基金(编号: 2020A1515010098, 2020A1515010314, 2017A030310192); 中山大学青年教师培育项目(编号: 17ykpy84)

[通讯作者] [△]李月, E-mail: liyue2@sysucc.org.cn

occurred in World Health Organization (WHO) II-III gliomas such as astrocytoma, oligodendroglioma, anaplastic astrocytoma, anaplastic oligodendroglioma and WHO IV secondary glioblastoma. **Conclusion:** IHC is consistent with Sanger sequencing in *IDH1* mutation detection. The former is less sensitive than the latter, but it is relatively easy to operate in most hospitals and laboratories. Sanger sequencing is able to detect unknown types of mutation, so it is suggested to further validate *IDH1* mutations when IHC results are uncertain.

[**Key words**] Brain neoplasm; Glioma; *IDH1* mutation; Immunohistochemistry; Sanger sequencing

恶性神经胶质瘤是起源于中枢神经系统的最常见的颅内恶性肿瘤,占颅脑肿瘤的 40% ~ 50%。胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 可分为原发性 GBM 和继发性 GBM。目前,胶质瘤的标准病理学诊断依据是世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 制定的分级系统,即根据组织学形态和分子检测结果将其分为 I ~ IV 级^[1]。*IDH1* 基因突变是 2008 年 Parsons 等^[2]首次在胶质瘤中发现,并且被各国学者证实为影响胶质瘤预后的重要标志^[3]。大量临床胶质瘤的病例-对照研究发现,*IDH1* 基因突变好发于超过 75% 的低级别胶质瘤 (WHO II ~ III 级) 和 90% 的继发性高级别胶质细胞瘤^[4]。因此,*IDH1* 基因突变被认为是胶质瘤发生的早期事件,可能是胶质瘤发生的驱动因子,对胶质瘤的发生和发展具有重要影响^[5]。现在普遍认为 *IDH1* 突变是初级胶质瘤和 sGBM 的确定性分子标志物^[6]。超过 90% 的 *IDH1* 突变发生于 4 号外显子上第 132 位氨基酸碱基序列 (CGT 突变为 CAT),导致其编码的氨基酸由精氨酸突变为组氨酸 (R132H)。常规组织病理学在胶质瘤的分型方面具有一定的局限性,而近期研究发现 *IDH1* 突变状态可辅助病理及临床医师对胶质瘤进行更加精准的诊断分型^[2]。目前,临床常用的 *IDH1* 突变检测方法主要为免疫组织化学法 (immunohistochemistry, IHC) 和 Sanger 测序法,然而对于二者检测 *IDH1* 基因突变一致性的比较分析鲜有报道,方法选择策略尚待明确。

本研究中,我们回顾性地收集了 657 份胶质瘤患者肿瘤样本,同时利用 Leica 全自动免疫组化系统与 Sanger 测序法检测 *IDH1* 基因突变,评估两种检测技术的检测效能及一致性,为临床及病理医生在 *IDH1* 突变不同检测方法的选择上提供指导依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集 2014 年至 2019 年中山大学肿瘤防治中心手术切除且经病理确诊为胶质瘤及其它神经上皮性肿瘤标本 657 例,其中男性 371 例,女性 285 例,平均年龄 (40.5 ± 17.5) 岁,范围 (1 ~ 81 岁)。病理分级依据 2007 年版 WHO 中枢神经系统肿瘤病理分

级标准: I 级 54 例 (毛细胞星形细胞瘤 50 例、室管膜下瘤 2 例、胚胎发育不良性神经上皮肿瘤 1 例、室管膜下巨细胞星形细胞瘤 1 例), II 级 192 例 (星形细胞瘤 119 例、少突胶质细胞瘤 50 例、室管膜瘤 8 例、少突星形细胞瘤 4 例、多形性黄色星形细胞瘤 4 例、节细胞胶质瘤 4 例、中枢神经细胞瘤 2 例、脑室外神经细胞瘤 1 例), III 级 118 例 (间变型星形细胞瘤 59 例、间变型少突胶质细胞瘤 33 例、间变型室管膜瘤 15 例、间变型少突星形细胞瘤 5 例、间变型毛细胞型星形细胞瘤 2 例、节细胞胶质瘤 1 例、间变型多形性黄色星形细胞瘤 1 例、乳头状脑膜瘤 1 例、间变型节细胞胶质瘤 1 例), IV 级 293 例 (原发性胶质母细胞瘤 248 例、继发性胶质母细胞瘤 18 例、弥漫中线胶质瘤 15 例、组织类型未明胶质瘤 6 例、胶质肉瘤 4 例、非典型畸胎样/横纹肌样肿瘤 1 例、髓母细胞瘤 1 例)。

1.2 IHC

常规石蜡包埋组织切片,厚 3 ~ 4 μm,65℃ 烤片 1h。使用 *IDH1*-R132H 即用型鼠抗人单克隆抗体 (福州迈新生物技术开发有限公司),采用 Leica 全自动免疫组化仪 (Leica Microsystems Nussloch GmbH) 进行检测。阳性判读标准: ≥ 10% 的肿瘤细胞浆内有棕黄色或棕褐色颗粒。

