

儿童肿瘤临床分子诊断研究进展

张柳蕙 综述 吴晔明 审校

分子诊断是指对编码与疾病相关的各种结构蛋白、酶、抗原抗体、免疫活性分子基因的检测。目前儿童肿瘤的临床分子诊断主要依赖于肿瘤标志物检测。肿瘤标志物是恶性肿瘤在发生、发展过程中,由癌基因或抑癌基因和其它肿瘤相关基因及其产物异常表达所产生的一些抗原和生物活性物质。已经知道肿瘤是一种异质性疾病,其发生与细胞分化、凋亡、转移及血管生成等多种信号传导途径紊乱有关。同种表型的肿瘤可具有不同发生机制,遗传背景上也可有差异。正是基于人们对肿瘤发生发展机制的不断认识,肿瘤分子诊断技术在近二十年得到了飞速的发展,现综述如下。

一、分子诊断技术在儿童肿瘤早期诊断中的应用

肿瘤标志物的变化往往早于影像学及临床表现,特别是儿童肿瘤具有早期转移、肿瘤临床变异大和生物学行为多样性的特点,肿瘤标记物的早期检测对于儿童肿瘤有巨大临床价值。目前常用的肿瘤标志物有甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、波形蛋白(vimentin)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、神经细丝蛋白(NF)等。随着技术的发展和研究的深入,已有越来越多的肿瘤标记物被发现有助于儿童肿瘤早期诊断的潜能,如肌原细胞基因(Myod1)、肌细胞生成素(myogenin)、高温必需蛋白 A1(HTRA1)及特异性微小 RNA(miRNAs)表达谱等,因其具有较高敏感性和特异性而被视为具有前景的肿瘤标记物。

横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma,RMS)是来源于原始骨骼肌细胞的恶性肿瘤,是儿童软组织肉瘤中最常见的类型,约占 60%。RMS 在组织学、年龄、发病部位和预后上都有着巨大差异,早期诊断对提高患儿预后具有重要影响。目前免疫组织化学已经被广泛用于 RMS 的诊断以及鉴别诊断,可标记 RMS 的抗体主要有结蛋白(desmin)、肌肉特异性肌动蛋白(MSA)、平滑肌肌动蛋白(SMA)、肌红蛋白(myoglo-

bin)、肌原细胞基因(Myod1)及肌细胞生成素(myogenin)等。其中肌细胞生成素和 Myod1 被认为是比结蛋白和 MSA 更具特异性,比肌红蛋白更具敏感性的肿瘤指标。Melissa H. Cessna 等^[1]通过对 150 例包括 RMS,RMS 亚型以及其他梭形细胞瘤的临床病例进行免疫组化分析从而对 Myod1 以及肌细胞生成素临床价值进行评价,其中肌细胞生成素对 100% 的 RMS 敏感,另外在所有的梭形细胞瘤中,肌细胞生成素也对 RMS 呈高度特异性,尽管仍有 7% 的非 RMS 病例中也出现了肌细胞生成素阳性,但是表达水平明显低于 RMS。可以认为肌细胞生成素是一种 RMS 高度特异性及敏感性的肿瘤指标,对临床诊断及鉴别诊断有很大的实用价值。研究中虽然 Myod1 结果差强人意但可能考虑跟染色方法有关,但并不影响其作为 RMS 的肿瘤标记物。

miRNA 是一类广泛存在于动、植物和病毒体内的单链小分子 RNA。miRNA 不编码蛋白质,通过与靶基因 mRNA 3'端非编码区互补结合而抑制靶基因翻译或促进靶基因 mRNA 降解,是一种负性调节因子。目前已在多种肿瘤中发现存在 miRNA 调节作用的失调^[2]。Mitsuru Miyachi 等^[3]通过评估肌肉特异性 miRNAs(miR-1,-133a,-133b 和 -206)作为 RMS 肿瘤标记物的可行性,研究发现在肿瘤组织标本中,肌肉特异性 miRNAs,特别是 miR-206,在 RMS 中的表达水平高于其他肿瘤细胞。另外,RMS 患者体内肌肉特异性 miRNAs 血清水平也显著高于非 RMS 肿瘤患者。故认为血清 miR-206 表达水平可以用于鉴别 RMS 和非 RMS 患者(敏感性:1.0,特异性:0.913)。这些结果也表明了肌肉特异性 miRNAs 表达谱作为 RMS 肿瘤标志物早期诊断的巨大潜力。

