

骶骨胃肠间质瘤的临床病理学特点、克隆性及*c-kit*基因突变分析

巩丽, 赵建业, 李艳红, 张力, 韩秀娟, 刘小艳, 朱少君, 张伟

■背景资料

GIST是胃肠道常见的一种间叶性肿瘤。GIST大部分来自于胃(39%)、小肠(32%)和大肠(15%),极少数发生于胃肠外。本文就1例发生于骶骨GIST的罕见病例,探讨其组织病理学特点和*c-kit*基因突变情况,以期能够为病理医生在诊断发生于骨且其他免疫学表型特征不明显的梭形细胞肿瘤时提供一定的理论依据。同时,对其进行了克隆性检测,以进一步证明其肿瘤性本质。

巩丽, 赵建业, 张力, 韩秀娟, 刘小艳, 朱少君, 张伟, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院病理科 陕西省西安市710038

李艳红, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院妇产科 陕西省西安市710038

国家自然科学基金资助项目, No. 30171052

作者贡献分布: 此课题由巩丽及张伟设计; 研究过程由巩丽, 赵建业, 李艳红, 张力, 韩秀娟, 刘小艳, 朱少君操作完成; 数据分析由巩丽, 赵建业及张伟完成; 本论文写作由巩丽完成。

通讯作者: 张伟, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院病理科. zhwllyh@fmmu.edu.cn

电话: 029-84777467

收稿日期: 2008-11-19 修回日期: 2008-12-03

接受日期: 2008-12-08 在线出版日期: 2009-01-28

Clinicopathological observation, clonal status and *c-kit* gene mutation of gastrointestinal stromal tumor in sacrum

Li Gong, Jian-Ye Zhao, Yan-Hong Li, Li Zhang, Xiu-Juan Han, Xiao-Yan Liu, Shao-Jun Zhu, Wei Zhang

Li Gong, Jian-Ye Zhao, Li Zhang, Xiu-Juan Han, Xiao-Yan Liu, Shao-Jun Zhu, Wei Zhang, Department of Pathology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University of the Chinese PLA, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Yan-Hong Li, Department of Gynecology and Obstetrics, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University of the Chinese PLA, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30171052

Correspondence to: Dr. Wei Zhang, Department of Pathology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University Chinese PLA, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. zhwllyh@fmmu.edu.cn

Received: 2008-11-19 Revised: 2008-12-03

Accepted: 2008-12-08 Published online: 2009-01-28

Abstract

AIM: To elucidate the clinicopathological features, *c-kit* gene mutation and clonal status of gastrointestinal stromal tumor that occurs in sacrum.

METHODS: After the sample was confirmed by histopathology and immunohistochemistry, genomic DNA was isolated from the lesions and the surrounding fibrous connective tissue

as control. Then, direct PCR sequencing was used to investigate the mutation status of *c-kit* gene exons 9, 11, 13, 17. Moreover, a clonality assay was examined based on X-chromosomal inactivation mosaicism in female somatic tissues and polymorphism of phosphoglycerate kinase (PGK) and androgen receptor (AR) genes.

RESULTS: Microscopically, the sample showed typical histological characteristics. Lesions were composed of spindle cells arranged in cords, knit and whirlpool patterns. The cytoplasm of tumor cells was abundant, and the nuclei were stafflike or fusiform. Mitosis figure was rare. Immunohistochemically, the tumor cells showed positive reactions for CD117 and CD34. On mutation analysis, the *c-kit* gene mutation was found in exon 11. The result of clonal analysis demonstrated that GIST was monoclonal.

CONCLUSION: GIST is a neoplastic lesion. It is very rare that GIST occurs in sacrum. It is difficult to differentiate from other spindle cell tumors, so it should be diagnosed by immunohistochemistry, and confirmed by the examination of *c-kit* gene amplification and sequencing.

Key Words: Gastrointestinal stromal tumor; Sacrum; *C-kit*; Clonality

Gong L, Zhao JY, Li YH, Zhang L, Han XJ, Liu XY, Zhu SJ, Zhang W. Clinicopathological observation, clonal status and *c-kit* gene mutation of gastrointestinal stromal tumor in sacrum. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(3): 316-320

摘要

目的: 探讨发生于骶骨的胃肠间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)的临床病理学特点、*c-kit*基因突变情况及克隆性。

方法: 手术切除标本经常规HE染色和免疫组化染色观察确诊后,应用显微切割技术分离病变及病变周围纤维结缔组织,提取基因组DNA,再进行*c-kit*基因外显子9、11、

