

- tems in osteoporotic comminuted distal humerus fractures [J]. *J Orthop Res*, 2008, 26(6): 778-784.
- [17] Sanchez-Sotelo J, Torchia ME, O'Driscoll SW. Principle-based internal fixation of distal humerus fractures [J]. *Tech Hand Up Extrem Surg*, 2001, 5(4): 179-187.
- [18] Mckee DM, Veillette CJV, Hall JA, et al. A multicenter, prospective, randomized, controlled trial of open reduction—internal fixation versus total elbow arthroplasty for displaced intra-articular distal humeral fractures in elderly patients [J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2009, 18(1): 3-12.
- [19] 黄聪, 蒋协远, 王满宜. 双钢板内固定与人工全肘关节置换术治疗老年肱骨髁间 C 型骨折的早期疗效比较 [J]. *中华骨科杂志*, 2011, 31(3): 243-248.
- [20] Kamineni S, Morrey BF. Distal humeral fractures treated with noncustom total elbow replacement [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2009, 86(5): 940-947.
- [21] Chen RC, Harris DJ, Leduc S, et al. Is ulnar nerve transposition beneficial during open reduction internal fixation of distal humerus fractures [J]. *J Orthop Trauma*, 2010, 24(7): 391-394.
- [22] Vazquez O, Rutgers M, Ring DC, et al. Fate of the ulnar nerve after operative fixation of distal humerus fractures [J]. *J Orthop Trauma*, 2010, 24(7): 395-399.
- [23] Gofton WT, Macdermid JC, Patterson SD, et al. Functional outcome of AO type C distal humeral fractures [J]. *J Hand Surg Am*, 2003, 28(2): 294-308.
- 综 述 ·

(收稿日期: 2012-10-15 修回日期: 2012-12-02)

脊索瘤新型标记物 *Brachyury* 相关研究的进展

刘拴得 综述, 初同伟[△] 审校

(第三军医大学新桥医院骨科, 重庆 400037)

关键词: 脊索瘤; 基因, *T-box*; 基因, *Brachyury*; 肿瘤标记物

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.02.043

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)02-0230-03

脊索瘤是一种较为罕见的恶性原发性骨肿瘤, 它起源于原始胚胎脊索组织残余物, 其年发生率约为 0.51~8.00/1 000 000^[1], 占原发恶性骨肿瘤的 1%~4%^[2]。脊索瘤好发于脊柱中轴的两端, 其中, 骶尾部占 40%~50%, 颅底部占 35%~40%, 只有少数发生于其余椎体, 约占 15%~20%^[3]。术后 1 年的患者中, 其复发率约为 20%^[4]。脊索瘤起病隐匿, 生长缓慢, 所有年龄段均可罹患, 有些报道称该病的男女发病比例约为 2:1, 但在其他报道中并未呈现一致性^[5]。

脊索瘤具有早期发现难, 手术彻底切除难, 切除后复发率高的特点。1856 年 Virchow 最早对该疾病进行了报道, 1894 年 Ribbert 首先发现其起源, 并用“脊索瘤(Chordoma)”一词描述此种疾病。脊索瘤的肿瘤学国际疾病分类编码(international classification of diseases for oncology, ICD-O)为 9370/3。脊索瘤可分为 3 种类型: 典型脊索瘤、软骨样脊索瘤以及去分化型脊索瘤。其诊断主要依靠临床症状、影像学表现, 并密切结合病理学诊断。一方面, 传统免疫标记物对脊索瘤的诊断与鉴别诊断虽然有重要的辅助价值, 但并非所有脊索瘤都恒定表达这些标记物^[6]; 另一方面, 不断改进的手术方式并辅以术后放疗虽然获得了一定的进步, 但仍然缺少一种特异而有效的对抗脊索瘤的化疗制剂, 这使得手术难以切除的残余肿瘤极易复发及转移。目前, 对脊索瘤的研究大多集中在临床治疗方面, 在分子生物学、细胞和分子遗传学方面的研究刚刚开始, 而对于脊索瘤分子机制的深刻认识无疑将有助于该疾病的早期诊断及彻底治愈。最近, 一个新的脊索瘤标记物正引起广泛关注, 即 *Brachyury* 基因。有证据表明, 该基因的表达仅局限于胚胎时期中胚层脊索源性肿瘤, 尤其是脊索瘤。本文将围绕国内、外近年来对该基因的相关研究做一综述。

