

The Expression of *CAGE* Gene and Its Mechanism in Intracranial Tumors

CAGE 基因在颅脑肿瘤中的表达及其机制

GAO Fei¹, YOU Tian², LÜ Jing-yu^{3,*}, WANG Yun-jie⁴高 飞¹/由 田²/吕晶玉^{3,*}/王运杰⁴

(1. Department of Neurosurgery, the Fourth Clinical College, China Medical University, Shenyang 110032; 2. Department of Emergency Medicine, the First Clinical College, China Medical University, Shenyang 110001; 3. Department of Medical Genetics, China Medical University, Shenyang 110001; 4. Department of Neurosurgery, the First Clinical College, China Medical University, Shenyang 110001, China)

(1. 中国医科大学第四临床学院神经外科 沈阳 110032; 2. 中国医科大学第一临床学院急诊科 沈阳 110001; 3. 中国医科大学医学遗传学教研室 沈阳 110001; 4. 中国医科大学第一临床学院神经外科 沈阳 110001)

【摘要】背景与目的：检测颅脑肿瘤组织中 *CAGE* 基因的表达及启动子区甲基化情况，探讨将其用于肿瘤免疫治疗的可能性。材料与与方法：采用 RT-PCR 及甲基化特异性 PCR 检测 8 种正常组织（17 例）、35 例脑膜瘤和 32 例胶质瘤组织 *CAGE* 基因表达及启动子区甲基化情况。结果：*CAGE* 基因在除睾丸以外的正常组织中不表达，4 例脑膜瘤（11.3%）和 26 例胶质瘤（81.25%）*CAGE* 基因表达阳性；*CAGE* 基因表达阳性的组织非甲基化扩增均为阳性，表达阴性的组织甲基化扩增均为阳性。结论：*CAGE* 基因启动子区甲基化与其表达密切相关，*CAGE* 可能成为胶质瘤的肿瘤特异性抗原。

【关键词】*CAGE* 基因；甲基化；胶质瘤；肿瘤免疫

中图分类号：R7391.41

文献标识码：A

文章编号：1004-616X(2007)03-0239-03

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: We studied the expression and promoter methylation of *CAGE* gene in intracranial tumors in order to explore its potential use in tumor immunotherapy. MATERIALS AND METHODS: RT-PCR and methylation-specific PCR were performed to detect the expression of *CAGE* gene in 17 normal tissues, 32 glioma and 35 meningioma, as well as the pattern of methylation in the promoter region. RESULTS: The *CAGE* gene was expressed in none of the normal tissues except testis. It was expressed in 4 meningioma (11.3%) and 26 glioma (81.25%). We found PCR products with methylation-specific primers in all the *CAGE*-negative cases and the PCR products with non-methylation-specific primers in all the *CAGE*-positive cases. CONCLUSION: The methylation of *CAGE* gene was closely associated with its expression. *CAGE* could act as the tumor-specific antigen for glioma.

【KEY WORDS】*CAGE* gene; methylation; glioma; tumor immunity

胶质瘤是颅内最常见的肿瘤之一，近年来，其病死率仍居高不下。目前，传统的手术方法、化疗和放疗仍存在着各种问题，因此迫切要求寻求新的治疗手段，肿瘤免疫治疗是这些新的治疗手段之一，该治疗的前提和关键是肿瘤特异性抗原的筛选与鉴定。迄今为止，已相继发现并确认了一系列的肿瘤抗原，其中包括癌-睾丸（cancer-testis, CT）抗原家族^[1]。该家族成员均具有一个共同的特性，即只表达于睾丸组织和一些肿瘤组织，在其他正常组织中不表达，被认为是肿瘤特异性免疫治疗的

理想免疫原。肿瘤相关基因（cancer associated gene, *CAGE*）是最近 Cho 等^[2]用胃癌患者的血清，筛查睾丸组织 cDNA 文库时所发现的一个新的癌-睾丸抗原编码基因，它在胃癌中的表达率高达 89%（17/19），但在颅脑肿瘤组织中的表达情况未见报道。我们采用 RT-PCR 和甲基化特异性 PCR 的方法，检测颅脑肿瘤中 *CAGE* 基因的表达及其启动子区域甲基化的情况，以探讨该基因是否能够成为颅脑肿瘤早期诊断的分子标志及肿瘤免疫治疗的靶标。

