

肺癌相关癌性脑膜炎患者脑脊液中 TP53 基因突变及其临床观察

李晓庆 黄敏 陈鑫鑫 邹月丽 燕犁天 赵辉 何俊瑛 卜暉

河北医科大学第二医院神经内科, 石家庄 050000

通信作者: 卜暉, Email: buhuimy1@163.com

【摘要】目的 观察脑脊液 TP53 基因突变在肺癌相关癌性脑膜炎中的作用。**方法** 选取 2015 年 12 月至 2018 年 12 月就诊于河北医科大学第二医院的 35 例确诊为肺癌相关癌性脑膜炎患者进行回顾性分析。所有患者均行脑脊液二代测序得出 TP53 基因为突变型或野生型, 其中 TP53 基因突变型患者有 23 例, TP53 基因野生型患者有 12 例。观察两组间患者的临床特征、脑脊液常规、生化、KPS 评分及总生存期间的差异。**结果** 两组在临床表现上均以头痛、恶心呕吐症状为主; 两组间在脑脊液压力、白细胞、生化及 KPS 评分方面均无统计学意义; TP53 基因突变型组原发灶确诊至脑膜转移平均时间明显短于 TP53 基因野生型组 (5.79 个月比 25.5 个月); TP53 基因突变型组中患者自原发灶确诊至观察终点的中位生存时间为 19.77 个月, TP53 基因野生型组中患者自原发灶确诊至观察终点的中位生存时间为 88.73 个月, 差异有统计学意义 ($P=0.043$)。**结论** 肺癌相关癌性脑膜炎患者的脑脊液中可检测到抑癌基因 TP53 的基因突变, 存在该基因突变的患者较早发生脑膜转移且中位生存期较短。

【关键词】 肺癌相关癌性脑膜炎; TP53 基因; 脑脊液

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC0904503)

DOI:10.3760/cma.j.cn112137-20190627-01425

Cerebrospinal fluid TP53 gene mutation in patients with lung cancer associated meningitis and its clinical implications

Li Xiaoping, Huang Min, Chen Xinxin, Zou Yueli, Yan Litian, Zhao Hui, He Junying, Bu Hui

Department of Neurology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Corresponding author: Bu hui, Email: buhuimy1@163.com

【Abstract】 Objective To observe the role of cerebrospinal fluid (CSF) TP53 gene mutation in lung cancer associated meningitis. **Methods** A retrospective analysis was performed on 35 patients diagnosed with lung cancer associated meningitis at the Second Hospital of Hebei Medical University from December 2015 to December 2018. All patients underwent the next-generation sequencing of CSF, and TP53 gene was found to be mutant or wild type, including 23 patients with TP53 mutant type and 12 patients with TP53 wild type. The clinical characteristics, CSF leukocyte, protein, glucose, chloride, Karnofsky performance (KPS) and overall survival were observed. **Results** Headache, nausea and vomiting were the main clinical manifestations in both groups. There were no significant differences in CSF pressure, leukocyte, biochemical indicators and KPS between the two groups. The average time from diagnosis of lung cancer to diagnosis of lung cancer associated meningitis in the TP53 mutant group was significantly shorter than that in the TP53 wild type group (5.79 months vs 25.5 months). The median survival time of patients in the TP53 mutant group from lung cancer diagnosis to the observation endpoint was 19.77 months, while it was 88.73 months in the TP53 wild type group, and the difference was statistically significant ($P=0.043$). **Conclusions** Mutation in the tumor suppressor gene TP53 can be detected in the CSF of patients with lung cancer associated meningitis. Patients with such mutation have earlier meningeal metastasis and shorter median survival time.

