

enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma among patients with culture-confirmed tuberculosis[J]. J Infect, 2009, 59(6): 421-423.

[12] Lee YM, Park KH, Kim SM, et al. Risk factors for false-negative results of T-SPOT. TB and tuberculin skin test in extrapulmonary tuberculosis [J]. Infection, 2013, 41(6): 1089-1095.

[13] 石慧, 崔丽英. 结核感染 T 细胞斑点试验诊断结核性胸膜炎的应用价值[J/CD]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2015, 8(2): 51-54.

[14] 万荣, 汪亚玲, 祈燕伟, 等. 结核感染 T 细胞斑点试验在 HIV/AIDS 合并结核感染诊断中的应用[J]. 昆明医学院学报, 2011, 32(7): 138-141.

[15] Chen J, Zhang R, Wang J, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis in HIV-infected patients: a systematic review and meta-analysis[J]. PLoS One, 2011, 6(11): e26827.

[16] 付津平, 可春梅. T 细胞酶联免疫斑点试验与结核抗体平行检测 HIV 感染/AIDS 合并结核感染比较[C]. // 中华医学会, 中国性病艾滋病防治协会. 第四届全国艾滋病临床影像学术会议暨第二届全国感染及传染影像学最新进展学术会议论文集. 郑州, 2011.

[17] Karam F, Mbow F, Fletcher H, et al. Sensitivity of IFN-gamma release assay to detect latent tuberculosis infection is retained in HIV-infected patients but dependent on

HIV/AIDS progression [J]. PLoS One, 2008, 3(1): e1441.

[18] Latorre I, De Souza-Galvao M, Ruiz-Manzano J, et al. Quantitative evaluation of T-cell response after specific antigen stimulation in active and latent tuberculosis infection in adults and children [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2009, 65(3): 236-246.

[19] Chee CB, KhinMar KW, Gan SH, et al. Tuberculosis treatment effect on T-cell interferon-gamma responses to Mycobacterium tuberculosis-specific antigens [J]. Eur Respir J, 2010, 36(2): 355-361.

[20] Wilkinson KA, Kon OM, Newton SM, et al. Effect of treatment of latent tuberculosis infection on the T cell response to Mycobacterium tuberculosis antigens [J]. J Infect Dis, 2006, 193(3): 354-359.

[21] Ferrand RA, Bothamley GH, Whelan A, et al. Interferon-gamma responses to ESAT-6 in tuberculosis patients early into and after anti-tuberculosis treatment [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2005, 9(9): 1034-1039.

[22] Adetifa IM, Ota MO, Jeffries DJ, et al. Interferon-gamma ELISPOT as a biomarker of treatment efficacy in latent tuberculosis infection: a clinical trial [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 187(4): 439-445.

(收稿日期: 2016-01-20 修回日期: 2016-02-27)

• 综 述 •

乙型肝炎病毒相关性肾炎实验室检查方法研究进展

郝小康 综述, 郭瑞林 审校

(陕西中医药大学医学技术学院, 陕西咸阳 712000)

关键词: 乙型肝炎; 肾炎; 临床实验室检查

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.11.029

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)11-1522-04

乙型肝炎(下称乙肝)病毒相关性肾炎(HBV-GN)是 HBV 诱发的肾小球肾炎, 由于我国 HBV 感染较高, 人群中 HBV 携带率高达 10%, 由此引起的肾脏损害亦非常常见。史文丽等^[1]研究显示, HBV-GN 约占肾活检 0.25%。HBV-GN 的发病机制较为复杂, 涉及多种学说: 包括免疫复合物介导、HBV 直接感染肾脏、HBV 诱发的自身免疫、免疫缺陷、遗传因素等^[2]。目前国内在 HBV-GN 的诊断上还有待深入讨论, 而国外由于 HBV 感染的低发生率, 没有制定相应的标准, 现在很多医院临床大夫仍在沿用 1989 年 HBV-GN 座谈会制定的初步诊断标准^[3]。2001 年全国肾活检病理诊断研讨会制定了 HBV-GN 诊断标准^[4]: 通过免疫组化方法在肾小球内检测出 HBV 抗原(HBV-Ag)阳性, 方可诊断为 HBV-GN。2004 年黎磊石院士也提出了关于 HBV-GN 的诊断标准。由于一些学者在血清 HBV 标志物阴性儿童的肾脏中检测到 HBV 标志物, 并且结合临床表现可以诊断 HBV-GN, 所以修订了 HBV-GN 的标准^[5-6]。多数学者认为, 肾组织中 HBV 抗原阳性的患者, 结合肾脏典型病理表现, 可以诊断为 HBV-GN, 而对于血