HTRA1 是被认为在神经母细胞瘤(Neuroblastoma,NB)的早期诊断中有良好运用前景的一个肿瘤标记物。HTRA1 是由 HTRA1 基因编码的一种酶,HTRA1 蛋白由四个不同的蛋白质结构域构成^[4]。HTRA1 蛋白属于胰酶类丝氨酸蛋白酶家族。它可以通过裂解 IGF 结合蛋白来调节胰岛素样生长因子

(IGFs)的活性,同时它也被认为在细胞增殖与分化中起着关键作用^[5]。Elia D' Angelo 等^[6]通过 Western blot 检测 10 名节细胞性神经母细胞瘤(GNB)患儿与 50 名神经母细胞瘤患儿的组织样本中 HTRA1 蛋白的表达,发现 HTRA1 在 56/60(93.3%)的样本上有不同程度的表达:在 36/56(64.3%)的样本中呈高水平表达,在 20/56(35.7%)的样本中呈低水平表达。在 I, II 和 IVs 期病例中有更高水平的表达,而在 III, IV 期病例中则呈低表达,结果具有统计学意义($P=0.003$)。

二、分子诊断技术在儿童肿瘤危险分层中的应用

随着时代的进步,对于儿童肿瘤的分类上也从肿瘤分级,TMN 分期,扩展到对肿瘤患者全面信息综合考虑的危险分层,如在神经母细胞瘤中,可根据肿瘤分期、确诊时患儿年龄、MYCN 基因拷贝数、Shimada 组织学病理分类及 DNA 指数可将其分为低危组、中危组和高危组,从而更好地实现患儿的个体化治疗。

许多基因水平的肿瘤标记物由于对治疗及预后效果都有一定指导作用而被更多地应用于危险分层。染色体 1p 和 16q 杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)已被作为肾母细胞瘤(Wilm's tumor, WT)患者危险分层的因素之一。大量研究证明伴有染色体 16q 或 1p 杂合性缺失的儿童有更高转移扩散及死亡的风险^[7]。除此之外,当前研究发现 1q 的增加与预后差相关,可能成为新的 WT 患儿预后评估的危险因素^[8]。H. Segers 等^[9]通过对英国 331 例 WT 病例研究发现,19%(64/331)的病例有 1q 增加。1q 的增加与 16q 的丢失($P<0.001$)以及 1p 的丢失($P<0.001$)显著相关。通过对年龄、肿瘤分期、细胞间变以及常见的细胞遗传学畸变(如 1p 和 16q 的丢失)的多变量分析显示,1q 增加是 WT 预后不良的标记物,是与肿瘤分期、细胞分化程度无明显相关的一个独立的危险因素。在 RMS 中,Edoardo Missiaglia 等^[10]研究认为 PAX3/FOXO1 融合基因状态是影响横纹肌肉瘤预后的关键肿瘤标记物,并且可作为危险因素从而改进目前的 RMS 危险分层。目前也有学者认为^[11]通过运用最新的微阵技术准确地反应基因表现与神经母细胞瘤发生的关系,也许可以提供给我们更准确的风险评估,从而实现个体化治疗。

