

· 临床研究 ·

RT-PCR 检测神经母细胞瘤患儿化疗后 骨髓 PGP9.5 mRNA 表达在预后判断中的意义

唐锁勤,冯晨,黄东生,王建文,张小飞

(解放军总医院小儿内科,北京 100853)

【摘要】目的 该研究试图阐明诱导化疗后在转录水平清除骨髓肿瘤细胞能否取得好的疗效。**方法** 应用以 PGP9.5 为靶基因的逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术,其敏感性为 10^6 个细胞,测定 32 例发病时组织学存在骨髓转移的神经母细胞瘤患者,测定初诊及诱导治疗结束后骨髓肿瘤细胞水平。入选病例须在诱导治疗后用免疫组织化学法测定骨髓瘤细胞阴性。**结果** 32 例患者诊断时骨髓 PGP9.5 mRNA 均阳性,诱导结束后 16 例仍阳性,自体骨髓移植后随访 3.4 ± 0.9 年 11 例复发,无病生存率 31%;16 例阴转,骨髓移植后随访 3.2 ± 0.7 年仅有 5 例复发,无病生存率 69%,两组无病生存率有显著性差异($P=0.018$)。**结论** 诱导治疗在转录水平清除骨髓神经母细胞瘤后行自体骨髓移植可以取得较好疗效。

[中国当代儿科杂志,2005,7(3):215-217]

【关键词】 神经母细胞瘤;逆转录聚合酶链式反应;PGP9.5;儿童

【中图分类号】 R73 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2005)03-0215-03

Detection of PGP9.5 expression in bone marrow by RT-PCR after induction chemotherapy in neuroblastoma: relationship with clinical outcome

Suo-Qin TANG, Chen FENG, Dong-Sheng HUANG, Jian-Wen WANG, Xiao-Fei ZHANG. Department of Pediatrics, 301 Hospital, Beijing 100853, China (Email: suoqin@yahoo.com)

Abstract: Objective This study aimed to investigate the effect of clearance of tumor cells in autologous bone marrow after induction chemotherapy (based on RT-PCR detection) on the outcome in patients with neuroblastoma. **Methods** Thirty-two neuroblastoma patients with histological bone marrow metastasis at diagnosis but without tumor cells in marrow based on the immunohistochemistry detection after induction therapy were eligible to this study. The neuroendocrine protein gene product 9.5 (PGP9.5) was measured with RT-PCR, as a bio-marker to detect the presence of tumor cells in bone marrow at diagnosis and after induction chemotherapy. **Results** All patients were PGP9.5 positive in bone marrow at diagnosis. After induction chemotherapy, 16 patients remained PGP9.5 positive in marrows. A 3.4 ± 0.9 year-follow-up showed a relapse in 11 out of the 16 patients, with event free survival (EFS) of 31%. In contrast, among the other 16 PGP9.5 negative patients, only 5 relapsed after (3.2 ± 0.7 years) treatment, with EFS of 69% ($P=0.018$). **Conclusions**

Clearance of neuroblastoma cells through induction chemotherapy (based on RT-PCR detection) in autologous bone marrow is associated with better prognosis in patients with neuroblastoma. [Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(3): 215-217]

Key words: Neuroblastoma; Reverse transcriptase polymerase chain reaction; PGP9.5; Child

神经母细胞瘤是儿童时期最常见的实体瘤,约 50% 的患儿诊断时就有转移症状^[1]。强烈的诱导化疗、手术切除、局部放疗、自体骨髓移植、1,3-顺维甲酸生物治疗可以提高高危病人的 5 年无病生存率到 40%。治疗失败主要归因于原发肿瘤难以缓解或临床缓解后的复发。免疫细胞化学染色方法发现在诱导化疗缓解的患者骨髓中仍有少量的瘤细胞,往往预示疾病进展^[2]。因此,需要采用更敏感的检测方法来监测骨髓微小残留病。PGP9.5 是一种神

经标志物,表达于来源于神经嵴的细胞,如:大脑、周围神经元和轴突、肾上腺髓质细胞、视网膜、垂体前叶、黑色素细胞、甲状腺囊泡细胞等^[3]。我们应用以 PGP9.5 为指标的逆转录-多聚酶链反应法(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测免疫组织化学阴性的骨髓标本^[4],并结合临床随访资料分析其应用价值,取得了较好的结果,报告如下。

[收稿日期]2004-08-31; [修回日期]2005-01-04

[作者简介]唐锁勤(1962-),男,博士,教授,主任。主攻方向:儿童血液/肿瘤疾病。

1 对象与方法

1.1 RT-PCR 检测 PGP9.5 表达敏感性的测定

人神经母细胞瘤细胞系 LA-N-5 用 Leibovitz L-15 培养基,加入 10% 胎牛血清培养。制备肿瘤细胞悬液。LA-N-5 细胞和急性淋巴细胞白血病人骨髓单个核细胞悬液以不同比例混合制成浓度分别为 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 的瘤细胞悬液,单纯的 ALL 病人骨髓和神经母细胞瘤细胞作为阴性和阳性对照。