清 HBV-Ag 阳性, 肾组织 HBV-Ag 阴性的患者则不能诊断 HBV-GN。所以肾组织 HBV 标志物的检测对于 HBV-GN 的诊断意义重大。HBV 标志物在肾脏中的检测一直存在问题, 实验室关于肾组织 HBV 标志物的检测, 目前主要包括免疫荧光法、免疫组织化学法(下称免疫组化法)、核酸分子检查这 3 种方法, 现将这 3 种实验室检查方法原理及优缺点综述如下。

1 免疫荧光法

1961 年 Dixon 开始在肾脏疾病中应用免疫荧光技术, 对肾脏病的病理诊断提供了重要帮助。肾组织中 HBV-Ag 的检测主要采用间接免疫荧光法, 即先用鼠抗人一抗与 HBV-Ag 反应, 形成复合物, 然后用荧光素标记的羊抗鼠二抗与复合物反应, 发出荧光, 在荧光显微镜下观察。目前实验室免疫荧光的检查主要是通过冰冻切片组织和石蜡切片组织来完成。冰冻切片免疫荧光具有操作时间短, 步骤简单, 组织抗原保护好等优点^[7]。但是冰冻间接免疫荧光染色要求实验人员做到: (1)切割后的新鲜肾组织要迅速放入含有生理盐水的一次性塑料管中, 随后放至冰冻切片机内, 进行包埋切片; (2)免疫荧光

检查的肾组织应避免接触任何固定液；(3) 推荐使用厂家的 OCT 包埋剂，不要使用普通胶水代替；(4) 切出大面后要在显微镜下观察有无肾小球，如果难以确认，可以将切片放入苏木素中几秒钟后观察，确认切片内有肾小球后重新切片。冰冻切片间接免疫荧光因为使用新鲜肾组织的原因，没有受到常规固定液的影响，结果的准确性和灵敏度比较可靠，所以临床实验室应多使用此方法。但是冰冻切片机和荧光抗体费用较高，使基层医院在使用上有所限制。

石蜡切片免疫荧光应用较少，作为冰冻切片无肾小球时的补救措施。但是由于肾组织在常规固定中使用的是 10% 的甲醛，甲醛固定的石蜡切片可以使肾组织内的蛋白质交联，抗原决定簇被封闭，导致假阴性。所以必要的抗原修复对于石蜡切片免疫荧光的成功具有重要意义。有研究报道，石蜡切片胰酶抗原修复方法与冰冻切片免疫荧光在检测肾组织 HBV-Ag 取得相似的效果^[8]。彭卫华等^[9]选择 HBV-GN、红斑狼疮肾炎、IgA 肾病，比较了几种抗原修复法的异同，结果显示胃蛋白酶修复效果好。张岚等^[10]比较了石蜡切片与冷冻切片的免疫荧光染色的异同，得出经过胃蛋白酶修复过的石蜡切片在关于疾病诊断判读上没有区别，只是显色强度上稍微弱于冰冻切片。有学者提出，高温高压修复也可以用于肾组织 HBV-Ag 的检查，但是要注意高压锅加热修复可能导致组织破碎，尤其像肾活检这样的小组织^[11]。这些相关性研究或许可以在 HBV-Ag 的检测时提供帮助，但是鉴于石蜡切片免疫荧光所做的研究较少，具体效果还有待证实。

