

Cochrane 系统评价方法对神经母细胞瘤分子与生物标记物的 Meta 分析

郭春宝¹ 王珊¹ 金先庆¹ 徐酉华² 李长春¹ 章均¹ 代江涛¹

【摘要】 目的 针对神经母细胞瘤已报道的生物标记进行系统评价及 Meta 分析, 评价他们在筛查、诊断、预后以及检测治疗中的临床价值。方法 对 1990 ~ 2007 年的相关文献应用定义明确的检索策略进行文献检索。运用 Cochrane 系统评价方法, 检索 Cochrane 图书馆临床对照试验资料库(2007 年第 2 期)、PubMed(1990 ~ 2007 年)、Embase(1990 ~ 2007 年) 和 Cancerlit, 应用 RevMan 4.2 软件进行统计分析。结果 共有 536 篇研究论文, 报道 208 种不同的肿瘤标记, 涉及筛查、诊断、检测及预后等 4 种临床相关的研究领域。样本量小, 统计报告质量差, 异质性大以及出版偏倚等是研究报告中存在的主要问题, 限制了数据抽出合并等定量分析处理过程。预后研究文献量相对较大, 进行 Meta 分析显示, MYCN、染色体 1p、CD44 及多药耐药等 13 种标记是潜在的重要预后判断工具。结论 系统评价是神经母细胞瘤肿瘤标记的重要研究方法, 可进一步确定一些重要的肿瘤标记, 在将来的研究及治疗策略中需引起重视。另外, 通过系统评价可以突出显示原始肿瘤标记研究中存在的普遍问题, 例如报告的异质性及质量较差。这些问题需要更适当的临床研究提供证据。肿瘤研究组织之间的合作非常重要, 可以扩大样本量, 使分析及报告标准化, 从而提高研究的质量。

【关键词】 神经母细胞瘤; 生物学标记

Full-scale investigation of tumor markers in neuroblastoma using systematic review. GUO Chun-bao, WANG Shan, JIN Xian-qing, et al. 1, Department of Solid Surgical Oncology, Children's hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China. 2, Department of Hematological Oncology, Children's hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China

【Abstract】 Objective The aim of this study was to conduct a systematic review, and if possible meta-analyses, of biological tumor markers described in neuroblastoma and to evaluate their clinical value for the screening, diagnosis, prognosis, and monitoring of patients. **Methods** A well-defined, reproducible search strategy was used to identify the relevant literatures from 1990 to February 2007 within Cochrane library and the three on-line bibliographic databases Medline, Embase, Cancerlit. **Results** A total of 536 papers studying the use of 208 different tumor markers in neuroblastoma were identified. Small sample sizes, poor statistical reporting, large heterogeneity across studies, and publication bias limited meta-analysis to conduct but the area of prognosis. There are 13 markers including MYCN, chromosome 1p, and multidrug resistance identified as potentially important prognostic tools. **Conclusions** This systematic review has identified some general problems in particular poor and heterogeneous reporting across tumor marker studies up to now. The review also highlighted some of the prognostic markers in neuroblastoma, which should be considered in future research and need to conduct better clinical interpretation and enable more appropriate evidence-based reviews in the future. In order to enable bigger sample sizes collaboration of cancer research groups is needed, standardize methods of analysis and reporting is the most important methods and criteria during the collaboration.

【Key Words】 Neuroblastoma; Biological markers

作者单位: 重庆医科大学附属儿童医院(400014)。1, 肿瘤外科; 2, 血液科。通讯作者: 王珊, E-mail: gchunbao@yahoo.com.cn。本课题为国家自然科学基金重点项目资助项目(项目编号: 30330590)

神经母细胞瘤是一种原始神经管嵴的肿瘤,是儿童最常见的颅外实体肿瘤,约占儿童肿瘤的8%~10%,表现为临床与生物行为变化多,恶性程度高,预后很差。I期、II期、4S期肿瘤及1岁内发病者预后较好,部分可自行退化,年龄大于1岁且存在转移的病人总体生存率仅10%~20%^[1]。最近通过基础与临床研究确定了许多与神经母细胞瘤相关的遗传学及生物学标记,这些标记的获得可以帮助筛选病人,早期诊断,预测预后和对肿瘤分层,从而进行适当的治疗。许多预后研究也已经确定多种肿瘤标记物与神经母细胞瘤的总体生存率及无瘤生存率有关。包括MYCN拷贝数、倍数性、删除,染色体1p杂合子丢失以及获得染色体17q等等。对预后标记的知识同样可以帮助理解这种疾病的起源。然而,目前很难确定哪一种标记物最有效,这也表明了肿瘤复杂的本性以及尚缺少大样本的临床研究^[2]。本研究的目的在于系统分析肿瘤的分子和生物学标记,建立以证据为基础的分析,扩大研究规模,提高证据的质量并应用合适的定量方法进一步分析,从而评价他们在筛选、诊断、预后判断及病人检测中的意义,帮助确定最有用的肿瘤标记物。

材料与方 法

一、搜索策略

本研究搜索了3种在线文献数据库Medline、Embase、Cancerlit及Cochrane图书馆1990~2007年所有相关文献。经过应用不同关键词组合反复搜索实验,应用3类重要的关键词确定最佳搜索策略。
 ①疾病:神经母细胞瘤;
 ②临床领域:包括筛查、诊断、检测及预后4个领域儿童肿瘤临床应用的标记;
 ③肿瘤标记:包括已经命名的标记,通过以前研究确认具有潜在重要性。一篇论文无论何处出现“神经母细胞瘤”、“肿瘤标记”、“临床领域”中的一词,此论文就被纳入进行分析。

