

文章编号 1006-8147(2018)04-0353-04

论 著

H3K27 三甲基化蛋白可作为 MPNST 的重要诊断标记物

宋紫暄¹, 李光明¹, 张 静¹, 张卫民², 杨吉龙³, 朱 泽¹

(1.天津医科大学病原生物学系, 天津 300070; 2.天津市第三中心医院输血科, 天津 300170; 3.天津医科大学肿瘤医院骨与软组织肿瘤科, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津 300060)

摘要 目的:探讨组蛋白 3 赖氨酸 27 位点的三甲基化(H3K27me3)在恶性周围神经鞘瘤(MPNST)中的表达及对预后的影响。方法:收集恶性周围神经鞘瘤病理组织标本 43 例,经福尔马林固定,石蜡包埋后,利用组织芯片技术(TMA)制成组织芯片,免疫组织化学方法检测 H3K27me3 等蛋白的表达,根据临床数据和随访信息,运用 SPSS 19.0 统计软件进行分析比较不同 H3K27me3 表达水平与患者临床病理特征之间的关系。结果:MPNST 组织芯片位点完整。H3K27me3 表达缺失组约占 65.11%,其中完全缺失组占 39.53%,部分缺失组占 25.58%,即以 H3K27me3 表达缺失为诊断依据则 MPNST 的检出率可达 65.11%,且与原诊断一致;在 39 例散发病例样本中有 43.58%完全缺失、28.20%部分缺失,4 例 NF1 相关样本 100%保留表达,即在非 NF1 相关的 MPNST 中检出率可达 71.78%。结论:检测 H3K27me3 的表达水平对 MPNST 的诊断具有良好的灵敏性和特异性,特别是在除外 NF1 相关临床背景的 MPNST 前期诊断中具有重要意义,有望成为早期诊断散发型 MPNST 的生物学标记物。

关键词 恶性周围神经鞘瘤; H3K27me3; NF1; 组织芯片

中图分类号 R73

文献标志码 A

H3K27me3 is a highly sensitive diagnostic marker for MPNST

SONG Zi-xuan¹, LI Guang-ming¹, ZHANG Jing¹, ZHANG Wei-min², YANG Ji-long², ZHU Ze¹

(1. Department of Pathogen Biology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Blood Transfusion, The Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China; 3. Department of Bone and Soft Tissue Tumor, Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300060, China)

Abstract Objective: To investigate the expression and prognostic effect of H3K27 trimethylation protein (H3K27me3) in malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST). **Methods:** A total of 43 MPNST patients were enrolled into this study. Tissue microarray (TMA) technique and immunohistochemistry (IHC) method were used for H3K27me3 immunostaining. Clinicopathologic and survival data were carefully collected. The relationship of H3K27me3 expression levels with clinical feature and prognosis of patients were compared by SPSS 19.0. **Results:** The quality of TMA was perfect and met the standard of analysis. Among all MPNST patients, 65.11% were characterized with loss expression of H3K27me3, 39.53% were with complete loss expression and 25.58% were with partial loss expression of H3K27me3. If loss expression of H3K27me3 was a diagnostic basis for MPNST, the detectable rate was 65.11%, in accordance with original diagnosis. Among the 39 sporadic MPNST patients, 43.58% were with complete loss expression of H3K27me3, and the partial loss patients were 28.20%. All of the type 1 neurofibromatosis (NF1) MPNSTs expressed H3K27me3. The detectable rate was 71.78% outside of NF1 clinical history MPNST. **Conclusion:** Immunohistochemical analysis of H3K27me3 has good sensitivity and specificity for the diagnosis of MPNST, particularly outside NF1 clinical history. Loss of H3K27me3 expression may be a sensitive marker for sporadic MPNST.