1.3 Sanger 测序法

常规石蜡包埋组织切片,根据 HE 染色结果,富集肿瘤细胞区域 (大于 60%) 并按试剂盒说明书进行组织 DNA 提取 (FFPE DNA Kit 试剂盒, QIAGEN 公司)。*IDH1* 基因 4 号外显子扩增引物由上海英潍捷基公司合成, *IDH1* 正向引物 F: 5'-TGCCAC-CAACGACCAAGTCA-3'; 反向引物 R: 5'-CCCTTGCT-TAATGGGTGTA-3', 扩增产物长度为 290 bp。配置 25 μL PCR 反应体系: DNA 模板 5 μL, *IDH1* 引物上下游使用液各 (10 μM) 1 μL, 2 × Premix EX Tap™ 12.5 μL, 去离子水 5.5 μL。PCR 反应条件为 94℃ 5 min; 94℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 30s, 共 32 个循环; 72℃ 5 min, 4℃ 保温。使用 ABI3500XL 型测序分析仪进行双向测序,使用 Chromas 软件分析测序结果,根据碱基信号峰图判定是否存在突变。

1.4 统计学分析

应用 R 语言软件进行统计学分析, IHC 与 Sanger 测序法的差异及一致性比较采用配对 χ^2 检验及 Kappa 一致性检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; $Kappa \geq 0.75$ 两者一致性较好, $0.4 \leq Kappa < 0.75$ 两者一致性中等, $Kappa < 0.4$ 两者一致性较差^[7]。

2 结果

2.1 IHC 检测 IDH1 基因突变

IDH1 R132H 阳性主要分布于细胞浆(图 1)。本研究结果显示, 35.0% (230/657) 标本可见 IDH1 R132H 蛋白表达(表 1)。另有 49 例标本检测结果为少量阳、弱阳等可疑阳性, 经 Sanger 测序进一步验证, 其中 23 例为阳性, 26 例为阴性。

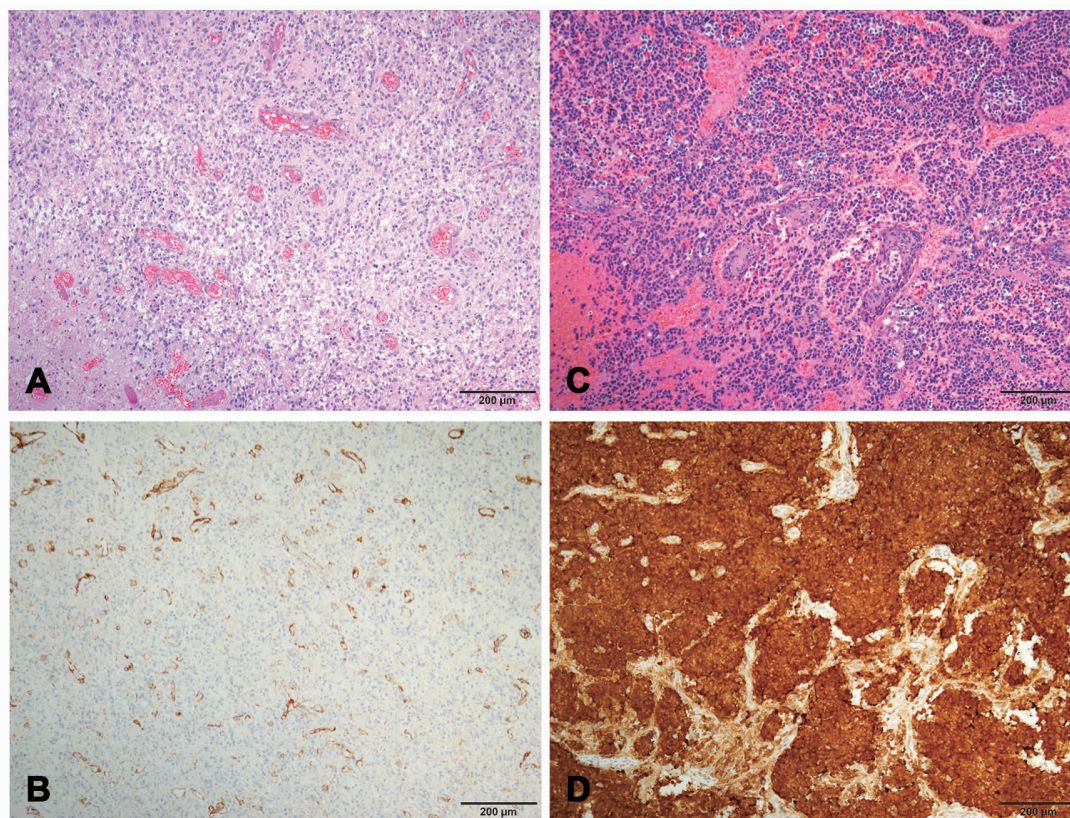


图 1 胶质细胞瘤形态学 HE 染色及相应的 IDH1 R132H 表达 ($\times 100$)

Figure 1. HE Staining and Corresponding IDH1 R132H Expression of Gliomas ($\times 100$)

Panel A and B show morphology of IDH1 wild-type glioma by HE staining and negative results of IDH1 R132H by IHC staining; Panel C and D show morphology of IDH1-mutant glioma by HE staining and positive results of IDH1 R132H by IHC staining. HE: hematoxylin eosin.