由两位具有系统分析及Meta分析经验的研究者独立进行论文的分析。每位研究者通过阅读摘要将文章归类于相关、不确定、不相关3类。两位研究者就评价进程及文献评估定期会晤,检查所有不确定类的研究文献摘要,最终达成一致,对仍不确定的文献通过通读全文最终决定纳入或排除。

二、纳入与排除标准

纳入标准:纳入系统评价的研究论文,必须提供

定量结果或对个体病人数据列表显示的原始研究。研究中对年龄没有限制。按照临床领域将论文分为4类:①筛查:应用肿瘤标记对健康人群筛查;②诊断:肿瘤标记的诊断价值;③预后:在特定的随访时间内,肿瘤标记水平与病人疾病预后有关;④监测:肿瘤标记在随访检查中与疾病的状态有关。

排除标准:仅报道实验室工作,发现新标记的方法学、动物研究结果等在本研究中被排除。综述文章及非英文文献也排除在外。肿瘤组织学特征(例如报道分化的神经节)同样排除在肿瘤标记的研究之外。

信息提取:从纳入的论文中提取应用的肿瘤标记以及领域(筛查、诊断、预后、监测)。在每篇论文提取的相关预后变异信息中,看生存是总生存率还是无病生存率、肿瘤标记截断值水平以及高水平与低水平病人亚组病人死亡数量。对病人年龄与肿瘤分期(为影响临床预后重要的病理变量)同样进行记录。

三、Meta分析

Meta分析合并所有搜索到的文献结果。筛查、诊断、监测3个领域针对某一标记的论文超过3篇时进行Meta分析,因预后研究领域有众多相关研究,Meta分析在相关论文超过10篇时进行。对于临床相关的亚组病例,如年龄小于4岁或IV期病人同样考虑进行Meta分析。对于预后研究论文Meta分析,危害比(hazard ratio,HR)及其变量范围提供了两组之间死亡/疾病复发的相对风险估计,是统计的重要目标。

一篇论文常常提供未调整与调整的结果(如调整年龄与疾病分期),并涉及超过一个标记的总生存率与无病生存率。可以应用Parmar的方法估计HR与其变化范围,并在单一标记定义的两组之间比较总生存率与无病生存率。应优先考虑未调整的结果,因为调整的结果很可能具有高度不一致性,只有未调整的结果不存在时才考虑调整的结果。

结 果

一、文献搜索结果

我们在Medline确定了1761篇文章,由两个研究者分类,共有428篇论文分类为相关,并且在本研究中进行系统分析,所有论文的列表可在网上获得。另外,本研究还分别检索Embase和cancerlit,没有发现遗漏的论文。检索的主要数据库及领域见表1。

表 1 检索的主要数据库及领域

数据库	关键词	领域	论文数(篇)
PubMed	Neuroblastoma marker	diagnosis	1761
		prognosis	356
		screening	961
		monitoring	45
Cochrane	Neuroblastoma	临床试验	110
		Cochrane 评价	1

结果显示,536 篇论文中,有 208 种不同肿瘤标记报道与筛查、诊断、预后、监测神经母细胞瘤有关。55 篇论文相关筛查,322 篇相关诊断,289 篇相关预后,56 篇相关监测,226 篇论文与两种以上领域相关。

二、筛查

系统评价确定了 55 篇论文报道应用肿瘤标记进行筛查的定量数据。这些论文覆盖的地域有奥地利、加拿大、法国、德国、日本、英国等。研究揭示了多种结果,包括①可行性;②假阳性与假阴性数量;③发病率;④分期分布;⑤死亡率。对于发病率、分期分布、死亡率等指标,已有许多实验通过筛查与未筛查人群之间的对照着手研究,结果存在较大的异质性,所以不能实现定量分析。

三、诊断

目前论文报道的结果大部分仅比较阳性/高水平标记与阴性/低水平标记病人数量,病人的标记水平很少与健康对照组比较,所以从诊断性研究中获得的资料不能进行 Meta 分析。如 22 篇论文中没有报道诊断时病人的血清乳酸脱氢酶水平与健康对照组的比较。临床实践表明,尿儿茶酚胺类是与小圆细胞肿瘤鉴别诊断相关的重要因子,但目前报道的文献质量差,不能进行定量评价。

四、预后

本研究对选出论文均大于 10 篇的最常见的预后标记进行深入分析,以判断其评价预后的价值。共 13 种标记,289 篇论文,占预后论文总数的 79.8%。

由于报道、分析及结果说明存在弱点,仅 189 篇可以抽出其 HR 与可信区间。因为临床和统计因素变异大,189 篇中,进行 Meta 分析还受到限制。例如 MYCN,98 篇论文可以抽出 HR 与可信区间,但涉及 11 个不同的截断值,9 个不同的分期组,4 个不同的年龄组,17 个调整与 77 个未调整结果以及 2 种不同的预后结果。治疗类型及标记检测方法没有记录,