1 *Brachyury* 与 *T-box* 基因家族

1927 年, 人们首次在鼠的原肠胚突变中发现 *Brachyury* (*T*) 座位; 1990 年该基因得到克隆, 并证明其编码一种转录因子^[7], 而后在果蝇、斑马鱼、青蛙、蝶螺、线虫等动物及人类陆续发现 50 多个不同的成员, 从而构成了 *T-box* 基因家族。

T-box 基因家族成员均含有 1 个保守的结构域, 该结构域编码一种名为 *T-box*(*Tbx*) 的多肽, 该 *Tbx* 蛋白的相对分子质量为 $50 \times 10^3 \sim 78 \times 10^3$, 大约包含了 230 个氨基酸。在 *Tbx* 蛋白中含有一个序列特异性 DNA 结合域, 即 *T* 结构域, 相对分子质量大约为 $17 \times 10^3 \sim 26 \times 10^3$ 。该结构域在所有的 *Tbx* 蛋白中都是保守的, 可结合大约 200 bp 的特异性 DNA 序列, 而与其结合的所有 DNA 序列都存在一致性序列(即 TCA-CACCT), 因此, 编码该蛋白的基因被称为 *T-box* 基因。

T-box 基因家族主要编码与发育调控相关转录因子。系统分类学研究表明, *T-box* 基因家族是一个古老的家族, 大部分生物的基因组至少含有 5 个 *T-box* 基因。小鼠的基因功能研究显示: *Tbx15* 为骨骼发育所必需, 而 *Tbx18* 则为脊柱、输尿管及心脏的形成所必需。*Brachyury* 基因是 *T-box* 基因家族中的一员, 它定位于 6q27 区域, 编码转录因子, 即 *Brachyury* (*Bra*) 蛋白, 其转录活性在中胚层后期的发展和中轴线原始胚胎组织的调控上发挥关键性作用。

2 *Brachyury* 基因与脊索组织细胞

骨骼系统源自轴旁中胚层、侧中胚层和神经嵴, 而胚胎时期的脊索主要引导神经管和椎体的进化^[8], 推测它们也许可以影响受损椎间盘的修复; 其与软骨组织也十分接近, 因此, 有学者将脊索组织认为是软骨组织的原始形式。在一些脊椎动物中, 脊索源性细胞存在于动物的一生; 而在人类, 从胚胎形成至

婴儿出生后,该细胞逐渐减少、消失,并且在椎体,该细胞被骨组织代替,在椎间盘由髓核替代,直至 10 岁左右该细胞基本消失殆尽^[9]。然而,有证据表明在成人中,有些还残留脊索细胞^[8]。有学者认为,髓核是否由脊索细胞直接形成尚不明确^[10];也有学者认为,由脊索性髓核向纤维软骨性髓核的转变伴随着软骨细胞由透明软骨终板向脊索髓核区域迁移的过程。这种出生后的终末分化组织(脊索性髓核)最终被新的异位组织(纤维软骨性髓核)取代的现象是一种独特的现象^[11]。

椎间盘内的脊索性细胞排列成团块状或网状,散布于黏液样基质中,细胞体积较大,约 25~85 μm,呈多边形或圆形,核为卵圆形或杆状,细胞质内含有幼稚线粒体和粗面内质网,黏稠的细胞质内还含有糖原和胞质丝以及大量的被细纤维所包裹的胞质内涵体,其中可见大小不等的空泡,因而被称为空泡样细胞^[12]。近期研究发现,脊索性细胞的空泡在维持自身正常形态上起着重要作用^[13]。分子生物和免疫学研究发现,脊索性细胞表达 CD44,半乳糖素-3(Galactin-3, Gal-3),弹性蛋白(Vimentin, Vim),细胞角蛋白(cytokeratins, CK) 8、19,硫酸软骨素蛋白多糖(chondroitin sulfate proteoglycan, CSPG)和 II A 型胶原蛋白^[14]。