2.2 Sanger 测序法检测 IDH1 基因突变

在胶质瘤中, IDH1 基因最常见突变位点为 4 号外显子第 132 位密码子的错义突变 (CGT > CAT, R132H)。本研究 657 例样本中, 38.8% (255/657) 检测出 IDH1 R132 基因点突变(表 1), 其中 R132H 突变 251 例 (98.4%), R132G (132 位精氨酸突变为甘氨酸) 突变 2 例 (0.8%), R132C (132 位精氨酸突变为半胱氨酸) 及 R132S (132 位精氨酸突变为丝氨酸) 各 1 例 (0.4%) (图 2, 3, 表 2)。此外, 11 例样本经 Sanger 测序检测失败进一步行 IHC 检测, 结果显示其中 7 例阴性, 3 例为阳性, 1 例组织掉片无法检测。

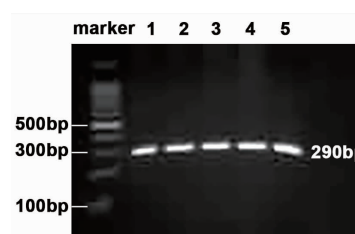


图 2 琼脂糖凝胶电泳结果

Figure 2. Results of Agarose Gel Electrophoresis

Agarose gel electrophoresis shows that PCR amplification products of IDH1 are 290 bp in length. Marker 1 - 5 are five randomly selected samples of IDH1 mutation. PCR: Polymerase chain reaction.

表 1 IHC 与 Sanger 测序法检测结果比较

Table 1. Results of IHC and Sanger Sequencing

Pathological type	WHO grade	N	IHC	Sanger sequencing
			Positive (%)	Mutation (%)
Pilocytic astrocytoma	I	50	1 (2)	0 (0)
Subependymoma	I	2	0 (0)	0 (0)
Embryogenic dysplastic neuroepithelial neoplasm	I	1	0 (0)	0 (0)
Subependymal giant cell astrocytoma	I	1	0 (0)	0 (0)
Total (I)	I	54	1 (1. 9)	0 (0)
Astrocytoma	II	119	72 (60. 5)	85 (71. 4)
Oligodendroglioma	II	50	42 (84)	44 (88)
Ependymoma	II	8	0 (0)	0 (0)
Oligoastrocytoma	II	4	2 (50)	2 (50)
Pleomorphic xanthoastrocytoma	II	4	0 (0)	1 (25)
Ganglioglioma	II	4	1 (25)	2 (50)
Central neurocytoma	II	2	0 (0)	0 (0)
Extraventricular neurocytoma	II	1	0 (0)	0 (0)
Total (II)	II	192	117 (60. 9)	134 (69. 3)
Anaplastic oligodendroglioma	III	59	33 (55. 9)	36 (61. 0)
Anaplastic ependymoma	III	33	27 (81. 8)	27 (81. 8)
Anaplastic ependymoma	III	15	0 (0)	0 (0)
Anaplastic oligoastrocytoma	III	5	5 (100)	5 (100)
Anaplastic pilocytic astrocytoma	III	2	0 (0)	0 (0)
Ganglioglioma	III	1	0 (0)	0 (0)
Anaplastic Pleomorphic xanthoastrocytoma	III	1	0 (0)	0 (0)
Papillary meningioma	III	1	0 (0)	0 (0)
Anaplastic ganglioglioma	III	1	1 (100)	1 (100)
Total (III)	III	118	66 (55. 9)	69 (58. 5)
Primary GBM	IV	248	34 (13. 7)	38 (15. 3)
Secondary GBM	IV	18	11 (61. 1)	12 (66. 7)
Diffuse midline glioma	IV	15	0 (0)	0 (0)
Gliosarcoma	IV	4	0 (0)	0 (0)
Atypical teratoid/rhabdoid tumor	IV	1	0 (0)	0 (0)
Medulloblastoma	IV	1	0 (0)	0 (0)
Uncertain	IV	6	1 (16. 7)	2 (33. 3)
Total (IV)	IV	293	46 (15. 7)	52 (17. 7)
Total (I – IV)		657	230 (35. 0)	255 (38. 8)

IHC: Immunohistochemistry; WHO: World Health Organization.

