

睾丸生殖细胞肿瘤病因学研究进展

秦晓东, 袁欣然综述, 李冬梅, 韩晓冬审校

Advances on Etiology of Testicular Germ Cell Tumors

QIN Xiaodong, YUAN Xinran, LI Dongmei, HAN Xiaodong

Immunology and Reproduction Biology Laboratory, Medical School, Nanjing University, Nanjing 210093, China

Corresponding Author: LI Dongmei, E-mail: lidm@nju.edu.cn

Abstract: Testicular germ cell tumor (TGCT) is one of the commonest malignant tumors among young men in industrialized countries. As most tumors are formed in fetal development stage, it is difficult to have an insight into the pathogenesis. By reviewing the recent related reports, we discussed several etiologic factors of TGCTs, including race, geography, environment, related genes and signaling pathways, cancer stem cells (CSC), the niche for spermatogonial stem cells (SSCs), *etc.*, to support investigating pathogenesis and treatment of TGCTs.

Key words: Testicular germ cell tumor; Cancer stem cell; Spermatogonial stem cells

摘要: 睾丸生殖细胞肿瘤 (TGCTs) 是工业化国家年轻男性常见的恶性肿瘤之一, 由于肿瘤大多形成于胎儿发育阶段, 深入了解TGCTs的发病机制比较困难。本文探讨了TGCTs发病的相关因素, 包括种族、地理与环境、基因与信号通路、癌干细胞、精原细胞微环境等, 从而为探究TGCTs的发病机制提供基础, 并为TGCTs的治疗开拓思路。

关键词: 睾丸生殖细胞肿瘤; 癌干细胞; 精原干细胞

中图分类号: R737.21; R730.2 **文献标识码:** A

0 引言

睾丸生殖细胞肿瘤 (testis germ cell tumors, TGCTs) 是好发于工业化国家15~34岁之间男性群体的实体肿瘤, 占睾丸恶性肿瘤的98%^[1]。近40年来TGCTs的发病率不断攀升, 欧洲22个国家的统计显示, 其发病率平均每年增长1%~6%^[2]。美国近20年来发病率平均每年增长1.1%^[3]。

根据发生部位的不同, TGCTs分为三类:

- (1) 胎儿的畸胎瘤 (teratoma)、卵黄囊瘤 (yolk sac tumor)、绒毛膜癌 (choriocarcinoma);
- (2) 青少年和成人的精原细胞瘤 (seminoma, SE) 与非精原细胞瘤 (non seminoma, NS);
- (3) 成人的精母细胞性精原细胞瘤 (spermatocyte seminoma)。其中, 60.6%的TGCTs属于SE, 它是一种转化的生殖细胞同源性肿瘤, 它与原始

生殖细胞 (primordial germ cell)、生殖母细胞 (gonocytes) 相似; 38.8%的TGCTs属于NS, 它是一种异源性肿瘤, 它可能发生在未分化的细胞或是高度分化的细胞的各个分化阶段, 它既可以出现在畸胎瘤的胚体组织内, 也可出现在卵黄囊瘤和绒毛膜癌的胚外组织中。有报道称SE可通过重新编程或者激活多能性基因来转变为NS^[4]。本文就近年来TGCTs的病因学研究进展作一综述。

1 种族、地域与环境因素

在美国, TGCTs在白人中的发病率明显高于黑人, 且发病率增长速度也快于黑人。SEER (surveillance, epidemiology, and end results) 项目调查显示^[5]: 1973—1978年, TGCTs在白人中发病率为3.69/10万, 1994—1998年发病率为5.62/10万人, 增长率为52%; 而黑人中发病率从0.83/10万增长到1.04/10万, 增长率为25%。另有研究显示^[3]: 从2002年至2009年, 拉美裔美国人的发病率增长速度显著高于非拉美裔。

