

胃间质瘤患者辅助治疗前 *CDK4* 和 *TP53* 突变水平与预后的相关性

张 帅, 申昌军

(延安市人民医院 普外科, 陕西 延安 716000)

摘要:[目的]比较高复发转移风险与非高复发转移风险胃间质瘤(GST)患者 *TP53* 和 *CDK4* 基因的表达水平差异,*TP53* 和 *CDK4* 基因的表达水平对高复发转移风险 GST 患者术后伊马替尼辅助治疗的预后影响。[方法]前瞻性纳入收治行根治切除手术的 143 例原发性 GST 患者,根据《中国胃肠间质瘤诊断治疗专家共识》将原发性 GST 患者分为高风险组(62 例)和非高风险组(81 例)。术后取瘤组织做免疫组化检测,比较 2 组间 p53(*TP53* 基因编码的蛋白)和 *CDK4* 表达情况。高风险组给予术后伊马替尼辅助治疗,再根据免疫组化结果,将 62 例高风险组患者分为 p53 高表达组、p53 低表达组和 *CDK4* 高表达组、*CDK4* 低表达组进行亚组分析。分别比较高表达组和低表达组间 5 年无事件生存率。[结果]高风险组和低风险组的年龄和性别比例差异无统计学意义。而高风险组的原发肿瘤大小较非高风险组大,分别为 (11.53 ± 2.81) cm、 (8.25 ± 1.52) cm ($P < 0.001$),且肿瘤核分裂数较非高风险组多,分别为 12.24 ± 2.32 、 7.52 ± 2.21 ($P < 0.001$)。免疫组化结果提示,高风险组 p53 蛋白表达水平较非高风险组高,而 *CDK4* 蛋白表达水平较非高风险组低。在高风险组中,p53 高表达组的 5 年无事件生存率较低表达组低,分别为 45.6%、78.4% ($P = 0.044$);然而,*CDK4* 高表达组的 5 年无事件生存率较低表达组高,分别为 74.2%、48.4% ($P = 0.029$)。[结论]高复发、高转移风险的 GST 患者 *TP53* 基因表达水平较高;*CDK4* 表达水平较低。更高的 *TP53* 基因表达和更低的 *CDK4* 表达水平提示着高复发、转移风险的 GST 术后伊马替尼辅助治疗有更好的预后。

关键词:胃间质瘤;术后辅助治疗;伊马替尼;*TP53* 基因;*CDK4* 基因;预后

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2020.09.11

中图分类号:R735.2 文献标志码:A

Correlation between *CDK4* and *TP53* gene mutations and prognosis in patients with gastric stromal tumors before adjuvant therapy

ZHANG Shuai, SHEN Chang-jun

(Department of General Surgery, Yan'an People's Hospital, Yan'an 716000, China)

Corresponding author: SHEN Chang-jun, E-mail: zhang76shuau@163.com

Abstract:[Objective]Comparing the expression levels of *TP53* and *CDK4* genes in patients with high risk of recurrence and metastasis and those with non-high risk of recurrence and metastasis, and the effect of *TP53* and *CDK4* gene expression levels on the prognosis of postoperative imatinib adjuvant therapy in patients with high risk of recurrence and metastasis. [Methods]A prospective enrollment of 143 patients with primary GST who underwent radical resection in our hospital was divided into high-risk groups(62 patients)and non-surgical patients according to the consensus of Chinese gastrointestinal stromal tumor diagnosis and treatment experts. High risk group(81 cases). The tumor tissues were taken for immunohistochemistry, and the expression of p53(protein encoded by *TP53* gene)and *CDK4* were compared between the two groups. High-risk group was given adjuvant treatment with imatinib. According to the results of immunohistochemistry, 62 high-risk patients were divided into p53 high expression group, p53 low expression group and *CDK4* high expression group, and *CDK4* low expression group. Group analysis. Five-year event-free survival rates were compared between the high-expression and low-expression groups, respectively. [Results]There were no significant differences in age(58.22 ± 5.21 , 56.74 ± 6.21)and sex ratio(37/