Key words malignant peripheral nerve sheath tumor; H3K27me3; NF1; tissue microarray

恶性周围神经鞘瘤(malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST)是一种罕见的高度恶性神经源性软组织肉瘤, 约占所有肉瘤的 4%^[1]; 50% 的 MPNST 继发于 1 型神经纤维瘤(NF1), 约 10% 与患

者先前的放射治疗相关^[2-3]; 截止到目前为止, 其余的 40% 尚没有明确的易感因素。MPNST 具有高度恶性, 复发率高, 转移能力强的特点, 5 年生存率为 50% 左右, 而 5 年无病生存率仅为 27%^[4-6]。MPNST 的诊断仍然是一项具有挑战性的工作, 并且由于其非特异性的形态学特征并缺乏特异性的 IHC 分子诊断标记, 使得其诊断标记并不成系统。在临床上, 当遇到已知易感因素(NF1, RT)以外的 MPNST 时, 其诊断

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81672650)

作者简介 宋紫暄(1990-), 女, 硕士在读, 研究方向: 恶性外周神经鞘瘤发病与发展的分子机制; 通信作者: 朱泽, E-mail: zhuze@tmu.edu.cn。

结果则与临床医生个体观察差异密切相关^[7],据以往复杂核型的研究报道,NF1相关的MPNST中S100在50%~90%的病例中表达阳性,或者存在频发的等位基因缺失,但这并不是这些肿瘤的特异性标记^[8-9]。MPNST的确切诊断是需要特定的临床背景下进行的,比如受NF1影响的个体或者之前接受过放射治疗而发生的肿瘤,但当遇到临床背景并不能辅助判断(即散发病例)的情况下,MPNST的诊断则需要依赖其形态学特征进行判断。因此,MPNST特异性标志物的发现对早期诊断以及预后关系重大。现如今,表观遗传调控神经纤维瘤中组蛋白甲基化修饰的研究日益受到重视^[10]。组蛋白H3在体内存在单甲基化(me1)、二甲基化(me2)及三甲基化(me3)3种形式,其N-末端赖氨酸残基K27是主要的甲基化修饰位点之一,其甲基化的程度可影响相应区域DNA的转录活性,从而发挥抑制转录的作用^[11]。在美国人群^[12]与日本人群^[13]中的研究发现,H3K27me3在非NF1相关的MPNST中频繁发生表达缺失,很有希望作为诊断MPNST的重要生物标志物。本研究通过应用组织芯片技术制备中国人群MPNST组织芯片,通过免疫组化的方法来研究H3K27me3在MPNST中的表达情况与疾病病理特征之间的关系,并验证H3K27me3的表达缺失在中国人群中是否具有辅助诊断MPNST的价值。

1 材料和方法

1.1 临床资料 收集天津医科大学肿瘤医院病理科自1991年1月-2011年11月恶性周围神经鞘瘤住院病理组织标本43例,经福尔马林固定,石蜡包埋后,利用TMA技术制成组织芯片,其中NF1型的恶性周围神经鞘瘤,是根据美国国立卫生研究院标准进行确诊的,临床资料的收集包括性别、年龄、MPNST的亚型、肿瘤的部位、大小、AJCC分期、放疗、化疗、复发、转移等。其中男性23例,女性20例,最大年龄86岁,最小年龄15岁,平均年龄45.86岁。组织学分型:39例为散发型恶性周围神经鞘瘤,4例为NF1型的恶性周围神经鞘瘤。患者无病生存率和总生存率的时间分布为0~176个月和0~182个月,中位生存时间分别为16个月和64个月。

1.2 主要试剂和仪器 鼠抗人单克隆抗体H3K27me3(ab6002)购自美国abcam公司,工作浓度为1:100。二抗试剂盒及DAB显色剂均购自北京中杉金桥公司。

1.3 构建MPNST组织芯片 光学显微镜下标记原始病理标本无坏死退变、具代表性的肿瘤区域,每例标本标记2点。用直径1.5 mm的打孔针在Quick-Ray

预铸受体蜡块上打孔,并在每个供体蜡块标本上按标记取出2份直径为1.5 mm的圆柱体组织块,分别将上述肿瘤组织块移入受体蜡块,构建TMA模块。52℃恒温烤箱中加热组织阵列块1 h,室温条件下冷却30 min后放入-20℃冰箱冷却6 min。切片辅助系统连续切片,每张切片厚4 μm。组织切片移入45℃温水中,待舒展充分后用组织芯片专用载玻片捞片,室温晾干,95℃病理组织漂烘仪烤干,60℃烤片16 h,取出冷却后置于-20℃冰箱贮存备用。