收稿日期：2006-06-12；修订日期：2006-10-08

作者简介：高 飞（1967-）男，辽宁省沈阳市人，博士，研究方向：神经外科

* Correspondence to: LÜ Jing-yu, Tel: 024-23256666-5324, E-mail:

jingyulu@mail.cmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料 颅脑肿瘤取自中国医科大学第一临床学院神经外科手术切除标本。经病理证实分别为：脑膜瘤 35 例，其中男 21 例，女 14 例，年龄 32~59 岁；胶质瘤 32 例，其中男 17 例，女 15 例，年龄 12~54 岁。正常组织均取自急诊外伤及普外手术患者，包括：3 例骨骼肌，4 例外周血，2 例先天性心脏病的心肌组织，2 例睾丸，1 例肝脏，2 例脾脏，2 例胃组织，1 例肾脏，共 8 种 17 例。上述标本取后立即置于液氮，-70℃冰箱贮存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR) 取 100 mg 组织置于液氮中，击碎，加入 1 ml Trizol(GIBCO BRL 公司)，匀浆后按说明书提取组织总 RNA，分光光度计在波长 260 nm 检测 RNA 浓度，同时检测 280 nm 波长时的吸光值，确定 RNA 的纯度。用 Reverse Transcription 试剂盒(Promega 公司)反转录成 cDNA。用于 PCR 扩增的 *CAGE* 基因特异性引物为：5'-GGTGGCGATACTCCCACTAT-3' (上游)，5'-TTGCTTCAGATTCCTCCGTTT-3' (下游)，扩增产物长度为 306 bp。以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内对照，GAPDH 特异性引物为：5'-ACGGATTGCTCGTATTGGG-3' (上游)，5'-TGATTTTGGAGGGATCTCGC-3' (下游)，扩增产物长度为 267 bp。PCR 反应在 PE-2400 型 PCR 仪上进行，循环参数为：95℃预变性 5 min，95℃30 s，60℃30 s，72℃1 min；32 个循环后，72℃延伸 10 min。扩增产物经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测，紫外灯下观察并照相。

1.2.2 甲基化特异性 PCR(MSP) 组织 DNA 用饱和 NaOH 法提取，取 1 μg DNA 于 50 μl 水中，加入 5 μl 3 mol/L NaOH，75℃变性 15 min 后置于冰上。向变性的 DNA 中加入新配制的 20 mmol/L 对苯二酚 12.6 μl 及 4.8 mol/L 亚硫酸氢钠 320 μl，加入矿物油覆盖，55℃孵育 5 h。采用 Wizard(r) DNA Clean-Up System(Promega 公司)纯化。向已纯化的 DNA 中加入终浓度为 0.3 mol/L 的 NaOH，室温 5 min，加入 1/10 体积 3 mol/L 乙酸钠及 3 倍体积无水乙醇沉淀 DNA，用 20 μl 双蒸水溶解，-20℃冻存备用。甲基化特异性 PCR 扩增中的甲基化引物序列为^[3]：

5'-TTTTATACGATTCCGAATTCGAC-3' (上游)

5'-CAAATCTACGACCTATTTCCCG-3' (下游)

非甲基化引物序列为：

5'-GTTTTTTATATGATTTCCAATTTTCAT-3' (上游)

5'-AATTCAAATCTACAACCTATTTCCCA3' (下游)

分别扩增 *CAGE* 基因启动子区 5' CpG 岛甲基化和

非甲基化的等位基因，扩增产物长度均为 180 bp。PCR 反应在 PCR 循环参数为：95℃预变性 5 min，95℃30 s，57℃30 s，72℃1 min 扩增 30 个循环后，72℃延伸 10 min。扩增产物经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

2 结果

2.1 *CAGE* 基因在各正常组织中的表达情况

CAGE 基因特异性引物扩增片段长度为 306 bp，GAPDH 特异性引物扩增片段长度为 267 bp。RT-PCR 扩增结果显示，*CAGE* 基因只表达在睾丸中，其他 7 种正常组织中无表达(图 1)。