【Key words】 Lung cancer associated meningitis; TP53 gene; Cerebrospinal fluid

Fund program: National Key Research and Development Plan (2017YFC0904503)

DOI:10.3760/cma.j.cn112137-20190627-01425

癌性脑膜炎是指来源于原发病灶的肿瘤细胞弥漫性播散或局灶浸润至脑膜、脊膜及蛛网膜下腔,导致神经系统功能障碍,而颅内一般并无肿块形成的一种中枢神经系统转移性瘤^[1-3]。

TP53 基因是防止正常细胞变成癌细胞的一个非常重要的基因,其编码的 P53 蛋白能通过调节基因的转录以对抗癌基因信号激活、基因毒性应激和 DNA 损伤等有害因素^[4]。但当 TP53 基因发生突变,其编码的突变型 P53 蛋白则获得了促进细胞增殖,抑制细胞凋亡的功能。

TP53 基因突变在癌性脑膜炎临床特征及预后的影响目前尚罕见相关文献报道,本研究旨在观察肺癌相关癌性脑膜炎患者脑脊液中 TP53 基因突变在患者临床特征、脑脊液实验室检查及生存期的差异,以明确 TP53 基因突变在肺癌相关癌性脑膜炎中的作用。

对象与方法

1. 研究对象:选取河北医科大学第二医院 2015 年 12 月至 2018 年 12 月收治的 35 例经二代测序技术检测脑脊液中 TP53 突变状态的肺癌相关癌性脑膜炎患者,男 17 例,女 18 例,年龄 23~77 岁,中位年龄为 56 岁。根据 TP53 基因突变状态将患者分为 TP53 基因突变型组(23 例)和 TP53 基因野生型组(12 例),本研究经医院伦理委员会批准(批件号:KY20163367-1 号),所有研究对象采集脑脊液前均签署知情同意书。

2. 研究方法:采集脑脊液 10 ml,以 1 000×g 离心 5 min,然后以 -20 ℃ 储存沉淀,同时将上清液以 10 000×g 再离心 30 min。采用二代基因测序技术检测 TP53 基因的突变状态,配套试剂由美国 Life Technologies 公司提供,严格按照仪器及试剂说明操作。使用 SV-OCP143-ctDNA 基因组合(圣谷生物技术有限公司,中国北京),检测来自 143 个癌症相关基因的血浆或组织样本的体细胞突变,以 CSF 样本中 TP53 基因的变异频率 >5% 为突变阳性。

3. 统计学分析:使用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析,若为正态分布且方差齐,采用 $\bar{x} \pm s$,并用两独立样本 *t* 检验;若为非正态分布,则采用中位数(四分位间距)[$M(Q_1 \sim Q_3)$]表示,并用非参数检验;用 Kaplan-Meier 法计算生存率,用 log-rank 法检验各组生存曲线;按检验水准 $P < 0.05$ 表示差异且具有统计学意义。

结 果

一、临床资料

1. 原发肺癌组织类型:TP53 基因突变型组中腺癌患者占 73.9%(17 例),鳞癌患者占 4.3%(1 例),病理类型未确定的患者有 21.7%(5 例);TP53 基因野生型组中腺癌患者占 66.7%(8 例),病理类型未确定的患者占 33.3%(4 例)。

2. 两组间临床表现比较:两组均以大脑半球及脑膜受累引起的头痛、恶心、呕吐症状为主,头晕、意识障碍、癫痫发作等较少见,此外,少数患者还有颅神经受损和脊髓、脊神经根受损的症状及体征,具体见表 1。

表 1 TP53 基因突变型组和 TP53 基因野生型组临床特征对比[例(%)]

临床特征		TP53 基因 突变型 (n=23)	TP53 基因 野生型 (n=12)
大脑半球及脑膜	头晕	5(21.7)	4(4/12)
	头痛	20(87.0)	7(7/12)
	恶心呕吐	14(60.9)	5(5/12)
	意识障碍	1(4.3)	0
	言语不清	1(4.3)	1(1/12)
	癫痫发作	0	2(2/12)
颅神经	认知障碍	0	1(1/12)
	视神经	2(8.7)	0
	动眼神经	3(13)	1(1/12)
	三叉神经	0	1(1/12)
脊髓及神经根	肢体无力	3(13)	1(1/12)
	颈部疼痛	2(8.7)	1(1/12)
	括约肌功能障碍	1(4.3)	0
小脑	走路不稳	1(4.3)	0

3. 肺癌相关癌性脑膜炎患者基因一致性 & 异质性:35 例肺癌相关癌性脑膜炎患者中,6 例既往行基因检测,其中仅 2 例两次检测出的突变一致,其余 4 例表现出肿瘤异质性,见表 2。