但如果考虑在内,很可能增加额外的异质性。

尽管研究中隐含巨大的异质性,仍然有必要就总生存率、无病生存率进行 Meta 分析,以决定哪一种是将来的最重要的潜在标记物(结果见表 2)。并将其划分为 3 类标记组:DNA 或染色体异常,生物学标记和尿儿茶酚胺类。大多数标记在预后判断中具有统计学意义。如在 MYCN 扩增与总生存率、无病生存率之间有显著统计学差异,死亡风险为 5.68 倍,在 MYCN 扩增与否的病人之间比较,无病生存风险为 4.66 倍。

表 2 与预后相关的肿瘤标记物及研究论文

类型	肿瘤标记物	研究论文数(篇)
DNA 或染色体异常	MYCN	158
	DNA index	46
	Chromosome 1p	48
尿儿茶酚胺类	VMA	36
	HVA	28
	VMA:HVA	26
	Dopamine	17
生物学标记	CD44	12
	TrkA	16
	NSE	28
	LDH	29
	Ferritin	53
	MRP	23

五、监测

本评价确认 56 篇论文提供了连续应用肿瘤标记帮助临床管理病人的定量资料,在肿瘤标记物类型、结果(OS 和 DFS)、统计学方法和结果、随访时间、病人数量、年龄/分期分布等方面具有相当的异质性,加上论文数量相对较少,Meta 分析的价值不大。

讨 论

神经母细胞瘤是一种多面性疾病,生物与遗传学标记的不断增多表明肿瘤的发展存在复杂变化。许多研究试图确定敏感性高、特异度高的标记物在诊断、筛查、预后等领域的重要价值。但单独的研究涉及的病例数较少,代表性差,系统分析能够发现单独研究所不能揭示的潜在问题,可以辨别将来研究的重要方向,因而非常重要,是评价已有证据的最好方式。以神经母细胞瘤肿瘤标记物研究为基础的评价是本论文的重要信息,可以帮助确定神经母细胞

瘤肿瘤标记物,并形成进一步研究的知识基础^[3,4]。

本文所用搜索策略可以确定主要的研究文献。由于出版及报告的偏差,本文还不能达到最广泛收录。我们最初搜索关键词包括标记物的名称,但存在标记物遗漏的现象。我们采用一般术语,例如“标记物”,再从文献中手工筛查,可以限制丢失的标记物。在这篇系统分析中,我们对1761篇论文分类,最终确定536篇相关论文,检查了收录论文的参考文献,来确定3种数据库中丢失的论文。这种方法不能扩大文献数量,也不能系统检查论文间重复的病例。为减少偏差,本研究仅纳入英语语种的论文。

分析纳入研究的论文发现,研究目的、方法学、数据分析及报告质量方面存在较大的差异性。异质性明显及质量差的研究报告限制了对这些研究报道的定量分析及全面的临床评价。许多研究报道不能抽出足够的数据进行对比,截断值的异质性及其他测量限制了研究之间以及特定亚组(例如年龄小于1岁的患者)之间肿瘤标记的评价,这也是文献之间出版差异的问题。McShane LM^[5]提出了评价预后因子的重要指导方针,我们也同样提出了设计与报道肿瘤标记的一般原则,严格按照循证医学的相关要求设计实施,接受临床试验注册中心的监控,对操作与主要技术指标标准化,提高统计学报告的科学性,对原始论文评价单一标记并确定联合标记的好处,使以证据为基础的系统分析得以进行。

我们的定性评价表明,许多结论存在相当的不确定性,例如以人口为基础的筛查是否有效,如果有效,最佳年龄是多少?最佳筛查策略是什么(如单阶段或多阶段等)?因为目前还没有足够证据支持早期筛查(早于6个月)的好处,大多数作者认为这样的研究应当停止。检测性研究应报道在复发肿瘤与保持无病状态病人之间系列标记测量的差别,最好是大样本长时期随访研究。可能的话,研究组之间可合作利用资源扩大病人数量,达成研究的一致性,只有这样,才能对肿瘤标记进行筛查、诊断、检测,得出更准确的结论。另外,已经证明尿中儿茶酚胺代谢产物检测有助于诊断其他小圆细胞肿瘤。但少数研究发现,儿茶酚胺代谢产物在对照组与病例组之间差别不明显,将来的研究应引起注意。本次分析中没有纳入临床与病理组织学特征,包括诊断时年龄、肿瘤病理、肿瘤原发部位等,虽然已经证明临床病理特征对诊断有意义^[6]。将特定肿瘤标记物与生存率相联系建立预后判断的依据是重要研究方向。本系统分析对最常见的单个标记在预后判断中的价值进行了评

价,并证明是潜在的预后预测工具。因报告的问题以及研究间临床统计因素的不均一性,对研究结果的合并必须谨慎。目前发现许多重要生物标记很可能互相联系,单个标记在预后判断中价值有限,重要生物标记必须组合起来评价才能提高诊断效能。

另外,在系统评价的基础上利用合并临床数据,扩大病人数量进行分层分析是可行的,可以比较病人亚组、个别标记物,评价任何标记物组合之间的差别,包括所有确切的标记物量化使评价亚组之间的信息(年龄,疾病分期)变得方便和可能。实际上,大的多中心研究已经开始评价染色体17q的价值以及其他重要的预后标记物,这些研究结果将使临床医生清楚地明白哪些是最有用的预后影响因子^[6]。