2 免疫组化法

免疫组化法作为实验室检测 HBV-Ag 的另一种重要方法，检测 HBV-Ag 主要是应用免疫酶染色法，即用酶标记特异性的抗体，待酶标抗体与抗原反应形成免疫复合物后，加入底物显色，进行镜检。目前实验室多采用 Dako 公司推出的二步法免疫组化技术-EnVision 法，相对于 SP、ABC 等方法，要敏感很多，定位比较好、比较省时^[12]。随着免疫组化的自动化，许多实验室目前都配有全自动免疫组化机，但是由于全自动免疫组化机所使用的抗原修复大多为 EDTA 和柠檬酸，这在石蜡切片 HBV-Ag 检测应用还没有大量试验进行验证，所以应该持怀疑态度。免疫组化染色涉及不同抗原的修复方法选择、不同厂家抗体效价、人为因素等缺点，使免疫组化技术的不确定性增多。伴随着试验仪器的发展和试验人员知识提高，一些改良的免疫组化方法取得了较好的效果。石成钢等^[13]研究了冰冻切片免疫荧光和石蜡切片免疫组化的比较，HBV-Ag 阳性率相近，改良组化为 67.5%，荧光法为 72.5%。

3 核酸分子检测方法

HBV 感染人体后，致病和传播主要在 HBV-DNA。HBsAg 和 HBV-DNA 作为 HBV 的外壳和核酸，检出 HBsAg 说明 HBV 感染了人体，但是不代表有传染性。HBV-DNA 阳性则说明 HBV 在人体复制和有传染性。共价闭合环状 DNA (cccDNA) 代表 HBV-DNA 正在复制，是复制过程中 RNA 的直接模板，它的检出相比 HBV-DNA 更能说明病毒复制。已知细胞内持续 HBV 感染以核内 cccDNA 的存在为特征，HBV cccDNA 的检测对研究 HBV-GN 致病机制和评价抗病毒药物的疗效等方面具有重要意义。1983 年，Hogan 等^[14]发现，HBV cccDNA 和 HBsAg 存在于鸭的肾组织中，证明 HBV 能在肾组织复制和翻译。Toplu 等^[15]研究抗病毒药物对血液

HBV DNA 和组织细胞内的 HBV cccDNA 的效果，得出拉米夫定对清除 HBV cccDNA 作用不大，所以检测 HBV cccDNA 在临床监测 HBV 疾病发展和用药效果方面是非常有必要的。目前 HBV 核酸分子的检测主要包括聚合酶链反应 (PCR)、原位杂交技术、Southern-blot 等方法检测。

3.1 PCR 肾组织 HBV 的核酸 PCR 检测技术是在新鲜肾组织或石蜡包埋肾组织中提取到目的 DNA 后，直接用 PCR 仪扩增后检测。PCR 已比较成熟，目前实验室多采用荧光定量 PCR 检测，标准化操作流程见参考文献^[16]。当然也要注意实时荧光定量 PCR 也有不可忽视的缺点，在检测步骤方面对于目的模板的制备，使用不同方法对于 DNA 的提取，扩增时反应条件的掌握及对 PCR 仪器的熟知等，这些方面都对检测提出了较高的要求。姜国涛等^[17]报道用巢式 PCR 检测 HBV-DNA 阳性率为 53.8%，免疫组化检测 HBsAg 阳性率为 48.1%。证实了肾组织中核酸标志物的阳性率高于抗原标志物的阳性率。Mccourt 等^[18]应用 PCR 技术检测 HBV-GN 患者中肾活检抽提物 PCR 检查 HBV-DNA 阳性率为 76.5%。然而在行直接 PCR 检测新鲜或石蜡包埋的肾组织时，不能排除血液中 HBV 污染^[19]。王祝娟等^[20]采用实时荧光定量 PCR 对患者肝组织内的 cccDNA 进行了检测，然而在判读结果中因该考虑到酶处理对象时导致 HBV cccDNA 减少这一因素。

