

WT1 在儿童横纹肌肉瘤中作用的初步研究

王景福 闫杰 曹嫣娜 李杰 李璋琳 王会娟 张广超

摘要 目的:探讨WT1基因在儿童横纹肌肉瘤(Rhabdomyosarcoma, RMS)发生、发展过程中的生物学作用及其与临床预后的关系,为WT1疫苗的应用提供理论依据。**方法:**应用普通和实时定量PCR技术检测WT1 mRNA在37例RMS中的相对表达量,采用免疫组织化学染色方法观察WT1蛋白在61例RMS中的表达情况。利用Mann-Whitney检验分析WT1 mRNA及蛋白在不同病理类型RMS病例中表达的差异性,采用Kaplan-Meier生存曲线和Log-rank检验评估WT1 mRNA及蛋白表达水平与生存率的关系。**结果:**与胚胎型组和转移阴性组比较,非胚胎型RMS组和转移阳性组中WT1 mRNA及蛋白表达水平较高($P < 0.05$)。37例RMS中的WT1 mRNA相对表达量中位数为 2.20×10^{-3} ,以其为阈值分为低表达组和高表达组,Log-rank检验提示高表达组生存率较低($P = 0.001$)。61例RMS中,依据阳性细胞的比例,将WT1蛋白表达水平分为低、中及高三组,Log-rank检验显示,低表达组与中表达组之间生存率差异无统计学意义($P = 0.185$),但低表达组与高表达组之间、中表达组与高表达组之间差异存在统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**WT1在儿童RMS发生发展中具有致癌效应,WT1疫苗在儿童RMS治疗有潜在应用价值。

关键词 横纹肌肉瘤 WT1基因 免疫治疗 儿童

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.15.007

The Role of WT1 Gene in Childhood Rhabdomyosarcoma

Jingfu WANG, Jie YAN, Yanna CAO, Jie LI, Zhanglin LI, Huijuan WANG, Guangchao ZHANG

Correspondence to: Jingfu WANG; E-mail: wangjingfu666@yahoo.com.cn

Department of Pediatric Oncology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Key Laboratory of Prevention and Treatment of Cancer of Tianjin City, Tianjin 300060, China

Abstract Objective: To elucidate the role of WT1 gene in the development of childhood rhabdomyosarcoma (RMS) and determine whether WT1 vaccines are applicable to RMS. **Methods:** WT1 mRNA expression was investigated in the tumor tissue of 37 RMSs using conventional and real-time RT-PCR. Immunohistochemistry was utilized to observe WT1 protein expression in 61 RMSs. Mann-Whitney Test was employed for the comparison of WT1 mRNA or protein expression in embryonal versus non-embryonal subtype and non-metastasis versus metastasis group. The effect of WT1 mRNA or the protein expression on survival was analyzed using Kaplan-Meier survival curve and Log-Rank Test. **Results:** Compared with the embryonal subtype and non-metastasis group, a higher elevation of WT1 mRNA or protein expression in non-embryonal and metastasis group was observed ($P < 0.05$). The median of relative WT1 mRNA expression in 37 RMSs was 2.20×10^{-3} , which was defined as the threshold value. The RMSs were divided into two groups: high and low WT1 mRNA expression groups. Survival analysis indicated that the high WT1 mRNA level worsened the prognosis ($P = 0.001$). Based on the ratio of positive cells in RMSs, the WT1 protein expression was grouped into three levels, namely, low, middle, and high groups. No significant difference between low and middle group ($P = 0.185$) was observed. However, significant difference appeared in low versus high group and in middle versus high group ($P = 0.000$ and $P = 0.000$). **Conclusion:** WT1 may act as an oncogene in childhood RMS, and immunotherapy using peptide vaccines against WT1 may be applicable for RMS.