表 2 255 例脑胶质瘤中 *IDH1* 突变位点分布Table 2. Distribution of *IDH1* Mutations in 255 Cases of Glioma

Mutation site	Amino acid change	N	Mutation rate (%)
G395A	R132H	251	98. 4
C394T	R132C	1	0. 4
C394G	R132G	2	0. 8
C394A	R132S	1	0. 4

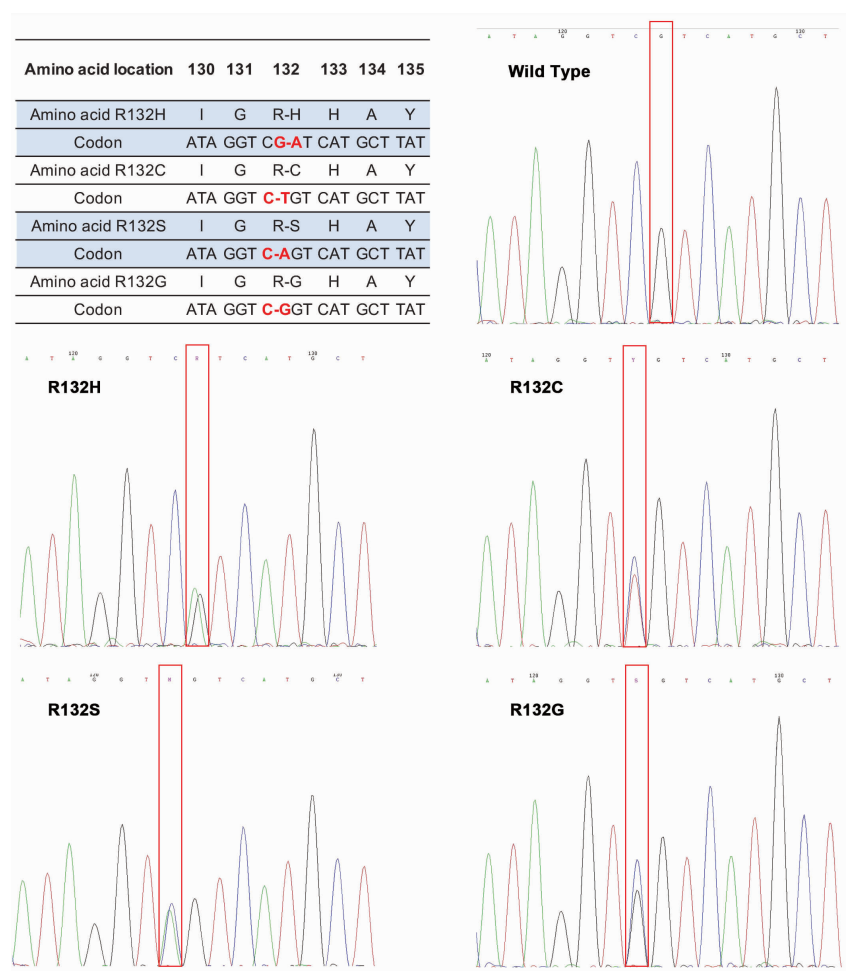


图3 IDH1 野生型和 IDH1 突变型的 Sanger 测序结果
Figure 3. Sanger Sequencing Results of Wild-Type and Mutated IDH1

2.3 IHC 与 Sanger 测序法检测结果比较

本研究共纳入 657 例标本,其中 49 例 IHC 结果可疑、11 例 Sanger 测序失败,共有 597 例标本同时完成 IHC 及 Sanger 测序检测。其中,94.5% (564/597) 检测结果一致,仅有 5.5% (33/597) 两种方法检测结果存在差异。两者检测结果通过配对 χ^2 检验比较,差异无统计学意义 ($P = 0.49$, 表 3); 通过 Kappa 一致性检验分析,两种检测方法的结果具有较好的一致性 ($Kappa = 0.88$)。

表 3 IHC 和 Sanger 测序法检测结果的配对 χ^2 检验分析
Table 3. McNemar-Bowker Test for Results of IHC and Sanger Sequencing

IHC	Sanger sequencing		Total
	Positive	Negative	
Positive	213	14	227
Negative	19	351	370
Total	232	365	597

IHC: Immunohistochemistry.

两种检测方法不一致的 33 例标本中,14 例 IHC 检测为阳性而 Sanger 测序为阴性,19 例 IHC 检测为

阴性而 Sanger 测序为阳性。

2.4 高通量测序法验证 IHC 和 Sanger 测序不一致标本

本研究中,共有 33 例样本经两种方法检测后结果不一致,我们对其中 11 例进行高通量测序验证,其余 22 例因核酸质量不足而无法进行进一步验证。结果发现,6 例原本是 IHC 阳性、Sanger 测序阴性的标本,高通量测序结果为 5 例阳性,1 例阴性;5 例原本是 Sanger 测序阳性、IHC 阴性的标本,高通量测序结果全部为阳性(图 4,表 4)。

表 4 高通量测序法验证 IHC 和 Sanger 测序结果不一致标本
Table 4. High-Throughput Sequencing Verifying Specimens with Inconsistent Results Detected by IHC and Sanger Sequencing

IDH1	NGS +	NGS -	Total
IHC + Sanger -	5	1	6
IHC-Sanger +	5	0	5

NGS: Next-generation sequencing; IHC: Immunohistochemistry; Sanger: Sanger sequencing.