1.4 免疫组化染色 60℃温箱孵育组织切片30 min,二甲苯脱蜡,各级浓度乙醇水化,高压蒸汽加热抗原修复,0.3%甲醛/双氧水封闭内源性过氧化物酶。常温下与胎牛血清孵育1 h,滴加抗体H3K27me3(1:100),4℃冰箱过夜。将切片与HRP标记的山羊抗鼠IgG抗体孵育1 h,4℃冰箱30~40 min。将切片浸入DAB溶液10 min,各级浓度乙醇快速脱水,二甲苯透明,加盖盖玻片,中性树脂封片。待晾干后观察。

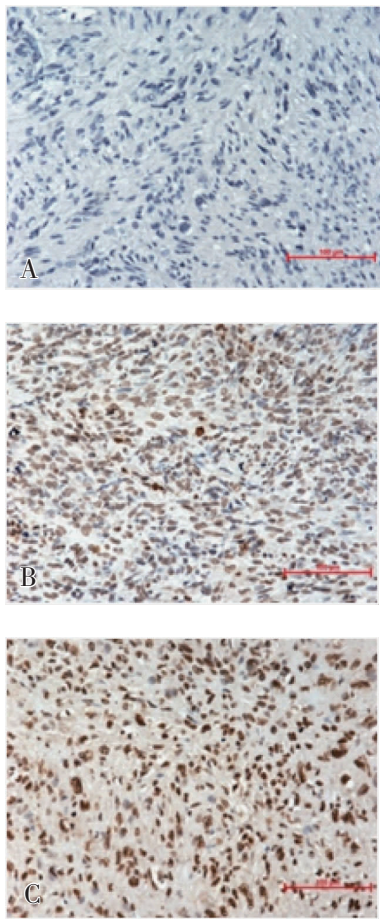
1.5 结果判读 在无背景染色情况下,以细胞质或细胞核染成黄色至棕褐色细颗粒状为阳性反应。在高倍镜下(×400)对阳性细胞进行评分,随机选择5个视野,总共计数500个细胞。将阳性细胞按所占百分比分为5级:<5%为0分,5%~25%为1分,25%~50%为2分,50%~75%为3分,>75%为4分。同时对细胞着色强度进行分级:0分为无色,1分为淡黄色,2分为棕黄色,3分为棕黑色。以两者相加为所得分数:≤1分为阴性(-),2~3分为弱阳性(+),4~5分为中等阳性(++),6~7分为强阳性(+++)。阴性(-)和弱阳性(+)为低表达组,而中等阳性(++)和强阳性(+++)为高表达组。

1.6 统计学分析 采用SPSS 19.0统计软件进行分析。H3K27me3的表达与临床病理参数之间的关系用 χ^2 检验或Fisher精确概率法检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 非NF1相关性MPNST表现出H3K27me3的表达缺失 运用H3K27me3单克隆抗体进行IHC研究评估,结果显示65.11%($n=28$)的MPNST病例显示完全($n=17$,39.53%,图1A)或部分($n=11$,25.58%,图1B)染色缺失,而35%($n=15$,图1C)的病例保留染色,即以H3K27me3表达缺失为诊断依据则MPNST的检出率可达65.11%,且与原诊断一致。然而,在不同的MPNST组中,免疫染色状态有很大差异。当仅考虑与NF1相关的MPNST($n=4$)时,4例(100%)显示H3K27me3染色正常,而非NF1相关的MPNST($n=39$)中,H3K27me3表达缺失达

71.78%($n=28$),其中完全缺失病例 43.58%($n=17$),部分缺失病例 28.20%($n=11$),保留表达组病例占 28%($n=11$),即在非 NF1 相关的 MPNST 中检出率可达 71.78%。H3K27me3 的表达缺失不仅可以诊断 MPNST,特别是对于非 NF1 相关的 MPNST 可显现出更好的敏感性和特异性。