Keywords Rhabdomyosarcoma; Wilms tumor gene; Immunotherapy; Children

横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma, RMS)是儿童最常见软组织恶性肿瘤,占有小儿恶性肿瘤的4%~5%,肿瘤多呈浸润性生长,恶性度高,多数患儿就诊时已发生临近组织受累或远处转移,对传统治疗抵抗的病例,免疫治疗或许是一个有益的治疗模式^[1-2]。近年来WT1疫苗在白血病和多种实体瘤中显示很好的疗效,为难治性小儿横纹肌肉瘤的治疗开辟了新思路,本文阐明WT1基因在儿童横纹肌肉瘤发生过程

中的生物学作用以及与预后关系,为WT1疫苗的临床应用提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 资料

收集2000年1月至2011年12月本院收治的RMS患儿诊治资料,研究纳入标准:1)具有规范病理学诊断;2)存有组织蜡块和/或新鲜冻存组织标本;3)临床资料及随访记录完整;4)接受横纹肌肉瘤RS-99

治疗方案;5)死亡原因与肿瘤相关。共获得61例石蜡切片,用于WT1免疫组织化学染色。其中男29例,女32例;年龄1~17岁(中位年龄7岁);胚胎型RMS 45例,腺泡型13例,多形型3例。获得37例新鲜冻存标本用于WT1 mRNA表达研究,其中男17例,女20例;年龄2~13岁(中位年龄6岁)。胚胎型RMS 28例,腺泡型8例,多形型1例。本研究符合伦理委员会相关规定。

1.2 方法

1.2.1 PCR检测WT1 mRNA在儿童RMS中的表达

RNA的提取和cDNA合成:采用Trizol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)进行RNA提取,利用RT-PCR Kit按照说明书的步骤合成cDNA,合成后的cDNA在-20℃条件下保存。普通PCR:WT1引物序列见表1,以GAPDH为内参,按照Primer Script RT-PCR Kit说明书进行温度和循环数条件设置。实时定量PCR:WT1引物和探针序列见表1,利用实时PCR仪进行定量PCR反应。把稳定表达WT1的K562白血病细胞中WT1 mRNA水平定为1.0,以其cDNA一系列稀释浓度建立标准曲线,从而定量各个样本中的WT1和 β -actin mRNA表达量,最终以WT1 mRNA表达量/ β -actin mRNA表达量的比值作为WT1 mRNA表达水平高低的评价指标,每个样本同时测定2次。

表1 普通和实时PCR中得引物和探针序列

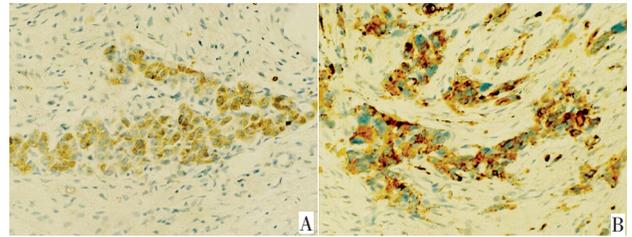
Table 1 The sequence of primer and probe for conventional and real time PCR

PCR类型	引物和序列	序列(5'~3'方向)
普通PCR	WT1-F	GGCATCTGAGACCACTGAGAA
	WT1-R	GAGACTCAGACTTCAAAGCACT
	GAPDH-F	TGAAAGTCTGTCTCCATGC
	GAPDH-R	ACCTTTGCTGAGACCTGTGG
实时PCR	WT1-F	GATAACCACACAAGCCCATC
	WT1-R	CACACGTCGCACATCCTGAAT
	WT1-P	FAM-ACACCGTGCCTGTATTCTGTATTGG-TAMRA
	β -actin-F	CCCAGCACAATGAAGATCAAGATCAT
	β -actin-R	ATCTGCTGGAAGGTGGACAGCGA
	β -actin-P	FAM-TGACCCGAAGTACTCCGTGTGGATCGGCG-TAMRA

F:forward;R:reverse

1.2.2 免疫组织化学染色方法评估WT1蛋白在儿童RMS中的表达 一抗为兔抗人WT1多克隆抗体(C-19; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)。采用Envision/HRP Universal kit (Dako cyto-mation, Carpinteria, CA, USA)进行两步法免疫染色,具体步骤如下:3 μ m的石蜡切片脱蜡、浸水、内源性过氧化物酶阻断和抗原复活;滴入一抗(浓度1:50),4℃过夜;滴入过氧化物酶标记的羊抗兔和鼠二抗,

