

癌睾丸抗原OY-*TES*-1在脑胶质瘤中的表达及其抗体血清学分析

李希圣^{1,4*} 严峻¹ 罗彬² 贺菽嘉² 范蓉³ 林永达²

罗昱¹ 肖绍文¹ 谢小薰^{2,4}

1. 广西医科大学第一附属医院神经外科, 广西南宁 530021;
2. 广西医科大学组胚教研室, 广西南宁 530021;
3. 广西中医学院组胚教研室, 广西南宁 530021;
4. 广西医科大学基础医学中心实验室, 广西南宁 530021

[摘要] **背景与目的:** 胶质瘤是最常见的原发性恶性脑肿瘤, 预后差, 生存率低。近年来, 以利用癌睾丸(cancer-testis, CT)抗原作为靶抗原行肿瘤免疫治疗已成为研究的热点, 而OY-*TES*-1是CT抗原家族中的一员。本研究拟了解OY-*TES*-1在脑胶质瘤中的mRNA表达及其抗体出现情况, 探讨将OY-*TES*-1应用于肿瘤免疫治疗及辅助诊断的可能性。**方法:** 收集51例脑胶质瘤患者肿瘤组织标本及配套血清, 107例健康人血清。通过RT-PCR, 从mRNA水平研究OY-*TES*-1在脑胶质瘤组织中的表达; 用酶联免疫吸附分析技术(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测患者及健康人血清OY-*TES*-1抗体; 同时对OY-*TES*-1 mRNA的表达及血清抗体出现的临床意义做初步分析。**结果:** 在脑胶质瘤患者中OY-*TES*-1 mRNA阳性率为80.4%(41/51), 血清OY-*TES*-1抗体阳性率为15.7%(8/51), 健康人血清则为阴性。OY-*TES*-1 mRNA的表达和血清抗体的出现均与脑胶质瘤患者的年龄、性别、病理分级、肿瘤大小等临床指标无关。**结论:** OY-*TES*-1在脑胶质瘤中存在较高的表达, 并能引起部分患者的体液免疫反应, 有望作为胶质瘤免疫治疗的靶抗原。

[关键词] OY-*TES*-1; 胶质瘤; 免疫治疗

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2011.09.003

中图分类号: R739.41 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2011)09-0671-04

OY-*TES*-1 expression and serum immunoreactivity in glioma LI Xi-sheng, YAN Jun, LUO Bin, HE Shu-jia, FAN Rong, LIN Yong-da, LUO Yu, XIAO Shao-wen, XIE Xiao-xun (Department of Neurosurgery, the 1st Hospital of Guangxi Medical University, Nanning Guangxi 530021, China)

Correspondence to: XIE Xiao-xun E-mail: xiexiaoxun@yahoo.com

[Abstract] **Background and purpose:** Glioma is the most common primary malignant brain tumor, with poor prognosis and low survival rate. In recent years, the cancer immunotherapy of taking cancer-testis (CT) antigen as the target antigen has been becoming a research hot spot, and OY-*TES*-1 antigen is a member of CT antigen family. This study was aimed to investigate the expression of OY-*TES*-1 mRNA and serum immunoreactivity in human glioma while also exploring the possibility of using OY-*TES*-1 as a target for immunotherapy and auxiliary diagnosis of glioma. **Methods:** Fifty one cases of tumor specimens from patients with glioma and matching sera, normal human sera in 107 cases were collected. OY-*TES*-1 expression in human glioma tissue was detected at mRNA level using RT-PCR. The presence of serum OY-*TES*-1 antibody in healthy donors and patients with gliomas was observed with ELISA. The clinical significance of OY-*TES*-1 mRNA expression and serum immunoreactivity was also analyzed. **Results:** The positive rate of OY-*TES*-1 mRNA expression in glioma was 80.4% (41/51). 15.7% (8/51) of patients' sera with gliomas

*: 现工作单位为滨州医学院附属医院神经外科, 山东 滨州 256600

基金项目: 国家自然科学基金(No: 30760055、81060207); 广西自然科学基金(No: 0832144、2011GXNSFA018275); 广西研究生教育创新计划资助项目资助(No: 2008105981002M175、2010105981002M182)。

通信作者: 谢小薰 E-mail: xiexiaoxun@yahoo.com

were OY-*TES-1* antibody positive, while normal human serum was negative. No statistically significant correlation was found between OY-*TES-1* mRNA expression, serum antibody and the clinical features of glioma including age, gender, tumor grade, and tumor size. **Conclusion:** OY-*TES-1* shows high expression in glioma and can induce humoral immune response, suggesting that OY-*TES-1* could be a target antigen for immunotherapy of glioma patients.