3.2 原位杂交 原位分子杂交法是检测肾组织中 HBV DNA 或 RNA 的另一方法。将经过适当处理的肾组织切片，与放射性物质或生物素标记的 HBV DNA 探针进行核酸杂交，载玻片光乳剂中杂交 HBV-DNA 或 RNA，在放射核素显像图中呈黑色颗粒，可发现 HBV 感染的肾细胞。具体步骤可见参考文献^[21]。原位杂交的优点是既可检测少量 DNA，又可判断肾组织中 HBV 感染细胞的分布状况。在 HBV-GN 患者的肾组织中检测到 HBV 核酸分子，说明 HBV 在肾组织中存在并且复制。然而用原位杂交检测 HBV DNA，国内以往均获阴性结果。原位杂交方法也有内在的缺点，例如不能够精确定量核酸分子，在探针选择、标记、浓度和杂交的时间和温度上都有严格的要求，组织内源性酶的影响等这些因素使它在临床应用受到了考验^[22]。

3.3 Southern 印迹杂交 Southern 印迹分子杂交法适合用于区分整合于肾组织细胞的 HBV-DNA 和未整合的游离 HBV-DNA，并可显示病毒复制中的中间产物序列，原理是肾细胞中 DNA 被一定的限制核酸酶切割，降解为一些小片段，后者通过琼脂凝胶电泳按相对分子质量大小分离开，将其移至硝化纤维素膜或尼龙膜上，变性后再与放射性物质标记的 HBV-DNA 探针一起孵育，二者结合后的含 HBV-DNA 片段在放射核素显像图上呈黑带。应用 Southern 印迹杂交在肾组织中见到整合型 HBV DNA，但无法提示 HBV DNA 在细胞内的定位。

随着实验室技术的不断发展，有很多学者也运用其他方法检测 HBV 核酸分子，取得了不错的效果。张爱平报道直接原位 PCR 检测 HBV DNA 阳性信号较原位杂交更为清晰。张静等^[23]报道应用原位杂交结合 PCR 检测 40 例 HBV-GN 患者的肾组织石蜡标本，HBV mRNA 检测阳性率达到 80% 以上，肾小管阳性率高于肾小球。应用原位杂交结合 PCR 检测 HBV-GN 患者的肾组织石蜡标本 HBV mRNA 检测阳性率达到 95%。原位 PCR 始于 1990 年，是对细胞内目的基因片段扩增再结合原位杂交进行检测的方法，具有扩增高效率与精确定

位的优点。肾组织 HBV cccDNA 的检测应采用原位杂交技术和 PCR 技术。Zhong 等^[24]在检测肝组织中的 HBV cccDNA 时,针对 DNA 少的情况,将实时荧光 PCR 技术和 PSAD 消化、滚环扩增及跨缺口联合,检测到一般 PCR 所不能检测到的范围。周益等^[25]应用激光微分离技术结合 PCR 检测肾组织 HBV DNA,检出率为 54.5%,通过激光微分离肾小球和肾小管,从而清除了来自肾血管和间质中 HBV DNA 对结果的影响,对 HBV 分布在肾小球还是肾小管作出了解释。以上几种方法或许会在检测肾组织中检测 HBV DNA 和 HBV mRNA、HBV cccDNA 提供有效的检测标准。

综上所述,目前临床上冰冻免疫荧光方法检测肾组织中 HBV-Ag 作为诊断 HBV-GN 最常用的方法。肾组织 HBV 标志物的检测方法中,冰冻免疫荧光方法在临床实验室应用最为普遍,在肾组织 HBV 标志物的检测方法中,冰冻免疫荧光技术因为采用新鲜标本的原因,荧光抗体的灵敏度尚可,避免了很多影响因素,所以受到临床实验室的认可。缺点是需要肾组织新鲜,实验室配备有冰冻切片机、荧光显微镜等设备,不适合做回顾性研究;免疫组化技术由于使用的是石蜡组织,检出敏感度较低,还有技术人员熟练程度影响大,限制了它的应用。经过改良的免疫组化技术还需要更多的研究及探索才能明确其对诊断的效果。PCR、原位杂交技术、Southern 印迹杂交因为各自方法的缺点很难实现独自在检测肾组织中 HBV 核酸分子的可靠性与真实性。原位 PCR 结合了 PCR 和原位杂交技术的优点,对检测到有 HBV 的核酸分子真实性有保证,可以为临床检测服务。激光微分离技术反映病毒在肾组织的分布中具有独特优势,在提取特定肾组织部位核酸分子上可以为其他检测方法所采用。希望以上研究进展为临床 HBV-GN 的诊断提供一个新的有效的途径。