37℃,30 min;DAB(diaminobenzidine)显色。每次染色均设立阴性和阳性对照。阳性判定标准:细胞质和/或细胞核呈现棕黄色(图1)。根据阳性细胞的比例进行染色强度分级:Grade 0:阳性细胞比例 \leq 5%;Grade 1+:5%<阳性细胞比例 \leq 40%;Grade 2+:40%<阳性细胞比例 \leq 100%。



A:胚胎型RMS;B:腺泡型RMS

图1 WT1在RMA细胞质呈阳性表达(\times 200)

Figure 1 WT1 protein expression in embryonal and alveolar RMS (\times 200)

1.3 统计学分析

采用Cox回归模型对61例病例进行多因素分析,引入的客观临床因素及赋值方法如下:1)性别:女为1,男为2;2)年龄:<10岁为1, \geq 10岁为2;3)肿瘤大小: \leq 5 cm为1,>5 cm为2;4)原发部位:预后良好部位为1,预后不良部位为2;5)原发灶局限情况:局限为1,侵犯临近组织或器官为2;6)病理类型:胚胎型为1,非胚胎型包括腺泡型和多形型为2;7)转移情况:无转移为1,发生区域性淋巴结或远处器官转移为2。最终确立本组病例中与预后独立相关的因素。基于上述确立的独立预后因素进行分组,评估WT1 mRNA及蛋白表达差别,采用Mann-Whitney检验进行统计分析。WT1 mRNA及蛋白表达量的生存分析,依据中位数对WT1 mRNA表达水平进行分组:低表达组:<中位数;高表达组: \geq 中位数。依据免疫染色强度将WT1蛋白表达水平分为三组:低表达组Grade 0;中表达组:Grade 1+;高表达组:Grade 2+。生存分析采用Kaplan-Meier生存曲线和Log-rank检验。

2 结果

2.1 Cox回归多因素分析结果

采用Cox模型逐步回归法(backward wald),结果显示:病理类型($P=0.032$)和转移情况($P=0.009$)两个因素与预后独立相关。

2.2 WT1 mRNA及蛋白表达分析

通过多因素分析确立病理类型和转移情况为本组病例的独立预后因素,依据病理类型分为胚胎型和非胚胎型RMS组,依据转移情况分为转移阴性组和阳性组。Mann-Whitney检验提示非胚胎型RMS组和转移阳性组中WT1 mRNA表达水平最高($P=0.010$, $P=0.001$,表2)。Mann-Whitney检验提示WT1蛋白高

水平表达出现在非胚胎型RMS组和转移阳性组(P 均 < 0.05 ,表3)。

表2 WT1 mRNA在不同组间表达水平比较

Table 2 Comparison of WT1 mRNA levels among different groups

分组	合计	WT1 mRNA 相对表达量*		P
		范围	中位数	
病理类型				
胚胎型	28	$7.10 \times 10^{-5} \sim 3.10 \times 10^{-2}$	1.09×10^{-3}	0.010
非胚胎型	9	$7.40 \times 10^{-5} \sim 4.20 \times 10^{-2}$	7.20×10^{-3}	
转移情况				
无	24	$8.40 \times 10^{-6} \sim 1.10 \times 10^{-2}$	7.05×10^{-4}	0.001
有	13	$3.39 \times 10^{-4} \sim 4.20 \times 10^{-2}$	6.70×10^{-3}	

*:K562细胞中WT1 mRNA 表达量被定义为1.0

表3 WT1 蛋白在不同组间表达强度比较 例

Table 3 Comparison of WT1 protein expression among different groups

分组	合计	WT1 蛋白免疫染色强度			P
		Grade 0	Grade 1+	Grade 2+	
病理类型					
胚胎型	45	13	24	8	<0.01
非胚胎型	16	1	2	13	
转移情况					
无	41	12	24	5	<0.01
有	20	2	2	16	