Brachyury 的一个重要功能是介导对胚胎中胚层的诱导,而该诱导作用被证明是通过通过对成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)信号的反应而实现的。脊索组织以及由大量细胞迁移形成的尾部近轴中胚层在缺少 Brachyury 功能的情况下是不能形成的。在 Brachyury 基因突变的小鼠中,它们均表现为无尾化,而在非洲爪蛙胚胎中该基因表达为阴性^[7]。Vujovic 等^[15]研究证明,正常妊娠 6~8 周的胚胎中 Brachyury 基因的表达仅限于脊索。有趣的是,Shen 等^[16]在对 46 例脊索瘤标本研究时意外发现,其中 6 例存在脊索样细胞遗迹与脊索瘤细胞共存的现象,并且,Brachyury 基因在这 6 例脊索瘤标本中全部在细胞核中表达,而在脊索样细胞遗迹中则全部为阴性。

3 Brachyury 在脊索瘤及其他类型肿瘤中的表达

Henderson 等^[17]运用基因表达微阵列的方法,对 19 种 96 个间叶组织肿瘤进行比较研究,他们发现脊索瘤与软骨样肿瘤(包括软骨肉瘤、软骨母细胞瘤、骨黏液样纤维瘤等)的基因表达谱十分接近,它们都共同表达一系列透明软骨的典型基因。虽然,脊索瘤与软骨样肿瘤有很多相似之处,但它们之间也存在着一些不同:脊索瘤低表达肥厚基因胶原 X、血小板源生长因子 α(platelet-derived growth factor-α, PDGF-α),内质网钙结合蛋白 3 (reticulocalbin-3)等;相反,CK-8、15、18 和 19,周斑蛋白(periplakin),CD24 以及 Brachyury 仅在脊索瘤中表达,而在软骨样肿瘤中未检测到。随后,Vujovic 等^[15]通过微矩阵分析,Brachyury 寡核苷酸的逆转录聚合酶链式反应、多克隆抗体免疫组织化学染色等方法进一步研究发现:Brachyury 转录因子在胚胎脊索组织以及脊索瘤中都有表达;相反,在对 323 例其他类型肿瘤(包括 163 例软骨样肿瘤和 160 例 30 种其他类型肿瘤)中均未发现其表达;同样,在人体各种正常组织(包括成人髓核)中也未发现其表达。因此认为,Brachyury 的表达仅限于脊索组织和脊索源性的肿瘤,且 Brachyury 基因有望成为辨别脊索瘤和软骨肉瘤的特异性生物标记物^[15]。

为进一步研究 Brachyury 作为新型脊索瘤标志物的敏感性和特异性,很多学者进行了深入研究。Oakley 等^[18]收集 103 例标本,经诊断其中 45 例为软骨样脊索瘤,34 例为普通型,24 例为软骨肉瘤,随后通过组织芯片对这些标本进行比

较,分析几种新型标记物和传统标记物的特异性和敏感性,新型标记物包括 Brachyury、性别决定区 Y 框蛋白 9(sex determining region Y-box 9, SOX-9)和平足蛋白(podoplanin);传统标记物包括神经胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acid protein, GFAP)、癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、CD24 和上皮细胞膜抗原(epithelial membrane antigen, EMA)。结果显示 Brachyury 检测的特异性和敏感性分别为 98%和 100%,这比传统标记物的特异性和敏感性有所提高;SOX-9 对脊索瘤和软骨肉瘤的鉴别诊断是无效的;Podoplanin 蛋白是软骨肉瘤惟一阳性的标记物^[18]。Romeo 等^[19]发现,Brachyury 出现在软骨样脊索瘤细胞的软骨样区域,这也许提示该软骨的形成是通过一种完全不同于软骨样肿瘤的调节机制而实现的。Jambhekar 等^[20]通过免疫组织化学染色的方法对 51 例脊索瘤和 58 例非脊索瘤样肿瘤进行比较分析后认为,90%以上的脊索瘤对 Brachyury 反应为阳性,显示出其在诊断方面惟一而独特的价值。有人对 46 例不同类型脊索瘤和 58 例其他肿瘤(包括软骨肉瘤、脂肪肉瘤、黏液表皮样癌、黏液样癌等)比较分析后认为,Brachyury 对于鉴别诊断的特异性为 100%,敏感性为 86.9%。Sangoi 等^[21]对 111 例生殖细胞瘤,184 例转移性肾透明细胞癌,30 例非瘤性和瘤性(非生殖细胞)睾丸组织进行研究,发现上述所有标本均不表达 Brachyury;而 12 例脊索瘤中 Brachyury 的表达均为阳性。Yang 等^[22]对 4 个患有家族性脊索瘤疾病的家族进行研究,发现患有该病的患者在 6q27 上具有重复区域,而该区域只有 Brachyury(T)基因,这表明,对于家族性脊索瘤来说,该基因是重要的敏感性基因^[23]。但是,也有报道称,成血管瘤细胞可高表达 Brachyury 基因;Palena 等^[24]对不同肿瘤细胞(包括小肠癌、膀胱癌、肾癌、肺癌、子宫癌及胃癌等)研究后认为,Brachyury 基因在这些肿瘤及其癌细胞系也有少量的表达。同时,Oakley 等^[18]认为只有 89%的脊索瘤细胞表达 Brachyury 基因,因此,这将意味着 Brachyury 基因的表达缺失不能完全排除脊索瘤。