A. H3K27me3 表达完全缺失;B. H3K27me3 表达部分缺失;C. H3K27me3 保留表达

图 1 IHC 显示 H3K27me3 在临床组织样本中的表达情况

Fig 1 IHC shows the expression of H3K27me3 in clinical tissue samples

2.2 MPNST 中 H3K27me3 的表达情况与临床病理参数的关系 本研究共纳入 43 例 MPNST 样本。大多数样本(84%)起源于原发性或复发性病变,而 16%的样本来自转移性病变。原发肿瘤位于双侧肢体 16 例(37%),躯干 20 例(47%),头颈部 7 例(16%)。6 个样本(14%)是放化疗前的状态。此外,包括 4 个 NF1 相关样本。按照临床病例数据的不同组别,我们进行了 H3K27me3 IHC 的统计分析(表 1)。研究结果表明,H3K27me3 的表达水平与性别、年龄、肿瘤大小、AJCC 分级、放化疗及复发和转移并无关联,而与 MPNST 是否为 NF1 型密切相关($P=0.014$)。

表 1 不同临床病例数据组别的 H3K27me3 IHC 统计情况(n)
Tab 1 H3K27me3 IHC statistics for different clinical case data sets(n)

临床参数	完全缺失	部分缺失	保留染色	χ^2	P
性别				0.543	0.762
男	8	6	9		
女	9	5	6		
年龄/岁				0.214	0.898
≥40	10	7	10		
<40	7	4	5		
肿瘤大小/cm				1.319	0.858
<5	6	3	7		
5~10	6	4	5		
>10	5	4	3		
AJCC 分级				1.421	0.491
I~II	12	8	8		
III~IV	5	3	7		
放射治疗				1.249	0.536
是	6	4	8		
否	11	7	7		
化学治疗				2.339	0.311
是	6	7	6		
否	11	4	9		
复发				2.155	0.34
是	11	5	11		
否	6	6	4		
转移				3.493	0.174
是	4	3	8		
否	13	8	7		
NF1 型				6.1	0.014
是	0	0	4		
否	17	11	11		

3 讨论

最近有研究表明,在 MPNST 中 EED 和 SUZ12 的基因表达异常,均可编码 PRC2 重要组成部分,这种基因表达异常在诸多临床情况下均有发生^[14]。EED 和 SUZ12 的基因表达产物与 EZH1/EZH2 可构成 PRC2 复合物的核心,其主要负责组蛋白 3 的赖氨酸 27 位点的二甲基化(H3K27me2)和三甲基化(H3K27me3),PRC2 参与染色质的压缩,异染色质的形成,X 染色体的失活以及多梳介导的基因沉默^[15-17]。有研究表明^[14],EED 和 SUZ12 的突变可以使得 PRC2 失活,从而促使 H3K27me3 IHC 表达的缺失。我们的结果显示,在所有的 MPNST 中,65%的病例中 H3K27me3 表达缺失。此结果相对于前人报道的 S100 蛋白染色具有相同的价值^[8-9]。但是,当考虑到 MPNST 的各类临床亚型时,在大多数散发的病例中,H3K27me3 表达的丧失则具有更高的敏感度,更有趣的是在我们的研究发现 4 例 NF1 相关的 MPNST 样本,IHC 染色显示 H3K27me3 阳性,曾有文献报道称 PRC2 表达异常在 NF1 相关的 MPNST 中发生率较低,仅有 60%的病例表现出 H3K27me3

的表达缺失,40%的病例仍保留了 H3K27me3 的表达^[12]。但是无论NF1 相关的 MPNST 中 H3K27me3 的表达水平如何,只要我们从实际诊断的角度出发,大多数 NF1 相关的患者检测为梭形细胞肉瘤基本都可认定为 MPNST,而很少再需要其他的辅助因子来进行诊断。

通过研究中国人 MPNST 组织样本证实了 H3K27me3 的 IHC 分析对于 MPNST 的诊断具有很强的实用性。在某些特定临床情况下,如 RT 相关性或散发性 MPNST,H3K27me3 表达的缺失可作为一种十分有意义的辅助标记物,具有很好的敏感性与特异性。该标记对于 NF1 相关的 MPNST 敏感性较低,这与 NF1 相关的 MPNST 中较低的 PRC2 失活发生率相关。在我们的 H3K27me3 的 IHC 分析结果中,发现在 NF1 相关的 MPNST 中 H3K27me3 的水平明显高于散发 MPNST,我们在中国人群中的研究结果与美国 Prieto-Granada 等^[12]和日本 Asano 等^[13]学者的研究结果基本一致,并且若以 H3K27me3 的表达缺失为诊断 MPNST 的标准,则其 MPNST 的整体检出率可达 65.11%,在除外 NF1 相关的 MPNST 的检测中的其检出率可高达 71.78%,显现出十分优异的敏感性和特异性。目前在诊断 MPNST 的过程中由于非特异性的形态学特征并缺乏特异性的 IHC 分子标记物,使得诊断工作仍然困难重重,而 H3K27me3 在 MPNST 早期诊断中具有灵敏、高效等优势。综上所述,我们认为在中国 MPNST 发病人群中,H3K27me3 亦可作为该疾病早期诊断的辅助工具。

