

# 子宫内膜癌和宫颈癌中 CT 抗原精子蛋白 17 的异常表达

李芳秋<sup>1</sup>, 孙 伟<sup>1</sup>, 吴 波<sup>2</sup>, 周航波<sup>2</sup>, 金 洁<sup>1</sup>

Cancer-testis Antigen Sperm Protein 17 Overexpressed in Endometrial and Cervical Carcinomas

LI Fang-qiu<sup>1</sup>, SUN Wei<sup>1</sup>, WU Bo<sup>2</sup>, ZHOU Hang-bo<sup>2</sup>, JIN Jie<sup>1</sup>

1. Institute of Medical Laboratory Sciences of PLA, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Nanjing 210002, China, 2. Department of Pathology

**Abstract :Objective** Human sperm protein 17 (Sp17) is a highly conserved protein that is expressed normally in testis. It has recently been included in the cancer/testis (CT) antigen family, and shown to be expressed in ovarian cancer, but little is known about its expression in other gynecological carcinomas. The aim of this study was to investigate the frequency of Sp17 expression at protein level and its cell pattern distribution in various histological subtypes of endometrial and cervical carcinomas, and correlation between Sp17 expression and clinical characteristics, in order to establish its usefulness as a molecular marker and a target for related tumor vaccine strategies. **Methods** The expression of Sp17 was assessed by means of a standardized immunohistochemical (IHC) procedure in 81 formalin-fixed and paraffin embedded gynecological cancer specimens, including 50 primary endometrial cancers (44 adenocarcinomas, 6 adenosquamous carcinomas) and 31 cervical carcinomas (14 adenocarcinomas, 17 squamous carcinoma). **Results** Most of endometrial cancers (66 %) were found heterogeneously immunopositive for Sp17. The expression pattern was heterogeneous in the positive samples, and did not correlate with the histological subtype, degree and FIGO stage of malignancy. A number of cervical carcinomas (32.2 %) were found heterogeneously immunopositive for Sp17, adenocarcinomas 42.8 % (6/14), squamous carcinoma 23.5 % (4/17). **Conclusion** Although there was no statistically significant relation between expression of Sp17 and degree and FIGO stage of malignancy, the data showed aberrant expression by IHC in a significant proportion of gynecological tumors. These findings indicate that Sp17 may be used as a marker for molecular imaging and attractive target for antigen-specific immunotherapy in these patients.

**Key words** :Sperm protein 17; Endometrial carcinomas; Cervical carcinomas

**摘 要:目的** 人精子蛋白 17 (sperm protein 17, Sp17) 正常情况下局限表达于睾丸,近年发现在上皮性卵巢癌等恶性肿瘤中异常表达,已被列入 CT (cancer/testis) 抗原家族。我们研究该蛋白在不同病理类型的子宫内膜癌和宫颈癌中的表达频度、分布类型以及与肿瘤临床分期分级的关系,旨在探讨 Sp17 是否可能成为相关妇科肿瘤诊断标志和治疗靶标。**方法** 用免疫组化技术检测 81 例石蜡包埋的妇科恶性肿瘤组织标本中 Sp17 的表达,其中包括 50 例子宫内膜癌(腺癌 44 例、腺鳞癌 6 例)和 31 例宫颈癌(鳞癌 17 例、腺癌 14 例)。**结果** 子宫内膜癌组织 Sp17 的阳性率为 66 % (33/50),其中腺癌 29 例阳性,腺鳞癌 4 例阳性,表达模式呈异质性,Sp17 表达与肿瘤分化程度和临床分期均无相关性。宫颈组织 Sp17 总阳性率 32.2 % (10/31),鳞癌 23.5 % (4/17),腺癌 42.8 % (6/14)。**结论** Sp17 在子宫内膜癌和宫颈腺癌中呈高水平异常表达,尽管其表达与肿瘤分化程度和临床分期无明显相关,仍有可能作为肿瘤体内显像诊断和免疫治疗的分子靶标。