总之,本系统评价强调了肿瘤标记物临床价值的不确定性,反映了许多研究样本较小,统计学报告质量差。肿瘤标记物的多因素与复杂性需要研究者之间的协作,可以通过肿瘤研究组之间的合作,利用多实验室对方法、分析、报告标准化。大的多中心协作研究应达成协议,特别是前瞻性计划的混合分析,这种策略可以最大限度保证定量分析,从而提出哪一种标记物组合将提供最好的预后判断效果。

参 考 文 献

- 1 McGregor LM, Rao BN, Davidoff AM, *et al.* The impact of early resection of primary neuroblastoma on the survival of children older than 1 year of age with stage 4 disease: the St. Jude children's research hospital experience [J]. *Cancer*, 2005, 104(12): 2837-2846.
- 2 Hsu WM, Jen YM, Lee H, *et al.* The influence of biologic factors on the surgical decision in advanced neuroblastoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2006, 18: 223-244.
- 3 McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, *et al.* Statistics subcommittee of the NCI-EORTC working group on cancer diagnostics. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(36):9067-9072.
- 4 Kyzas PA, Loizou KT, Ioannidis JP. Selective reporting bias in cancer prognostic factor studies [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(14):1043-1055.
- 5 Kyzas PA, Denaxa-Kyza D, Ioannidis JP. Quality of reporting of cancer prognostic marker studies: association with reported prognostic effect [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99(3): 236-43.
- 6 Riley RD, Heney D, Jones DR, *et al.* A systematic review of molecular and biological tumor markers in neuroblastoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(1):4-12.

Meta分析

作者: 郭春宝, 王珊, 金先庆, 徐西华, 李长春, 章均, 代江涛
作者单位: 郭春宝, 王珊, 金先庆, 李长春, 章均, 代江涛 (重庆医科大学附属儿童医院肿瘤外科, 400014), 徐西华 (重庆医科大学附属儿童医院血液科, 400014)
刊名: 临床小儿外科杂志 **ISTIC**
英文刊名: JOURNAL OF CLINICAL PEDIATRIC SURGERY
年, 卷(期): 2008, 7(1)
被引用次数: 1次

参考文献(6条)

1. McShane LM; Altman DG; Sauerbrei W Statistics subcommittee of the NCI-EORTC working group on cancer diagnostics. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies 2005 (36)
2. Hsu WM; Jen YM; Lee H The influence of biologic factors on the surgical decision in advanced neuroblastoma 2006
3. McGregor LM; Rao BN; Davidoff AM The impact of early resection of primary neuroblastoma on the survival of children older than 1 year of age with stage 4 disease: the St. Jude children's research hospital experience 2005 (12)
4. Riley RD; Heney D; Jones DR A systematic review of molecular and biological tumor markers in neuroblastoma 2004 (01)
5. Kyzas PA; Denaxa-Kyza D; Ioannidis JP Quality of reporting of cancer prognostic marker studies: association with reported prognostic effect 2007 (03)
6. Kyzas PA; Leizou KT; Ioannidis JP Selective reporting biases in cancer prognostic factor studies 2005 (14)

相似文献(4条)

1. 学位论文 陈新让 肾母细胞瘤血清蛋白质标记物检测与分期模型构建研究 2007

背景与目的:

肾母细胞瘤是儿童最常见的恶性肿瘤之一, 全世界15岁以下儿童的发病率约为1/10, 000。德国医师Wilms于1899年首次报告此病, 因此多数作者称之为Wilms瘤。肾母细胞瘤是小儿最常见的由肾胚基发生的恶性肿瘤, 2岁以下发病率最高。儿童恶性肿瘤的死亡率由20世纪80年代的8%上升到了10.7%, 小儿肾母细胞瘤已经成为小儿病死的主要原因之一。肾母细胞瘤的临床病理分期和治疗方法的选择与患儿预后直接的关系, NWTs在其2001年的总结中提到: 在目前的影像学技术条件下(依靠CT等)仍有7.0%的漏诊率, 主要是直径小于3 cm的肾母细胞瘤。而表面增强激光解析离子化飞行时间质谱技术(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization time of flight Mass Spectrometry, SELDI-TOF-MS)是近年发展起来的一种新的蛋白质组学技术, 具有快速、简便、高通量及对多样本平行检验的优点, 质谱技术及生物信息学方法的出现提供了有效筛选特异性标记物的方法。CIPHERgen公司研发的SELDI-TOF-MS技术是一项全新的蛋白质组学研究方法, 该技术通过应用少量天然蛋白质提取物来进行快速分析, 克服了传统分析方法的局限性。具有样品用量小、操作简便、灵敏度高、高通量等优点, 已成功将其应用于卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、直肠癌等恶性肿瘤的诊断、肿瘤标志物的筛选及其他蛋白质组学研究中。本组应用该技术在肝癌, 甲状腺癌及肾母细胞瘤前期研究中获得满意效果。应用SELDI-TOF-MS技术结合生物信息学和支持向量机(support vector machine, SVM)方法, 筛选出肾母细胞瘤患儿特异性蛋白质标记物, 建立肾母细胞瘤临床分期血清蛋白质指纹图谱模型并与CT分期进行对照分析。

材料与与方法:

(1) 血清标本共80例均来自郑州大学第一附属医院小儿外科, 其中术前肾母细胞瘤30例, 其它小儿腹恶性肿瘤30例(神经母细胞瘤16例, 肝母细胞瘤4例, 肾横纹肌瘤4例, 恶性畸胎瘤4例, 胰母细胞瘤2例), 正常对照组20例均来自体检的健康小儿。

