

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性, 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并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

在乳腺黏液腺癌、乳腺浸润性导管癌和乳腺单纯癌 3 种恶性肿瘤组织中阳性率分别达到 100.0%、100.0% 和 87.5%；而在乳腺纤维腺瘤及乳腺增生中的阳性率仅为 14.6% 和 15.6%，阳性染色出现在肿瘤细胞中，而在肿瘤间质细胞及肿瘤周围相对正常的组织中表现为阴性；而且早期乳腺癌患者 TSP50 蛋白表达较低。Xu 等^[2]研究显示，化合物 TI503 通过上调乳腺癌细胞 miR-937-5p 和 miR-4709-3p 的表达抑制 TSP50 蛋白的表达，进而抑制乳腺癌细胞的增殖，而土木香内酯通过下调细胞 TSP50 的表达诱导肿瘤细胞的凋亡，但其具体机制并不清楚^[12]；由此表明，TSP50 蛋白在乳腺癌中高表达，其与乳腺癌密切相关，可以作为乳腺癌特异性分子标记应用于乳腺癌的诊断，也可以作为某些抗肿瘤药物作用的靶点，通过阻断癌组织中 TSP50 蛋白的表达进而抑制肿瘤细胞的增殖而达到控制肿瘤的进展、改善患者预后的目的。

2.2 TSP50 与胃癌 胃癌是全球最常见的恶性肿瘤之一，虽然在过去的十几年里，其发病率下降了约 10%，但其发病率仍排在全球恶性肿瘤发病率的第 4 位，且其病死率排在第 2 位^[13]。常用的肿瘤标志物如胃癌相关抗原 MG7-Ag(MG7-Ag)、血清胃蛋白酶原 I (PGI)、PG II 等在胃癌的诊断中发挥了重要作用。而最近的研究表明，TSP50 蛋白在胃癌组织同样高表达，因此其可能在胃癌的诊断、治疗及判断预后等方面也有重大意义。茅淑砚等^[14]通过研究 51 例胃癌患者，应用免疫组织化学染色和反转录-PCR 检测 TSP50 蛋白在胃癌中的表达情况，结果显示，TSP50 蛋白表达阳性 45 例，阳性率为 88%。Liu 等^[15]应用组织微阵列技术对 334 例胃癌组织及对应的癌旁组织蜡块 20 例的表达进行检测的研究表明，TSP50 蛋白在 191 例胃癌患者中呈高表达，在 20 例癌旁组织中均呈低表达；单因素 χ^2 检验分析结果显示，TSP50 蛋白表达在年轻患者、较晚 TNM 分期、有淋巴结转移的病例明显高于年老患者、较早 TNM 分期和无淋巴结转移的病例，差异有统计学意义；低表达 TSP50 病例中位生存年龄为 38.02 个月，高表达 TSP50 组为 30.21 个月；多因素 Cox 回归模型显示，TSP50 蛋白表达是胃癌的独立预后因素 ($P=0.017$, 95% $CI=1.078\sim 2.172$)。TSP50 蛋白在胃癌组织中表达明显高于正常组织及癌旁组织，因此它可作为胃癌新的诊断标志物，也可以通过监测胃癌患者 TSP50 蛋白的水平来评估患者的 TNM 分期、淋巴结转移情况及判断患者预后，对指导治疗、选择合适治疗方案意义重大。但由于研究的标本量少，有必要进行大标本、多中心的临床验证，以期得到 TSP50 蛋白在胃癌中的应用价值。

2.3 TSP50 与结肠癌 关于 TSP50 蛋白在结直肠癌中的表达情况：Zheng 等^[16]通过 RT-PCR 与 Western blot 分析检测 SW480、SW620、LoVo、HT-29、HCT116、LS174T 和 Caco-2 等 7 种人结直肠癌细胞，首次发现 TSP50 蛋白在结直肠癌细胞中的表达，其表达水平显著高于结直肠腺瘤和正常组织，差异有统计学意义 ($P<0.05$)，ROC 曲线评价其诊断结直肠癌的特异性、阳性预测值为 92.5%、95.6%；TSP50 高表达患者的 5 年生存率为 42.8%、中位生存时间为 48 个月，而低表达患者的 5 年生存率为 73.3%、中位生存时间为 108 个月。多因素 Cox 回归模型同样显示 TSP50 蛋白表达是结肠癌的独立预后因素。与此同时，任双双等^[17]应用免疫组织化学染色技术检测结肠癌中 TSP50 蛋白的表达结果同样显示 TSP50 蛋白在结肠癌组织中高表达，其阳性率为 94% (45/48)。从以上研究可以看出，TSP50 蛋白在结直肠癌中表达有很高的阳性率，并且其水平的高低与肿瘤患者的预后及生存期有很大联系，因