■同行评议者

田晓峰, 教授, 大连医科大学附属第二医院普通外科

13和17的PCR扩增和测序。同时利用女性X染色体失活的嵌合性和磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase, PGK)和雄激素受体(androgen receptor, AR)基因位点的多态性进行克隆性检测。

结果: 光镜下瘤细胞主要为梭形, 呈束状、编织状或旋涡状排列; 胞质丰富, 嗜酸性或中性; 细胞核杆状或长梭形, 核分裂像罕见。免疫组化标记瘤细胞表达CD117和CD34强阳性。PCR产物直接测序检测揭示*c-kit*基因外显子11有突变发生, 而外显子9、13和17均无突变。克隆性检测结果示GIST为单克隆性病变。

结论: GIST是肿瘤性病变; 发生于骶骨的GIST的诊断需要通过免疫组化来确诊, 并行*c-kit*基因扩增的检测以及测序进一步证实。

关键词: 胃肠间质瘤; 骶骨; *c-kit*基因; 克隆性

巩丽, 赵建业, 李艳红, 张力, 韩秀娟, 刘小艳, 朱少君, 张伟. 骶骨胃肠间质瘤的临床病理学特点、克隆性及*c-kit*基因突变分析. 世界华人消化杂志 2009; 17(3): 316-320
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/316.asp>

0 引言

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GIST)是胃肠道最常见的间叶源性肿瘤, 起源于表达*c-kit*(CD117)的Cajal间质细胞^[1], 被认为是一种胃肠道原发性、非上皮性、非淋巴性、非平滑肌和非神经鞘瘤的肿瘤。其中, 胃(60%-70%)、小肠(20%-25%)、直肠和食管约5%, 极少部分见于十二指肠甚至腹腔内的网膜、肠系膜^[2]。但发生于骨的GIST极其罕见, 我们查阅PubMed数据库和中国学术期刊全文数据库, 仅有1例发生于骶区的GIST转移至脑的报道^[3]。因此, 我们就1例发生于骶骨GIST的罕见病例, 探讨其组织病理学特点和*c-kit*基因突变情况, 以期能够为病理医生在诊断发生于骨且其他免疫学表型特征不明显的梭形细胞肿瘤时提供一定的理论依据。同时, 对其进行了克隆性检测, 以进一步证明其肿瘤性本质。

1 材料和方法

1.1 材料 患者, 女, 50岁。左下肢疼痛3 mo, 大便困难1 mo。患者于3 mo前无明显诱因自感左下肢疼痛, 不伴有肿胀、麻木, 无活动受限。至当地医院就诊, 诊断为“腰椎间盘突出症”。给予对症治疗(具体不详), 症状无明显缓解。后左下肢疼痛反

复发作。1 mo前无明显诱因出现大便困难, 无便血、肛周疼痛, 服用“番泻叶”后缓解。现再次出现大便困难, 为求进一步诊治, 遂来我院就诊。X线示: 骶骨病变。并行CT检查。专科查体: 骶尾部无明显压痛及扣击痛, 局部无包块, 浅静脉怒张, 皮温正常。左小腿外侧及左足背浅感觉减退, 双下肢肌力正常, 会阴部浅感觉尚可。术中所见: S1椎体有软组织包块, 质软, 色暗红。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学: 应用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶(SP)试剂盒(KIT9730, 福州迈新生物技术开发有限公司), 按厂家说明书进行。所用第一抗体包括针对CD34、结蛋白(Desmin)、神经特异性烯醇化酶(NSE)、神经纤维(NF)的鼠抗人mAb和CD117、S-100蛋白、平滑肌肌动蛋白(SM-actin)及HMB45的兔抗人多克隆抗体以及波形蛋白(vimentin)的鼠抗猪mAb。以上试剂均购自迈新公司。

1.2.2 激光显微切割和DNA提取: 所送标本石蜡包埋后制备10 μm切片8张, 黏附在激光纤维切割仪专用的切片上, 并将组织裱在有膜的一面。HE染色后, 将切片(表有组织的一面朝下)固定在显微镜下并确定好所需要的病变, 即可进行切割, 切割的样本通过重力作用会自动落入选择好的收集管。同时, 取肿瘤周围软组织作为参照样本, 然后再利用QIAamp DNA提取试剂盒(Qiagen GmbH, Germany)按照说明书提取基因组DNA。

1.2.3 PCR扩增和测序: 选择*c-kit*基因外显子9、11、13和17的寡核苷酸引物用于PCR扩增, 序列见表1。PCR循环参数: 95℃预变性2 min, 95℃变性30 s, 退火40 s, 72℃延伸30 s, 共35次, 最后72℃延伸5 min。PCR产物送上海生物工程有限公司纯化并测序。