25,51/30) between the high-risk and low-risk groups included in the study ($P > 0.05$). The size of the primary tumor in the high-risk group was larger than that in the non-high-risk group, which was $(11.53 \pm 2.81) \text{ cm}$, $(8.25 \pm 1.52) \text{ cm}$ ($P < 0.001$), and the number of mitotic divisions in the tumor was higher than that in the non-high-risk group, which was 12.24 ± 2.32 , 7.52 ± 2.21 , $P < 0.001$. The results of immunohistochemistry indicated that the expression level of p53 protein in high-risk group was higher than that in non-high-risk group, while the expression level of CDK4 protein was lower than that in non-high-risk group. In the high-risk group, the five-year event-free survival rate was lower in the low-expression group of the p53-high expression group, 45.6%, 78.4%, $P = 0.044$. However, CDK4 was highly expressed. The group's five-year event-free survival rate was lower in the expression group, which was 74.2%, 48.4%, $P = 0.029$. [Conclusion] Gastric stromal tumors with high recurrence and metastasis risk have higher TP53 gene expression level and lower CDK4 expression level. Higher TP53 gene expression and lower CDK4 expression levels suggest a better prognosis for the prognosis of patients with high recurrence and metastatic gastric stromal tumors after imatinib adjuvant therapy.

Key words: gastric stromal tumor; adjuvant therapy; imatinib; TP53 gene; CDK4 gene; prognosis

胃间质瘤(gastric stromal tumor, GST)是一类起源于胃肠道间叶组织的肿瘤,发病率仅占消化道肿瘤的1%~3%,但却占胃肠道间叶肿瘤的大部分^[1]。超90%的GST存在*c-KIT*或*PDGFRA*基因突变,*c-KIT*和*PDGFRA*基因的功能性突变是GST发生的关键因素,其突变可使相应受体及下游的信号通路形成非配体依赖性激活,从而启动细胞的过度增殖^[2-3]。近年来,越来越多的研究提示,GST的发病也和细胞周期的紊乱有关,这种现象在高危复发或转移风险的GST尤其常见^[4-7]。

分子靶向药物如酪氨酸激酶抑制剂(TKIs)、伊马替尼已成功应用于临床,在GST的治疗中取得令人瞩目的疗效^[8-9]。伊马替尼不但用于晚期GST的治疗,也被广泛应用于高危复发或转移风险GST患者术后的辅助治疗。虽然使用伊马替尼明显改善了大部分高危复发或转移风险GST患者的预后,但仍有相当部分GST患者不能从中获益,出现复发和转移。复发和转移与原发肿瘤大小、肿瘤的核分裂数、肿瘤部位以及肿瘤是否完全切除密切相关,其中肿瘤大小、有丝分裂计数是目前评价GST复发和预后的主要预测指标^[10-11]。目前尚没有可靠的确定GST预后相关的免疫组化生物标志物。鉴于细胞周期紊乱对高危复发或转移风险的GST起重要作用,p53及其下游蛋白CDK4在细胞周期调控中扮演了重要角色。本研究探讨高风险GST患者接受伊马替尼辅助治疗前p53、CDK4的表达水平与伊马替尼辅助治疗预后的相关性,为预测高风险GST术后复发、转移提供免疫组化预测指标。

1 资料与方法

1.1 一般资料

连续前瞻性纳入我院2012年1月~2013年12

月收治行根治切除术的143例原发性GST患者。根据2011年版《中国胃肠间质瘤诊断治疗专家共识》^[12],将患者分为高危组和非高危组。其中高危组62例,非高危组81例。纳入标准为:①术后病理明确诊断为原发性GST;②术前未接受放、化疗或其他抗肿瘤治疗;③高危组术后规范接受伊马替尼辅助治疗>12个月。排除标准:①术中肿瘤破裂或非R₀切除患者;②接受舒尼替尼等其他抗肿瘤辅助治疗者;③高危组伊马替尼辅助治疗期间肿瘤复发、转移或死亡;④高危组术后接受伊马替尼辅助治疗的患者中由于无法耐受或经济原因等停药,辅助治疗时间少于1年者。

1.2 方法

将患者肿瘤组织做免疫组化检测,分别比较高危组和非高危组p53和CDK4蛋白的表达水平。

高危组术后接受不少于12个月的伊马替尼辅助治疗。接着,根据术后免疫组化评分中位数,将高危组分为p53高表达组、低表达组,CDK4高表达组、低表达组,分别比较p53高表达组、低表达组,CDK4高表达组、低表达组间5年无事件生存率(event free survival, EFS)。