参考文献

- [1] 史文丽,刘飞飞,张晓锋,等.乙型肝炎病毒相关性肾炎的中医证候特点及疗效分析[J]. 中西医结合肝病杂志, 2013,23(3):145-147.
- [2] 康慧霞,李荣山.乙型肝炎病毒相关性肾小球肾炎 39 例临床与病理分析[J]. 临床肾脏病杂志,2011,11(5):213-216.
- [3] 朱肖鸿,陈丹丹,周萍,等.不同中医证型慢性乙型肝炎轻度患者肝组织病理研究[J]. 中西医结合肝病杂志,2014, 24(1):7-8.
- [4] 关金,生杰.肾穿刺活检 610 例患者的临床病理特点分析[J]. 中国全科医学,2015,14(14):1723-1726.
- [5] Koga T, Kai Y, Fukuda R, et al. Mild electrical stimulation and heat shock ameliorates progressive proteinuria and renal inflammation in mouse model of Alport syndrome[J]. PLoS One, 2012, 7(8):e43852.
- [6] Kruegel J, Rubel D, Gross O. Alport syndrome—insights from basic and clinical research[J]. Nat Rev Nephrol, 2013, 9(3):170-178.
- [7] 邹万忠.肾活检病理学[M]. 2 版. 北京:北京大学医学出版社, 2009:214-215.
- [8] 金丽,曾玲,郑智勇.乙型肝炎病毒相关性肾炎伴大量蛋白栓 3 例报道并文献复习[J]. 临床与实验病理学杂志, 2012, 28(12):1394-1396.
- [9] 彭卫华,陈建,黄晓清,等.改良免疫组化法在诊断乙型肝炎病毒相关性肾炎的应用研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(8):683-687.
- [10] 张岚,王水华,陈邦明,等.石蜡切片免疫荧光染色在肾活检病理诊断中的应用[J]. 临床与实验病理学杂志, 2011, 27(6):670-671.
- [11] Watson K, Wang C, Yilmaz A, et al. Use of immunohistochemistry in routine workup of prostate needle biopsies; a tertiary academic institution experience[J]. Arch Pathol Lab Med, 2013, 137(4):541-545.
- [12] 刘俊峰,连家燕,聂钊铭,等. EnVision 法在病理免疫组织化学检测中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(20):2941-2942.
- [13] 石成钢,胡爱玲,曾晓琳,等.肾组织 preS1/S2-Ag 检测在乙型肝炎病毒相关性肾炎诊断中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(10):1815-1820.
- [14] Hogan J, Mohan P, Appel GB. Diagnostic tests and treatment options in glomerular disease, 2014 update[J]. Am J Kidney Dis, 2014, 63(4):656-666.
- [15] Toplu N, Aydogan A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniasis[J]. Parasitol Res, 2011, 109(4):1051-1057.
- [16] 张永乐,徐岱,朱国献,等.乙肝患者肝组织中 HBVcccDNA 与血清中 HBVDNA、HBeAg 的关系[J]. 医学研究杂志, 2008, 37(3):60-61.
- [17] 姜国涛,安惠霞,张琪琦,等.肾组织中乙型肝炎病毒抗原及核酸的检测在诊断中的意义[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2008, 9(7):620-621.
- [18] Mccourt CM, Boyle D, James J, et al. Immunohistochemistry in the era of personalised medicine[J]. J Clin Pathol, 2013, 66(1):58-61.
- [19] Kirac Y, Bilen S, Duranay M. Comparison of laboratory findings in patients with glomerulonephritis classified according to histopathologic diagnosis[J]. Minerva Med, 2014, 105(2):149-156.
- [20] 王祝娟.乙型肝炎病毒相关性肾炎 40 例临床分析[J]. 陕西医学杂志, 2014, 7(7):856-858.
- [21] 王轩,周益,袁伟杰,等.乙型肝炎病毒 X 基因对肾小管上皮细胞凋亡及免疫分子的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2013, 29(1):50-54.
- [22] 王轩,周益,袁伟杰,等. Notch1 受体在乙型肝炎病毒 X 基因介导的肾小管上皮细胞增殖、凋亡中的作用[J]. 中华医学杂志, 2013, 93(4):300-304.
- [23] 张静,于艳,王汉民,等.乙型肝炎病毒相关性肾炎肾组织内 HBV mRNA 原位杂交检测及其临床意义[J]. 诊断病理学杂志, 2009, 16(2):113-116.
- [24] Zhong Y, Han J, Zou Z, et al. Quantitation of HBV covalently closed circular DNA in micro formalin fixed paraffin-embedded liver tissue using rolling circle amplification in combination with real-time PCR[J]. Clin Chim Acta,