1.2.4 克隆性检测: 磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase, PGK)和雄激素受体(androgen receptor, AR)位点的克隆性检测参照以前的方法进行^[4]。即PGK基因多态性表现为在甲基化位点下游有一个可以被*Bst* XI识别的单核苷酸多态性位点, 可经琼脂糖凝胶电泳显示^[5]。AR基因多态性表现为其第一外显子的CAG串联重复序列(short-tandem repeat, STR)的长度不同, 即(CAG)_n的n值有差别(11-31), 通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳显示^[6]。具有多态性位点的女性个体中正常和多克隆增生的组织显示两条带, 而肿瘤性病变仅显示1条带或以1条带为主^[7]。电

■创新盘点

本文报道了1例罕见部位的GIST, 并且利用免疫组化染色技术、*c-kit*基因的扩增以及突变位点的检测进一步证实了GIST的诊断, 同时分析了其克隆性, 明确了其性质。

应用要点

GIST的分子靶向治疗药物是格列卫, 罕见部位GIST的明确诊断有助于患者得到及时有效的治疗, 对于挽救患者的生命和提高生活质量具有重要的意义。

表 1 *c-kit*基因寡核苷酸引物序列、PCR产物大小和退火温度

<i>c-kit</i> 外显子	序列(5'-3')	PCR产物大小(bp)	退火温度(°C)
9(F)	5'-TCC TAG AGT AAG CCA GGG CTT T-3'	283	56
9(R)	5'-TGG TAG ACA GAG CCT AAA CAT CC-3'		
11(F)	5'-CTG AGA CAA TAA TTA TTA AAA GGT GA-3'	227	60
11(R)	5'-TTA TGT GTA CCC AAA AAG GTG ACA-3'		
13(F)	5'-GCT TGA CAT CAG TTT GCC AG-3'	193	60
13(R)	5'-AAA GGC AGC TTG GAC ACG GCT TTA-3'		
17(F)	5'-TAC AAG TTA AAA TGA ATT TAA ATG GT-3'	228	56
17(R)	5'-AAG TTG AAA CTA AAA ATC CTT TGC-3'		

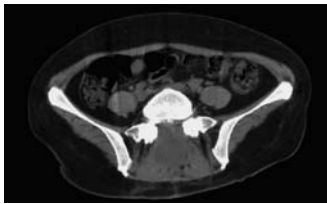


图 1 患者CT检查.

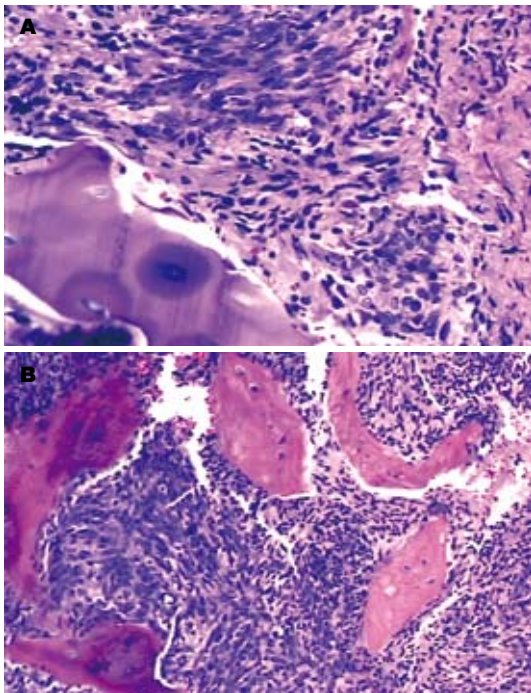


图 2 在光镜下骶骨胃肠间质瘤的临床病理学特点.

泳结果观察分别用UVP凝胶分析系统(UVP, Cambridge, UK)和光学照相记录数据, 用相应软件(LabWorksTM, UVP)比较*Hpa* II或*Hha* I消化前后一对等位基因扩增产物的强度差异, 其中1条带可比强度减弱达50%以上时才被认为有意义, 即X染色体失活嵌合性丢失^[8].

2 结果

2.1 患者CT检查结果 CT示骶1椎体一类圆形低密度影, 境界相对清楚(图1).