1.2.1 免疫组化 术后取肿瘤组织,由我院病理科完成免疫组化,操作步骤参考文献报道的方法^[13]。免疫组化评分采用IRS法^[14]进行量化计分,结合染色阳性细胞数百分率和染色强度进行评价。在光学显微镜下对组织切片分别按染色程度(0~3分为阴性着色、淡黄色、浅褐色、深褐色)、阳性范围进行评分(1~4分为0%~25%、>25%~50%、>50%~75%、>75%~100%),最终分数为染色程度和染色范围相乘。由我院2名病理科医师双人独立评分,有争议的共同讨论。

1.2.2 随访 GST 术后最常见的转移部位是腹膜和肝脏,故采用腹、盆腔增强 CT 或 MRI 扫描作为常规随访项目。每 3 个月进行 CT 或 MRI 检查,持续 3 年,然后每 6 个月 1 次,直至满 5 年。终点事件为复发、转移或死亡。失访患者作为删失值纳入生存分析。

1.3 统计学处理

计量资料间的差异用 t 检验(正态分布)或曼-惠特尼秩和检验(非正态)。计数资料间的差异用 χ^2 检验。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,评估不同分组的 5 年 EFS。Log-rank 检验用于比较不同分组间生存率。以上数据均使用 IBM SPSS 22.0 进行统计分析。

2 结果

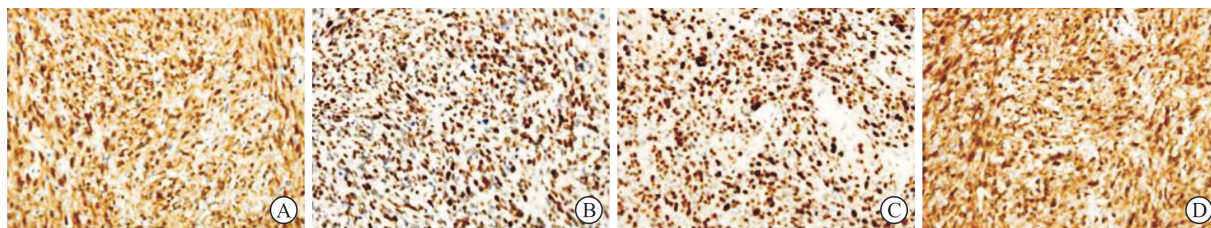
2.1 一般临床资料

本研究共纳入原发性 GST 行根治术患者 143 例,其中高危组 62 例,非高危组 81 例。患者的一般临床资料如表 1 所示。2 组的平均年龄、性别,差异无统计学意义。高危组原发肿瘤较非高危组大,核分裂数较非高危组多,差异有统计学意义。高危组和非高危组的 p53、CDK4 免疫组化 IRS 评分差异有统计学意义($P < 0.001$)。典型的免疫组化结果如图 1 所示。结果提示,高危组的 p53 蛋白表达水平较非高危组高,而 CDK4 蛋白表达水平较非高危组低。

表 1 一般临床资料

$\bar{x} \pm s$

观察指标	高危组($n=62$)	非高危组($n=81$)	t/χ^2	P
年龄/岁	58.22 $\pm$ 5.21	56.74 $\pm$ 6.21	1.513	0.066
男/女	37/25	51/30	0.160	0.689
原发肿瘤大小/cm	11.53 $\pm$ 2.81	8.25 $\pm$ 1.52	8.940	<0.001
肿瘤的核分裂数/50 HPF	12.24 $\pm$ 2.32	7.52 $\pm$ 2.21	12.386	<0.001
p53 免疫组化 IRS 评分/分	6.37 $\pm$ 1.30	2.30 $\pm$ 0.85	22.580	<0.001
CDK4 免疫组化 IRS 评分/分	3.58 $\pm$ 0.74	7.75 $\pm$ 2.14	10.220	<0.001



A: 高危组 p53; B: 非高危组 p53; C: 高危组 CDK4; D: 非高危组 CDK4。

图 1 典型的 p53 和 CDK4 免疫组化阳性结果

2.2 高危组中 p53 和 CDK4 表达水平与预后的相关性

根据免疫组化 IRS 评分中位数,将纳入本研究的 62 例高危组患者分别分为 p53 高表达组、p53 低表达组和 CDK4 高表达组、CDK4 低表达组。其中,31 例 p53 高表达组中,有 27 例为 CDK4 低表达组。各分组的一般临床资料如表 2 所示。p53 高表达组和低表达组的性别比例、平均年龄、肿瘤的核分裂数比较,差异均无统计学意义。然而,p53 高表达组的原发肿瘤大小较低表达组大,免疫组化评分较低表达组高。