2011, 412(21/22):1905-1911.

脏病杂志, 2011, 27(9):646-651.

[25] 周益, 朱楠, 袁伟杰, 等. 乙型肝炎病毒相关性肾炎患者肾组织 Notch1 受体表达与临床病理的相关性[J]. 中华肾

(收稿日期:2016-01-20 修回日期:2016-03-19)

• 综 述 •

睾丸特异性蛋白 50 在肿瘤中的研究进展

郭秋实¹, 李冰洁²综述, 朱 涛^{1△}审校

(1. 河南省柘城县人民医院检验科, 河南商丘 476200; 2. 河南省平顶山学院 467000)

关键词: 睾丸特异性蛋白 50; 乳腺癌; 胃癌; 结直肠癌; 肿瘤标记

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.11.030

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)11-1525-03

睾丸特异性蛋白 50(TSP50)是利用甲基化敏感差分析技术(MS-RDA)从睾丸组织和乳腺癌组织中分离出来的低甲基化片段,其表达具有高度的特异性,在人睾丸组织中特异性高表达;肺脏、胃肠道、乳腺等正常组织均不表达。近年来的研究发现, TSP50 在乳腺癌、胃癌、结直肠癌等多种肿瘤中高表达,与肿瘤的发生和发展密切相关,有望作为一种潜在的新型肿瘤标志物和药物作用靶点应用于临床肿瘤的诊断和治疗,成为肿瘤免疫学研究的热点。

1 TSP50 概述

1.1 TSP50 的理化特性 TSP50 是肿瘤/睾丸抗原(CTA)家族中的一个新成员, Shan 等^[1]以乳腺癌组织为材料,用对甲基化 CG 丰富序列敏感的限制性核酸内切酶 MSP I 来消化基因组 DNA 制备复制子,再通过 MS-RDA 在乳腺癌组织基因组中分离得到 2 个亚甲基化 DNA 片段(BR50、BR254),再用 BR50 作为探针,在人体睾丸 cDNA 文库里筛选到一种新的肿瘤-睾丸基因。正常情况下, TSP50 在人睾丸组织中特异性高表达,肺脏、胃肠道、乳腺等组织均不表达^[2]。TSP50 编码基因位于人类第 3 号染色体上, cDNA 全长 1 338 bp, 含有 4 个外显子, 编码一种含 385 个氨基酸的蛋白, 其与常见的丝氨酸蛋白酶同源, 但催化活性中心三联体结构中的丝氨酸被苏氨酸替换, 因此它是一个特殊类型的苏氨酸蛋白酶, 且苏氨酸蛋白酶活性残基在细胞增殖中发挥重要作用^[3]。TSP50 基因有活性的启动子包含 CpG 岛和转录活性区, 人 DNA 经重亚硫酸盐处理后聚合酶链反应(PCR)扩增的片段为 -89 ~ -257, 长度为 168 bp, 这个 CpG 岛包括 12 个 CG 和 TATA 盒子^[4]。