最新研究显示,miRNA 表达谱的分析也能有效地改进目前的分层方法。Ruey-Jen Lin 等^[12]研究发

现在晚期神经母细胞瘤中存在 miRNAs 表达的全面下调,并确定了 27 种 miRNAs 可以清楚地区分低危组、中危组和高危组。其中,Dicer 酶或 Drosha 酶的表达水平在高危组神经母细胞瘤呈低表达,与患者预后相关。值得注意的是,其研究发现在无 MYCN 基因扩增的 NB 患者,Dicer 酶的低表达可以作为预后不良的一个显著并且独立预测因素(危险比为 9.6, $P=0.045$, $N=52$)。miRNA 表达谱同样可以作为肾母细胞瘤化疗反应性的预测指标,从而更好地对患者进行分层。目前治疗肾母细胞瘤(Nephroblastoma)的国际儿科肿瘤学会(the International Society of Pediatric Oncology, SIOP)方案包括了术前化疗,然后并不是所有患儿能从术前化疗中同样获益。Jenny A. Watson 等^[13]应用统计学方法分析基因组范围的 miRNA 表达谱,可以清楚地区分中危组肿瘤和高危组肿瘤。一共有 29 个 miRNAs 在治疗后的中危组和高危组中表达水平显著不同。其中也包括先前认为与其他肿瘤化疗耐药相关的 miRNAs。29 个中的 7 个 miRNAs 在治疗前组织活检中就已经表现出两组间表达水平的显著不同:miR-193a, 5p, miR-27a 在高危组中水平的下降以及 miR-483, 5p, miR-628, 5p, miR-590, 5p, miR-302a 和 miR-367 在高危组中水平的上升。这样通过治疗前的组织活检检测这些 miRNAs 标志物的水平就可以对不同分层的患者选择更有针对性的治疗方案。

三、分子诊断技术在儿童肿瘤预后评估中的应用

通过客观指标进行肿瘤预后评估,可以克服凭临床经验判断预后的局限性,帮助临床医生做出治疗决策,评价疾病的防治效果,促进治疗水平的提高,并且通过研究影响疾病预后的各种因素,有助于改善并干预疾病结局。许多研究都表明,肿瘤标记物在预后评估中发挥重要作用。

半乳糖凝集素 3(galectin-3, Gal-3)是人类体内 12 种半乳糖凝集素中唯一的嵌合体型成员,可选择性识别糖结构并与之非共价结合^[14]。半乳糖凝集素 3 已被证实参与了癌症^[15]、炎症^[16]、纤维变性^[17]、心脏疾病^[18]等多种疾病过程。V Veschi 等^[19]研究发现,Gal-3 的表达与神经母细胞瘤 INPC 病理学分类($P<0.001$)及 Shimada 组织病理学分类($P=0.001$)相关,并且 GAL-3 的表达与 NB 较好的 5 年总生存率($P=0.003$)相关联。在体外,Gal-3 的表达和核内积累伴随有维甲酸诱导的 NB 细胞系的细胞分化,通过提高 Gal-3 的过表达,提高了组

组织分化水平同时抑制了肿瘤细胞的增殖。表明对 Gal-3 的免疫组化测定对临床患儿的预后评估有明显意义。

RNA 结合蛋白 Sam68 定位于细胞核,在有丝分裂期它是 Src 特异性靶蛋白,它参与细胞周期、RNA 代谢以及信号传导等方面的调节^[20]。有研究报道^[21] Sam68 的高表达及其细胞质定位与各种引起疾病恶化的危险因素显著相关。Xiaohong Zhao 等^[21]通过 Western blotting 以及逆转录 PCR 发现,在信使 RNA 和蛋白质水平, Sam68 在 NB 细胞系中表达水平明显高于无限增殖的正常上皮细胞。MTT 法检测结果显示, Sam68 的表达支持 NB 细胞的增殖。Sam68 蛋白质水平与临床分期,肿瘤组织学类型,远处转移相关。有较高 Sam68 表达的患者预后较差,而肿瘤组织中 Sam68 低表达患者预后较好。