2.3 生存分析

37例RMS的WT1 mRNA相对表达量为 $8.40 \times 10^{-6} \sim 4.20 \times 10^{-2}$,中位数为 2.20×10^{-3} ,以中位数为阈值,分为低表达组和高表达组,Log-rank 检验提示高表达组生存率较低($P=0.001$,图2)。61例RMS中,WT1 蛋白低、中及高表达组对生存率的影响经Log-rank 检验显示,低表达组与中表达组之间差异无统计学意义($P=0.185$,图3),但低表达组与高表达组和中表达组与高表达组之间差异存在统计学意义(P 均 <0.05)。

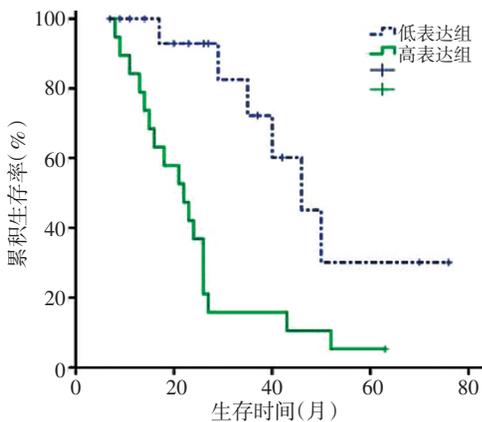


图2 WT1 mRNA 高表达组和低表达组的Kaplan-Meier生存曲线
Figure 2 The Kaplan-Meier survival curves of high and low WT1 mRNA level groups

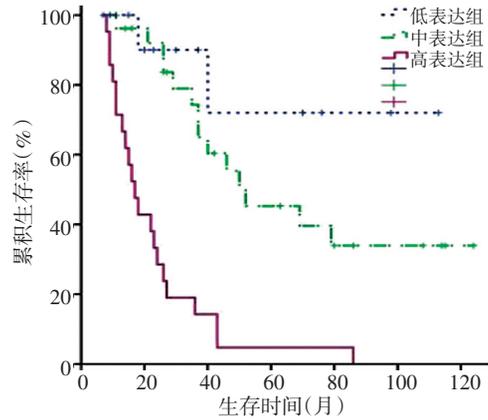


图3 WT1 蛋白低、中及高表达组的Kaplan-Meier生存曲线
Figure 3 The Kaplan-Meier survival curves of low, mediate and high WT1 protein expression group

3 讨论

WT1 (Wilms tumor gene, WT1) 基因位于11p13,最初作为抑癌基因被发现,其变异与肾母细胞瘤(Wilms tumor)的发生密切相关^[3]。但最近研究发现WT1 在某些肿瘤中表现出致癌特性,WT1 mRNA 在血液疾患和部分实体瘤病中呈现高表达,WT1 mRNA 高水平表达与不良预后、肿瘤进展和高临床分期相关,用反义WT1 寡聚体处理表达WT1的肿瘤细胞,结果肿瘤细胞增生被抑制。上述证据同时也说明WT1 是一种癌抗原。此外,WT1还具有免疫原性,在表达WT1 恶性癌症患者体内针对WT1的细胞免疫和体液免疫水平与正常人相比,抗体的效价或检出频率均明显升高。以上均提示可选择WT1作为免疫治疗的靶点。目前临床上WT1 疫苗为HLA-A 限制性蛋白肽,其长度为9或10个氨基酸,诱导机体发生细胞免疫。免疫作用机制如下^[4]:HLA-A 限制性蛋白肽与免疫佐剂混合行皮内注射,免疫佐剂使皮内存在的树突细胞活性化,然后WT1 蛋白肽与活性化树突细胞表面的HLA-A 位点结合,带有WT1 蛋白肽/HLA-A 复合体的树突细胞向所属的淋巴结移动,淋巴结中存在的CD8⁺CTLs 识别WT1 蛋白肽/HLA-A 复合体并被活化,活化的CD8⁺CTL 移行到瘤巢中,识别带有内源性WT1 蛋白肽/HLA-A 复合体的肿瘤细胞,发生细胞免疫攻击。在过去几年里,利用WT1 疫苗对血液病和成人多种实体瘤(包括肺癌、乳腺癌及胶质瘤等)进行免疫治疗取得了令人振奋的效果^[5-9]。在儿童实体瘤治疗中有1例成功病例报道,利用WT1 疫苗较好控制了横纹肌肉瘤的腰椎转移灶^[10]。