同样地,CDK4 高表达组和低表达组的性别比例、平均年龄、肿瘤的核分裂数差异无统计学意义。

但 CDK4 高表达组的原发肿瘤大小较低表达组小,免疫组化评分较低表达组低。

根据随访结果,采用 Kaplan-Meier 法分别绘制 p53 高表达组、p53 低表达组和 CDK4 高表达组、CDK4 低表达组的无事件生存曲线,结果如图 2 所示。p53 高表达组、p53 低表达组 5 年 EFS 分别为 45.6%、78.4%,Log-Rank 检验 $P=0.044$,差异有统计学意义(图 2A)。CDK4 高表达组、CDK4 低表达组 5 年 EFS 生存率分别为 74.2%、48.4%,Log-Rank 检验 $P=0.029$,差异有统计学意义(图 2B)。结果表明,p53 高表达组较低表达组更好,而 CDK4 高表达组较低表达组预后更差。

表2 高危组中不同分组的一般临床资料比较

 $\bar{x} \pm s$

指标	p53				CDK4			
	高表达组 (n=31)	低表达组 (n=31)	t/χ^2	P	高表达组 (n=31)	低表达组 (n=31)	t/χ^2	P
男/女	17/14	20/11	0.603	0.437	19/12	18/13	1.200	0.273
年龄/岁	58.02±6.63	59.12±7.75	0.601	0.550	59.14±7.22	58.06±6.93	0.601	0.550
原发肿瘤大小/cm	12.41±3.53	9.08±2.37	4.361	<0.001	9.02±3.63	11.96±2.74	3.560	<0.001
肿瘤的核分裂数/50 HPF	13.20±4.16	11.33±3.16	1.993	0.051	11.92±3.70	13.41±3.05	1.730	0.088
免疫组化 IRS 评分/分	7.52±2.31	6.02±2.24	2.560	0.012	2.93±0.88	4.25±1.18	4.993	<0.001