[**Key words**] OY-*TES-1*; Glioma; Immunotherapy

胶质瘤是最常见的原发性恶性脑肿瘤, 目前的治疗仍以手术为主, 放、化疗为辅。尽管这些传统的治疗方法已有了很多改进, 但是患者的中位生存期仍不足1年^[1]。免疫治疗是一种新的辅助治疗方法, 目前已用于肿瘤治疗, 具有一定的临床疗效^[2]。中枢神经系统一直被认为是一个免疫豁免区, 但近年来的许多研究发现, 恶性脑肿瘤常伴有血-脑脊液屏障破坏, 免疫细胞穿越血-脑脊液屏障进入脑组织, 以及脑组织的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)表达上调, 这一现象提示开展脑肿瘤免疫治疗具有一定的可能性^[3]。

癌睾丸(cancer-testis, CT)抗原是一类在多种肿瘤组织表达的抗原^[4]。目前一些CT抗原如Mage-A1、A3的肿瘤疫苗已进入临床实验, 在一些颅外肿瘤的治疗中收到了较好的疗效^[5]。由于胶质瘤低表达或不表达这些CT抗原而制约了将其用于胶质瘤免疫治疗。因此, 有必要对一些新筛选出的CT抗原做进一步的研究, 探讨哪些CT抗原具有用于胶质瘤免疫治疗的可能性。

OY-*TES-1*是CT抗原家族中的一员^[6]。根据它在CT抗原数据库中的排名, 又称为CT23。最近的研究发现, OY-*TES-1*蛋白与有丝分裂纺锤体蛋白NuMA相互作用, 导致细胞恶性转化, 抵抗化疗药物紫杉醇的作用^[7]。为了解OY-*TES-1*在胶质瘤的表达情况及是否具有免疫原性, 本研究初步检测了OY-*TES-1* mRNA和血清抗体, 并结合临床病理指标进行分析。

1 材料和方法

1.1 标本和主要试剂

胶质瘤患者肿瘤标本及配套血清51例, 其中男性32例, 女性19例, 年龄8~65岁, 中位年龄35岁, 均来自广西医科大学第一附属医院神经外科2004年—2008年的住院患者; 所有肿瘤标本均经病理检测确认, 收集血清标本之前

患者均未接受任何治疗。健康人血清107例来自广西医科大学学生。

RNA提取试剂盒(北京天根生化公司), 逆转录试剂盒和Taq DNA聚合酶(日本TaKaRa公司), Cellstar 96孔酶标板(Greiner bio-one公司), 生物素-山羊抗人IgG单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(HRP-streptavidin)(美国KPL公司), TMB(美国Sigma公司)。

1.2 总RNA提取与cDNA合成

取50~100 mg于-80℃保存的组织, 迅速加入裂解液, 电动匀浆仪匀浆, 步骤按公司提供的说明书进行。所得RNA溶于无RNA酶的纯水中, 电泳检测RNA质量, 无明显18 S和28 S者予以舍弃。取2 μg总RNA, 进行cDNA合成, 所得的cDNA用P53引物作PCR扩增以检测其质量。P53引物序列及PCR反应条件参考文献[8]。

1.3 目的基因RT-PCR扩增

PCR反应体系为30 μL, 包括1 μL cDNA、上下游引物各1 μL、dNTPs、Taq DNA聚合酶及PCR缓冲液等, 置反应物于PCR仪。OY-*TES-1*引物序列及PCR反应条件参考文献[6], 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。每轮RT-PCR反应中, 采用正常癌睾丸cDNA为阳性对照, 同时设立不加模板的空白对照, 以排除假阳性的可能性。