二战期间出生于丹麦和挪威的男性患TGCTs的风险相比于出生于战前或战后的明显降低, 提示TGCTs的发生与环境 and 人们的生活方式有关^[6]。最近一项在芬兰图尔库的调查显示^[7], 近50年来当

收稿日期: 2013-06-17; 修回日期: 2013-12-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21377052); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20131281); 南京大学大学生创新创业训练计划项目资助课题 (G1210284113)

作者单位: 210093 南京, 南京大学医学院免疫与生殖生物学实验室

通信作者: 李冬梅, E-mail: lidm@nju.edu.cn

作者简介: 秦晓东 (1991-), 男, 硕士在读, 主要从事生殖系统肿瘤发生发展机制研究

地TGCTs发生率从5/10万上升到30/10万,同时伴随男性的精子质量下降等症状,提示TGCTs发生率快速增长的原因可能与环境因素有关。多个实验中心的研究表明1,1-双(对氯苯基)-2,2-二氯乙烯(dichloro-diphenyl-dichloro-ethylene, DDE)、氯丹等有机氯杀虫剂与TGCTs的发生关系密切^[8]。作为塑化剂主要成分的邻苯二甲酸酯类化合物(PAEs)近年来也被发现具有雄性生殖毒性,Skakkebaek等^[9]实验发现围生期大鼠暴露于PAEs,雄性子代会出现睾丸发育不良综合征(TDS)。因此,环境因素在TGCTs的发病中起着重要作用。

2 基因、信号通路和其他因素

2.1 12号染色体短臂与TGCTs发生

细胞生物学研究表明,12号染色体短臂(12p)基因高表达是TGCTs中最常见的一种变化,其与生殖细胞肿瘤的早期发生阶段有密切联系。Korkola等^[10]通过检测17例SE、84例NS和5例正常样本的基因,发现12p上的73个基因在TGCTs中高度表达,并进一步找到12p13.31上200kb的基因簇,此基因簇包含了一些干细胞相关基因,如NANOG、STELLA、GDF3等。另外,在12p上还发现与胚胎癌发生相关的其他干细胞相关基因表达升高,如EBAF、TDGF1、SOX2以及WNT、NODAL、FGF信号通路的下游靶点等。因此,12p基因高表达可激活干细胞关键基因,从而促进干细胞的增殖并维持其功能,在TGCTs的发生中具有一定作用。目前,12p染色体异常已被运用于TGCTs的分子生物学诊断中。Gatcombe等^[11]在总结畸胎瘤的发病原因中提出:12p染色体异常是畸胎瘤中最常见的一种染色体畸形;Cheng等^[12]在研究睾丸畸胎瘤的纤维间质改变时,以12p染色体异常作为生殖细胞肿瘤的诊断靶点。此外,随着研究的深入,有学者发现成年人的良性畸胎瘤中并无12p染色体异常^[13];婴幼儿的畸胎瘤中12p染色体无异常,但出现环形21染色体畸形,可用于畸胎瘤的产前检测^[14]。

2.2 与TGCTs发生有关的其他基因

近年来,研究者发现多种基因在TGCTs中表达升高。Gashaw等^[15]发现新型生殖细胞标志(如BOB1, Prominin 1)在SE中的表达显著上调。激光蛋白B(Aurora B)在精原细胞中表达受限,但在TGCTs中表达升高。这些基因靶点与TGCTs发病的关系有待进一步研究。

Krüppel-like factor4 (KLF4)在诱导多能干细胞和胚胎干细胞中发挥重要作用,但KLF4并不表

达于正常精原细胞,而强烈表达于小管内生殖细胞肿瘤(intratubular germ cell neoplasia, IGCN)和SE中。Godmann等^[16]认为KLF4在IGCN和SE的维持和恶化方面起着重要作用。Looijenga等^[17]研究Lin28基因,他们用siRNA使小鼠的Lin28基因沉默,发现Lin28对SE和EC的维持有着重要作用,它可能是OCT3/4、NANOG等基因的上游调控因子。Houldsworth^[18]、Braydich-Stolle等^[19]发现青春期前的大鼠精原细胞和支持细胞中过表达CyclinD2和N-Myc,前者为原位癌(CIS)的早期标志,对于生殖细胞肿瘤的转化起重要作用,后者是一种原癌基因,可促进SSCs的增殖。这些研究证明CIS、SE和NS等由异常的基因表达模式引起,与增殖、多能性、表观遗传等机制相关的基因在睾丸肿瘤各亚型中有不同的调节机制。