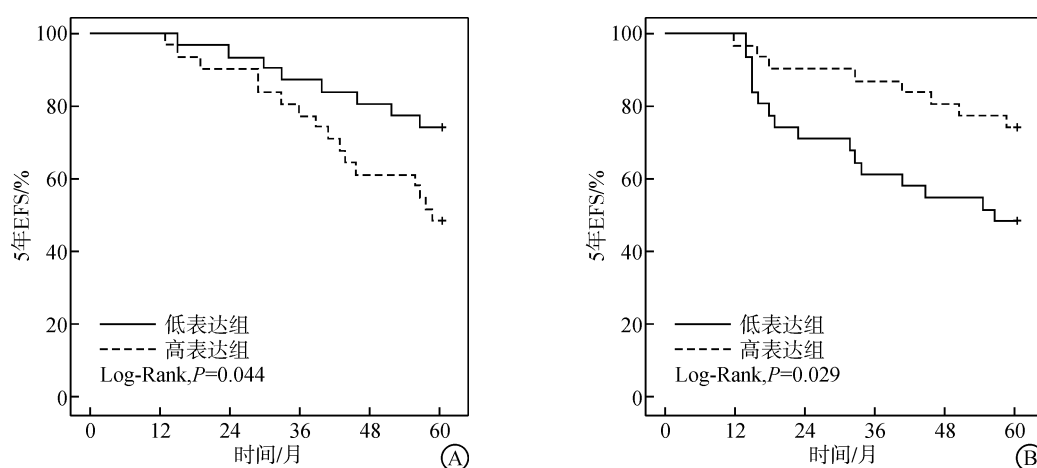


图2 p53 高表达组、p53 低表达组(A)和 CDK4 高表达组、CDK4 低表达组(B)的无事件生存曲线

3 讨论

TP53 基因编码的 p53 蛋白是控制细胞凋亡、衰老、DNA 损伤修复和细胞周期停滞的许多基因的必需调节因子。DNA 损伤时, p53 被激活作为 G1 期检查点的元件调控 DNA 修复。p53 的激活调控下游的细胞周期蛋白依赖激酶抑制因子 p21 激活, p21 作为细胞周期蛋白复合的细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)的抑制剂, 通过抑制 DNA 合成使细胞停滞在 G1 期^[15-16]。TP53 基因突变的频率在不同肿瘤实体之间存在较大差异, 例如在宫颈癌中, TP53 基因突变率小于 5%, 而在卵巢癌中, TP53 基因的变异高达 90%^[17]。TP53 基因发生突变, 细胞凋亡功能被抑制, 细胞增殖失去控制, TP53 基因的突变与肿瘤形成发展, 分期更高, 预后不良和治疗反应低有关^[18-19]。突变型的 p53 蛋白会因为空间构象的改变而用免疫组化的方法检出^[20-21]。因此, 当组织中有 p53 蛋白高表达, 即表明有 TP53 基因的突变。胃肠道间质瘤中的 TP53 基因突变已有文献报道, Ihle 等^[22]和 Ognjanovic 等(2012)的研究均提示, TP53 基因水平的改变能增加 p53 蛋白的表达。

本研究通过对比高复发、转移风险与非高复发、转移风险的 GST 患者 p53 蛋白表达差异。结果表

明, 在高风险组中, p53 蛋白表达量更高, 2 组免疫组化 IRS 评分分别为 6.37 ± 1.30 、 2.30 ± 0.85 ($P < 0.001$)。即 p53 具有用于评价 GST 复发、转移风险的潜在作用。高风险组中根据 p53 表达量中位数进行分组, 进一步进行亚组分析。p53 高表达组和低表达组的性别比例、平均年龄差异无统计学意义, 提示 2 组具有可比性。此外, 常被用于评价 GST 复发、转移风险的肿瘤的核分裂数 2 组间比较差异无统计学意义。然而, 高风险患者在术后接受大于 12 个月伊马替尼辅助治疗后, p53 高表达组的 5 年 EFS 较低表达组低, 分别为 45.6%、78.4%, 差异有统计学意义 ($P = 0.04$)。提示, p53 表达量作为评价 GST 术后接受伊马替尼辅助治疗后复发、转移风险较肿瘤核分裂数更敏感。p53 高表达提示高风险患者术后接受伊马替尼辅助治疗预后差。

CDK4 是细胞周期的正性调控因子。Cyclin D1 与 CDK4 结合成复合物使 CDK4 活化, 活化的 CDK4 可使其底物 PRb 磷酸化, 释放出 E2 而启动 S 期相关基因的转录, 细胞由 G1 期进入 S 期, 而 p53 则可特异性地与 cyclin D1 竞争性结合 CDK4, 从而抑制 CDK4 的活性, 抑制细胞由 G1 期向 S 期转变, 对细胞周期起负调节作用 (Lee 等, 2015; Li 等,

2016)。故在细胞周期调控中,CDK4 的过度表达可导致细胞增殖分化失控,增加细胞癌性转化的可能性。目前,CDK4 在胃肠道间质瘤的表达相关的研究较少。Sabah 等(2006)通过检测 100 个胃肠道间质瘤组织学样本中发现,CDK4 的表达量与 CDK4 组织学类型无显著相关性。Tornillo 等通过荧光原位杂交分析和高通量组织微阵列分析了 9 494 例 GST 的组织,也未检测到 CDK4 基因的扩增。在本研究中,高复发、转移风险的 CDK4 蛋白表达水平较非高复发、转移风险的 GST 患者高。此外,在高风险患者的亚组分析中,CDK4 蛋白高表达组在术后接受大于 12 个月伊马替尼辅助治疗后的预后较差,5 年 EFS 分别为 74.2%、48.4% ($P=0.029$)。结果表明,CDK4 在高风险 GST 患者中的高表达提示着预后良好。

综上,本研究发现 p53 蛋白在 GST 高复发、转移风险患者中表达量更高,p53 高表达提示 GST 术后伊马替尼辅助治疗预后较差。CDK4 蛋白在 GST 高复发、转移风险患者中表达量较低,CDK4 高表达提示 GST 术后伊马替尼辅助治疗预后好。