二、TP53 基因突变型组及 TP53 基因野生型组脑脊液实验室检查及 KPS 评分差异分析

TP53 基因突变型组患者中,17 例患者脑脊液压力升高,约占 73.9%,其中压力 >500 mmH₂O 患者有 5 例(21.7%);脑脊液白细胞升高患者有 4 例(17.4%),脑脊液氯化物降低患者有 9 例(39.1%),脑脊液葡萄糖降低患者有 6 例(26.1%),脑脊液蛋白升高患者有 10 例(43.5%);TP53 野生型患者中,8 例(8/12)患者脑脊液压力升高,其中压力 >500

mmH₂O 患者有 2 例(2/12);脑脊液白细胞升高患者有 2 例(2/12),脑脊液氯化物降低患者有 4 例(4/12),脑脊液葡萄糖降低患者有 5 例(5/12),脑脊液蛋白升高患者有 3 例(3/12)。

表 2 6 例患者脑脊液肿瘤异质性及一致性结果

患者	既往基因检测		本次基因检测		肿瘤异质性及一致性
	样本类型	突变结果	样本类型	突变结果	
1	肺组织	EGFR	脑脊液	EGFR	一致性
2	肺组织	EGFR、TP53	脑脊液	EGFR、TP53	一致性
3	血液	EGFR	脑脊液	EGFR、TP53	异质性
4	血液	无突变	脑脊液	EGFR、TP53	异质性
5	脑脊液	无突变	脑脊液	EGFR	异质性
6	脑脊液	无突变	脑脊液	EGFR	异质性

两组间在脑脊液压力、白细胞、葡萄糖、蛋白质、氯化物及 KPS 评分方面差异均无统计学意义 ($P>0.05$),见表 3。

表 3 TP53 基因突变型与 TP53 基因野生型实验室检查指标及 KPS 评分比较

指标	TP53 基因分组		统计值	P 值
	野生型	突变型		
脑脊液压力 [mmH ₂ O, $M(Q_1\sim Q_3)$]	255 (130~400)	280 (185~500)	-0.787 ^a	0.431
白细胞 [$\times 10^6/L, M(Q_1\sim Q_3)$]	7 (3~11)	7 (2~14)	-0.055 ^a	0.956
葡萄糖 [mmol/L, $M(Q_1\sim Q_3)$]	2.88 (1.29~3.53)	2.89 (2.28~3.56)	-0.902 ^a	0.367
蛋白 [g/L, $M(Q_1\sim Q_3)$]	0.4 (0.3~0.6)	0.45 (0.17~0.67)	-0.055 ^a	0.956
氯化物(mmol/L)	121±6	120±7	0.416 ^b	0.680
KPS 评分 [分, $M(Q_1\sim Q_3)$]	70 (65~80)	70 (60~80)	-0.740 ^a	0.459

注: KPS 评分: Karnofsky 功能状态评分标准; ^aZ 值, ^bt 值

35 例肺癌相关癌性脑膜炎患者中,共有 33 例患者脑脊液细胞学发现了肿瘤细胞,阳性率为 94.3%,其中第一次发现肿瘤细胞的患者有 30 例(90.9%),第二次发现肿瘤细胞的患者有 2 例(6.1%),第三次发现肿瘤细胞的患者有 1 例(3.0%)。见图 1。

三、两组间肺癌至脑膜转移时间及生存时间差异分析

TP53 基因野生型组自原发灶确诊至脑膜转移平均时间为 25.5 个月,TP53 基因突变型组自原发

灶确诊至脑膜转移平均时间为 5.79 个月。

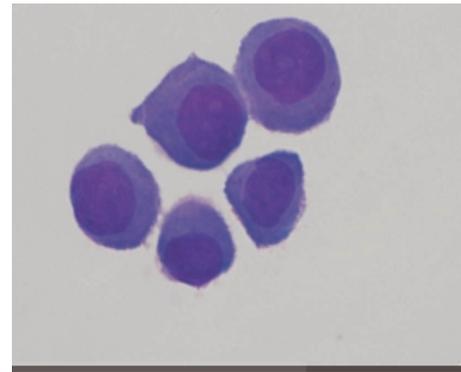


图 1 肺癌相关癌性脑膜炎脑脊液细胞学(MGG 染色 $\times 1000$ 倍)