本次研究采用免疫组织化学染色和实时定量PCR技术观察WT1 mRNA 和蛋白在儿童RMS中的表达情况,同时收集临床资料,包括客观临床因素和随访情况,纳入临床因素包括性别、年龄、肿瘤大小、原

发部位、原发灶局限情况、病理类型和转移情况进行分析。多因素分析发现病理类型和转移情况为儿童RMS独立预后因素,以二者为分组依据,进行WT1 mRNA及蛋白表达差异性分析,结果发现WT1 mRNA和蛋白均在非胚胎型RMS组和转移阳性组中呈现高水平表达,提示WT1高表达与预后不良相关。37例RMS的WT1 mRNA相对表达量的中位数为 2.20×10^{-3} ,以中位数为阈值,分为低表达组和高表达组,Log-rank检验提示高表达组生存率低。61例RMS中,依据阳性细胞的比例将WT1蛋白表达水平分为低、中及高表达组,生存分析发现低表达组与中表达组之间差异无统计学意义,但低表达组与高表达组、中表达组与高表达组之间有统计学差异,说明WT1 mRNA及蛋白高水平表达预示预后不良。

综上,WT1 mRNA和蛋白在发生转移病例和预后不良病理类型中呈现高水平表达,且高水平表达预示生存率低,说明WT1在儿童RMS中发挥致癌效应,是一种癌抗原,WT1疫苗具有应用于儿童RMS治疗的可能和潜在价值。下一步拟进行细胞学和动物体内试验,为WT1的致癌生物学效应提供直接证据。

参考文献

- Ognjanovic S, Linabery AM, Charbonneau B, et al. Trends in childhood rhabdomyosarcomas incidence and survival in the United States, 1975–2005[J]. *Cancer*, 2009, 115(18): 4218–4226.
- Meza JL, Anderson J, Pappo AS, et al. Analysis of prognostic factors in patients with nonmetastatic rhabdomyosarcomas treated on intergroup rhabdomyosarcomas studies III and IV: the Children's Oncology Group[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(24): 3844–3851.
- Call KM, Glaser T, Ito CY, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus[J]. *Cell*, 1990, 60(3): 509–520.
- Oka Y, Tsuboi A, Oji Y, et al. WT1 peptide vaccine for the treatment of cancer[J]. *Curr Opin Immunol*, 2008, 20(2): 211–220.
- Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, et al. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(38): 13885–13890.
- Tsuboi A, Oka Y, Kyo T, et al. Long-term WT1 peptide vaccination for patients with acute myeloid leukemia with minimal residual disease[J]. *Leukemia*, 2012, 26(6): 1410–1413.
- Ohno S, Kyo S, Myojo S, et al. Wilms' tumor 1 (WT1) peptide immunotherapy for gynecological malignancy[J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(11): 4779–4784.
- Krug LM, Dao T, Brown AB, et al. WT1 peptide vaccinations induce CD4 and CD8 T cell immune responses in patients with mesothelioma and non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59(10): 1467–1479.
- Chiba Y, Hashimoto N, Tsuboi A, et al. Prognostic value of WT1 protein expression level and MIB-1 staining index as predictor of response to WT1 immunotherapy in glioblastoma patients[J]. *Brain Tumor Pathol*, 2010, 27(1): 29–34.
- Ohta H, Hashii Y, Yoneda A, et al. WT1 (Wilms tumor 1) peptide immunotherapy for childhood rhabdomyosarcoma: a case report [J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2009, 26(1): 74–83.

(2012-03-20收稿)

(2012-05-01修回)

(本文编辑:郑莉)

来稿须知

投稿需经作者单位主管学术机构审核,在线投稿成功收到稿号后邮寄单位推荐信至本刊。推荐信应注明稿件无一稿两投、不涉及保密、署名无争议等项。一旦发现一稿两投,将立即退稿。一旦发现一稿两用,本刊将进行如下处理:

- 刊登撤销该论文及该文系重复发表的声明,并向中国抗癌协会系列杂志通报;
- 向作者所在单位通报;
- 2年内拒绝接收该文第一作者的来稿。