(2) 样本冰融, 4℃10000 rpm离心2 min; 取96孔板, 放冰盒上, 每孔加U9 (9M Urea, 2% CHAPS, 1% DTT) 10 μl, 血清5 μl, 4℃层析柜600 rpm振荡30 min; 振荡结束前15 min做芯片预处理, 芯片装入Bioprocessor中并记下芯片号; 每孔加NaAc(100mM, pH4) 200 μl, 层析柜中600 rpm, 5min, 重复1次; U9处理后96孔板放冰上, 快速加入NaAc 185 μl在层析柜中6000 rpm振荡2 min; 加已处理好的样本100 μl到芯片, 层析柜4℃600 rpm振荡1 h, 甩干, 重复3次; 用hplc水200 μl洗2次快速甩干; 用50%饱和的SPA 1 μl重复2次; 上机检测; 将芯片放入CIPHERgen读谱仪中检测。

(3) 用protein chip software 3.1做校正, 使总离子的强度及分子量均一化。应用ZUCI-Protein Chip Data Analyze System软件包进行分析。原始数据用离散小波(undecimated discrete wavelet transform)分析去除噪音, 并减掉基线。聚类分析以10%为最小阈值, 将各个样本中m/z的差异小于0.3%的峰聚为一类。支持向量机(support vector machine, SVM)特征向量的选取采用统计过滤结合模型依赖性筛选的方法建立判别模型, 用留一法交叉验证作为评估模型判别效果。

(4) 统计学分析所有的蛋白质谱原始数据经过过滤掉信噪和聚类分析处理后, 对所有初步筛选出的质谱峰做Wilexon秩和检验, 选出p值最小的10个峰进一步分析。将10个峰的任意组合(共175种组合)用于支持向量机模型的输入, 用留一法评估模型的预测效果, 检验标准设α=0.01

结果1. 肾母细胞瘤 I 肾母细胞瘤和肾母细胞瘤 II 期组肾母细胞瘤 I 期组和肾母细胞瘤 II 期的质谱经过初步过滤筛选得到483个M/Z峰, 对其相对强度做Wilexon秩和检验分析得到P值小于0.01的M/Z峰5个, 从差异显著蛋白质峰的任意组合中, 采用SVM筛选出预测值的约登(youden)指数最高的组合模型, 筛选出M/Z位于7965.4、5022.4和8469.6的标志物3个, 在肾母细胞瘤 II 期低表达, 在肾母细胞瘤 I 期高表达。联合两个潜在标记物作为输入值, 用留

一法交叉检验,在测试集上判别模型的敏感性为100%,特异性为100%。2. 肾母细胞瘤 I 肾母细胞瘤和肾母细胞瘤 III 期组肾母细胞瘤 I 组和肾母细胞瘤 III 期的质谱经过初步过滤筛选得到496个M/Z峰,对其相对强度做Wilcoxon秩和检验分析得到P值小于0.01的M/Z峰4个,从差异显著蛋白质峰中的任意组合中,采用SVM筛选出预测值的约登(youden)指数最高的组合模型,筛选出M/Z位于4263.1、4122.8、4330.7和4303.7的标志物4个,在肾母细胞瘤 III 期组低表达,在肾母细胞瘤 I 期高表达。联合两个潜在标记物作为输入值,用留一法交叉检验,在测试集上判别模型的敏感性为100.00%,特异性为100.00%。

3. 肾母细胞瘤 I 肾母细胞瘤和肾母细胞瘤 IV 期组肾母细胞瘤 I 组和肾母细胞瘤 IV 期的质谱经过初步过滤筛选得到565个M/Z峰,对其相对强度做Wilcoxon秩和检验分析得到P值小于0.01的M/Z峰4个,从差异显著蛋白质峰中的任意组合中,采用SVM筛选出预测值的约登(youden)指数最高的组合模型,筛选出M/Z位于10836.6和8179.1的标志物2个,在肾母细胞瘤 IV 期低表达,在肾母细胞瘤 I 期高表达。联合两个潜在标记物作为输入值,用留一法交叉检验,在测试集上判别模型的敏感性为88.89%,特异性为100.00%。

4. 肾母细胞瘤 II 肾母细胞瘤和肾母细胞瘤 III 期组肾母细胞瘤 II 期和肾母细胞瘤 III 期的质谱经过初步过滤筛选得到490个M/Z峰,对其相对强度做Wilcoxon秩和检验分析得到P值小于0.01的M/Z峰3个,从差异显著蛋白质峰中的任意组合中,采用SVM筛选出预测值的约登(youden)指数最高的组合模型,筛选出M/Z位于5019.2和4143.2的标志物2个,在肾母细胞瘤 III 期组低表达,在肾母细胞瘤 II 期高表达。联合两个潜在标记物作为输入值,用留一法交叉检验,在测试集上判别模型的敏感性为88.89%,特异性为100.00%。

5. 肾母细胞瘤 III 肾母细胞瘤和肾母细胞瘤 IV 期组肾母细胞瘤 III 期和肾母细胞瘤 IV 期的质谱经过初步过滤筛选得到508个M/Z峰,对其相对强度做Wilcoxon秩和检验分析得到P值小于0.01的M/Z峰20个,从差异显著蛋白质峰中的任意组合中,采用SVM筛选出预测值的约登(youden)指数最高的组合模型,筛选出M/Z位于7976.5的标志物1个,在肾母细胞瘤 IV 期组低表达,在肾母细胞瘤 III 期高表达。联合两个潜在标记物作为输入值,用留一法交叉检验,在测试集上判别模型的敏感性为100.00%,特异性为100.00%。