对所有入组患者随访至 2018 年 12 月 31 日,获得患者的目前生存状态、一般情况及死亡时间,观察终点为生存期。因肺癌因素导致的患者死亡作为结果事件,将其他原因导致的死亡、失访及到截止日期仍然存活的病例按截尾数据进行处理。截止到 2018 年 12 月 31 日,TP53 基因野生型组患者中 8 例存活,4 例已死亡;TP53 基因突变型组患者中 8 例存活,13 例已死亡,2 例失访。TP53 基因野生型组患者自原发灶确诊至观察终点中位生存时间为 88.73 个月,TP53 基因突变型组患者自原发灶确诊至观察终点中位生存时间为 19.77 个月,二者差异有统计学意义 ($P=0.043$),见图 2;TP53 基因野生型组患者自癌性脑膜炎确诊至观察终点的中位生存时间为 90.28 周,TP53 基因突变型组患者自癌性脑膜炎确诊至观察终点的中位生存时间为 56.42 周,二者差异无统计学意义 ($P=0.589$),见图 3。

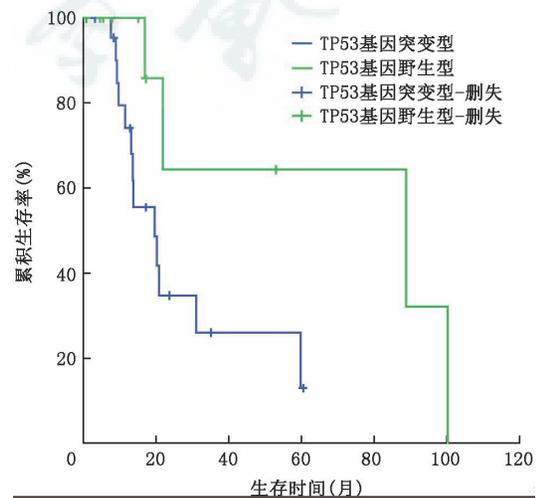


图 2 TP53 基因突变型组与野生型组患者自原发灶确诊至观察终点生存曲线 ($P<0.05$)

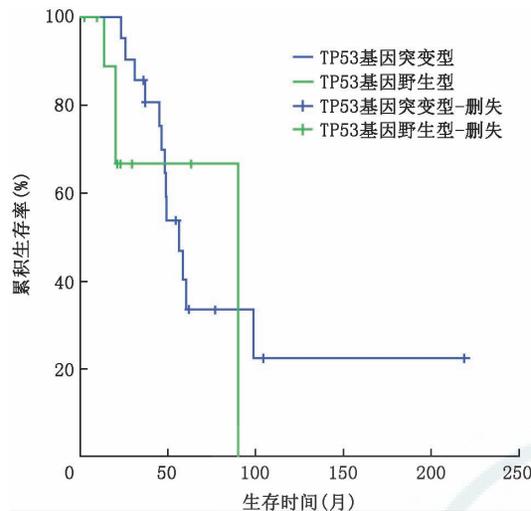


图3 TP53 基因突变型组与野生型组患者自癌性脑膜炎确诊至观察终点生存曲线 ($P>0.05$)

讨 论

癌性脑膜炎是一种中枢神经系统转移癌,由于早期特异性检查缺失及临床表现无特异性等问题,导致目前诊断仍较困难。既往研究指出^[5]癌性脑膜炎的原发癌以腺癌为主,本研究中,35 例肺癌相关癌性脑膜炎患者中,26 例病理类型确定,腺癌占 96.2%,与文献报道相符。

癌性脑膜炎的临床表现通常是多灶性的,可能涉及一个或多个神经轴段,包括:大脑(15%)、颅神经(35%)和脊髓(50%)。大脑半球及脑膜受累的最常见的临床表现包括头晕、头痛、恶心及呕吐、颈项强直、肢体瘫痪、精神行为状态改变、认知功能障碍等。本研究中,TP53 基因突变型组与野生型组均以头痛、恶心、呕吐最为常见。癌性脑膜炎中 12 对颅神经均可受损,其中第 II-VIII 对颅神经受累占比最大,本研究中,患者受累的神经有 3 对:视神经(II)、动眼神经(III)及三叉神经(V),以视力下降、视物成双、面部麻木为主要临床表现。脊髓及脊神经根受损的主要临床表现包括:肢体无力、大小便障碍、颈背部疼痛、感觉障碍等。本研究中,表现为肢体无力的患者中有 5 例,表现为颈背部疼痛的患者有 1 例。但上述症状与体征大多无特异性,需要与脊髓炎、颅内占位病变、感染性脑膜炎等疾病相鉴别。

