

文章编号:1005-6947(2006)02-0121-04

· 实验研究 ·

原癌基因 c-kit 突变在胃肠道基质瘤临床预后中的意义

王东杰¹, 毕建威¹, 马大烈²

(第二军医大学附属长海医院 1. 普外一科 2. 病理科, 上海 200433)

摘要:目的 探讨 c-kit 基因突变对胃肠道基质瘤(GIST)的发病及在临床病理和预后中的意义。方法 采用聚合酶链反应单链构象多态性技术(PCR-SSCP)方法检测 106 例 GIST 中 c-kit 基因突变的情况,并对其中的 57 例进行临床随访。结果 全组基因突变率为 45.3% (48/106);良性 GIST c-kit 基因突变率为 4.9% (2/41),恶性 GIST c-kit 基因突变率为 70.8% (46/65),c-kit 基因突变阳性组的 1,3,5 年生存率及中位生存期均明显低于突变阴性组。对肿瘤大小、肿瘤性坏死、浸润程度、核分裂象计数、核异型性等指标的比较,突变阳性组和阴性组均存在显著差异($P < 0.005$),邻近组织的侵袭及肿瘤的转移、复发的发生率突变阳性组均明显高于突变阴性组。结论 c-kit 基因突变在 GIST 的发生发展中可能发挥着重要作用,可以作为判断 GIST 患者临床预后的一个重要指标。

关键词: 胃肠肿瘤/诊断; 基质瘤/诊断; 预后; 突变; 癌基因 c-kit

中图分类号: R735; R730.262

文献标识码: A

Significance of the mutation of c-kit gene in the clinical prognosis of gastrointestinal stromal tumor

WANG Dong-jie¹, BI Jian-wei¹, MA Da-lie²

(1. the First Department of General Surgery, 2. Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To investigate the significance of the mutation of c-kit gene in the development, clinical pathology and prognosis of gastrointestinal stromal tumors (GISTs). **Methods** The technique of PCR-SSCP was used to detect c-kit gene mutation in 106 cases of GIST, and 57 of the cases were followed-up. **Results** The c-kit gene mutation rate in the whole group was 45.3% (48/106), and 3.4% (2/41) in benign GIST, and 70.8% (46/65) in malignant GIST. The 1-, 3 and 5-year survival rates and median survival time of the mutation positive group were all markedly lower than those of the mutation negative group. A comparison of the parameters that can differentiate the benign GISTs from malignant ones such as size, histological necrosis, aggressive grade, nucleus mitotic count and nuclear discrepancy, showed significant difference between the of positive and negative gene mutation ($P < 0.005$), and the occurrence rates of tumor invasion into neighboring structures, metastasis and recurrence in mutation positive group were all obviously higher than those in mutation negative group. **Conclusions** Mutation of c-kit can play an important role in the occurrence and development of GIST, and it may be an important marker to predict the clinical prognosis of GIST patients.

Key words: Gastrointestinal Neoplasms/diag; Stromal Tumor/diag; Prognosis; Mutation; Oncogenes c-kit

CLC number: R735; R730.262

Document code: A

收稿日期:2005-01-11; 修订日期:2006-01-20。

作者简介:王东杰,男,浙江宁波人,第二军医大学附属长海医院主治医师,主要从事胃肠道肿瘤方面的研究。

通讯作者:王东杰 E-mail:55024@wbip.net。

胃肠道基质瘤 (gastrointestinal stromal tumor, GIST) 是胃肠道最常见的间叶源性肿瘤, 组织学评估是诊断和预后判断的标准手段, 但组织学分级并不能完全反映该肿瘤的生物学行为, 有时组织学良性的肿瘤临床可表现为恶性。近年来的大量研究表明^[1-2], GIST 的发生、发展与 c-kit 基因突变有着密切的关系。为此笔者对 GIST 中的 c-kit 基因突变进行了检测, 并通过临床调查及随访对其在 GIST 临床病理和预后中的意义进行探讨。

1 材料与方 法

1.1 临床一般资料

收集长海医院 1995—2002 年 106 例病理诊断明确的 GIST 病理标本和临床资料。本组患者年龄 17~76 岁, 中位年龄 47.2 岁; 男女比例为 68:38。肿瘤位于胃 65 例, 十二指肠 10 例, 小肠 19 例, 直肠 8 例, 肠系膜、网膜各 1 例, 腹膜后 2 例。106 例均行手术治疗。按 Lewin 分级标准, 其中 65 例为恶性肿瘤, (37 例侵及黏膜肌层或浆膜层, 9 例复发, 15 例有转移, 10 例再次手术), 41 例为良性 (有 3 例侵及黏膜肌层或浆膜层, 复发 2 例, 转移 1 例, 再次手术 1 例)。全部病例中 57 例获随访, 随访率为 53.8%。随访时间 3 个月至 9 年, 中位随访时间 5 年。