**关键词** :精子蛋白 17;子宫内膜癌;宫颈癌

**中图分类号** :R737.33 **文献标识码** :A **文章编号** :1000-8578(2008)01-0043-04

**收稿日期** :2007-01-09; **修回日期** :2007-09-29

**基金项目** :国家自然科学基金资助项目(30670599);南京军区医学科学技术研究“十一五”计划重点资助项目(06Z43);江苏省“六大人才高峰”基金资助项目(2005A2)

**作者单位** :1. 210002 南京军区南京总医院中国人民解放军医学检验研究所, 2. 病理科

**作者简介** :李芳秋(1956-),女,博士,教授,主要从事分子免疫学研究

## 0 引言

癌瘤-睾丸抗原(cancer-testis antigen, CT 抗原)是近来倍受重视的一类肿瘤相关抗原,由于这类抗原的独特组织特异性,使它们成为肿瘤生物治疗和诊断的候选分子<sup>[1]</sup>。CT 抗原具有如下特征:在

男性生殖细胞中高水平表达,在正常体细胞中很少表达,在多种类型的肿瘤中异常表达。目前为人熟知的 CT 抗原家族包括黑色素瘤抗原 (MAGE、BAGE、GAGE)、食管癌抗原 (NY-ESO-1) 和肾癌抗原 (SCP-1) 等。

精子蛋白 17 (sperm protein 17, Sp17) 是新发现的一种 CT 抗原。Sp17 最初在兔附睾的精子膜和睾丸膜沉淀物中分离出来,继而从人睾丸 cDNA 文库中克隆该蛋白基因并测序<sup>[2]</sup>,人和其他哺乳动物 Sp17 有很高的同源性。人 Sp17 分子由 151 个氨基酸组成,其表观分子质量为  $24.5 \times 10^3$ ,主要生物学功能是参与受精过程中精子顶体与卵子透明带反应。

曾用 RT-PCR 技术和免疫组化技术对病理诊断明确的卵巢恶性肿瘤表达 Sp17 的情况进行研究。结果表明,新鲜原发性卵巢癌组织标本 Sp17 mRNA 阳性率达到 84.5 %<sup>[3]</sup>,44 % 的上皮性卵巢癌中不同程度地出现 Sp17 蛋白的异常表达,而且发现腹水中的转移卵巢癌细胞依然表达 Sp17<sup>[4,5]</sup>。由于 Sp17 的生物学功能是促进受精,在女性体内很少表达且尚未发现生理作用,因此,Sp17 可能是妇科恶性肿瘤体内分子显像诊断和肿瘤生物治疗的理想靶标。为了查明 Sp17 在另外两种妇科常见恶性肿瘤中的表达情况,我们用免疫组化法对 50 例子宫内膜癌和 31 例宫颈癌标本进行了研究。

## 1 资料与方法

### 1.1 组织标本

选取 1995 年 3 月 ~ 2005 年 12 月间南京军区

南京总医院病理科的妇科肿瘤标本存档蜡块,所有病例均经病理学确诊。子宫内膜癌 50 例(腺癌 44 例、腺鳞癌 6 例),年龄 34 ~ 71 岁,中位年龄 54 岁;宫颈癌 31 例(鳞癌 17 例、腺癌 14 例),年龄 17 ~ 72 岁,中位年龄 46 岁。另取 10 例临床诊断为功能性子宫出血患者诊断性刮宫的子宫内膜组织作为阴性对照。

### 1.2 主要试剂

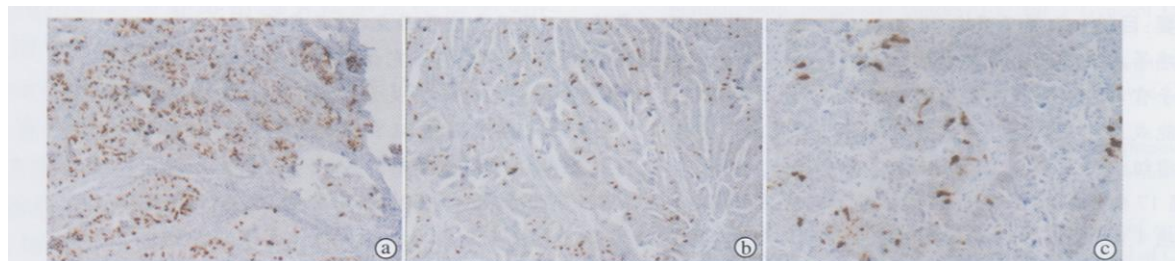
抗 Sp17 单克隆抗体由本实验室制备<sup>[6]</sup>,免疫组化试剂盒和 DAB 显色液为福州迈新公司产品。