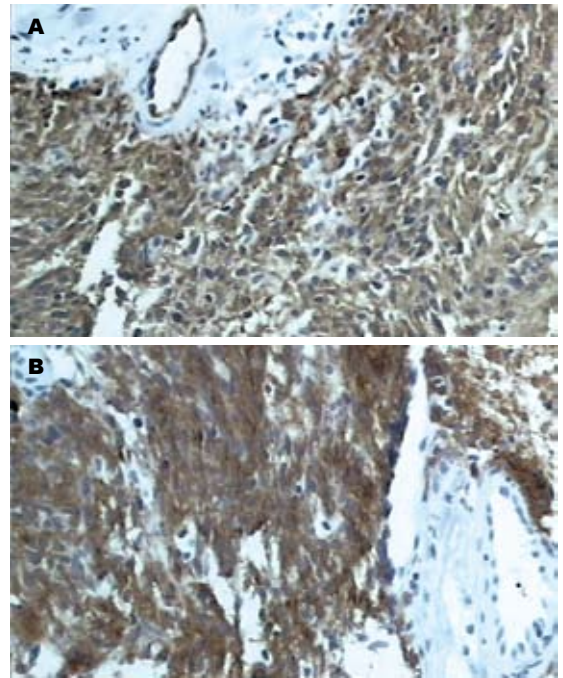


图 3 免疫组化标记瘤细胞表达. A: CD34; B: CD117.

2.2 病理学观察 灰红、灰白不规则组织一堆. 总体积4 cm×2.5 cm×0.5 cm, 切面灰白, 质中. 光镜下瘤细胞主要为梭形, 呈束状、编织状或漩涡状排列, 胞质丰富, 嗜酸性或中性; 细胞核杆状或长梭形, 核分裂像少见(图2). 免疫组化标记瘤细胞表达CD34(图3A)、CD117(图3B)和Vimentin, 不表达Desmin、SM-actin、SC-actin、NSE、NF、HMB45和S-100.

2.3 *c-kit*基因外显子9、11、13和17的PCR扩增和突变的检测 *c-kit*基因外显子9、11、13和17 PCR产物经2 g/L琼脂糖电泳结果显示, 在283 bp、227 bp、193 bp和228 bp处均有1条带(图4), 进一步证实了病变为GIST的诊断. 另外, 除*c-kit*基因外显子11经PCR直接测序检测揭示有突变外, 即103 bp处开始有12 bp(AAC AAC CTT CCA)的缺失, 余外显子9、13和17均无突变.

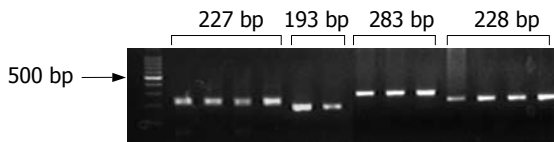


图 4 c-kit基因的琼脂糖电泳结果.

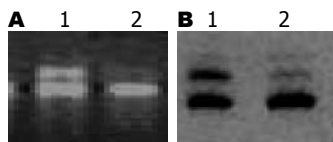


图 5 PGK和AR基因位点的凝胶电泳图. 1: 酶切前; 2: 酶切后; A: PGK基因; B: AR.

2.4 克隆性检测 所有检测组织在PGK和AR位点的凝胶电泳图上均表现为2条带, 有多态性. 其中肿瘤组织经限制性内切酶Hpa II和Hha I酶切后上带均消失, 只保留下带(图5), 均显示出X染色体失活嵌合性丢失, 证明为肿瘤性病变. 而周围纤维结缔组织在酶切前后两条带密度无明显改变. 这表明, 所有肿瘤组织均为单克隆性病变.

3 讨论

GIST是胃肠道常见的一种间叶性肿瘤. 国外文献报道每年发病约为10-20/100万, 多发生在40岁以上, 儿童罕见, 男女之比为3:1^[2]. GIST大部分来自于胃(39%)、小肠(32%)和大肠(15%), 极少数发生于胃肠外. 而发生于骨的更为罕见, 仅有1例发生于骶区的GIST转移至脑的报道^[3].