近年来,也有学者试图建立脊索瘤细胞系,以期从更深入的层面进一步研究脊索瘤。Decomas 等^[25]认为,轴外脊索瘤(副脊索瘤)难以确诊的问题可通过检测 Brachyury 基因的高表达加以解决,并建立轴外脊索瘤细胞系(EACH-1)。Hsu 等^[26]从一位患有骶骨脊索瘤的 61 岁妇女身上获取肿瘤标本,并以此成功建立细胞系(JHC7),将其移植于免疫缺陷小鼠后发现该肿瘤的特性与亲代无异。随后,他们用短发夹状 RNA(short hairpin RNA, shRNA)使 Brachyury 基因静默的方法消除了脊索瘤的一些显著特征,比如含空泡的特点,继而使其增殖能力几乎缺失,并使其更趋向上皮细胞样分化,因此,他们认为 Brachyury 是间充质样表型的一个上游转录调节因子,并提出它可以成为治疗上的一个重要靶点。

4 展 望

目前,Brachyury 基因作为脊索瘤的新型标记物的特异性和敏感性越来越引起人们广泛的关注,它有望成为一种可靠的诊断标记物及肿瘤治疗的靶向蛋白之一,然而,国内对这一免疫标记物的研究尚鲜有报道。因此,致力于从分子生物学、细胞生物学、基因组学以及蛋白质组学的角度深入探讨脊索瘤的发生、发展与转归的病理机制,必将有助于对这一疾病的深刻认识,并对脊索瘤进行早期诊断和彻底治愈。笔者相信,在今后的研究中,建立富含脊索瘤各种特征(包括完全表达 Brachyury)的细胞系,并以此为基础进行深入研究,将会成为脊索瘤研究的新热点和趋势。

参考文献:

- [1] Memaster ML, Goldstein AM, Bromley CM, et al. Chordoma; incidence and survival patterns in the United States, 1973-1995 [J]. *Cancer Causes Control*, 2001, 12(1):1-11.
- [2] Bergh P, Kindblom LG, Gunterberg B, et al. Prognostic factors in chordoma of the sacrum and Mobile spine; a study of 39 patients [J]. *Cancer*, 2000, 88(9):2122-2134.
- [3] Fuchs B, Dickey ID, Yaszemski MJ, et al. Operative management of sacral chordoma [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2005, 87(10):2211-2216.
- [4] Colli B, Al-Mefty O. Chordomas of the craniocervical junction; follow-up review and prognostic factors [J]. *J Neurosurg*, 2001, 95(6):933-943.
- [5] Diaz RJ, Cusimano MD. The biological basis for modern treatment of chordoma [J]. *Neuro Oncol*, 2011, 104(2):411-422.
- [6] 张宝燕, 李向红, 王湛博, 等. 脊索瘤 82 例临床病理分析和免疫表型研究 [J]. *诊断病理学杂志*, 2010, 17(1):11-13.
- [7] Showell C, Binder O, Conlon FL. T-box genes in early embryogenesis [J]. *Dev Dyn*, 2004, 229(1):201-218.
- [8] Hunter CJ, Matyas JR, Duncan NA. The notochordal cell in the nucleus pulposus; a review in the context of tissue engineering [J]. *Tissue Eng*, 2003, 9(4):667-677.
- [9] Stevens JW, Kurrriger GL, Carter AS, et al. CD44 expression in the developing and growing rat intervertebral disc [J]. *Dev Dyn*, 2000, 219(3):381-390.
- [10] Hunter CJ, Matyas JR, Duncan NA. Cytomorphology of notochordal and chondrocytic cells from the nucleus pulposus; a species comparison [J]. *J Anat*, 2004, 205(5):357-362.
- [11] Kim KW, Ha KY, Park JB, et al. Expressions of membrane-type I matrix metalloproteinase, Ki-67 protein, and type II collagen by chondrocytes migrating from cartilage endplate into nucleus pulposus in rat intervertebral discs; a cartilage endplate-fracture model using an intervertebral disc organ culture [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2005, 30(12):1373-1378.
- [12] Trout JJ, Buckwalter JA, Moore KC. Ultrastructure of the human intervertebral disc; II. Cells of the nucleus pulposus [J]. *Anat Rec*, 1982, 204(4):307-314.
- [13] Hunter CJ, Bianchi S, Cheng P, et al. Osmoregulatory function of large vacuoles found in notochordal cells of the intervertebral disc running title; an osmoregulatory vacuole [J]. *Mol Cell Biomech*, 2007, 4(4):227-237.
- [14] Zhu Y, Mcalinden A, Sandell LJ. Type II A procollagen in development of the human intervertebral disc: regulated expression of the NH(2)-propeptide by enzymic processing reveals a unique developmental pathway [J]. *Dev Dyn*, 2001, 220(4):350-362.
- [15] Vujovic S, Henderson S, Presneau N, et al. Brachyury, a crucial regulator of notochordal development, is a novel biomarker for chordomas [J]. *J Pathol*, 2006, 209(2):157-165.
- [16] Shen J, Li CD, Yang HL, et al. Classic chordoma coexisting with benign notochordal cell rest demonstrating different immunohistological expression patterns of brachyury and galectin-3 [J]. *J Clin Neurosci*, 2011, 18(1):96-99.
- [17] Henderson SR, Guiliano D, Presneau N, et al. A molecular map of mesenchymal tumors [J]. *Genome Biol*, 2005, 6(9):R76.
- [18] Oakley GJ, Fuhrer K, Seethala RR. Brachyury, SOX-9, and podoplanin, new markers in the skull base chordoma vs chondrosarcoma differential; a tissue microarray-based comparative analysis [J]. *Mod Pathol*, 2008, 21(12):1461-1469.
- [19] Romeo S, Hogendoorn PC. Brachyury and chordoma; the chondroid-chordoid dilemma resolved [J]. *J Pathol*, 2006, 209(2):143-146.
- [20] Jambhekar NA, Rekhil B, Thorat K, et al. Revisiting chordoma with brachyury, a "new age" marker; analysis of a validation study on 51 cases [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2010, 134(8):1181-1187.
- [21] Sangoi AR, Karamchandani J, Lane B, et al. Specificity of brachyury in the distinction of chordoma from clear cell renal cell carcinoma and germ cell tumors; a study of 305 cases [J]. *Mod Pathol*, 2011, 24(3):425-429.
- [22] Yang XR, Ng D, Alcorta DA, et al. T (brachyury) gene duplication confers major susceptibility to familial chordoma [J]. *Nat Genet*, 2009, 41(11):1176-1178.
- [23] Park DM, Zhuang Z, Chen L, et al. von Hippel-Lindau disease-associated hemangioblastomas are derived from embryologic multipotent cells [J]. *PLoS Med*, 2007, 4(2):e60.
- [24] Palena C, Poley DE, Tsang KY, et al. The human T-box mesodermal transcription factor Brachyury is a candidate target for T-cell-mediated Cancer immunotherapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(8):2471-2478.
- [25] Decomas AM, Penforis P, Harris MR, et al. Derivation and characterization of an extra-axial chordoma cell line (EACH-1) from a scapular tumor [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2010, 92(5):1231-1240.
- [26] Hsu W, Mohyeldin A, Shah SR, et al. Generation of chordoma cell line JHC7 and the identification of Brachyury as a novel molecular target [J]. *J Neurosurg*, 2011, 115(4):760-769.