二代测序技术(next-generation sequencing technology, NGS),同时又被称为深度测序技术,在其他相关领域,也被叫做高通量测序,其最大的优势为可同时数百万级的 DNA 片段进行测序和分

析,与基因芯片技术互为补充,演变成了一种新的高通量的工具^[6]。本研究中通过二代测序技术对 35 例肺癌相关癌性脑膜炎患者脑脊液检测了 TP53 基因的突变状态,发现 TP53 基因突变型有 23 例,突变率为 65.7%。

随着基因测序技术的不断发展和更新,肿瘤异质性越发重要,渐渐得到人们的广泛关注。肿瘤异质性是指肿瘤在增殖分化过程中,肿瘤细胞持续不间断地进行分裂增殖,其不仅从单一祖细胞进行克隆进化,获得更高的攻击性及治疗抗性,而且还可表现出分支进化,在基因表达、宏观结构、细胞学、组织病理学等方面表现有所差异,进而在对药物的耐药程度、肿瘤的侵袭力、患者的预后等方面产生一定的差别^[6-7]。肿瘤异质性可使患者对药物的敏感性发生变化,同时影响患者预后,探索肿瘤的异质性,有助于肿瘤患者的精准治疗。有证据表明,基因组的不稳定性是肿瘤异质性的主要原因,基因组的不稳定性导致了突变率的增加,并且还可以通过多种机制来促进肿瘤基因组的进化。肿瘤异质性不仅表现在同一肿瘤病灶的不同细胞间,还可表现在不同病灶间,如原发病灶及转移灶^[8]。国内有文献指出^[7],来自原发肿瘤病灶的循环肿瘤细胞的受体状态与原发病灶肿瘤细胞的受体状态存在差异,这表明肿瘤中存在异质性。在本研究中,6 例患者前后两次行基因检测,其中 2 例表现突变一致性,4 例表现突变异质性,提示在肺癌相关癌性脑膜炎患者中也存在肿瘤异质性。

TP53 是目前已知人类肿瘤中突变率最高的基因,于 1979 年被误认为一种致癌基因被发现,直至 1989 年,才证实真正起致癌作用的是突变的 TP53 基因,野生型 TP53 基因是一种防止正常细胞转变为肿瘤细胞的一种抑癌基因^[9]。TP53 基因野生型表达的 P53 蛋白可以参与细胞周期调控,降低细胞进入 DNA 合成期的可能性等作用,细胞中 P53 蛋白在正常情况下含量很低且半衰期很短,通常难以检测到。然而当 TP53 基因发生突变时,所表达的突变的 P53 蛋白丧失了正常功能。有文献指出^[10],丧失功能的 P53 蛋白,反而会加速肿瘤的发生和进展,同时为肿瘤的侵袭及其转移创造条件。其具体机制包括:(1)促进细胞运动,有助于肿瘤细胞迁移;(2)P53 蛋白失活失去了对 E-钙黏蛋白的负调控,促进肿瘤细胞的上皮间质转化,获得迁移表型;(3)使细胞不能进行失巢凋亡(是 P53 依赖性细胞凋亡的一种形式。抗失巢凋亡的肿瘤细胞在循环

中表现出较强的转移能力)。本研究中 TP53 基因野生型组原发灶向脑膜转移平均时间为 25.5 个月, TP53 基因突变型组原发灶向脑膜转移平均时间为 5.79 个月, 明显短于 TP53 基因野生型组, 提示 TP53 基因突变可能对脑膜转移起促进作用。