1.2 PCR-SSCP 检测 c-kit 基因突变

1.2.1 石蜡切片组织的处理及 DNA 的粗提 石蜡 5 μ m 连续切片, 常规脱蜡; 加入不含蛋白酶 K 的裂解液 (0.5% Tween20, 1 mmol/L, EDTA 50 mmol/L, Tris-HCL pH8.0) 消化, 再加入 PK 继续消化, 消化液稍离心取上清, 用酚氯仿法抽提基因组 DNA 溶于 TE 缓冲液, 备用。

1.2.2 7% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性

1.2.2.1 PCR 反应 exon11 引物序列 上游引物 5' AACTCAGCCTGTTTCTGG-3', 下游引物 5'-GATC-TATTTTCCCTTCTC-3'。50 μ L 反应体系中含有

5 μ L 模板, 上游引物 (10 pmol/ μ L) 5 μ L, 下游引物 (10 pmol/ μ L) 5 μ L, dNTP 10 μ L, 双蒸水 10 μ L, Taq 酶 2 μ L, 25 mmol/L Mg + 8 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 (buffer) 5 μ L。

1.2.2.2 PCR 产物的鉴定 取 10 μ L 扩增产物与 2 μ L 载样缓冲液 [0.25% 溴酚蓝, 40.0% (W/V) 蔗糖水溶液] 混合后, 进行 107 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 同时以 c-kit 基因 exon11 正常扩增产物做对照, 紫外线灯下观察是否有特异扩增带。

1.2.2.3 非变性聚丙烯酰胺凝胶 (PAG) 垂直平板电泳 根据扩增产物分子质量的大小, 采用内含 5% 甘油的 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后行硝酸银染色, 直至出现清晰的条带。

1.2.2.4 结果分析 根据 DNA 单链条带 (ssDNA) 泳动变位情况进行结果分析。与正常组织相比, 凡泳动变位者即提示有基因突变。

1.3 统计学方法

采用 χ^2 检验对基因突变阳性组阴性组的临床、组织学资料和预后指标进行分析比较; 生存率的计算采用极限乘积法; 两组生存率的比较采用 log-rank 检验。

2 结 果

2.1 PCR-SSCP 检测结果

106 例 GIST 中 c-kit 基因突变阳性 48 例, 占 45.3%; 其中良性 GIST 基因突变 2 例, 突变率 4.9% (2/41); 恶性 GIST 基因突变 46 例, 突变率 70.8% (46/65)。

2.2 基因突变阳、阴性组良恶性指标的判别分析

基因突变阳性组和阴性组在肿瘤大小、肿瘤性坏死、浸润程度、核分裂象计数、核异型性等判别良恶性指标的比较均存在显著性差异 (表 1), 其中肿瘤大小、核分裂象计数、浸润程度分别以长径 5 cm, 5/50 HPF, 浸润至黏膜肌层或浆膜层为界。

表 1 基因突变阳、阴性组判别良恶性指标的对照

分组	肿瘤大小 (≥ 5 cm)	肿瘤性坏死	浸润程度 (侵及浆肌层)	核分裂象计数 [$>5/50$ (HPF)]	核异型
基因突变阳性	37	32	37	34	28
基因突变阴性	6	2	3	4	2
χ^2 值	48.5	48.2	57.9	46.7	38.9
P 值	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005

2.3 基因突变阳、阴性组侵袭邻近组织及肿瘤复发、转移的比较

肿瘤的转移部位有肝、脾、肠系膜、大网膜、腹膜、腹膜后、腹壁、肺、膀胱、卵巢、前列腺、骨、腹腔淋巴结等。基因突变组的复发转移率明显高于无突变组(表2)。

表2 基因突变阳、阴性组对邻近组织的侵袭及肿瘤转移、复发率的比较

分组	对邻近组织的侵袭(术中粘连)	转移 (n,%)	复发 (n,%)
基因突变阳性组	28	15 (31.3)	9(18.8)
基因突变阴性组	2	2(3.4)	1(1.7)
χ^2 值	38.9	15.1	8.9
P 值	<0.005	<0.005	<0.005