2.3 与TGCTs发生相关的细胞信号通路及其他因素

信号分子或通路的表达改变会增加睾丸肿瘤的发病风险。胶质细胞源性神经营养因子(glial-cell-line-derived neurotrophic factor, GDNF)信号通路与TGCTs发病密切相关。在该通路中,GDNF与其受体GFRA1(GDNF family receptor- α 1)结合形成复合物,再与Ret结合激活下游级联反应,影响生殖细胞的增殖和分化。实验证明高度表达GDNF的小鼠会发生恶性睾丸肿瘤^[20]。Ferranti等^[21]通过检测GFRA1和Ret水平,发现GDNF信号通路在TGCTs的发生与发展中发挥重要作用。Fustino等^[22]研究表明TGF β /BMP信号通路可能在儿童TGCTs发病中起作用。

此外,年龄较大男性的精母细胞性精原细胞瘤是从已分化的细胞发育而来的,表观遗传学机制可能在其中起到一定作用,即基因启动子区的DNA错误甲基化导致了肿瘤抑制基因的沉默。miRNAs在人类睾丸肿瘤发生中也起着重要作用。有报道称miRNA-372和miRNA-373(潜在的新型致癌基因)参与了人类TGCTs的形成^[23]。实验证实Dnd1缺失会导致生殖细胞的损伤、引发TGCTs,因为Dnd1可与载脂蛋白B复合体(APOBEC3)相互作用后与mRNA连结,从而阻断miRNA对mRNA的抑制,进而抑制TGCTs的发生^[24]。Cao等^[25]发现SALL4(sal-like 4)这种转录因子是转移性生殖细胞肿瘤的新型高度特异性标志,在检测转移性的卵黄囊肿瘤发生中具有重要价值。国内学者^[26]发现TGCTs中血管内皮生长因子(VEGF)水平显著升高,认为VEGF是TGCTs中主要的促血管生成因子,而脉管浸润是肿瘤易发生转移的特征之一,因此,检测VEGF水平对了解TGCTs的进展转移有

一定意义。

3 睾丸CIS(原位癌)/IGCNU(小管内生殖细胞肿瘤未定型)的癌干细胞假说

随着睾丸CIS/IGCNU被发现为多种生殖细胞肿瘤的前体细胞,有人提出假设:CIS细胞来源于发育异常的PGCs/gonocytes。其证据在于CIS、PGCs、gonocytes这三种细胞在免疫组织化学时表达相同的标志物^[27],如PLAP、KIT、TFAP2C、NONOG、OCT-3/4等。此外,CIS与gonocytes均有DAZL、VASA、HIWL与TSPY等生殖细胞特异性基因表达^[28]。

Al-Hajj等^[29]提出癌干细胞(cancer stem cell, CSC)的概念,认为CSC是推动肿瘤发展的动力。CSC与上皮组织的干细胞作用方式相似,不断地向组织补充成熟细胞,从而引发实体瘤。由此,有人提出假设:CIS可能是一种特殊类型的CSC,因为CIS是一群具有分化潜能的细胞,并经常在实体瘤的外周被检测到。故当胎儿生殖细胞发育障碍时,PGCs/gonocytes转化为一类特殊的具有癌干细胞潜能的CIS细胞,从而引发TGCTs。为了检测CSC在移植模型中能否引起TGCTs,Conway等^[30]将小鼠的胚胎生殖干细胞移植入重症联合免疫缺陷的成体小鼠睾丸内,最终引发了侵袭性肿瘤。