此，临床上可以以检测肿瘤患者 TSP50 蛋白水平来筛选高风险患者及评估患者预后，这对根据患者情况采取适当、有效的个体化治疗具有很大指导意义。

2.4 TSP50 与喉癌 喉癌是一种常见的恶性程度高的鳞状细胞癌，虽然其发病率仅为 (1.1~3.4)/10 万人，因其常伴有声音嘶哑、呼吸困难、咳嗽和吞咽困难等多种并发症，这就使喉癌早期诊断很困难，且因此导致其预后非常差^[18]。Zhang 等^[19]通过应用 TSP50 shRNA 转染人喉癌细胞系的 HEp2 细胞及敲除 HEp2 细胞中的 TSP50 基因，然后采用 Western blot 检测 TSP50 的表达水平、MTT 比色法检测细胞的增殖、核染色法评价细胞的凋亡等，结果显示这两类 HEp2 细胞表达的 TSP50 显著下调、细胞凋亡增多、且细胞的增殖和迁移也受到极大的限制。他们研究认为这可能与 TSP50 下调，抑制 NF- κ B 信号传导通路有关，此研究让初步了解了 TSP50 在喉癌发生和发展中的机制及作用，提示 TSP50 在喉癌的发生和发展中也发挥了重要作用，为喉癌发生机制的研究提供一个新的视角，其也可能成为喉癌治疗新的潜在作用靶点。

3 问题与展望

TSP50 在乳腺癌、胃癌、结直肠癌、喉癌等多种肿瘤的诊断中具有良好的前景，可是 TSP50 在肿瘤应用的研究过程中仍存在的问题：如 TSP50 蛋白到底在哪些肿瘤中表达，其在正常组织中的表达情况如何；由于生物学功能并不十分清楚，其在癌症发生和发展中所起的作用及机制到底是怎样的；TSP50 蛋白的表达与肿瘤的分期有没有相关性及相关性有多大等这些都需要进一步研究。目前现有的研究标本量较少，结果具有局限性，有必要扩大标本进行更多的临床试验来验证；而且最重要的是肿瘤患者血清中能否也检测到特异性的 TSP50 蛋白或抗体，这是作为一项肿瘤标志物能否广泛应用于临床诊断的关键，但现在鲜有文章来验证。随着研究的进展，Wei 等^[20]采用噬菌体筛选技术获得了针对 TSP50 片段的特异性单链抗体 A1 基因 (scFv-A1)、scFv-A11、scFv-C8，然后把 scFv-A1、scFv-A11 克隆到 pELB 信号肽上并在大肠埃希菌中成功表达出可溶性蛋白，得到的蛋白通过 2 次离子交换色谱法和固定化金属亲和层析纯化后，在十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳得到了一个相对分子质量为 31×10^3 的蛋白条带，经双抗体夹心法证实成功得到 TSP50 蛋白的单克隆抗体。

TSP50 单克隆抗体制备的成功将使关于血清中 TSP50 蛋白或抗体的检测成为现实，并且让通过检测血清 TSP50 蛋白或抗体来用于肿瘤诊断成为可能，其同样让学者在研究 TSP50 蛋白在肿瘤发病中的机制、肿瘤的免疫治疗和靶向治疗等方面的研究取得更大突破。

参考文献

- [1] Shan J, Yuan L, Xiao Q, et al. TSP50, a possible protease in human testes, is activated in breast cancer epithelial cells [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(1): 290-294.
- [2] Xu HP, Yuan L, Shan J, et al. Localization and expression of TSP50 protein in human and rodent testes [J]. *Urology*, 2004, 64(4): 826-832.
- [3] Yu YL, Bao YL, Zhen BS, et al. The threonine protease activity of testes-specific protease 50 (TSP50) is essential for its function in cell proliferation [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e35030.
- [4] Huang Y, Wang YZ, Li YX, et al. Differential methylation