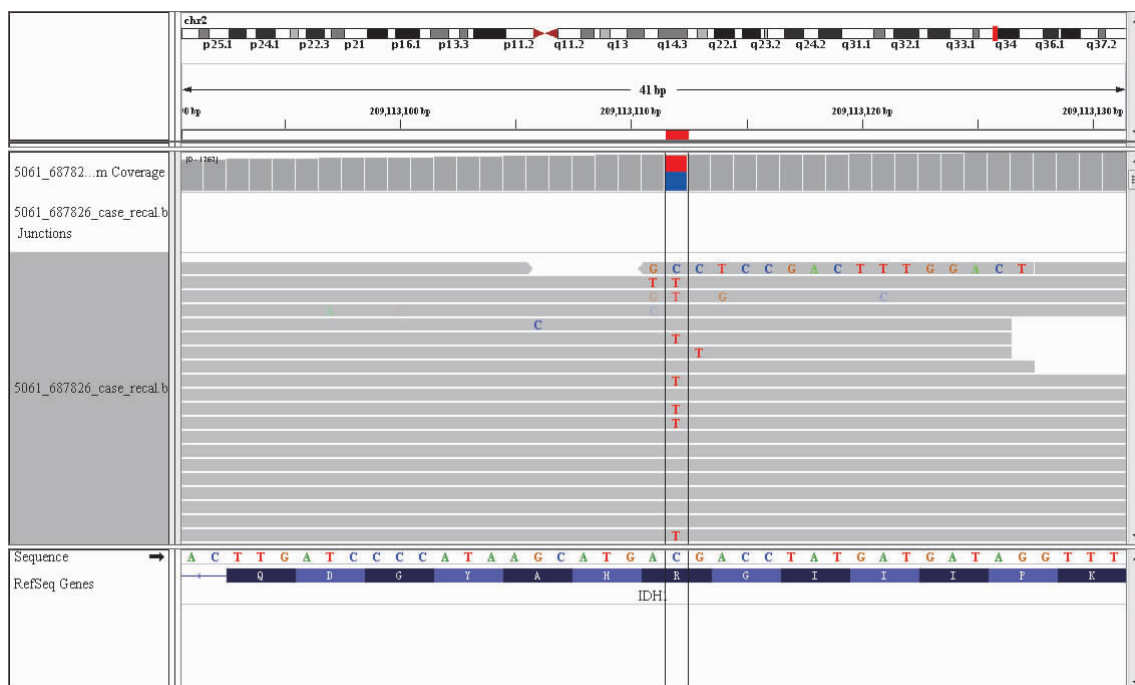


图 4 IDH1 R132H 突变型的高通量测序结果

Figure 4. Results of IDH1 R132H Mutations Detected by High-Throughput Sequencing

2.5 原发性与继发性胶质母细胞瘤比较

266 例 IV 级胶质母细胞瘤中,248 例为原发性,18 例为继发性。检测结果显示,继发性胶质母细胞瘤 IDH1 基因突变阳性率明显高于原发性胶质母细胞瘤 ($P = 0.025$, 表 5)。继发性胶质母细胞瘤中 IDH1 基因突变阳性率在 IHC 和 Sanger 测序中分别为 61.1% 和 66.7%,原发性胶质母细胞瘤阳性率分别为 13.7% 和 15.3%。

表 5 原发性 GBM 和继发性 GBM IDH1 基因突变率结果的比较

Table 5. IDH1 Mutation Rates of Primary and Secondary GBM

Pathological type	N	Number of positive cases (%)	
		IHC	Sanger sequencing
Primary GBM	248	34 (13.7)	38 (15.3)
Secondary GBM	18	11 (61.1)	12 (66.7)

GBM: Glioblastoma; IHC: Immunohistochemistry.

3 讨论

位于染色体 2q33 上的 IDH1 基因,编码异柠檬酸脱氢酶,其作用是催化异柠檬酸氧化为草酰琥珀酸,然后转化为 α -酮戊二酸,导致烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 的产生。在人类基因组中编码的 5 种异柠檬酸脱氢酶蛋白中,至少有 3 种位于线粒体中,而 IDH1 位于细胞质和过氧化物酶体内^[8]。

IDH1 蛋白酶形成一个非对称性同源二聚体,是细胞三羧酸循环中重要的限速酶^[9],并被认为是通过产生 NADPH 在细胞控制氧化损伤中发挥重要作用,而 IDH2 与 IDH3 主要参与细胞的能量代谢^[10]。早期研究发现 IDH1 的突变与脑胶质瘤密切相关^[2,11],之后又发现其与前列腺癌、副神经节瘤、大肠癌、胆管癌、软骨肉瘤以及急性髓细胞白血病相关^[12]。其致病机制为突变的 IDH 能将 α -酮戊二酸转化为 2-羟戊二酸,且后者可以抑制前者的靶点,导致这些靶点表达异常而引发癌症。最新的研究发现,在肝内胆管细胞癌中,也有 IDH1 突变^[13]。随着研究的不断深入,越来越多的研究证实, IDH1 基因突变与胶质瘤的发生、发展有着重要关系^[14]。