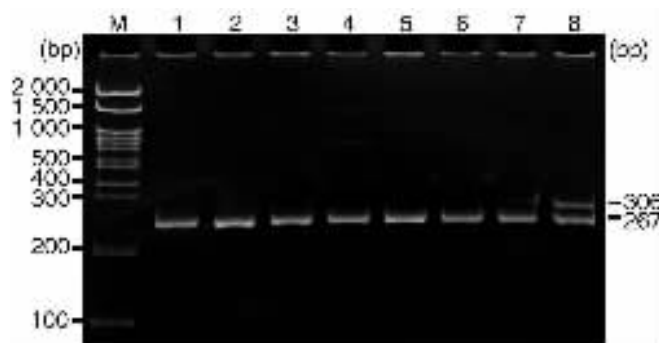


图 1 *CAGE* 基因在正常组织中的表达情况

Figure 1 The expression of *CAGE* gene in normal tissues(M: 100 bp DNA ladder, 1: Skeleton, 2: Heart, 3: Kidney, 4: Liver, 5: Spleen, 6: Stomach, 7: Blood, 8: Testis)

2.2 *CAGE* 基因在颅脑肿瘤中的表达情况

35 例脑膜瘤中 4 例表达阳性，32 例胶质瘤中 26 例表达阳性(图 2)。

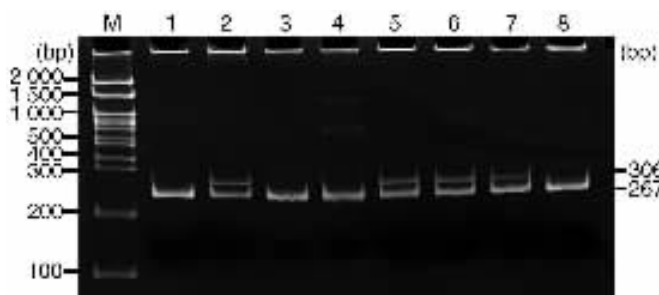


图 2 *CAGE* 基因在颅脑肿瘤中的表达情况

Figure 2 The expression of *CAGE* gene in intracranial tumors(M: 100bp DNA ladder; 1~4 Meningioma tissues; 5~8 Glioma tissues)

2.3 *CAGE* 基因启动子区域甲基化检测

结果甲基化和非甲基化特异性扩增产物均为 180 bp。35 例脑膜瘤中有 3 例仅非甲基化扩增产物阳性，28 例仅甲基化扩增产物阳性，有 4 例其两种扩增均为阳性；32 例胶质瘤中 23 例仅非甲基化扩增产物阳性，4 例仅甲基化扩增产物阳性，有 5 例其两种扩增均为阳性，见图 3 表 1。

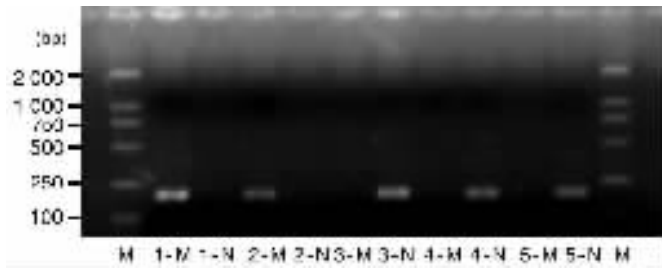


图 3 脑膜瘤和胶质瘤组织中 *CAGE* 基因启动子区甲基化检测结果
Figure 3 The methylation status in the promoter region of *CAGE* gene in meningioma and glioma tissues
(M:DL2000 DNA ladder ,1~2 meningioma tissues,3~5: glioma tissues, -M: the results of amplification with methylation-specific primers , -N :the results of amplification with non-methylation primers)

表 1 在各种脑肿瘤组织中 *CAGE* 基因的表达及其基因启动子区甲基化扩增情况
Table 1 The expression and promoter methylation of *CAGE* gene in brain tumors

Observing markers	Meningioma (n = 35)		Glioma (n = 32)	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Expression of <i>CAGE</i> gene	4	31	26	6
With methylation Primers	1	31	3	6
With nonmethylation primers	4	3	26	2