### 1.3 免疫组化染色

手术标本均经 10 % 甲醛固定,常规石蜡包埋,3  $\mu$ m 连续切片,贴附于涂有 100 g/L 多聚赖氨酸的载玻片上。脱蜡后,滴加 0.03 ml/L 甲醇- $H_2O_2$  孵育 30 min,再于微波炉中煮沸 1 min。加 100 ml/L 羊血清 PBS 封闭 30 min,用 PBS-T 洗 3 次,滴加 1:300 的 Sp17 mAb,4 h 孵育过夜,漂洗 3 次,再按 SP 法常规操作。滴加 DAB 底物溶液显色 10 min 后,再以苏木素复染 1 min,脱水,透明及封片,在光学显微镜下观察结果并照像。根据染色强度与范围作出每张切片分级。以着色程度及计数 100 个细胞中的阳性细胞数来判定。阴性(-):细胞无着色或阳性细胞数 < 5 %; (+):阳性细胞数 25 %; (++) :细胞着色染成黄色,阳性细胞数 26 % ~ 50 %; (+++) :阳性细胞数 51 % ~ 75 %; (++++):阳性细胞数 > 75 %。

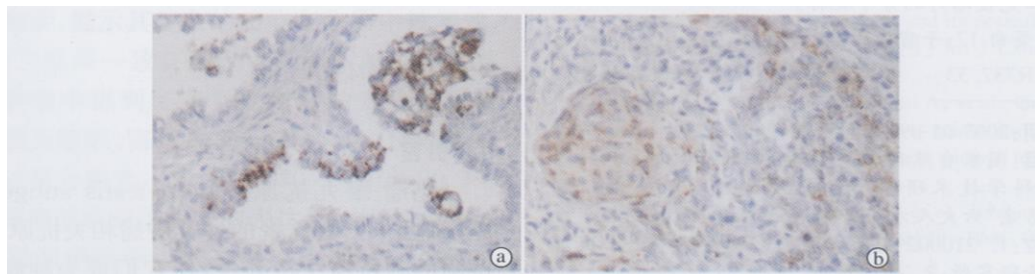
### 1.4 统计学处理

用 SPSS 12.0 软件完成。两组阳性率的比较采用 Fisher 精确概率法。用秩和检验 (Wilcoxon) 进



a:弥漫性表达 (SP  $\times 100$ ) ;b:散在性表达 (SP  $\times 100$ ) ;c:局灶性表达 (SP  $\times 200$ )

图 1 子宫内膜腺癌组织中 Sp17 的异常表达



a:宫颈腺癌 (SP  $\times 400$ ) ;b:宫颈鳞癌 (SP  $\times 400$ )

图 2 宫颈癌组织中 Sp17 的异常表达

行两等级指标的相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化

Sp17 在不同组织类型子宫内膜癌和宫颈癌中的表达频度,见表 1。Sp17 在子宫内膜癌和宫颈癌组织标本均有异常表达,特别是子宫内膜癌,其阳性率和染色强度均显著高于宫颈癌。50 例子宫内膜癌标本,33 例有 Sp17 表达,阳性率达 66%,其中腺癌和腺鳞癌阳性率相同。所有阳性细胞的 Sp17 蛋白主要表达在细胞浆,被染成黄褐色。Sp17 表达模式呈异质性,相同病理类型的肿瘤组织中有弥漫性、

分散性和局灶性表达,见图 1。31 例宫颈癌,10 例不同程度表达 Sp17 (32%),阳性细胞均呈灶性分布,见图 2a、b。腺癌阳性率高于鳞癌,但由于病例数太少,差异无统计学意义( $\chi^2 = 1.312, P = 0.252$ )。10 例阴性对照标本,2 例出现 Sp17 局灶表达,阳性率 20%,表达强度为+,病理诊断为简单型子宫内膜增殖症。