参考文献

- [1] Luo XF, Zhou L H. Prognostic significance of neutrophil to lymphocyte ratio in patients with gastrointestinal stromal tumors: A meta-analysis[J]. Clin Chim Acta, 2017, 477(1): 7—12.
- [2] Gomes A, Bardales RF, Reis R, et al. Molecular analysis of c-Kit and PDGFRA in GISTs diagnosed by EUS[J]. Am J Clin Pathol, 2015, 127(1): 89—96.
- [3] Ahmad F, Lad P, Bhatia S, et al. Molecular spectrum of c-KIT and PDGFRA gene mutations in gastro intestinal stromal tumor: determination of frequency, distribution pattern and identification of novel mutations in Indian patients[J]. Med Oncol, 2015, 32(1): 1—11.
- [4] Wang Y, Fletcher JA. Cell cycle and dystrophin dysregulation in GIST[J]. Cell Cycle, 2015, 14(17): 2713—2714.
- [5] Neves LR, Oshima CT, Artigianineto R, et al. Ki67 and p53 in gastrointestinal stromal tumors-GIST[J]. Arq Gastroenterol, 2009, 46(2): 116—120.
- [6] Al-Bozom I A. p53 expression in gastrointestinal stromal tumors[J]. Pathol Int, 2010, 51(7): 519—523.
- [7] 周东, 毕瑞雪, 杨勇, 等. FAK 在胃肠道间质瘤组织中的表达及其与诊断治疗关系的研究[J]. 医学信息, 2016, 29(26): 226—228.
- [8] Kubota T. Gastrointestinal stromal tumor(GIST) and imatinib[J]. Int J Clin Oncol, 2006, 11(3): 184—189.
- [9] Van Glabbeke MM, Owzar K, Rankin C, et al. Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors (GIST): A meta-analysis based on 1,640 patients(pts)[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(7): 1247—1253.
- [10] Joensuu H, Rutkowski P, Nishida T, et al. KIT and PDGFRA mutations and the risk of GI stromal tumor recurrence[J]. J Clin Oncol, 2015, 33(6): 634—642.
- [11] Dematteo RP, Gold JS, Saran L, et al. Tumor mitotic rate, size, and location independently predict recurrence after resection of primary gastrointestinal stromal tumor(GIST)[J]. Cancer, 2010, 112(3): 608—615.
- [12] CSCO 胃肠间质瘤专家委员会. 中国胃肠间质瘤诊断治疗专家共识(2011 年版)[J]. 临床肿瘤学杂志, 2011, 16(9): 836—844.
- [13] 王志生, 李晓辉, 任飞, 等. 免疫组化染色的操作技巧和注意事项[J]. 中国实用医药, 2014, 9(15): 240—240.
- [14] Clark BZ, Dabbs DJ, Cooper KL, et al. Impact of progesterone receptor semiquantitative immunohistochemical result on Oncotype DX recurrence score: a quality assurance study of 1074 cases[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2013, 21(4): 287—291.
- [15] Zhu X, Yang S, Lin W, et al. Roles of Cell Cycle Regulators Cyclin D1, CDK4, and p53 in Knee Osteoarthritis[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2016, 20(9): 529—534.
- [16] Liao P, Zeng SX, Zhou X, et al. Mutant p53 Gains Its Function via c-Myc Activation upon CDK4 Phosphorylation at Serine 249 and Consequent PIN1 Binding[J]. Mol Cell, 2017, 68(6): 1134—1146.
- [17] Leroy B, Anderson M, Soussi T. TP53 Mutations in Human Cancer: Database Reassessment and Prospects for the Next Decade [J]. Hum Mutat, 2014, 35(6): 672—688.
- [18] Ohnstad HO, Castro R, Sun J, et al. Correlation of TP53 and MDM2 genotypes with response to therapy in sarcoma[J]. Cancer, 2013, 119(5): 1013—1022.
- [19] Muller PAJ, Trinidad AG, Timpson P, et al. Mutant p53 enhances MET trafficking and signalling to drive cell scattering and invasion [J]. Oncogene, 2013, 32(10): 1252—1265.
- [20] Somasundaram K. Tumor suppressor p53: regulation and function[J]. Front Biosci, 2000, 5(5): 424—437.
- [21] Muller PAJ, Vousden KH. p53 mutations in cancer[J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(1): 2—8.
- [22] Ihle MA, Huss S, Jeske W, et al. Expression of cell cycle regulators and frequency of TP53 mutations in high risk gastrointestinal stromal tumors prior to adjuvant imatinib treatment [J]. Plos One, 2018, 13(2): e0193048.