关于 TP53 基因对肺癌相关癌性脑膜炎预后的影响国内外尚罕见相关文献报道。TP53 基因对肿瘤预后的影响目前尚无统一的结论。Labbé 等^[11]对 105 例 EGFR 突变的非小细胞肺癌患者测定了 TP53 基因的状态, 发现首次手术后, TP53 基因的突变状态与患者的无复发生存期及总生存期无关。国外文献分析了对 133 例 1~2 期肺腺癌患者^[12], 发现无论 EGFR 突变状态如何, TP53 基因突变型组患者的总体存活率显著低于 TP53 基因野生型组患者, 提示 TP53 基因的表达特征能预测肺腺癌患者早期预后。本研究中发现, TP53 野生型组患者自原发灶确诊至观察终点的中位生存时间为 88.73 个月, TP53 基因突变型组患者自原发灶确诊至观察终点的中位生存时间为 19.77 个月, 二者间的差异有统计学意义, 提示 TP53 基因突变在缩短肺癌相关癌性脑膜炎患者自原发灶诊断至观察终点的中位生存时间上有一定影响。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Kumar SB, Pak I, Budhathoki N, et al. Targeted therapy for leptomeningeal metastases in non-small cell lung cancer -Changing treatment paradigms[J]. Chin J Cancer Res, 2017, 29(6):535-542. DOI: 10.21147/j.issn.1000-9604.2017.

- 06.08.
- [2] Pan Z, Yang G, He H, et al. Leptomeningeal metastasis from solid tumors: clinical features and its diagnostic implication [J]. Sci Rep, 2018, 8(1):10445. DOI: 10.1038/s41598-018-28662-w.
- [3] 李丹, 刘巍. 肺癌软脑膜癌病的治疗及预后因素[J]. 广东医学, 2015, (10):1621-1623.
- [4] Kandath C, McLellan MD, Vandin F, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types[J]. Nature, 2013, 502(7471):333-339. DOI: 10.1038/nature12634.
- [5] 斯晓芳. 肺癌脑膜转移的临床治疗分析[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(35):73.
- [6] O'Connor JP, Rose CJ, Waterton JC, et al. Imaging intratumor heterogeneity: role in therapy response, resistance, and clinical outcome[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(2): 249-257. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0990.
- [7] 杨琪帆, 刘洋洋, 曾玉兰, 等. 肿瘤异质性的机制、检测及临床意义[J]. 国际肿瘤学杂志, 2017, 44(12):922-925. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-422X.2017.12.010.
- [8] Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, et al. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution[J]. Nature, 2013, 501(7467):338-345. DOI: 10.1038/nature12625.
- [9] 卞春安, 李忠佑, 许有涛, 等. 突变型 P53 蛋白在肺腺癌中的表达及其临床意义[J]. 中国肺癌杂志, 2015, (1):23-28. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2015.01.04.
- [10] Powell E, Piwnica-Worms D, Piwnica-Worms H. Contribution of p53 to metastasis[J]. Cancer Discov, 2014, 4(4): 405-414. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0136.
- [11] Labbé C, Cabanero M, Korpanty GJ, et al. Prognostic and predictive effects of TP53 co-mutation in patients with EGFR-mutated non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. Lung Cancer, 2017, 111:23-29. DOI: 10.1016/j.lungcan.2017.06.014.
- [12] Yamaguchi S, Takahashi S, Mogushi K, et al. P1-1-25 TP53 mutation signature can predict prognosis of early lung adenocarcinoma[J]. Ann Oncol, 2015, 26 (suppl 7): vii107. DOI:10.1093/annonc/mdv472.05.

(收稿日期:2019-06-27)

(本文编辑:朱瑶)

·读者·作者·编者·

本刊有关文稿中法定计量单位的书写要求

本刊法定计量单位具体使用参照 1991 年中华医学会编辑出版部编辑的《法定计量单位在医学上的应用》一书。注意单位名称与单位符号不可混合使用, 如 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{天}^{-1}$ 应改为 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 组合单位符号中表示相除的斜线多于 1 条时, 应采用负数幂的形式表示, 如 $\text{ng}/\text{kg}/\text{min}$ 应采用 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式; 组合单位中斜线和负数幂亦不可混用, 如前例不宜采用 $\text{ng}/\text{kg} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式。在首次出现不常用的法定计

量单位处用括号加注与旧制单位的换算系数, 下文再出现时只列法定计量单位。人体及动物体内的压力单位使用 mmHg 或 cmH_2O , 但文中首次出现时用括号加注 ($1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ kPa}$)。正文中时间的表达, 凡前面带有具体数据者应采用 d 、 h 、 min 、 s , 而不用天、小时、分钟、秒。量的符号一律用斜体字母。