6. 肾母细胞瘤 II 肾母细胞瘤和肾母细胞瘤 III+IV 期组肾母细胞瘤 II 期和肾母细胞瘤 III+IV 期的质谱经过初步过滤筛选得到504个M/Z峰,对其相对强度做Wilcoxon秩和检验分析得到P值小于0.01的M/Z峰12个,从差异显著蛋白质峰中的任意组合中,采用SVM筛选出预测值的约登(youden)指数最高的组合模型,筛选出M/Z位于8194.4的标志物1个,在肾母细胞瘤 IV 期组低表达,在肾母细胞瘤 III 期高表达。联合两个潜在标记物作为输入值,用留一法交叉检验,在测试集上判别模型的敏感性为93.75%,特异性为100.00%。

7. 肾母细胞瘤 I+II 肾母细胞瘤和肾母细胞瘤 III+IV 期组肾母细胞瘤 I+II 期组和肾母细胞瘤 III+IV 期的质谱经过初步过滤筛选得到519个M/Z峰,对其相对强度做Wilcoxon秩和检验分析得到P值小于0.01的M/Z峰3个,从差异显著蛋白质峰中的任意组合中,采用SVM筛选出预测值的约登(youden)指数最高的组合模型,筛选出M/Z位于4153.9、3257.6和3290.7的标志物3个,在肾母细胞瘤 III+IV 期低表达,在肾母细胞瘤 I+II 期高表达。联合两个潜在标记物作为输入值,用留一法交叉检验,在测试集上判别模型的敏感性为83.33%,特异性为93.75%。

8. 临床各分期的对照:通过肾母细胞瘤早期诊断模型中的2个m/z(6984.4, 6455.5)血清标记物进行分析得出肾母细胞瘤各期情况如下:IV 期相对于 III 期低表达;III 期相对于 II 期低表达;II 期相对于 I 期低表达;I 期相对于正常儿童低表达;后者相对高表达;临床分期越晚M/Z强度就越低表达。

9. 盲法验证CT与蛋白质芯片分期的准确性:蛋白质芯片分期如下:I 期6例,II 期10例,III 期10例,IV 期4例,30例肾母细胞瘤各期均与病理分期相一致,各期符合率均为100.00%,CT分期与手术病理分期的对照:各期均被手术及病理所证实CT把病理 III 期1例列入 II 期,把病理 IV 期1例列入 III 期,各期符合率依次为100.00%,85.00%,85.00%,75.00%。

2. 外文期刊 [Sakakibara. M. Koizumi. S. Saikawa. Y. Wada. H. Ichihara. T. Sato. H. Horita. S. Mugishima. H. Kaneko. Y. Koike. K Membrane-type matrix metalloproteinase-1 expression and activation of gelatinase A as prognostic markers in advanced pediatric neuroblastoma.](#)

BACKGROUND: Recently a novel membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT-MMP-1) was discovered to be a specific activator of progelatinase A, and was correlated with tumor invasion. To the authors' knowledge, no information regarding the expression of MT-MMP-1 has been reported in childhood malignancies. In this study, the authors attempted to elucidate the specific mechanisms that underlay the invasive behavior of neuroblastoma (NB) cells with respect to the expression of MT-MMP-1 and its determined prognostic value, especially in pediatric patients with advanced Evans' Stage IV NB. METHODS: Thirty specimens from surgically excised NB (mainly Stage IV) were collected retrospectively. The total levels of progelatinase A (68 kilodaltons [kD]) and its activated form (62 kD) in the tumor lysates were quantified by gelatin zymography. The expression of MT-MMP-1 was estimated by immunostaining with a monoclonal antibody (113-5B7). RESULTS: Progelatinase A and the activated form were detected in each of the 30 specimens. The gelatinase A activation ratio, 62 kD/(62 kD + 68 kD), strongly correlated with the high levels of MT-MMP-1 expression found in specimens of advanced tumor stage. In the patients with advanced Stage IV NB, the activation ratio was strongly associated with unfavorable clinical outcome; the 5-year survival was 88.9% in the patients with a low activation ratio (< or = 26%) versus only 21.2% in the patients with a high activation ratio (> 26%). CONCLUSIONS: Gelatinase A activation correlates with high expression of MT-MMP-1 on NB cells and is associated strongly with advanced stage and poor clinical outcome. These results are consistent with the notion that MT-MMP-1 expression is an important prognostic determinant of the biologic behavior of NB.

3. 外文期刊 [Combaret V. Bergeron C. Brejon S. Iacono I. Perol D. Negrier S. Puisieux A Protein chip array profiling analysis of sera from neuroblastoma patients.](#)

Neuroblastoma, the most common extracranial solid tumour in children, is characterised by highly heterogeneous clinical behaviour: patients are stratified into risk categories according to a combination of clinical and biological markers. However, identifying non-invasive prognostic markers predicting outcome independently from current risk-stratification features remains critical for better disease monitoring. Using the SELDI-TOF-MS technology (surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry), we found a serum biomarker that strongly correlates with prognosis in neuroblastoma patients. Subsequent peptide mapping identified this biomarker as SAA protein. In support of this observation, high SAA levels were detected by ELISA in the sera of patients with poor prognosis neuroblastoma. Based on this finding, promises and limitations of the approach are discussed.

