临床研究 文章编号:0253-3626(2010)12-1870-04

MyoD1、Myogenin 在儿童横纹肌肉瘤中的表达及其临床意义

马玉虹,王 珊,邓晓斌,李 想
(重庆医科大学附属儿童医院肿瘤外科,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨 MyoD1、Myogenin 在儿童横纹肌肉瘤(Rhabdomyosarmma,RMS)及其他 3 种儿童小细胞恶性肿瘤中的表达情况及其临床意义。方法:选取胚胎型横纹肌肉瘤(Embryonal rhabdomyosarcoma,ERMS)11 例,腺泡型横纹肌肉瘤(Alveolar rhabdomyosarcoma,ARMS)5 例,神经母细胞瘤、恶性淋巴瘤、尤文肉瘤各 10 例,行 HE 染色,并应用 S-P 免疫组织化学染色法检测MyoD1、Myogenin 蛋白在这 4 种儿童小细胞恶性肿瘤中的表达水平。结果:MyoD1、Myogenin 在 RMS 中阳性表达率分别为:75%,68.75%,在其他 3 种肿瘤中阳性表达率均为 0%,MyoD1、Myogenin 在 RMS 组中的表达与其他肿瘤组比较差异有统计学意义($P<0.05$),2 种蛋白在 ARMS中的阳性表达率明显高于 ERMS($P<0.05$),其恶性程度越高,MyoD1 和 Myogenin 阳性表达越强($P<0.05$)。MyoD1、Myogenin 在预后差组中的阳性表达率明显高于预后中组($P<0.05$)。结论:MyoD1、Myogenin 可以作为辅助鉴别 RMS 及其他小细胞恶性肿瘤的依据;MyoD1、Myogenin 基因可以作为辅助诊断儿童 RMS 的综合指标,也可作为鉴别儿童 ERMS和 ARMS有用的分子生物学标志;检测儿童 RMS 中 MyoD1、Myogenin 的表达情况对 RMS 恶性程度及预后的判断有一定的临床指导意义。

【关键词】横纹肌肉瘤;儿童;MyoD1;Myogenin
【中国图书分类法分类号】R739;R729 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-07-23

The expressions and clinical significance of MyoD1 and myogenin in rhabdomyosarcomas of childhood

MA Yu-hong, et al
(*Depatment of Surgical Oncology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expressions of MyoD1 and Myogenin in rhabdomyosarcoma (RMS) and other small cell malignant tumors of childhood, so as to approach their clinical significance. *Methods*: 11 cases of embryonal rhabdomyosarcoma(ERMS), 5 cases of alveolar rhabdomyosarcoma (ARMS), 10 cases of neuroblastoma, 10 cases of malignant lymphoma and 10 cases of Ewing's sarcoma were collected and stained with HE staining, to detect the expression levels of MyoD1 and Myogenin proteins by S-P immunohistochemistry method in these 4 types of small cell malignant tumors. *Results*: The positive expressions of MyoD1 and Myogenin in RMS were 75% and 68.75% respectively, but the expression rates in the other 3 types of small cell malignant tumors were 0%. The positive expression rates and intensity of MyoD1 and Myogenin in RMS group were higher than those in the other 3 types of small cell malignant tumors significantly ($P<0.05$). The positive expression rates of these 2 proteins in ARMS were higher than in ERMS ($P<0.05$). The higher malignant level was, the higher the positive expressions of MyoD1 and myogenin showed ($P<0.05$). The positive expressive rates of these 2 types of proteins in bad prognosis group were higher than those in middle prognosis group ($P<0.05$). *Conclusion*: The obvious expression difference between MyoD1 and Myogenin in RMS and in the other 3 types of small cell malignant tumors can be used as an index that distinguishes RMS with other small cell malignant tumors. MyoD1 and Myogenin can be a combination index of auxiliary diagnosis in RMS, providing significant and additional molecular biological methods to pathological diagnosis.