1.2 病例选择

选择 32 例诊断时骨髓有组织学转移,诱导化疗后组织学、免疫组织化学瘤细胞阴性的 IV 期神经母细胞瘤患儿,男 17 例,女 15 例;年龄 1 岁 2 个月到 8 岁 7 个月(平均 4.8 ± 1.9 岁);原发部位:肾上腺 21 例,腹部其他部位 8 例,胸部 2 例,胸腹联合 1 例;所有患儿治疗方案相同,诱导化疗 6 个疗程、2~3 疗程中手术切除肿瘤、局部放疗(20~30 Gy)、自体骨髓移植、生物治疗。患儿在诊断时和诱导治疗结束后采集骨髓行 RT-PCR 检测 PGP9.5 mRNA,同时用组织学及免疫组织化学染色检查以确保病例选择合格。

1.3 RNA 提取

骨髓细胞经淋巴细胞分离液分离单个核细胞。细胞总 RNA 采用硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步法抽提, RNA 浓度通过紫外分光光度仪测量。

1.4 RT-PCR

RT-PCR 操作程序及 PGP9.5 引物序列参照文献^[3],引物采用 Applied Biosynthesis 380B DNA Synthesizer 合成。PGP9.5,正义链:5'AGA TCA ACC CCG AGA TGA TGC TGA ACA AAG TGC TG,反义链:5'ATT AGG CTG CCT TGC AGA GAG CCA CGG CAG AGAA;PCR 产物为 653 bp。MIC₂ 引物根据 Gene Bank 提供的序列设计并合成。MIC₂,正义链:5'GAT GAC TTT GAC TTA GGA GAT GC. 反义链 5'CAC TCA ATC CAA ATG CGG C,扩增长度为 1238 bp。PCR 条件:PGP9.5:94℃ 40 s,72℃ 75s, 27 次循环;MIC₂:94℃ 90s, 60℃ 2 min,72℃ 3 min,27 次循环,接着于 72℃ 延伸 10 min。产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色紫外凝胶成像分析系统拍照分析。

1.5 统计学分析

应用 STAT 7.0 统计软件进行统计学处理。

2 结果

2.1 RT-PCR 灵敏度测定

琼脂糖凝胶电泳显示 LA-N-5 细胞在 100%,

10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 及 10^{-6} 时候 PGP9.5 阳性,但瘤细胞 10^{-7} 时及阴性对照 PGP9.5 mRNA 阴性,提示 RT-PCR 的灵敏度为 10^{-6} 。(图 1)

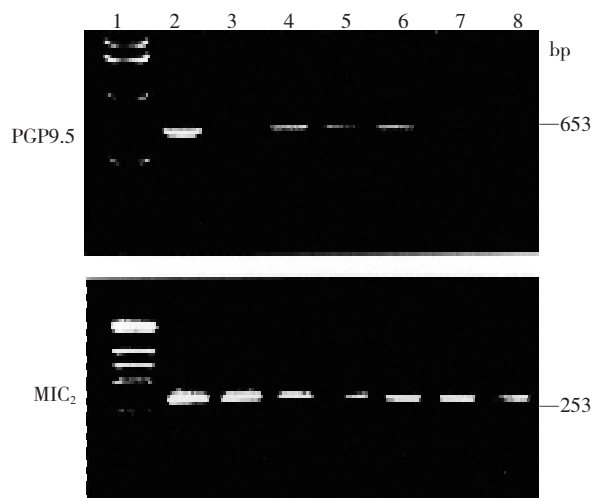


图 1 PGP9.5 mRNA 为测定指标的 RT-PCR 测定骨髓残留神经母细胞瘤灵敏度测定

1:Marker; 2:100% LA-N-5(阳性对照); 3:ALL 骨髓单个核细胞(阴性对照); 4-8:浓度依次为 10^{-3} ~ 10^{-7} 的 LA-N-5 细胞悬液,除 10^{-7} 为阴性外,其余均为阳性。

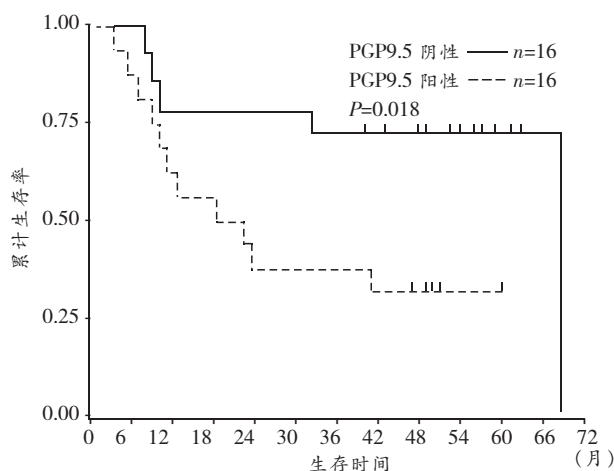


图 2 32 例患儿的生存期曲线

2.2 患儿结果

32 名患儿诊断时骨髓肿瘤细胞 RT-PCR 测定 PGP9.5 mRNA 均阳性。诱导治疗后 16 例仍然阳性,治疗结束后随访 3.4 ± 0.9 年 11 例复发,无病生存率 31%;16 例阴转,随诊 3.2 ± 0.7 年只有 5 例复发,无病生存率 69%,两组中位无病生存时间及 95% 可信区间(confidence interval, CI)见表 1。两组随访时间相似,差异无显著性($P = 0.78$)。Kaplan-Meier 分析显示:PGP9.5 mRNA 阳性的患儿较阴性患儿无病生存率低($P = 0.018$)(图 2)。