4. 学位论文 [王弘 p53诱导基因Unc5H4在神经母细胞瘤发生发展的作用机制](#) 2008

本研究将进一步证实Unc5H4可作为新型的具有独立预后指示作用的神经母细胞瘤标志物。

良性神经母细胞瘤中有高Unc5H4表达的现象提示该基因具有诱导肿瘤细胞凋亡的功能,而p53是已知的重要肿瘤抑制基因,在人类半数以上肿瘤中均有p53基因的突变[7]。在致癌因素存在时,细胞通过转录或转录后水平激活内源性p53的表达,而上调的p53又反过来在转录水平调节具有p53结合位点的目的基因的表达从而发挥肿瘤抑制作用。本研究致力于Unc5H4的条件性肿瘤抑制功能与p53关系的研究,以期发现新型p53诱导基因及凋亡信号传导途径。

人体是复杂的有机整体,发育中基因表达的多样性,信号传导通路的错综复杂使神经母细胞瘤的研究更加深奥。依赖性受体和条件性肿瘤抑制基因的概念是近年研究的重大发现,而在神经母细胞瘤中发现和证实该种基因的存在为进一步揭示神经母细胞瘤的特殊生物学行为提供了全新和深入的理论依据,在神经系统发生发育过程中,Unc5H4家族成员在有Netrin-1蛋白分泌区域能够诱导神经细胞存活、分化及轴突的延伸,但随着优化筛选后,机体通过抑制Netrin-1蛋白的分泌,而仅依靠Unc5H4基因的独立表达诱导那些未能建立轴突联系的神经细胞发生凋亡,凋亡的延迟或消失则导致肿瘤发生。而神经母细胞瘤中p53基因的失活、Unc5H4基因的突变或Netrin-1基因的持续表达均可造成肿瘤的发生发展,重建p53、Unc5H4基因功能,抑制Netrin-1蛋白分泌等理论上均可抑制神经母细胞瘤的发生发展,因而明确Unc5H4所激活的不同信号传导通路有利于从分子水平揭示神经母细胞瘤的发生发展机制,并为在基因水平治疗该疾病提供有力的分子生物学基础。

方法:

一、临床部分

1、临床资料：118例原发神经母细胞瘤cDNA，其中良性神经母细胞瘤56例，Evans分期属I期、II期及IVS期，平均生存时间43.8月；恶性神经母细胞瘤62例，Evans分期属III期和IV期，平均生存时间34.7月。全部肿瘤均经术中、术后病理及分子生物学标记物确诊，患者确诊年龄为1月~14岁，平均年龄3.1岁。肿瘤标本均为初发未治。标本来源于日本千叶县肿瘤研究所神经母细胞瘤标本库，标本使用符合日本相关法律。

2、RT-PCR：采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术对32例神经母细胞瘤cDNA标本中Unc5H4及其家族同系物Unc5H1-3的mRNA进行半定量检测，以初步明确Unc5H家族成员在良、恶性神经母细胞瘤中的表达模式。32例标本中包含16例良性神经母细胞瘤、16例恶性神经母细胞瘤。以GAPDH为内参照。

3、荧光定量实时PCR：118例原发神经母细胞瘤标本cDNA已制备完成。制备标准曲线样品。标准曲线样品和待测样品分别加入到含SG的实时PCR反应液中进行实时PCR扩增和检测。检测结果进行标准曲线分析，对Unc5H4或Unc5H1/3基因进行定量。

4、Kaplan-Meier生存分析：结合临床资料及Unc5H4在某一群体中表达模式进行生存分析。

二、基础部分

1、细胞培养：人骨肉瘤来源U2OS及SAOS2细胞系在DMEM培养液中培养，人肺癌细胞系H1299及人神经母细胞瘤细胞系SH-SY5Y均在RPMI1640培养液中培养。培养基中含有10%热灭活胎牛血清，50U/ml青霉素及50μg/ml链霉素；细胞在37℃、5%CO₂平衡浓度的细胞培养箱中培养，当细胞单层生长融合率至80%时传代或进行实验。在实验所设计的时间段用终浓度1μmol/L阿霉素的相应培养基换液处理。

2、质粒转染：采用脂质体Lipofectamine2000介导转染技术，在H1299细胞中转染入p53质粒或对照空质粒；在U2OS细胞中转染入siRNAp53质粒或空质粒；在H1299细胞中转入PGL3-p53结合区质粒和p53质粒，转染方法参照相关转染试剂说明步骤。

3、细胞生存分析：将U2OS、H1299及SH-SY5Y细胞以5×10³个细胞/孔分别接种于96孔板中，贴壁过夜，然后暴露于终浓度1μmol/L阿霉素中。在阿霉素处理后的指定时间内，加入10μl染色剂，在37℃培养箱内反应1hr，然后放入酶标仪，读取570nm波长下的OD。D.值。

4、RT-PCR：参照试剂盒使用方法，在实验细胞中通过Rnasy Mini Kit提取总RNA，并用随机引物和SuperScript II逆转录酶得到cDNA。经PCR扩增的第一链来检验目的基因的表达水平。PCR扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳分离后，用溴乙锭显色。