【Key words】Rhabdomyosarmma; Child; MyoD1; Myogenin

横纹肌肉瘤(Rhabdomyosarcoma,RMS)是儿童期最常见的恶性软组织肿瘤[1],约占儿童软组织肉瘤的 45%~70%[2],其 5 年生存力较低[3]。RMS 来源于横纹肌的间充质细胞,由几乎不表现任何细胞分化证据的原始细胞组成,也可包含具有成熟骨骼肌特征的高度分化的细胞。其按照遗传及组织学分类为:胚胎型横纹肌肉瘤(Embryonal rhabdomyosarcoma,ERMS),

作者介绍:马玉虹(1985-),女,硕士,
研究方向:儿童实体肿瘤。
通讯作者:王 珊,女,教授,E-mail:wangshan778@163.com。
基金项目:重庆医科大学校级课题重点项目(编号:XBZD200708)。

其中包括梭形细胞葡萄状变异型,腺泡型横纹肌肉瘤(Alveolar rhabdomyosarcoma,ARMS)和一种罕见的成体变异:多形性横纹肌肉瘤(Pleomorphic rhabdomyosarcoma,PRMS)[4]。RMS常表现为分化不良的小圆细胞,缺乏明显的横纹肌母细胞,在光镜下仅有40%的病例可找到横纹,从而难以与其它儿童小细胞恶性肿瘤相鉴别,给病理组织学诊断带来很大困难。

从20世纪80年代以来,国内外对生肌调节因子的研究已日渐深入,至今,哺乳动物中发现的生肌调节因子(Myogenic regulatory factors,MRFs)有4个:MyoD、Myogenin、Myf5及MRF4。早在1989年Scrable已开始将检测MyoD1应用于诊断RMS。本实验使用S-P免疫组织化学染色法检测MyoD1、Myogenin蛋白在儿童RMS及其他儿童小细胞恶性肿瘤中的表达情况,并探讨其临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验46例临床标本均取自重庆医科大学附属儿童医院病理科2006~2009年间的石蜡标本。其中,RMS 16例,神经母细胞瘤、恶性淋巴瘤、尤文肉瘤各10例。在16例RMS中,ERMS 11例,ARMS 5例;按照组织学分级[5]:Ⅰ级7例,Ⅱ级4例,Ⅲ级5例;根据新IRS分类:预后中11例,预后差5例。所有标本均取自术前未经过任何化疗的患儿。

1.2 方法

1.2.1 HE染色对标本切片进行病理复检及用S-P免疫组织化学法检测病理标本切片中MyoD1、Myogenin的蛋白表达水平 每例石蜡标本连续5 μm切片,HE染色进行病理复检。免疫组织化学染色:采用S-P免疫组织化学染色法[6],鼠抗人MyoD1单克隆抗体(5.2F,稀释度1:300)、鼠抗人Myogenin单克隆抗体(F12B,稀释度1:500)购自Abcam香港公司,S-P免疫组化试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司,操作严格按说明书进行,均采用pH 6.0枸橼酸盐缓冲液加热修复法对组织抗原进行修复。实验以PBS代替第一抗体作为空白对照。

1.2.2 判断标准 MyoD1,Myogenin阳性部位均定位于细胞核,其阳性反应表现为细胞核中出现棕黄色颗粒,不着色则为阴性;每张切片观察5个具有代表性的高倍视野(×400),每个视野计数200个细胞,共1 000个细胞,计数其中的染色阳性细胞数,根据阳性细胞所占比例分析:<25%为(-),25%~50%为(+),50%~75%为(++),>75%为(+++),(++)及其以上者为强阳性表达。

1.2.3 统计学处理 所有数据均在SPSS17.0统计分析软件上进行。MyoD1、Myogenin相应各组的阳性表达强度及阳性表达率比较分别用等级资料秩和检验、Fisher精确概率检验法,$P<0.05$认为差异有统计学意义。

2 结 果

MyoD1、Myogenin阳性核染色分别见于12/16例(75%)和11/16例(68.75%)RMS(表1),RMS组中2种蛋白阳性表达比较差异无统计学意义($P>0.05$);其他3种小细胞恶性肿瘤的阳性表达率均为0%,10例神经母细胞瘤和10例恶性淋巴瘤中MyoD1和Myogenin蛋白不表达,10例尤文肉瘤中2种蛋白呈极低水平表达或不表达。12例RMS MyoD1染色阳性包括7例ERMS和5例ARMS,11例RMS Myogenin染色阳性包括6例ERMS和5例ARMS,MyoD1和Myogenin蛋白在ERMS中的阳性表达与ARMS组比较差异有统计学意义($P<0.05$),2种蛋白在ARMS中的阳性表达率均明显高于ERMS($P<0.05$)(表2)。