2.4 基因突变阳性组和阴性组生存率的比较

106例中获得随访的有57例,获访至今者55例,中途因复发或转移后失访者2例(1~4年),11例死于肿瘤转移或复发(3个月至6年),有转移或复发但仍生存至今者6例(4~7年),无瘤生存38例(2~9年)。基因突变阳性组共11例死亡,1例1年后中途失访;而基因突变阴性组无1例死亡,1例因复发于4年后失访。两组的1,3,5年生生存率见表3。

表3 基因突变阳、阴性组1,3,5年生生存率比较
($x \pm s$)

分组	1年生生存率	3年生生存率	5年生生存率	中位生存期(月)
基因突变阳性组	0.895±0.052	0.763±0.073	0.709±0.084	51.2
基因突变阴性组	1.000	1.000	0.947±0.027	67.3
P 值	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005

3 讨论

GIST是一种独立的疾病,其组织起源尚未完全明了。现多认为来源于原始间叶细胞,可以向平滑肌或神经分化,因此过去常被诊断为胃肠道的平滑肌肿瘤或神经源肿瘤。但GIST在免疫表型上不同于典型的平滑肌瘤和神经鞘瘤,各种肌源性标记物和神经源性标记物表达率较低,如Desmin, SMA, NSE和S-100等^[3]。大多数GIST可表达CD34和原癌基因C-kit的蛋白产物(CD117),尤

其是C-kit蛋白的阳性表达率可高达85%~94%^[4]。原癌基因C-kit是HZ4猫科肉瘤病毒kit癌基因的同源物,其表达产物是一种酪氨酸蛋白激酶受体,表达于造血干细胞亚群、肥大细胞、黑色素细胞及胃肠道的卡特尔基质细胞。当其与配体干细胞因子(SCF)结合后,可激发酪氨酸残基磷酸化,从而调节细胞的生长。现已证明kit-SCF系统在造血细胞、生殖细胞及卡特尔细胞的发生发展中起着重要作用^[1,5]。

GIST可发生于胃肠道的各个部位,除消化道管腔外还包括网膜和肠系膜,其最常见的症状是腹痛和黑便。恶性基质瘤引起患者死亡的主要原因是广泛侵犯邻近器官和经血管转移至肝、肺、骨及其他器官。

GIST迄今还缺乏统一的良、恶性诊断标准,目前采用最多是Lewin分级标准^[6]。(1)肯定恶性标准:转移(组织学证实)或浸润至邻近器官,大肠的基质瘤细胞侵犯肌层。(2)潜在恶性指标:肿瘤长径在胃部>5.5cm,在肠部>4cm。核分裂像在胃部>5/50HPF,在肠道>1/50HPF。肿瘤坏死,核异型性明显,细胞丰富,小上皮样细胞呈巢或腺泡状排列。GIST的良、恶性判断标准:(1)良性无任何恶性指标;(2)潜在恶性GIST仅有1项潜在恶性指标;(3)恶性GIST具有1项肯定恶性指标。本研究将潜在恶性和肯定恶性均归入恶性组。但某些GIST组织学特征无任何恶性表现,但仍可发生转移、复发。这表明某些GIST组织形态学与其生物学行为存在不一致性。

影响GIST的预后因素较多,如肿瘤大小、核分裂像计数、细胞增殖活性、细胞密度、DNA倍性、年龄等^[7-8]。但每一种因素都不能作为一种可靠的、独立的预后指标^[4]。目前很多研究认为c-kit基因突变与GIST的预后有着重要关联^[9-11]。

Hirota^[1]等报道,GIST中邻近膜区即(exon11编码区)存在C-kit基因获得性功能突变,而且突变部位局限于Lys550~Val560之间,突变类型有多种。这种突变只存在于部分(27%~50%)GIST中,但C-kit基因突变及蛋白表达是GIST特有的基因和蛋白表型^[2]。Ernst等^[12]的研究证实C-kit蛋白邻近膜区的(exon11编码区)的基因突变与GIST的恶性生物学行为有关;C-kit基因突变有可能是

造成 GIST 组织细胞无限制生长和增殖最后导致肿瘤恶性转化的一个重要机制。Ernst 等^[12]和 Taniguchi 等^[9]还报道 C-kit 基因突变阳性组的病死率、基底和邻近组织的侵蚀以及肿瘤转移的发生率,坏死、出血和肿瘤的复发率,均明显高于 C-kit 基因突变阴性组。Nishida 等^[10]和 Moskaluk 等^[5]也先后报道 C-kit 基因突变阳性组患者与突变阴性组患者相比,肿瘤体积大,易侵犯邻近组织,核分裂像计数高,而且易出血、坏死,病死率和复发率较高。提示 c-kit 基因突变的检出有可能成为判断 GIST 恶性变和预后的重要指标^[3,9]。