IDH1 在胶质瘤中突变类型均是碱基错义突变导致单个氨基酸替换,且突变均发生于与异柠檬酸盐结合部位的进化保守区域。本研究发现,90% 以上的突变类型是 R132H,密码子由 CGT 突变为 CAT,与之前文献报道一致^[15]。其它位点可偶见报道, Hartmann 等^[16]研究表明非 R132H 突变类型发生率低于 5%。本研究结果与既往报道结果相似^[17-18], Sanger 测序法仅检测到 4 例 (1.6%) R132H 以外的点突变类型,分别为 2 例 R132G、1 例 R132C 及 1 例 R132S。本研究显示,这些稀有突变分布在不同的胶质瘤亚型中:2 例 R132G 分别发现于星形细胞瘤和胶质母细胞瘤;1 例 R132C 发现于间变型星形细胞瘤;1 例 R132S 发现于间变型星形细胞瘤,

但因例数过少,无法分析少见 *IDH1* 突变类型与组织学分型之间是否存在联系,但是有文章发现这些少见突变类型的发生可能有谱系偏爱性^[19]。关于这些少见突变是否具有与 R132H 突变同等重要的鉴别诊断意义及判读预后价值,尚需更加深入的研究。

我们通过两种方法进行 *IDH1* 突变状况的分类,结果显示,不同组织病理分型中突变阳性率存在一定的差异性,在 54 例 I 级胶质瘤中,仅有 1 例毛细胞型星形细胞瘤可见 *IDH1* 基因突变,其发生机制可能与其他低级别胶质瘤不同^[20]。另一方面,也提示我们对于低级别星形细胞瘤,当组织病理学诊断不明确,无法区分弥漫性星形细胞瘤和毛细胞型星形细胞瘤时,可通过 *IDH1* 基因突变检测加以鉴别,以便给患者带来最适合的治疗方案,取得最好的治疗效果^[21]。本研究中,两种检测方法的结果显示,*IDH1* 基因突变阳性率在 II ~ III 级的星形细胞瘤和少突胶质细胞瘤中及 IV 级继发性 GBM 中较高,而在原发性 GBM 中 *IDH1* 基因突变阳性率较低(约 15%)(表 1),原发性 GBM 中 *IDH1* 基因突变率与国内外文献报道基本一致(11.39% ~ 17.64%)^[21-29]。以往的研究表明,继发性与原发性 GBM 发病机制有所不同,原发性 GBM 病变迅速出现,恶性前体病变的临床证据比较少,而继发性 GBM 从低级别的神经胶质瘤发展而来^[30]。WHO II 级中少突星形细胞瘤突变率为 50% (2/4)、4 例多形性黄色星形细胞瘤突变率为 25% (1/4)、4 例节细胞胶质瘤突变率为 50% (2/4),其他间变型室管膜瘤、间变型毛细胞型星形细胞瘤、间变型多形性黄色星形细胞瘤等其他类型肿瘤中均未发现 *IDH1* 基因突变。WHO III 级中 5 例间变型少突星形细胞瘤和 1 例间变型节细胞胶质瘤均可见突变;以上研究说明 *IDH1* 突变频繁发生于一些特定类型的胶质瘤,特别是星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤及继发性胶质母细胞瘤中,而在室管膜瘤、髓母细胞瘤等其他胶质瘤中罕见发生^[31]。

本研究发现,IHC 与 Sanger 测序法检测 *IDH1* 基因突变结果具有较好的一致性($Kappa = 0.88$)。Sanger 测序法是目前测定 *IDH1* 突变的最常用方法,可检测具体的突变位点,但操作较为繁琐,对实验室环境设备及技术员操作技能要求高。来源于肿瘤周围正常脑组织及淋巴细胞的 DNA 可能将低丰度的突变序列稀释,导致其低于检测阈值而呈现假阴性结果。另外,Sanger 测序法敏感性较低,需要至少 20% 突变的等位基因才能得出准确的结果^[32]。IHC

法操作简单,绝大多数病理实验室均可以开展,无论手工还是自动化仪器均可获得较为满意的结果,但有时免疫组化仪染色可能出现背景偏深或局灶少量染色难以明确判读,给病理医师的诊断分型带来困难,甚至产生假阳性结果。本研究中,有 49 例 IHC 结果为弱阳性、少量阳性及不确定等难以明确分类的样本,经 Sanger 测序均得到了明确的判读结果,即 23 例为突变型,26 例为野生型。由此可见,对于 IHC 结果可疑或无法判读的样本,进一步进行 Sanger 测序检测有助于明确结果,为临床和病理医师提供更多诊断依据。