在16例RMS中,MyoD1、Myogenin蛋白在RMS中的表达水平与肿瘤的恶性程度成正相关($P<0.05$),其恶性程度越高,MyoD1、Myogenin的阳性表达就越强(见表3)。本实验结果显示MyoD1、Myogenin的表达与RMS预后有明显的相关性:MyoD1和Myogenin在预后差组中的表达率要明显高于预后中组($P<0.05$),其阳性表达率与预后呈明显的负相关(见表4)。

3 讨 论

在儿童肿瘤中,小细胞恶性肿瘤种类繁多,临床上单单凭借症状及体征难以鉴别,尤其是在光镜下RMS和其他的

表1 2种蛋白在4类肿瘤中的阳性表达率(%)

组别/蛋白种类	MyoD1	Myogenin
RMS△	75 (12/16)△	68.75 (11/16)△
神经母细胞瘤☆	0 (0/10)	0 (0/10)
恶性淋巴瘤☆	0 (0/10)	0 (0/10)
尤文肉瘤☆	0 (0/10)	0 (0/10)

☆为神经母细胞瘤组、恶性淋巴瘤组、尤文肉瘤组与RMS组比较,$P<0.05$;△为RMS组中2种蛋白表达比较,$P>0.05$

表2 2种蛋白在ERMS和ARMS中的阳性表达率(%)

RMS类型	例数	MyoD1	Myogenin
ERMS	11	63.64(7/11)☆	54.55▲(6/11)
ARMS	5	100 (5/5)	100 (5/5)

☆为MyoD1的阳性表达率与ARMS组比较,$P<0.05$;▲为Myogenin的阳性表达率与ARMS组比较,$P<0.05$

表 3 2 种蛋白在 RMS 中的阳性表达与组织学分级(恶性程度分级)的关系(%)

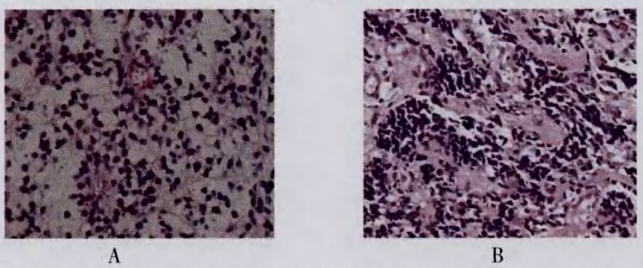
组织学分级(恶性程度分级)	例数	MyoD1	Myogenin
Ⅰ级	7	57.14(4/7)☆●	42.86 (3/7)●☆
Ⅱ级	4	75(3/4) ※	75 (3/4) ※
Ⅲ级	5	100 (5/5)※●	100 (5/5) ※●

※为 MyoD1、Myogenin 表达与Ⅰ级组比较,$P<0.05$;●为 MyoD1、Myogenin 表达与Ⅱ级组比较,$P<0.05$;☆为 MyoD1、Myogenin 表达与Ⅲ级组比较,$P<0.05$

表 4 2 种蛋白在 RMS 中的阳性表达与预后的关系(%)

RMS 类型	例数	MyoD1	Myogenin
预后中☆	11	63.64 (5/11)☆	54.55 (3/11)△
预后差☆	5	100 (5/5)	100(5/5)

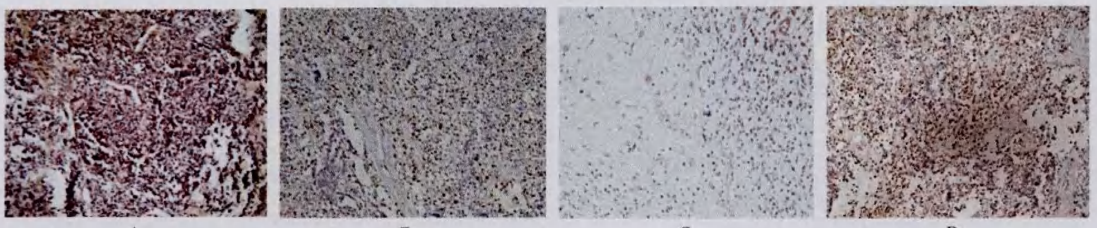
☆为 MyoD1、Myogenin 的表达预后中组与预后差组间有显著差异,$P<0.05$;△为 Myogenin 阳性表达与预后差组比较,$P<0.05$