2.2 子宫内膜癌中 Sp17 表达与临床病理特征的关系

Sp17 表达与肿瘤病理及临床特征的关系,见表 2。经过统计分析,Sp17 表达与肿瘤分化程度和临床分期均无相关性。

表 1 Sp17 在不同组织类型子宫内膜癌和宫颈癌中的表达频度

Histological subtypes	Number tested	Negative	Positive( %)	+	++	+++	++++
endometrial carcinomas	50	17	33 (66)				
adenocarcinomas	44	15	29 (66)	9	4	12	4
adenosquamous	6	2	4 (66)	3	1		
Cervical carcinomas	31	21	10 (32)				
adenocarcinomas	14	8	6 (43)	1	3	2	
squamous carcinoma	17	13	4 (23)	4			

表 2 子宫内膜癌 Sp17 表达与临床病理特征的关系

Clinicopathological characteristics	Negative	Positive	+	++	+++	++++
All tumors, n( %)	17 (34 %)	33 (66 %)	9 (18 %)	7 (17 %)	13 (26 %)	4 (8 %)
(n = 50)						
tumor grade, n						
G1	4	13	4	1	6	2
G2	11	16	2	5	7	2
G3	2	4	3	1		
FIGO stage, n						
	12	27	6	5	12	4
	4	4	2	1	1	
	1	2	1	1		
histology (n)						
adenocarcinoma	15	29	9	4	12	4
adenosquamous carcinoma	2	4		3	1	

3 讨论

卵巢癌、子宫内膜癌和宫颈癌是妇科最常见的恶性肿瘤,早期诊断预后较好,晚期患者的治疗只能采取化疗和放疗,疗效有限。迫切需要寻找有用的肿瘤相关抗原,发展更敏感的分子影像诊断技术,以提高肿瘤的早期诊断率,同时发展针对肿瘤抗原的免疫治疗方法,延长晚期患者的生存时间。

CT 抗原是近年来陆续鉴定的一组肿瘤相关抗

原,目前报道的有 44 种<sup>[1]</sup>,其主要特点是在睾丸生殖细胞中丰富表达,在其他体细胞中限制表达,在多种恶性肿瘤中异常表达。CT 抗原的限制表达特性及高免疫原性,使其成为肿瘤免疫治疗的理想靶点。Sp17 是 CT 抗原一个新成员,已经发现在多种恶性肿瘤细胞系和多发性骨髓瘤(MM)、卵巢癌、食管癌的临床肿瘤标本中异常表达<sup>[7-9]</sup>。Sp17 既有 B 细胞表位又有细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)表位,已经从正

常供体、MM 患者和卵巢癌患者制备出能杀伤 HLA 相配的 Sp17<sup>+</sup> 的肿瘤细胞的 CTL,提示 Sp17 是免疫治疗的理想疫苗<sup>[10,11]</sup>。但是,目前对 Sp17 在各种临床肿瘤标本中的表达研究得尚不充分。我们拟将 Sp17 作为妇科肿瘤诊治靶标,曾对卵巢癌组织标本中 Sp17 表达作过调查<sup>[3,4]</sup>,现又将研究范围扩展到子宫内膜癌和宫颈癌。结果发现,子宫内膜癌组织 Sp17 的阳性率为 66% (33/50),在上述 3 种妇科恶性肿瘤中阳性率最高,而且 Sp17 在癌组织中的表达量也最大,其中腺癌 29 例阳性,腺鳞癌 4 例阳性,表达模式与卵巢癌中一样,呈异质性,Sp17 表达与肿瘤分化程度和临床分期均无相关性。宫颈癌组织 Sp17 总阳性率 32.2% (10/31),鳞癌 23.5% (4/17),腺癌 42.8% (6/14),Sp17 阳性细胞在肿瘤组织中呈局灶性分布。