本研究通过检测 GIST 中 C-kit 基因 exon11 的突变,并对 GIST 患者进行临床资料的统计和随访,得出的结论基本一致。c-kit 基因突变阳性组的生存率明显低于突变阴性组,对肿瘤的大小、肿瘤性坏死、浸润程度、核分裂象计数、核异型性等判别良恶性的指标的分析比较均和突变阴性组存在显著差异,对邻近组织的侵袭及肿瘤转移、复发的发生率均明显高于突变阴性组。据此可以认为,c-kit 基因突变与 GIST 侵袭、转移、复发等恶性生物学行为密切相关,c-kit 基因突变可望能够作为判断 GIST 临床预后的重要指标。

参考文献:

[1] Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, *et al.* Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors [J]. *Science*, 1998, 279(5350):577-580.

[2] 马大烈,刘晓红,蔡在龙,等. 胃肠道间质瘤中原癌基因 c-kit 突变及其蛋白表达 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2002, 24(5):461-463.

[3] Sircar K, Hewlett BR, Huizinga JD, *et al.* Interstitial cell of Cajal as precursors for gastrointestinal stromal tumors. [J]. *Am J Surg Pathol*, 1999, 23(4):377-389.

[4] 刘晓红. 原癌基因 c-kit 与胃肠道间质瘤 [J]. *国外医学生理、病理科学与临床分册*, 2001, 21(5):343-344.

[5] Moskaluk CA, Tian Q, Marshall CR, *et al.* Mutations of c-kit JM domain are found in a minority of human gastrointestinal stromal tumors [J]. *Oncogene*, 1999, 18(8):1897-1902.

[6] Lewin KJ, Riddell RH, Weinstein WM, *et al.* *Gastrointestinal Pathology and Its Clinical Implications*, 1st ed. New York: Igaku-Shoin, 1992. 284-341.

[7] Adani GL, Marcello D, Sanna A, Mazzetti J, *et al.* Gastrointestinal stromal tumors: evaluation of biological and clinical current opinions [J]. *Chir-Ital*, 2002, 54(2):127-131.

[8] 李雪兰,胡忠良,郑长怡,等. 胃肠道间质瘤的病理与免疫组化特征:附 20 例报告 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(3):221-224.

[9] Taniguchi M, Nishida T, Hirota S, *et al.* Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* [J], 1999, 59(23):4297-4300.

[10] Nishida T, Nakamura J, Taniguchi M, *et al.* Clinicopathological features of gastric stromal tumors [J]. *J Exp ClinCancerRes*, 2000, 19(4):417-425.

[11] Iijima S, Maesawa C, Sato N, *et al.* Gastrointestinal stromal tumour of the oesophagus: significance of immunohistochemical and genetic analyses of the c-kit gene [J]. *Eur J GastroenterolHepatol*, 2002, 14(4):445-448.

[12] Ernst SI, Hubbs AE, Przygodzki Rm, *et al.* KIT mutation portends poor prognosis in gastrointestinal stromal /smooth muscle tumors [J]. *Lab Invest*, 1998, 78(11):1633-1636.

2005 年十位中国医生当选为美国外科学院院士

美国外科学院 (American College of Surgeons) 于 1913 年成立,是全球外科医生公认的领导外科科研和教学的专业组织,该组织致力于高标准的外科实践活动,以期不断提高病人的医疗质量。

长期以来,很少有中国大陆外科医生申请加入该组织。在美国外科学院-香港分院主席黄健灵教授的热心支持和帮助下,来自中国内地的 10 名中国著名外科教授,经过为期近一年的考核和评审,于 2005 年 10 月 16 日-22 日在美国旧金山召开的“第 91 届美国外科学院年会”(The 91st American College of Surgeons Annual Congress)上,正式宣布他们当选为美国外科学院院士。他们是:冷希圣教授(北京大学人民医院)、赵玉沛教授(北京协和医院)、陈孝平教授(华中科技大学同济医学院附属同济医院)、吴一龙教授(广东省人民医院)、詹文华教授(中山大学附属第一医院)、姜洪池教授(哈尔滨医科大学)、郑树教授(浙江大学附属第二医院)、李宏为教授(上海交通大学瑞金医院)、郝希山教授(天津医科大学附属肿瘤医院)和郑树森教授(浙江大学附属第一医院)。