3 讨论

人类肿瘤抗原的寻找和鉴定不仅有助于阐明肿瘤免疫的分子机制,也是建立新的肿瘤免疫学诊断和防治方法的基础。本研究采用 RT-PCR 技术检测 17 例共 8 种正常组织, 35 例脑膜瘤和 32 例胶质瘤组织 *CAGE* 基因的表达,证实了该基因在除睾丸以外的其他 7 种正常组织中不表达,表明该基因是癌-睾丸特异性基因。脑膜瘤大部分是良性的,仅 5% 为恶性。而胶质瘤的恶性度较强,易转移和复发。*CAGE* 基因在脑膜瘤中表达的阳性率为 11.3% (4/35) 而在胶质瘤中表达的阳性率高达 81.25% (26/32),说明其表达具有特异性,这可能与这两种肿瘤的不同发病机制有关。本实验结果表明该基因参与了胶质瘤的发生,可以成为该的肿瘤特异性抗原。

DNA 甲基化是一种重要的表观遗传修饰,甲基化异常是人类肿瘤发生的重要的分子遗传学机制^[4-7]。低甲基化是大多数肿瘤基因组的特征,单拷贝基因的低甲基化能改变基因的表达使细胞极易恶性转化,有证据表明那些原癌基因的启动子区域异常的低甲基化与其表达激活有关^[8-9]。实验表明,去甲基化制剂诱导正常情况下不表达 MAGE-A1 蛋白的黑色素瘤细胞会产生 MAGE-A1 抗原^[10],表明 DNA 的去甲基化是 MAGE 活化的机制。本实验采用甲基化特异性 PCR 方法,在 *CAGE* 基因表达阳性的 4 例脑膜瘤 26 例胶质瘤中均扩增出非

甲基化产物,在 *CAGE* 基因表达阴性的 31 例脑膜瘤和 6 例胶质瘤中均扩增出甲基化产物。说明该基因启动子区的甲基化与基因表达密切相关,启动子区的甲基化抑制了该基因的表达。一些病例虽然测出有甲基化,但 *CAGE* 基因还有表达,可能与基因启动子区域 CpG 岛甲基化的密度有关,低密度的 CpG 岛甲基化只能使 67% ~ 90% 的转录被抑制,只有 CpG 岛呈高甲基化时,才表现为基因转录的完全抑制,另外也不能排除所采集的颅脑肿瘤组织中含有少量的正常组织。我们将采用定量 PCR 的方法检测该基因启动子区域甲基化和非甲基化的比例,探讨不同比例与基因表达的关系;并进一步研究该基因在更大数量胶质瘤组织中的表达频率及血清反应性,希望将来可作为胶质瘤特异性免疫治疗的一种候选疫苗或临床诊断的分子标志。

参考文献:

- [1] De Backer, O Arden, KC Boretti, *et al.* Characterization of the GAGE genes that are expressed various human cancers and in normal testis[J]. *Cancer Res*, 1999,59(13):3157 - 3165.
- [2] Bomsoo Cho, Yoon Lim, Dae-yeon Lee, *et al.* Identification and characterization of a novel cancer/ testis antigen gene *CAGE*[J]. *BBRC*, 2002,292(3):715 - 726.
- [3] Bomsoo Cho, hansoo Lee, ShinWu Jeong, *et al.* Promoter hypomethylation of a novel cancer/testis antigen gene *CAGE* is correlated with its aberrant expression and is seen in premalignant stage of gastric carcinoma[J]. *BBRC*, 2003, 307(1):52 - 63.
- [4] Boon T, Vanden Bruggen P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes[J]. *J Exp Med*. 1996,183(3):725 - 729.
- [5] Gama Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, *et al.* The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors[J]. *Nucleic Acids res*, 1983,11(19):6883 - 6894.
- [6] De Smet C, De Backer O, Faraoni I, *et al.* The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation[J]. *PNAS*. 1996,93(12):7149 - 7153.
- [7] SB Baylin, M Esteller, MR Rountree, *et al.* Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer[J]. *Hum Mol genet*, 2001, 10(7):687 - 692.
- [8] JL Counts, JI Goodman. Alteration in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis[J]. *Cell*, 1995,83(1): 13 - 15.
- [9] JP Jost, A Bruhat. The formation of DNA methylation and the silencing of genes[J]. *PNAS*, 1997,94(1):217 - 248.
- [10] Weber J, Salgaller M, Samid D, *et al.* Expression of the MAGE1 tumor antigen is upregulated by the demethylating agent 5-aza-2-deoxycytidine[J]. *Cancer Res*, 1994,54(7):1766 - 1771.