本研究中有 14 例 IHC 检测阳性,但 Sanger 测序检测为阴性的病例,Sanger 测序假阴性的结果可能与肿瘤细胞含量较低有关。值得注意的是,4 例为 R132H 以外的少见突变位点阳性的样本(1 例 R132C 突变、2 例 R132G 突变及 1 例 R132S 突变)均为 Sanger 测序检测阳性,但 IHC 为阴性。这是因为 IHC 所用抗体主要针对 R132H 位点突变设计,并不适用于其他类型的突变,这会导致少见突变位点漏诊的情况发生。而 Sanger 测序法则不受此局限,因为它可明确读出目标区域的碱基序列,所以无论是已知突变位点还是未知突变位点都可以检测到。由于常规组织病理在胶质瘤诊断分型方面具有一定的局限性,*IDH1-R132* 基因位点突变检测的辅助诊断价值日益凸显。高通量测序法的验证结果显示,分子病理诊断应用于临床的重要性,而分子标志物对肿瘤分类、预后判断和进展预测都有重要意义。2016 年新版《WHO 中枢神经系统肿瘤分类》认为组织学与分子病理分类结果存在分歧时首先考虑分子病理诊断,然而组织学分型十分重要,不能单独依据分子病理结果对中枢神经系统肿瘤分类。中枢神经系统 WHO 肿瘤分级依然按照组织学标准进行^[33]。所以在临床实践中,应根据实际情况选择检测方法,必要时 IHC 与 Sanger 测序应互为补充,以获得更加精准的检测结果。

基于 *IDH1* 基因突变对胶质瘤具有重要的生物学意义和治疗价值,目前靶向 *IDH1* 基因突变的药物研发成为医药界的研究热点。例如,小分子化合物 AGI-5198 和 AGI-6780、针对包含 *IDH1* R132H 氨基酸 123 ~ 142 的多肽疫苗以及能激活 CD8 + T 细胞的 *IDH1* R132H 的多肽疫苗^[34-37]。近年来,有研究发现周细胞也可以作为胶质瘤潜在的治疗靶点^[38]。

综上所述,*IDH1* 突变主要发生在 WHO II、III 和

IV 级的星形细胞、少突胶质细胞以及继发性胶质母细胞瘤中。IHC 和 Sanger 测序法检测 *IDH1* 基因突变的结果具有较高的一致性,两种平台方法都比较成熟,基本上能够满足临床检测需求。目前尚无一种突变检测方法可以完全避免假阴性或者假阳性而完全准确地检测出基因变异结果,各有优势和不足:免疫组化染色简单、快捷、检测费用相对较低且结果稳定,但有时全自动免疫组化仪染色结果背景偏深,易出现判读困难和假阳性现象;Sanger 测序可检测已知和未知突变位点,有降低假阴性结果的产生的优势,但 Sanger 测序耗时长,检测费用高,对实验室环境要求高。在临床实践中,如有必要应结合多种检测方法以得到准确的结果,以更快地辅助病理诊断及临床治疗,也为抗胶质瘤药物的研发提供参考。

作者声明:本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

学术不端:本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

同行评议:经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

文章版权:本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

[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] Parsons DW, Jones S, Zhang XS, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme[J]. *Science*, 2008, 321(5897):1807-1812.
- [3] Polivka J, Rohan V, Pesta M, et al. Isocitrate dehydrogenase-1 mutations as prognostic biomarker in glioblastoma multiforme patients in West Bohemia[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:7356-7359.
- [4] 高艳, 邓文斌, 龚文容, 等. 脑胶质瘤中异柠檬酸脱氢酶突变的研究进展[J]. *肿瘤*, 2016, 36(1):110-115.
- [5] Turkalp Z, Karamchandani J, Das S. IDH mutation in glioma: New insights and promises for the future[J]. *JAMA Neurol*, 2014, 71(10):1319-1325.
- [6] Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(4):764-772.
- [7] 夏邦世, 吴金华. Kappa 一致性检验在检验医学研究中的应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2006, 29(1):83-84.
- [8] 刘晋发, 朱文标, 谢寿城, 等. 异柠檬酸脱氢酶 1 在大脑胶质瘤组织中表达的意义[J]. *肿瘤基础与临床*, 2018, 31(4):295-297.
- [9] 王振, 许在华, 孙靖驰, 等. IDH1 基因突变及 MGMT 基因启动子甲基化在胶质瘤中的临床意义[J]. *肿瘤学杂志*, 2018, 24(11):1118-1121.
- [10] Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas[J]. *Neuro Oncol*, 2016, 18(1):16-26.
- [11] Jo SH, Son MK, Koh HJ, et al. Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(19):16168-16176.
- [12] Ye D, Ma S, Xiong Y, et al. R-2-hydroxyglutarate as the key effector of IDH mutations promoting oncogenesis[J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(3):274-276.
- [13] 贾潘丽, 邝新红, 伍瑶, 等. IDH 基因突变与肿瘤关系的研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(22):207-210.
- [14] Alderton GK. Metastasis: Directions to metastatic sites[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(12):696-697.
- [15] 刘千琪, 尹晓雪, 邹艳, 等. 弥漫浸润性胶质肿瘤中 TERT 和 IDH 突变联合分析的预后价值[J]. *中华病理学杂志*, 2018, 47(9):658-663.
- [16] Hartmann C, Meyer J, Balss J, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: A study of 1,010 diffuse gliomas[J]. *Acta Neuropathol*, 2009, 118(4):469-474.
- [17] 王君祥, 褚荣涛, 周幽心, 等. IDH1R132H 抗体在测定人脑胶质瘤中 IDH1 突变的意义[J]. *临床神经外科杂志*, 2012, 9(5):262-265.
- [18] 潘怡, 齐雪岭, 王雷明, 等. 胶质瘤患者异柠檬酸脱氢酶基因突变分析[J]. *中华病理学杂志*, 2013, 42(5):292-298.
- [19] Lu VM, McDonald KL. Isocitrate dehydrogenase 1 mutation subtypes at site 132 and their translational potential in glioma[J]. *CNS Oncol*, 2018, 7(1):41-50.
- [20] Jones DTW, Kocalkowski S, Liu L, et al. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(21):8673-8677.
- [21] Reuss DE, Sahm F, Schrimpf D, et al. ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an "integrated" diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma[J]. *Acta Neuropathol*, 2015, 129(1):133-146.
- [22] 杨燕武, 谢飞, 汤俊佳, 等. IDH1 基因突变对胶质瘤诊断及预后意义[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2012, 12(6):712-718.
- [23] Saeed MS. IDH1 mutation in gliomas in Mosul City-Iraq[J]. *Open Access Macedonian J Med Sci*, 2015, 3(2):250-255.
- [24] Arita H, Narita Y, Yoshida A, et al. IDH1/2 mutation detection in gliomas[J]. *Brain Tumor Pathol*, 2015, 32(2):79-89.
- [25] Wang J, Zhao YY, Li JF, et al. IDH1 mutation detection by droplet digital PCR in glioma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(37):