GIST的诊断主要依赖于组织病理学和免疫组化表型, 其中最主要的免疫组化特点就是肿瘤细胞CD117和CD34染色阳性. 根据文献报道, 大约90%-95%的GIST表达CD117, 60%-70%的GISTs表达CD34, 30%-40%的GIST表达SM-actin, 而只有5%的GISTs表达S-100蛋白^[9]. 当然, vimentin总是阳性的. 通过这些免疫组化特点, 即可与其他间叶性肿瘤, 如雪旺氏细胞瘤或平滑肌瘤相鉴别. 我们对此例也进行了详细的组织病理学观察和免疫组织化学染色, 除了具有典型的形态学特点外, 其肿瘤细胞还强表达CD117和CD34. 另外, 为了进一步证实病变的确为GIST, 我们还进行了c-kit基因四个外显子的扩增和突变的检测, 结果基因扩增及4个外显子的测序均成功, 所以上述的工作足以证明我们诊断的正确性. 关键的问题是他是原发的还是继发的. 当然, GIST发生于骨时, 应首先考虑胃肠道转移性或侵袭至骨. 此例经我们确诊后, 临床便进行了一系列全面的检查, 包括实质脏器的CT和MRI检查, 尤其是消化系统的电子内镜检查, 结果均未发现病灶. 那么, 是原发病灶消

失了还是骨原发的呢? 如果是原发的, 其起源又作何解释呢? 这都值得我们进一步探讨.

克隆性增生是多数肿瘤性病变的特征^[10], 通过克隆性分析技术, 即可判断一个病变的性质. PGK和AR位点的克隆性检测是基于女性体细胞组织的X染色体失活嵌合性, 即所有女性体细胞的2条X染色体中的一条在胚胎发育早期必须通过永久甲基化而随机灭活, 另一条保持遗传活性^[11]. PGK基因多态性表现为在甲基化位点下游有一个可以被BstXI识别的单核苷酸多态性位点, 酶切后可经琼脂糖凝胶电泳显示^[5]. AR基因多态性表现为其第一外显子的CAG短串联重复序列(short-tandem repeat STR)的长度不同, 即重复次数有差别($n = 11-31$), 可通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳显示^[6]. 具有多态性位点的女性个体中正常组织以及反应性增生的组织都属于多克隆性细胞构成, 显示两条带. 而肿瘤性(单克隆)病变仅显示一条带或以一条带为主^[7].

GIST是近年提出的一种间叶性肿瘤, 关于其克隆起源, 文献上未见报道. 我们曾对1例发生于腹膜的多发性GIST进行了克隆性分析, 结果证明, GIST属于单克隆性, 多发性胃肠间质瘤起源相同, 即起源于同一个细胞^[12]. 此例克隆性检测结果与其一致, 从而进一步证实了其肿瘤性本质.

4 参考文献

- 1 Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH, Weiss SW. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* 2002; 33: 459-465
- 2 Resorlu B, Baltaci S, Resorlu M, Kankaya D, Savas B. Coexistence of papillary renal cell carcinoma and gastrointestinal stromal tumor in a case. *Turk J Gastroenterol* 2007; 18: 47-49
- 3 Kaku S, Tanaka T, Ohtuka T, Seki K, Sawauchi S, Numoto RT, Murakami S, Komine K, Abe T. Perisacral gastrointestinal stromal tumor with intracranial metastasis. Case report. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2006; 46: 254-257
- 4 Gong L, Zhang W, Li YH, Li G, Zhu SJ, Tong X, Zhang YQ, Li HT, Su Q. [Fibrous dysplasia: molecular clonality analysis of 21 cases] *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2007; 36: 592-595
- 5 Gilliland DG, Blanchard KL, Levy J, Perrin S, Bunn HF. Clonality in myeloproliferative disorders: analysis by means of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 6848-6852
- 6 Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992; 51:

同行评价

本文书写规范, 层次清楚, 逻辑性强, 符合科学论文要求. 文章内容针对间质瘤性质进行了病理学特性的深入检测, 方法先进, 所得结果清晰, 图片清楚, 有较好的临床指导意义.

- 1229-1239
- 7 苏勤, 刘茜, 王淑芳. 基于X染色体基因多态性的克隆性分析技术及其应用. *中华病理学杂志* 2002; 31: 162-164
- 8 王淑芳, 刘茜, 张伟, 刘节, 苏勤. 子宫平滑肌瘤的克隆性分析. *第四军医大学学报* 2001; 22: 1576-1582
- 9 Rauf F, Bhurgri Y, Pervez S. Gastrointestinal stromal tumors: a demographic, morphologic and immunohistochemical study. *Indian J Gastroenterol* 2007; 26: 214-216
- 10 苏勤. 人肝细胞癌的癌前期病变. *诊断病理学杂志* 2003; 10: 12-115
- 11 Lyon MF. X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1972; 47: 1-35
- 12 巩丽, 张伟, 李艳红, 王旭霞, 朱少君, 韩秀娟, 苏勤. 多发性胃肠间质瘤的克隆性及其临床病理. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3001-3005

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志(国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology*)》, 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助.

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价.

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术.

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务. (常务副总编辑: 张海宁 2009-01-28)