表1 两组病例无病生存时间及95% CI

组别	平均无病生存时间(月)	95% CI
阴性组	44.0 ± 4.6	38.2 - 53.8
阳性组	24.1 ± 4.7	14.0 - 34.1

3 讨论

自体骨髓移植后肿瘤复发的原因来自两个方面,一是体内残留的肿瘤细胞,一是移植中污染的肿瘤细胞,两者均与移植前骨髓中的残留肿瘤细胞有关,因此测定骨髓残留肿瘤细胞的方法学十分重要。组织学检测神经母细胞瘤的灵敏度为 10^{-2} ,免疫组织化学测定的灵敏度为 10^{-5} ,许多神经母细胞瘤患儿用上述方法测定骨髓神经母细胞瘤阴性时行自体骨髓移植,术后病人仍然复发^[2,5],说明免疫组织化学方法仍然不够灵敏,需要更灵敏的方法进行测定。本研究显示,应用以 PGP9.5 为指标的 RT-PCR 是测定骨髓残留神经母细胞瘤细胞敏感的、特异的、可重复的方法。PGP9.5 的表达不受 MYCN 基因扩增与否、瘤细胞耐药与否的影响,它可以检测到 10^6 个正常骨髓细胞中的一个残留肿瘤细胞,灵敏度较免疫组化高,具有临床应用价值,在化疗后如骨髓残留的神经母细胞瘤阴性后行自体骨髓移植较阳性时疗效明显优良。

与异基因骨髓移植比较,自体骨髓移植由于移植有瘤细胞污染的可能,移植后的肿瘤复发是影响疗效的重要因素。因此,从临床角度看,需要有客观指标来衡量,骨髓内残留的肿瘤细胞杀伤到何种程度进行移植才能最大降低移植后复发率? 本研究显示,诱导治疗结束后,骨髓移植前如骨髓中肿瘤细胞在转录水平消失,将取得好的疗效,也可以说,当用 RT-PCR 测定骨髓肿瘤细胞阴性后行自体骨髓移植可能取得较好的疗效。移植前残留的肿瘤细胞可能逃避预处理或污染移植体回体内,经过若干代增殖后可引起临床复发。

骨髓中的微小残留病影响骨髓移植后的复发,

Matthay 等^[6]报道接受 HLA 相合的异体骨髓移植并不能取得较经净化的自体骨髓移植更低的复发率。这可能是骨髓中的微小残留病影响骨髓移植后的长期无病生存率的又一佐证。

本研究中患儿获得 75% 的长期无病生存,这种高的长期无病生存率得益于分组时选取的病例为经诱导化疗达免疫化学染色细胞水平缓解,其不具备分组的随机性原则。

本研究结果提示:自体骨髓移植前骨髓残留的神经母细胞瘤可引起移植后肿瘤复发;神经母细胞瘤化疗至骨髓 PGP9.5 mRNA 阴性后行自体骨髓移植可降低移植后复发率。

[参 考 文 献]

- [1] Reynolds CP. Detection and treatment of minimal residual disease in high-risk neuroblastoma [J]. *Pediatr Transplant*, 2004, 8 (Suppl 5): 56-66
- [2] Seeger RC, Reynolds CP, Gallego R, Stram DO, Gerbing RB, Matthay KK. Quantitative tumor cell content of bone marrow and blood as a predictor of outcome in stage IV neuroblastoma: a Children's Cancer Group Study [J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18 (24): 4067-4076.
- [3] Takase T, Hibi K, Yamazaki T, Nakayama H, Taguchi M, Kasai Y, Ito K. PGP9.5 overexpression in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Hepatogastroenterology*, 2003, 50 (53): 1278-1280
- [4] Mattano LA Jr, Moss TJ, Emerson SG. Sensitive detection of rare circulating neuroblastoma cells by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction [J]. *Cancer Res*, 1992, 52 (17): 4701-4705.
- [5] Corrias MV, Faulkner LB, Pistorio A, Rosanda C, Callea F, Piccolo MS, et al. Detection of neuroblastoma cells in bone marrow and peripheral blood by different techniques: accuracy and relationship with clinical features of patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10 (23): 7978-7985.
- [6] Matthay KK, O'Leary MC, Ramsay NK, Villablanca J, Reynolds CP, Atkinson JB, et al. Role of myeloablative therapy in improved outcome for high risk neuroblastoma: review of recent Children's Cancer Group results [J]. *Eur J Cancer*, 1995, 31A (4): 572-575.

(本文编辑:王霞)