5、蛋白质检测(Western-blotting)：收集细胞经冷1×PBS液清洗后在SDS细胞裂解液中裂解。再用蛋白检测染料测定蛋白浓度，相同蛋白含量的细胞裂解液加样于10%SDS聚丙烯酰胺电泳分离后，转移至PVDF膜，用含0.3%脱脂牛奶的TBS封闭非特异吸附，分别加入一抗抗体室温作用1hr，洗膜，并用相应二抗作用，在ECL系统显色。

6、克隆构建实验：在U2OS和H1299细胞中转染入空质粒(pcDNA3)或Unc5H4表达质粒(pcDNA3-Unc5H4)48小时后，用400μg/ml G418的培养基进行14天筛选，耐药克隆用Giemsa染色，记录克隆数目。

7、荧光素酶检测法：H1299细胞以5×10⁴细胞/孔接种于12孔板中贴壁过夜。转染体系包括100ng PGL3-启动子质粒，p53-RE1，p53-RE2，p53-RE3及p53-RE4，10ng Renilla荧光素酶标记结构及25ng p53-flag表达质粒。每一份转染所包含的质粒数为510ng，不足处以pcDNA3质粒填充，转染48小时后，裂解细胞并应用双荧光素酶检测系统进行荧光素酶活性的检测，具体步骤参照试剂盒说明。

8、染色质免疫沉淀分析法：在H1299细胞中转染空质粒或p53表达质粒，转染48小时后细胞在37℃条件下与含1%甲醛的培养液进行交联反应，得到交联的染色质后超声将其断裂为平均长度为200-800的核苷片段，应用脱氧核糖核酸/蛋白质A琼脂糖珠加以反复清洗后，对照使用正常鼠血清、实验组使用单克隆抗p53抗体进行免疫沉淀。沉降物用100μl洗提液(含1%SDS和1mM碳酸氢钠)洗提。甲醛介导的脱氧核糖核酸/蛋白质交联在65℃加热4小时条件下失效，反应物在45℃下蛋白酶K作用1小时。应用QIAquickPCR纯化试剂盒(Qiagen)纯化基因组DNA。

9、流式细胞仪检测凋亡：转染群1和#3的SAOS2细胞，应用1μg/ml ADR处理48小时，收集包括悬浮细胞在内的全部细胞。PBS清洗，-20℃ 70%酒精固定细胞，悬浮于phosphate-citrate液中，室温放置15分钟，Propidium Iodido使DNA染色，并10μg/ml Rnase A抑制RNA酶作用，暗处反应30分钟，流式细胞仪检测细胞DNA含量并应用CellQuest软件处理数据。

结果：

一、临床部分

1、Unc5H4在良性神经母细胞瘤具有高表达：应用RT-PCR法在16例良性神经母细胞瘤cDNA和16例恶性神经母细胞瘤cDNA中检测Unc5H家族成员的表达模式发现Unc5H1/3/4均在良性神经母细胞瘤中有高表达的可能，进而在118例原发神经母细胞瘤cDNA中进行荧光定量实时PCR检测，结果显示Unc5H4在良性神经母细胞瘤中较在恶性神经母细胞瘤中有高表达，差值有显著统计学意义，而Unc5H1/3则无此种表达差别。

2、在良、恶性神经母细胞瘤中Unc5H4高表达与长期临床预后相关：在118例神经母细胞瘤患儿中，良性56例，平均生存期为43.8月，而恶性神经母细胞瘤共62例，平均生存时间为34.7月，统计学处理显示，高Unc5H4表达与长期生存密切相关。

3、在恶性及有MYCN扩增的神经母细胞瘤中，Unc5H4的高表达与肿瘤患儿长期临床预后相关：同样结论在恶性神经母细胞瘤及MYCN扩增组神经母细胞瘤患儿中均显示高Unc5H4表达与长期预后相关。证明Unc5H4是一个新型神经母细胞瘤的预后指示基因。

二、基础部分

1、Unc5H4诱导细胞包括神经母细胞瘤细胞的凋亡：在U2OS细胞系及SH-SY5Y细胞系细胞中，Unc5H4的表达能诱导细胞发生凋亡。

2、Unc5H4的功能依赖于正常的p53基因功能：在阿霉素介导的DNA损伤型凋亡中，H1299细胞无p53表达，则其不能诱导Unc5H4的表达且不能诱导克隆形成减少，而含正常p53功能的U2OS细胞均能实现。此外，在U2OS细胞中敲除p53基因的表达则阻断了阿霉素诱导凋亡功能和Unc5H4的内源性表达。

3、Unc5H4是p53的直接转录目标基因：在Unc5H4内含子1序列中发现和证实了p53结合位点的存在。

结论：

1、Unc5H4在良性神经母细胞瘤中有高于在恶性神经母细胞瘤中的表达。

2、高Unc5H4表达与神经母细胞瘤的长期预后相关。

3、Unc5H4是新型的神经母细胞瘤预后指示基因。

4、Unc5H4诱导神经母细胞瘤细胞凋亡，此凋亡功能依赖于正常的p53功能。

5、Unc5H4是p53直接的转录靶向基因。

引证文献(1条)

1. 陈新让, 王家祥, 余捷凯, 郑树 基于支持向量机神经母细胞瘤血清蛋白质标记物的检测及临床应用[期刊论文]-临床小儿外科杂志 2008(2)

本文链接：http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_lcxewkzz200801002.aspx

授权使用：黔南民族师范学院(gnnzsfxy)，授权号：613ff588-4970-41e1-be85-9ed30126b4c2

下载时间：2011年4月28日