A B

A. ERMS:疏松黏液或水肿背景中散在分布着中等量瘤细胞,瘤细胞较小;B. ARMS:相互交织、吻合的纤维结缔组织分隔瘤细胞形成腺泡状结构,附着于纤维间隔肿的瘤细胞较小,空腔或腺泡中的瘤细胞较大

图 1 RMS HE 染色(×200)



A B C D

A. MyoD1 蛋白在 ERMS 中的阳性表达:肿瘤细胞核呈强阳性棕黄色染色,阳性细胞成团分布;B. MyoD1 蛋白在 ARMS 中的阳性表达:肿瘤细胞核呈强阳性棕黄色染色,阳性细胞呈弥漫性分布;C. Myogenin 蛋白在 ERMS 中的阳性表达:肿瘤细胞核呈阳性棕黄色染色,阳性细胞呈散在分布;D. Myogenin 蛋白在 ERMS 中的阳性表达:肿瘤细胞核呈强阳性棕黄色染色,阳性细胞呈弥漫性分布

图 2 MyoD1、Myogenin在 RMS 中的阳性表达(S-P 染色×200)

小细胞恶性肿瘤难以区分, 给病理组织学诊断带来很大困难。而临床上不同种类肿瘤其治疗方案不同,因此,确定肿瘤的病理组织学诊断尤其重要。以往国内外已有许多使用各类方法检测肌源性分化标志物,如:肌红蛋白、波型蛋白、肌钙蛋白、肌纤蛋白、肌球蛋白、肌动蛋白等来辅助诊断儿童 RMS,但这些蛋白的特异性及敏感性的不高,使得其对确定肿瘤组织的来源意义并不大,故需要借助其他特异性标志物来帮助诊断及鉴别诊断儿童 RMS。

胚胎发育早期的生肌过程为:多能胚胎干细胞到中胚层干细胞,然后定向发育为成肌纤维,再分化成为肌管,最后融合形成肌细胞,即肌纤维。在定向阶段已有碱性螺旋 - 环 - 螺旋结构的生肌调节因子的表达,并指导定向,直到分化阶段,一旦生肌调节因子水平降低或撤出,成肌细胞的分裂、增殖即停止,因此,MRFs 对骨骼肌系统的发育成熟具有重要意义,其中 MyoD1 确定肌源性的发生,而 Myogenin 则是肌细胞终末分化的关键因素。在肿瘤中,早期实验指出 MRFs 在RMS 中均有阳性表达,而在其他的软组织肿瘤中无表达。

根据 MyoD1、Myogenin 在儿童 RMS 与其他 3 种儿童小细胞恶性肿瘤中表达的明显差异可以推断:MyoD1 和 Myogenin 可以作为辅助鉴别儿童 RMS 及其他小细胞恶性肿瘤的依据,为病理学诊断提供重要的分子生物学标记。本实验RMS 组中,2 种蛋白的阳性表达比较无显著差异($P>0.05$),Morotti 等[7]的研究结果则与本实验结果类似,而 Wang 等[8,9]的实验结果不同。

Morgenstern 等[10]的研究结果显示 Myogenin 在 ARMS 的平均阳性表达率明显高于 ERMS,他们认为 Myogenin 可以用来区分 ERMS 和 ARMS。本实验结果显示 2 种蛋白在 2 种类型 RMS 中的阳性表达比较均有显著差异,因此,MyoD1、

Myogenin 可以作为辅助鉴别儿童 ERMS 和 ARMS 的有用的分子生物学标志。

RMS 的病理组织学分级标准[5]：主要参考细胞分化的成熟程度、细胞的异形性、坏死及核分裂数等，分为 3 级：Ⅰ级：肿瘤以梭型细胞及小细胞为主，有明显的横纹肌母细胞分化，核分裂相少见；Ⅱ级：以小细胞成分为主，有一定量的梭型细胞及横纹肌母细胞分化，有一定异型性，按分裂相 6～10 个/10 HPF；Ⅲ级：肿瘤几乎由一致性的小圆细胞或原始间叶样细胞构成，横纹肌母细胞少见，或有明显异型性，坏死明显，核分裂相多见 >10 个/10 HPF。本实验发现 MyoD1、Myogenin 蛋白在 RMS 中的表达水平与肿瘤的恶性程度成正相关($P<0.05$)，恶性程度越高，MyoD1、Myogenin 的阳性表达就越强。国内外也有类似研究结果[11-14]。决定 RMS 预后的主要因素包括肿瘤部位、病理分级和大小[15]，我们发现，RMS 中 MyoD1、Myogenin 的表达与 RMS 预后有明显的相关性：MyoD1 和 Myogenin 在预后差组中的表达率要明显高于预后中组，其阳性表达率与预后呈明显的负相关。