Caveolin-1 (CAV-1) 和 Caveolin-3 (CAV-3) 是胞膜窖的主要结构蛋白,其特异性地表达于骨骼肌和心肌细胞。其中在骨骼肌细胞上, Caveolin 呈差异性分布, CAV-1 特异性地表达于卫星细胞,而 CAV-3 表达于成熟肌纤维细胞。Samson W. Fine 等^[7]通过对 24 例 RMS 病例分析,得到 88% (21/24) 的 RMS 呈 CAV-3 阳性,并且更多表现于分化程度更高的肿瘤细胞。目前 CAV-3 已被提意作为 RMS 分化程度较高的一个肿瘤标记物。而 CAV-1 在 RMS 中表达的生物学意义仍有争议。Stefania Rossi 等^[22]研究发现 CAV-1 主要表达于胚胎型横纹肌肉瘤中。胚胎型横纹肌肉瘤中的未成熟细胞表型携带有自发激活的 RAS 基因突变,与 ERK MAPK 信号通路密切相关,并且以高水平的 CAV-1 为特点,而通过抑制 ERK 通路,可以促进细胞分化并且导致 CAV-1 水平的下调。提示 CAV-1 可以作为 RMS 低分化的一个有诊断价值的肿瘤标志物。

除这些以外,如 WT 端粒酶的表达水平等也被视为肾母细胞瘤有前景的预后相关因素。

近 10 年内,关于儿童肿瘤分子诊断相关的研究越来越多,也对儿童肿瘤的治疗起到了许多推动作用。表型上相同的肿瘤在临床过程、治疗和预后效果上都截然不同,在这方面,传统的病理诊断和影像诊断则显得力不从心,但分子诊断则可以填补这一空缺,通过对肿瘤标记物,基因表型等的分析,更加细化具体化患者的危险分层,从而更好的指导临床治疗。肿瘤标记物一直都是儿童肿瘤诊断的重要组成部分,相信随着基础研究的不断深入以及新技术的出现,分子诊断领域将不断发展,从而实现儿童肿瘤的

早期诊断以及个体化治疗。

参考文献

- 1 Cessna MH, Zhou H, Perkins SL, et al. Are myogenin and MyoD1 expression specific for rhabdomyosarcoma?; A study of 150 cases, with emphasis on spindle cell mimics [J]. The American journal of surgical pathology, 2001, 25(9): 1150-1157.
- 2 Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(36): 13556-13561.
- 3 Miyachi M, Tsuchiya K, Yoshida H, et al. Circulating muscle-specific microRNA, miR-206, as a potential diagnostic marker for rhabdomyosarcoma [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2010, 400(1): 89-93.
- 4 Hu SI, Carozza M, Klein M, et al. Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage [J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(51): 34406-34412.
- 5 Clausen T, Kaiser M, Huber R, et al. HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2011, 12(3): 152-162.
- 6 D'Angelo V, Pecoraro G, Indolfi P, et al. Expression and localization of serine protease Htra1 in neuroblastoma: correlation with cellular differentiation grade [J]. Journal of neuro-oncology, 2014: 1-8.
- 7 Fine SW, Lisanti MP, Argani P, et al. Caveolin-3 is a sensitive and specific marker for rhabdomyosarcoma [J]. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 2005, 13(3): 231-236.
- 8 Gratias EJ, Jennings LJ, Anderson JR, et al. Gain of 1q is associated with inferior event-free and overall survival in patients with favorable histology Wilms tumor; A report from the Children's Oncology Group [J]. Cancer, 2013, 119(21): 3887-3894.
- 9 Segers H, Heuvel-Eibrink MM, Williams RD, et al. Gain of 1q is a marker of poor prognosis in Wilms' tumors [J]. Genes, Chromosomes and Cancer, 2013, 52(11): 1065-1074.
- 10 Missiaglia E, Williamson D, Chisholm J, et al. PAX3/FOXO1 fusion gene status is the key prognostic molecular marker in rhabdomyosarcoma and significantly improves current risk stratification [J]. Journal of Clinical Oncology, 2012, 30(14): 1670-1677.
- 11 Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn (下转第 237 页)