本研究在部分简单型子宫内膜增殖症的子宫内膜组织中也检测到 Sp17 的表达,但表达水平很低。2003 年,Chiriva-Internati 在正常输精管、女性生殖道、气管、肺和咽喉的上皮细胞中发现 Sp17 表达,对 Sp17 作为肿瘤疫苗的安全性产生了质疑<sup>[12]</sup>,后来 Zhang 等<sup>[13]</sup>分别应用实时定量 RT-PCR 和免疫组化技术检测正常组织中 Sp17 表达情况,结果表明,20 种正常组织 Sp17 mRNA 的表达水平仅为睾丸的 0~2%,用组织微阵列作免疫组化,在 30 种正常组织中未检出 Sp17 蛋白的表达。因此,他们认为 Sp17 是一个 CT 抗原,适合作为免疫治疗的靶点。

总之,CT 抗原 Sp17 在妇科常见的 3 种恶性肿瘤组织中都有大量异常表达,尤其以子宫内膜癌表达水平最高。虽然 Sp17 表达与肿瘤的恶性程度和临床分期无相关性,而且在部分非恶性增生的组织中亦有少量表达,该抗原仍然可望作为妇科肿瘤体内分子显像诊断和免疫治疗的靶标。

#### 参考文献:

[1] Simpson AJG, Caballero OL, Jungbluth A, et al. Cancer/testis antigens: gametogenesis and cancer[J]. Nat Rev Cancer,

2005, 5:615-625.

- [2] Lea IA, Richardson RT, Widgren EE, et al. Cloning and sequencing of cDNAs encoding the human sperm protein, Sp17[J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1307 (3): 263-266.
- [3] 李芳秋,杨爱龙,刘群,等. 精子蛋白 17 mRNA 在卵巢癌中的表达及临床意义[J]. 医学研究生学报, 2005, 18 (6): 493-495.
- [4] 李芳秋,杨爱龙,黄文斌,等. 精子蛋白 17 在上皮性卵巢癌中的异常表达[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006, 13 (15): 47-50.
- [5] Straughn J M, Jr Shaw DR, Guerrero A, et al. Expression of sperm protein 17 (Sp17) in ovarian cancer[J]. Int J Cancer, 2004, 108 (6): 805-811.
- [6] 李芳秋,杨爱龙,缪家文,等. 人精子蛋白 17 单克隆抗体的制备及特性鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2006, 22 (5): 638-640.
- [7] Lim SH, Wang ZQ, Chiriva-Internati M, et al. Sperm protein 17 is a novel cancer-testis antigen in multiple myeloma[J]. Blood, 2001, 97 (5): 1508-1510.
- [8] Grizzi F, Gaetani P, Franceschini B, et al. Sperm protein 17 is expressed in human nervous system tumours[J]. BMC Cancer, 2006, 6:23.
- [9] Gupta G, Sharma R, Chattopadhyay TK, et al. Clinical significance of sperm protein 17 expression and immunogenicity in esophageal cancer[J]. Int J Cancer, 2007, 120 (8): 1739-1748.
- [10] Chiriva-Internati M, Wang Z, Salati E, et al. Tumor vaccine for ovarian carcinoma targeting sperm protein 17[J]. Cancer, 2002, 94 (9): 2447-2453.
- [11] Chiriva-Internati M, Wang Z, Salati E, et al. Successful generation of sperm protein (Sp17)-specific cytotoxic T lymphocytes from normal donors: implication for tumor-specific adoptive immunotherapy following allogeneic stem cell transplantation for Sp17-positive multiple myeloma[J]. Scand J Immunol, 2002, 56 (4): 429-433.
- [12] Chiriva-Internati M, Grizzi F, Franceschini B, et al. Is sperm protein 17 a useful target for tumor immunotherapy [J]? Blood, 2003, 102 (6): 2308-2309.
- [13] Zhang Y, Wang Z, Robinson WR, et al. Combined real time PCR and immunohistochemical evaluation of sperm protein 17 as a cancer-testis antigen[J]. Eur J Haematol, 2004, 73 (4): 280-284.

[编辑:安 凤;校对:杨 卉]