1.2 TSP50 蛋白在肿瘤中的表达与调控 TSP50 蛋白表达具有高度的特异性, 其可能与 TSP50 基因启动子 CpG 岛甲基化水平有关。Huang 等^[4]的研究指出, 正常组织中 TSP50 启动子 CpG 岛甲基化位点处于高甲基化状态, 结合的甲基改变了 DNA 双链结构的构象, 影响了某些表达调控因子与 TSP50 启动子的结合, TSP50 启动子的活性降低, TSP50 基因功能保持沉默, TSP50 蛋白不表达。肿瘤组织因启动子 CpG 岛甲基化位点去甲基化, DNA 双链结构的构象发生了改变, 使某些表达调控因子能够与 TSP50 启动子的结合位点结合, 启动子被激活, TSP50 基因开始转录, 表达 TSP50 蛋白, 表达 TSP50 蛋白的组织和不表达 TSP50 蛋白的组织进行的启动子甲基化水平试验结果与 TSP50 蛋白在这些组织中的表达结果相符, 由此证明了 TSP50 启动子 CpG 岛甲基化位点的甲基化水平决定了启动子的活性, 也决定了 TSP50 蛋白在组织

中的表达。关于 TSP50 基因表达调控机制到目前为止仅有少量研究。碱性成纤维生长因子(bFGF)可以与 TSP50 启动子中的 SP1 结合位点, 通过 ERK/SP1 通路下调 TSP50 表达^[5]。Kosaka-Suzuki 等^[6]也发现, TSP50 基因上有 2 个可以与转录因子 BORIS 蛋白结合的位点, 通过与转录因子 BORIS 蛋白结合可以促进 TSP50 基因的表达, 而结合位点的突变将导致 BORIS 无法结合及丧失其激活启动子的能力。虽然 BORIS 的表达很重要, 但它对于 TSP50 的表达是非常必需的, 进一步的研究表明 BORIS 结合位点与其甲基化状态相互独立, 同时他们的研究也在生理条件下验证了一种 CTA 的表达可以被另一种 CTA 调控。Yu 等^[3]的研究发现, TSP50 T310 基因突变显著降低了 TSP50 诱导的细胞增殖、集落形成、离体细胞的侵袭力, 最重要的是降低了 TSP50 在体内的致癌作用, 可见 TSP50 蛋白 T310 基因在 TSP50 发挥生物功能中也起重要作用。进一步研究表明, 其蛋白酶活性中心的三联体结构尤其是第 206 位表达的天门冬氨酸, 在 TSP50 介导的细胞增殖特别是肿瘤的发生中起的作用大于第 310 位表达的苏氨酸及第 153 位表达组氨酸^[7]。应用 RNA 干扰技术沉默 TSP50 的表达后, 可以抑制肿瘤细胞的增殖、克隆形成和转移、诱导肿瘤细胞凋亡, 增强肿瘤细胞对抗肿瘤药物阿霉素的敏感度, 其潜在分子机制与 NF- κ B 信号途径相关^[8]。TSP50 通过激活细胞核内的 NF- κ B 信号传导通路及 P53 抑癌基因的负调控在细胞的增殖中起重要作用^[9-10]。研究 TSP50 蛋白在肿瘤中的分子机制, 将使关于 TSP50 蛋白在肿瘤发生和发展中作用的研究更加明了。

2 TSP50 表达与肿瘤

2.1 TSP50 与乳腺癌 乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤。据国家癌症中心和原卫生部疾病预防控制局 2012 年公布的 2009 年乳腺癌发病数据显示, 全国肿瘤登记地区乳腺癌发病率位居女性恶性肿瘤的第 1 位, 女性乳腺癌发病率全国约为 42.55/10 万, 成为危害女性健康的第一大杀手。乳腺癌的早期发现、早期诊断是提高疗效、减少病死率、改善预后的关键。因此新的肿瘤标志物被不断发现应用于乳腺癌的早期诊断。TSP50 是 Shan 等^[1]在乳腺癌组织中通过 MS-RDA 分离出来的特殊蛋白质, 他们应用免疫印迹法检测癌组织的研究表明, 大约 92% 的乳腺癌患者癌组织中有 TSP50 蛋白表达, 具有很高的阳性率; 刘洋等^[11]利用免疫组织化学方法, 用单克隆抗体检测了 112 例乳腺癌患者组织、乳腺良性肿瘤患者组织及乳腺增生患者组织中 TSP50 蛋白的表达情况。结果显示, TSP50