目前,针对癌干细胞的假说,研究者尝试使用干细胞因子抑制剂来治疗TGCTs。Hasibeder等^[31]发现射干根提取物(belamcanda chinensis extract)和鸢尾黄素等植物雌激素可下调TGCTs患者体内干细胞因子(NANOG、POU5F1)的水平,从而对治疗TGCTs有一定帮助。

4 SSCs、SSCs微环境相互作用与TGCTs

精子形成起始于SSCs的增殖和分化,是一个循环有序、并持续进行的过程,从青春期开始一直持续到死亡。SSCs通过自我更新保证数量的稳定;通过对称分裂或不对称分裂,形成精原细胞,产生精子。通常情况下,SSCs自我更新缓慢、恒定,然而当有化学或辐射损伤时,它们会快速分裂,而SSCs是增殖还是分化,则由旁分泌和自分泌的分子调控机制决定。研究表明鼠类和人类SSCs可以重新编程,转化为胚胎干细胞样细胞,与PGCs结构和功能类似,可进一步分化为原始的三胚层衍生物^[32-33]。

Ryser等^[34]指出青春期前的精原细胞大多为SSCs,具有干细胞潜能,青春期前的支持细胞则具有提供SSCs微环境的能力。青春期前的精原细胞和支持细胞具有一些能相互作用的特异性基因:(1)精原细胞表面有Integrin α 6、integrin β 1,

可与细胞外基质黏附,支持细胞特异性基因可生成细胞外基质成分;(2)编码Ob-Cdh、N-Cdh、PB-Cdh的基因在支持细胞和精原细胞中都上调,它们相互黏附促进SSCs的存活;(3)趋化因子受体CXCR4在精原细胞中上调,其配体SDF1/CXCL12在支持细胞中也上调。SDF1/CXCL12-CXCR4通路对于干细胞归巢和移动有着重要作用^[35]。因此,精原细胞与支持细胞相互作用形成精原细胞微环境,对精原细胞的增殖分化起着调控作用。精原细胞微环境的改变将促进肿瘤的转化,导致CIS发生:(1)原位癌中缝隙连接破坏,血睾屏障丢失,支持细胞呈去分化状态^[36];(2)代表SSCs增殖的GDNF/c-ret信号通路在位癌中激活^[37]。

Sin3A(Swi-independent 3A)在小鼠支持细胞系TM4中的精原细胞染色体修饰中发挥作用。Payne等^[38]将胚胎期小鼠的支持细胞Sin3A敲除,小鼠出生后几乎没有未分化的精原细胞,干细胞相关标志物(Plzf, Oct4)明显减少;分化的精原细胞标志物(kit2, sohlh2)达正常水平,但精原细胞和支持细胞的CXCR4、CXCL12/SDF1水平很低。进入青春期后,小鼠分化的精原细胞进行性减少,出现精子延伸障碍等症状。因此,支持细胞的表现遗传修饰会影响生殖干细胞微环境的建立,引起睾丸等病变。

这些结果提示SSCs、SSCs微环境内的基因表达及其产物的相互作用在TGCTs的形成过程中可能被逐级激活和放大。维持微环境的稳态对于肿瘤的预防有着重要作用。

5 小结

TGCTs是影响15~34岁男性生殖系统较常见的恶性肿瘤之一,其发病率不断攀升。TGCTs的发生与种族、地理、环境因素密切相关,其发病机制涉及多种基因和多条信号通路。癌干细胞假说和精原细胞微环境改变引发癌变等学说为我们分析TGCTs病因开阔了思路,癌干细胞等因此可能成为治疗TGCTs的新型靶细胞。

参考文献:

- [1] McGlynn KA, Cook MB. Etiologic factors in testicular germ-cell tumors[J]. *Future Oncol*, 2009, 5(9): 1389-402.
- [2] Bray F, Richiardi L, Ekbom A, *et al.* Trends in testicular cancer incidence and mortality in 22 European countries: continuing increases in incidence and declines in mortality[J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(12): 3099-111.
- [3] Nigam M, Aschebrook-Kilfoy B, Shikanov S, *et al.* Incidence of testicular cancer in the United States from 1992 to 2009[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 189(4): e384.
- [4] Oosterhuis JW, Looijenga LH. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(3): 210-22.