- of TSP50 and mTSP50 genes in different types of human tissues and mouse spermatic cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374(4): 658-661.
- [5] Wang M, Bao YL, Wu Y, et al. Basic FGF downregulates TSP50 expression via the ERK/Sp 1 pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(1): 75-81.
 - [6] Kosaka-Suzuki N, Suzuki T, Suzuki T, et al. Transcription factor BORIS (Brother of the Regulator of Imprinted Sites) directly induces expression of a cancer-testis antigen, TSP50, through regulated binding of BORIS to the promoter [J]. *Biol Chem*, 2011, 286(31): 27378-27388.
 - [7] Song ZB, Liu B, Li YY, et al. The catalytic triad of testes-specific protease 50 (TSP50) is essential for its function in cell proliferation [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(10): 2266-2275.
 - [8] Song ZB, Bao YL, Zhang Y, et al. Testes-specific protease 50 (TSP50) promotes cell proliferation through the activation of the nuclear factor κ B (NF- κ B) signalling pathway [J]. *Biochem J*, 2011, 436(2): 457-467.
 - [9] Yuan J, Wu C, Huang M, et al. TSP50 depends on its threonine protease activity and its interactions with TNF- α -induced NF- κ B for its role in human cervical tumorigenesis [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71(2): 891-896.
 - [10] Zhou L, Bao YL, Zhang Y, et al. Knockdown of TSP50 inhibits cell proliferation and induces apoptosis in P19 cells [J]. *IUBMB Life*, 2010, 62(11): 825-832.
 - [11] 刘洋, 李玉新, 鲍永利. TSP50 单克隆抗体的制备及其与乳腺癌相关性研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2009.
 - [12] Xu GM, Zheng BS, Bao YL, et al. Alantolactone induces cell apoptosis partially through down-regulation of testes-specific protease 50 expression [J]. *Toxicology Letters*, 2014, 224(3): 349-355.
 - [13] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-2917.
 - [14] 茅淑砚, 王悦增. 胃癌中肿瘤-睾丸特异性抗原 TSP50 的表达及其机制的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2012.
 - [15] Liu F, Cao QH, Liu N, et al. Overexpression of Testes-Specific Protease 50 (TSP50) Predicts Poor Prognosis in Patients with Gastric Cancer [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2014, 30(3): 498246-498256.
 - [16] Zheng L, Xie GF, Li QW, et al. High expression of testes-specific protease 50 is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22203.
 - [17] 任双双, 王悦增. 人结肠癌中 TSP50 的表达及其启动子区域的甲基化[D]. 长春: 吉林大学, 2014.
 - [18] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63(1): 11-30.
 - [19] Zhang X. Depression of testes-specific protease 50 (TSP50) inhibits cell proliferation and induces apoptosis in laryngocarcinoma [J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(11): 10781-10788.
 - [20] Wei J, Liu Y, Yang S, et al. Screening of single-chain variable fragments against TSP50 from a phage display antibody library and their expression as soluble proteins [J]. *J Biomol Screen*, 2006, 11(5): 546-555.

(收稿日期: 2015-12-28 修回日期: 2016-02-10)

(上接第 1516 页)

- [2] 邱梅婷. 恶性肿瘤血清同型半胱氨酸和胱抑素 C 检测的临床意义[J]. *中国误诊学杂志*, 2011, 11(18): 151.
- [3] Garcia-Miss MR, Perez-Mutul J, Lopez-Canul B, et al. Folate, homocysteine, interleukin-6, and tumor necrosis factor α levels, but not the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, are risk factors for schizophrenia [J]. *J Psychiatr Res*, 2010, 44(7): 441-446.
- [4] 孙云霞, 候卫科. 同型半胱氨酸和 D-二聚体的联合检测对冠心病诊断的临床价值[J]. *中国实用医刊*, 2011, 38(22): 110-111.
- [5] 高晓婷. 腹膜透析患者尿酸、同型半胱氨酸和超敏 C 反应蛋白的变化及其意义[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.
- [6] 李洪林, 李洪猛, 李波. 恶性肿瘤患者血清同型半胱氨酸及胱抑素 C 水平检测分析[J]. *中国基层医药*, 2012, 21(19): 3208-3210.
- [7] 丁海波, 南云广, 江彩云. 胃癌患者手术治疗前后血清 CA724、Hcy 和 CysC 检测的临床评估[J]. *放射免疫学杂志*, 2011, 24(6): 639-641.
- [8] 孙继兴, 赵刚, 杨雅静, 等. 恶性肿瘤患者血清、胸水、腹水、囊肿液、尿液中胱抑素 C 和可溶性尿激酶受体水平的测定[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(3): 498.
- [9] Zoppi G, Targher G, Chonchol M, et al. Serum uric acid levels and incident chronic kidney disease in patients with type 2 diabetes and preserved kidney function [J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(1): 99-104.
- [10] 王菁婧. 高同型半胱氨酸血症个体化治疗的临床研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2011.
- [11] 杨鸣. 叶酸、维生素 B12、同型半胱氨酸和 K-ras 基因相互作用与胰腺癌关系的研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2011.
- [12] 王玉霞, 李学强, 赵季平. 同型半胱氨酸和低密度脂蛋白胆固醇与颈动脉内膜中层厚度对女性冠心病患者的预测价值[J]. *中国综合临床*, 2011, 27(8): 802-804.
- [13] Kohaar I, Kumar J, Thakur N, et al. Homocysteine levels are associated with cervical cancer independent of methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) polymorphisms in Indian population [J]. *Biomarkers*, 2010, 15(1): 61-68.
- [14] 马慧霞, 莫红梅. 胱抑素 C 检测对原发性高血压并发早期肾损害的诊断价值[J]. *中国基层医药*, 2010, 17(8): 1011-1012.

(收稿日期: 2015-12-28 修回日期: 2016-02-22)