参考文献:

- [1] Toro J R, Travis L B, Wu H J, et al. Incidence patterns of soft tissue sarcomas, regardless of primary site, in the Surveillance, Epidemiology and End Results program, 1978–2001: an analysis of 26,758 cases[J]. *Inter J Cancer*, 2006, 119(12):2922
- [2] Ducatman B S, Scheithauer B W. Postirradiation neurofibrosarcoma [J]. *Cancer*, 1983, 51(6):1028
- [3] Foley K M, Woodruff J M, Ellis F T, et al. Radiation-induced malignant and atypical peripheral nerve sheath tumors[J]. *Ann Neurol*, 1980, 7(4):311
- [4] Bradford D, Kim A. Current treatment options for malignant peripheral nervesheath tumors[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2015,16(3):328
- [5] Shepard T H, Tucci D L, Grant G A, et al. Management of hearing in pediatricNF2[J].*Otol Neurotol*, 2012,33(6):1066
- [6] Lafemina J, Qin L X, Moraco N H, et al. Oncologic outcomes of sporadic,neurofibromatosis-associated, and radiation-induced malignant peripheral nervesheath tumors[J]. *Ann Surg Oncol*,2013,20(1):66
- [7] Mertens F, Dal Cin P, De Wever I, et al. Cytogenetic characterization of peripheral nerve sheath tumours: a report of the CHAMP study group[J]. *J Pathol*, 2000,190(1):31
- [8] Matsunou H, Shimoda T, Kakimoto S, et al. Histopathologic and immunohistochemical study of malignant tumors of peripheral nerve sheath (malignant schwannoma) [J]. *Cancer*, 1985,56(9):2269
- [9] Nakajima T, Watanabe S, Sato Y, et al. An immunoperoxidase study of S-100 protein distribution in normal and neoplastic tissues [J]. *Am J Surg Pathol*, 1982, 6(8):715
- [10] Kalac M, Scotto L, Marchi E, et al. HDAC inhibitors and decitabineare highly synergistic and associated with unique gene-expression and epigenetic profiles in models of DLBCL[J]. *Blood*,2011, 118(20):5506
- [11] YooK H, Hennighausen L.EZH2 methyltransferase and H3K27 methylation in breast cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(1):59
- [12] Prieto-Granada C N, Wiesner T, Messina J L, et al.Loss of H3K27me3 ExpressionIs a Highly Sensitive Marker for Sporadic and Radiation-inducedMPNST[J]. *Am J Surg Pathol*, 2016, 40(4):479
- [13] Asano N, Yoshida A, Ichikawa H, et al. Immunohistochemistry for trimethylated H3K27 in the diagnosis of malignant peripheral nerve sheath tumours[J]. *Histopathology*, 2017, 70(3):385
- [14] Lee W, Teckie S, Wiesner T, et al. PRC2 is recurrently inactivated through EED or SUZ12 loss in malignant peripheral nerve sheath tumors[J]. *Nat Genet*, 2014, 46(11):1227
- [15] Zhang M, Wang Y X, Jones S, et al. Somatic mutations of SUZ12 in malignant peripheral nerve sheath tumors[J]. *Nat Genet*, 2014, 46 (11):1170
- [16] Luscan A, Vidaud D, Ortonne N, et al. PRC2 alterations in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors: schwann cells with no complex[J]. *Med Sci (Paris)*, 2014, 30(8/9):733
- [17] Margueron R, Reinberg D. The polycomb complex PRC2 and its mark in Life[J]. *Nature*, 2011,469(7330):343

(2018-01-15 收稿)