- [5] McGlynn KA, Devesa SS, Sigurdson AJ, *et al.* Trends in the incidence of testicular germ cell tumors in the United States[J]. *Cancer*, 2003, 97(1): 63-70.
- [6] Jacobsen R, Møller H, Thoresen SØ, *et al.* Trends in testicular cancer incidence in the Nordic countries, focusing on the recent decrease in Denmark[J]. *Int J Androl*, 2006, 29(1): 199-204.
- [7] Jørgensen N, Vierula M, Jacobsen R, *et al.* Recent adverse trends in semen quality and testis cancer incidence among Finnish men[J]. *Int J Androl*, 2011, 34(4 Pt 2): e37-48.
- [8] Cook MB, Trabert B, McGlynn KA, *et al.* Organochlorine compounds and testicular dysgenesis syndrome: human data[J]. *Int J Androl*, 2011, 34(4 Pt 2): e68-84.
- [9] Skakkebaek NE, Raipert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects[J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(5):972-8.
- [10] Korkola JE, Houldsworth J, Chadalavada RS, *et al.* Down-regulation of stem cell genes, including those in a 200-kb gene cluster at 12p13. 31, is associated with in vivo differentiation of human male germ cell tumors[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(2): 820-7.
- [11] Gatcombe HG, Assikis V, Kooby D, *et al.* Primary retroperitoneal teratomas: a review of the literature[J]. *J Surg Oncol*, 2004, 86(2): 107-13.
- [12] Cheng L, Zhang S, Eble JN, *et al.* Molecular genetic evidence supporting the neoplastic nature of fibrous stroma in testicular teratoma[J]. *Mod Pathol*, 2012, 25(10): 1432-8.
- [13] Zhang C, Berney DM, Hirsch MS, *et al.* Evidence supporting the existence of benign teratomas of the postpubertal testis: a clinical, histopathologic, and molecular genetic analysis of 25 cases[J]. *Am J Surg Pathol*, 2013, 37(6):827-35.
- [14] Chen CP, Cheng PJ, Chang SD, *et al.* Ring chromosome 21 presenting with sacrococcygeal teratoma: prenatal diagnosis, molecular cytogenetic characterization and literature review[J]. *Gene*, 2013, 522(1):111-6.
- [15] Gashaw I, Dushaj O, Behr R, *et al.* Novel germ cell markers characterize testicular seminoma and fetal testis[J]. *Mol Hum Reprod*, 2007, 13(10): 721-7.
- [16] Godmann M, Gashaw I, Eildermann K, *et al.* The pluripotency transcription factor Krüppel-like factor 4 is strongly expressed in intratubular germ cell neoplasia unclassified and seminoma[J]. *Mol Hum Reprod*, 2009, 15(8): 479-88.
- [17] Gillis AJ, Stoop H, Biermann K, *et al.* Expression and interdependencies of pluripotency factors LIN28, OCT3/4, NANOG and SOX2 in human testicular germ cells and tumours of the testis[J]. *Int J Androl*, 2011, 34(4 Pt 2): e160-74.
- [18] Houldsworth J, Reuter V, Bosl GJ, *et al.* Aberrant expression of cyclin D2 is an early event in human male germ cell tumorigenesis[J]. *Cell Growth Differ*, 1997, 8(3):293-9.
- [19] Braydich-Stolle L, Kostereva N, Dym M, *et al.* Role of Src family kinases and N-Myc in spermatogonial stem cell proliferation[J]. *Dev Biol*, 2007, 304(1):34-45.
- [20] McIntyre A, Gilbert D, Goddard N, *et al.* Genes, chromosomes and the development of testicular germ cell tumors of adolescents and adults[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2008, 47(7): 547-57.
- [21] Ferranti F, Muciaccia B, Ricci G, *et al.* Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes invasive behaviour in testicular seminoma cells[J]. *Int J Androl*, 2012, 35(5): 758-68.