- 39651-39660.
- [26] Perrech M, Dreher L, Röhn G, et al. Qualitative and quantitative analysis of IDH1 mutation in progressive gliomas by allele-specific qPCR and western blot analysis[J]. Technol Cancer Res Treat, 2019, 18 :1533033819828396.
- [27] Deng L, Xiong P, Luo Y, et al. Association between IDH1/2 mutations and brain glioma grade[J]. Oncol Lett, 2018, 16(4) : 5405-5409.
- [28] 王川, 高峰, 董军, 等. 不同病理类型及分级胶质瘤细胞 IDH1 基因突变临床探究[J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(74) : 14483-14484, 14486.
- [29] Greene-Schloesser D, Moore E, Robbins ME. Molecular pathways: Radiation-induced cognitive impairment[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(9) : 2294-2300.
- [30] 谭春雷, 苏君, 金华, 等. IDH1 基因突变在胶质瘤中的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(13) : 2554-2557.
- [31] Gravendeel LAM, Kloosterhof NK, Bralten LBC, et al. Segregation of non-p. R132H mutations in IDH1 in distinct molecular subtypes of glioma[J]. Hum Mutat, 2010, 31(3) : E1186-E1199.
- [32] 赵焕英, 方霄, 李慎涛, 等. 免疫组化和直接测序以及焦磷酸测序对 IDH1 突变的比较研究[J]. 实验技术与管理, 2019, 278(10) : 73-76.
- [33] 杜伟. 2016 版《WHO 中枢神经系统肿瘤分类》更新解读[J]. 中华神经外科杂志, 2016, 32(11) : 1095-1098.
- [34] Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N, et al. An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells[J]. Science, 2013, 340(6132) : 626-630.
- [35] Wang F, Travins J, DeLaBarre B, et al. Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation[J]. Science, 2013, 340(6132) : 622-626.
- [36] Schumacher T, Bunse L, Pusch S, et al. A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity[J]. Nature, 2014, 512(7514) : 324-327.
- [37] Pellegatta S, Valletta L, Corbetta C, et al. Effective immuno-targeting of the IDH1 mutation R132H in a murine model of intracranial glioma[J]. Acta Neuropathol Commun, 2015, 3(1) : 4.
- [38] 李育平, 朱磊, 王杏东, 等. 周细胞作为胶质瘤潜在治疗靶点研究进展[J]. 肿瘤预防与治疗, 2018, 31(4) : 294-297.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《肿瘤预防与治疗》2021 年征订启事

《肿瘤预防与治疗》系《中国科技论文统计源期刊》(即《中国科技核心期刊》), CN51 - 1703/R, ISSN1674 - 0904, 大 16 开, 月刊, 每月 25 日出版。

本刊主要报道国内外肿瘤防治研究领域的新成果、新进展。开设栏目有专家述评、国际交流、应用基础研究、临床研究、临床经验与技术交流、肿瘤流行病学、综述与讲座、短篇与个案报道等。所征稿件内容: 肿瘤流行病学、基础研究、肿瘤病理、临床研究、临床诊治经验、病例报告、国外研究动态等。

敬请读者及作者踊跃投稿, 欢迎订阅, 每期定价 15.00 元, 全年订价 180.00 元。需订阅者请到当地邮局订阅, 邮发代号 62 - 142, 错过订阅时间可直接向编辑部订阅, 款汇至成都市武侯区人民南路四段 55 号《肿瘤预防与治疗》编辑部。

邮编: 610041; 电话: 028 - 85420233

E-mail: zlyfyzl@163.com; 网址: www.zlyfyzl.cn

欢迎订阅, 欢迎使用网上投稿。

本刊编辑部