总之，MyoD1、Myogenin 可以作为辅助鉴别 RMS 及其他小细胞恶性肿瘤的依据；MyoD1、Myogenin 基因可以作为辅助诊断儿童 RMS 的综合指标，也可作为鉴别儿童ERMS 和ARMS 的有用的分子生物学标志；检测儿童 RMS 中 MyoD1、Myogenin 的表达情况对 RMS 恶性程度及预后的判断有一定的临床指导意义。因此，对于儿童 RMS 的诊断、鉴别诊断、恶性程度的判断和预后的评估，MyoD1 和 Myogenin 是很有用的标志物。

参考文献

[1] 金 彪，祝明洁，薛建平，等.横纹肌肉瘤的影像诊断和病理分析比较[J].中国临床医学影像杂志，2006，17(10)：594.

[2] 何乐健，王 琳，孙 宁，等.儿童横纹肌肉瘤的临床病理研究[J].中华病理学杂志，2004，33(3)：225-228.

[3] Sbeity S，Abella A，Arcand P，et al. Temporal bone rhabdomyosarcoma in children[J]. Int J Pediatr otorhinolaryngol，2007，71 (5)：807-810.

[4] 王朋朋，杨立业.横纹肌肉瘤的分子生物学研究进展[J].医学综述，2009，15(4)：514.

[5] Costa J，Edward W，Lannod G，et al.The grading of soft tissue sarcoma:results of a clinicohistopathologic correlation in a series of 163 case[J]. Cancer，1984，53(3)：530-541.

[6] Radaelli G，Patruno M，Maccatrozzo L，et al.Expression and cellular localization of insulin-like growth factor-II protein and mRNA in Sparus aurata during development[J].J Endocrinol，2003，178(2)：285-299.

[7] Morotti R A，Nicol K K，Parham D M，et al. An immunohistochemical algorithm to facilitate diagnosis and subtyping of rhabdomyosarcoma: the children's oncology group experience[J].Am J Surg Pathol，2006，30(8)：962-968.

[8] Wang J，Tu X Y，Sheng W Q. Sclerosing rhabdomyosarcoma a dinicopathologic and immunohistochemical study of five cases[J].Am J Clin Pathol，2008，129(3)：410-415.

[9] Sartori F，Alaggio R，Zanazzo G，et al.Results of a prospective minimal disseminated disease study in human rhabdomyosarcoma using three different molecular markers[J].Cancer，2006，106(8)：1766-1775.

[10] Morgenstern D A，Rees H，Sebire N J，et al. Rhabdomyosarcoma subtyping by immunohistochemical assessment of myogenin: tissue array study and review of the literature[J].Pathol Oncol Res，2008，14(3)：233-238.

[11] Mermelstein C S，Martins E R，Partilbo D M，et al.Associatio between the muscle-specific proteins desmin and caveolin-3 in muscle cells [J].Cell Tissue，2007，327(2)：343-351.

[12] 马 兴，王全平，王 臻，等.肌原调节蛋白 MyoD1 在横纹肌肉瘤中的表达[J].细胞与分子免疫学杂志，1999，15(3)：213-214.

[13] 王 正，陈建华，范钦和.横纹肌肉瘤中小窝蛋白 -3 的表达及鉴别诊断意义[J].临床与实验病理学杂志，2008，24(2)：203-206.

[14] Fine S W，Lisanti M P，Argani P，et al.caveolin-3 is a sensitive and specific marker for rhabdomyosarcoma[J].Appl Immunohistehem Mol Morphol，2005，13(3)：231-236.

[15] Wen H R，Borys K，Guy L，et al. Combined vascular endothelial growth factor receptor/epidermal growth factor receptor blockade with chemotherapy for treatment of local，uterine，andmetastatic soft tissue sarcoma[J].Clin Cancer Res，2008，14(17)：5466-5474.

（责任编辑：张学颖）