- [22] Fustino N, Rakheja D, Ateek CS, *et al.* Bone morphogenetic signalling activity distinguishes histological subsets of pediatric germ cell tumours[J]. *Int J Androl*, 2011, 34(4 Pt 2): e218-33.
- [23] Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, *et al.* A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors[J]. *Cell*, 2006, 124(6): 1169-81.
- [24] Bhattacharya C, Aggarwal S, Kumar M, *et al.* Mouse apolipoprotein B editing complex 3 (APOBEC3) is expressed in germ cells and interacts with dead-end (DND1)[J]. *PLoS One*, 2008, 3(5): e2315.
- [25] Cao D, Humphrey PA, Allan RW. SALL4 is a novel sensitive and specific marker for metastatic germ cell tumors, with particular utility in detection of metastatic yolk sac tumors[J]. *Cancer*, 2009, 115(12): 2640-51.
- [26] Luo XM, Yang SX, Wang LL. The expression of vascular endothelial growth factor in testicular germ cell tumors[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2005, 32(11): 716-8.[罗小敏, 杨嗣星, 王玲珑. 血管内皮生长因子在睾丸生殖细胞肿瘤中的表达[J]. *肿瘤防治研究*, 2005, 32(11): 716-8.]
- [27] Rajpert-De Meyts E, Bartkova J, Samson M, *et al.* The emerging phenotype of the testicular carcinoma in situ germ cell[J]. *APMIS*, 2003, 111(1): 267-78.
- [28] Rajpert-De Meyts E. Development model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects[J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(3): 303-23.
- [29] Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells[J]. *Oncogene*, 2004, 23(43): 7274-82.
- [30] Conway AE, Lindgren A, Galic Z, *et al.* A self-renewal program controls the expansion of genetically unstable cancer stem cells in pluripotent stem cell-derived tumors[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(1): 18-28.
- [31] Hasibeder A, Venkataramani V, Thelen P, *et al.* Phytoestrogens regulate the proliferation and expression of stem cell factors in cell lines of malignant testicular germ cell tumors[J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(5): 1385-94.
- [32] Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, *et al.* Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis[J]. *Cell*, 2004, 119(7): 1001-12.
- [33] Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, *et al.* Generation of pluripotent stem cells from adult human testis[J]. *Nature*, 2008, 456(7220): 344-9.
- [34] Ryser S, Glauser D, Vigier M, *et al.* Gene expression profiling of rat spermatogonia and Sertoli cells reveals signaling pathways from stem cells to niche and testicular cancer cells to surrounding stroma[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 29.
- [35] Dar A, Goichberg P, Shinder V, *et al.* Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(10):1038-46.
- [36] Brehm R, Rüttinger C, Fischer P, *et al.* Transition from preinvasive carcinoma in situ to seminoma is accompanied by a reduction of connexin 43 expression in Sertoli cells and germ cells[J]. *Neoplasia*, 2006, 8(6):499-509.
- [37] Davidoff MS, Middendorff R, Koeva Y, *et al.* Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and its receptors GFRalpha-1 and GFRalpha-2 in the human testis[J]. *Ital J Anat Embryol*, 2001, 106(2 Suppl 2):173-80.
- [38] Payne CJ, Gallagher SJ, Foreman O, *et al.* Sin3a is required by sertoli cells to establish a niche for undifferentiated spermatogonia, germ cell tumors, and spermatid elongation[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(8):1424-34.

[编辑: 刘红武; 校对: 尤婷婷]