1.4 OY-*TES-1*融合蛋白制备

带麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein, MBP)标签的OY-*TES-1*重组质粒由本课题组构建^[9]。将OY-*TES-1*重组质粒转化感受态细胞(42℃热休克法), 接种单菌落于含0.2%葡萄糖、100 μg/mL氨卞青霉素的LB培养液, 37℃剧烈振荡至 D_{600} 为0.5~0.7, 取1 mL菌液作为诱导前对照, 加入IPTG终浓度为0.5 mmol/L, 30℃诱导表达2 h。收集菌液, 4℃以5 000 r/min离心10 min(Sigma公司3K15离心机), 每克菌体沉淀加入3 mL过柱平衡液(20 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L β-巯基乙醇)和

50 mmol/L的苯甲基磺酰氟(PMSF) 8 μ L, 反复冻融3次, 冰浴超声裂解细菌, 在4 $^{\circ}$ C以12 000 r/min离心20 min(Sigma公司3K15离心机), 收集上清液并加入Amylose Resin亲和层析柱中, 随后加入12倍柱床体积的过柱平衡液, 以洗去非特异结合的蛋白, 最后用10 mmol/L麦芽糖洗脱缓冲液过亲和层析柱, 收集含OY-*TES-1*融合蛋白洗脱液。测定 D_{280} , SDS-PAGE电泳鉴定纯度, 将含有融合蛋白的洗脱液合并收集, 待浓缩冻干。

1.5 ELISA检测

将1.0 mg/L的OY-*TES-1*融合蛋白加入酶标板(100 μ L/孔), 4 $^{\circ}$ C包被过夜。用PBST(PBS含0.05% Tween-20)在室温下洗板3次, 50 g/L脱脂奶于37 $^{\circ}$ C封闭1 h, 上待检血清(1:400)于37 $^{\circ}$ C温育1 h, 随后用IgG单克隆抗体(1:10 000)于37 $^{\circ}$ C温育1 h, 洗板后加入HRP-streptavidin(1:1 000), 37 $^{\circ}$ C温育30 min, 再次洗板加TMB避光显色15 min, 用1 mol/L硫酸终止反应。酶标仪(美国Thermo公司)测定 D_{450} 值。以包被MBP为阴性对照, 进行统计学分析。以大于健康人平均吸光度值3个标准差者为阳性。

1.6 统计学处理

应用SPSS13.0统计分析软件进行数据分析, 样本率的比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OY-*TES-1* mRNA在脑胶质瘤组织中的表达

脑胶质瘤OY-*TES-1* mRNA阳性率为80.4%(41/51), 统计学分析显示OY-*TES-1* mRNA表达与脑胶质瘤患者的性别、年龄、肿瘤大小、病理分级等参数无关(图1, 表1)。

2.2 血清抗体的检测结果

ELISA检测107例健康人血清抗体, 吸光度均值为 0.686 ± 0.125 ; 以健康人 D_{450} 均数加3个标准差值为Cut-off值(1.061), 判定抗体阳性

的血清。在所检测健康人血清中无一例抗体阳性(图2)。

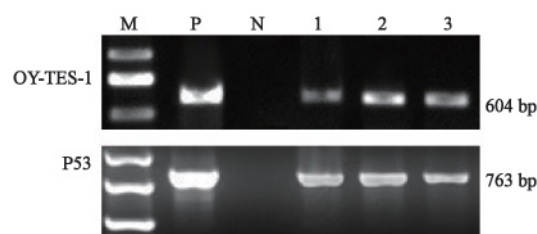


图1 OY-*TES-1* PCR产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of OY-*TES-1* PCR products of glioma tissues

M: DNA marker; P: Testis cDNA (Positive control); N: Negative control; 1-3: OY-*TES-1* mRNA positive expression in glioma tissues; P53 was used as internal control.

表1 OY-*TES-1* mRNA及其抗体与胶质瘤相关临床指标的关系

Tab. 1 Correlation between ACRBP/OY-*TES-1* mRNA expression, sera antibody and clinicopathological features in

Clinical feature	glioma			
	OY- <i>TES-1</i> mRNA Positive/total(%)	<i>P</i>	OY- <i>TES-1</i> antibody Positive/total(%)	<i>P</i>
Gender				
Male	25/32(78.1)	0.725	4/32(12.5)	0.450
Female	16/19(84.2)		4/19(21.0)	
Age/year				
≤ 35	24/27(88.9)	0.054	5/27(18.5)	0.707
> 35	16/24(66.7)		3/24(12.5)	
Size of tumor/cm				
≤ 5	18/21(85.7)	0.495	2/21(9.5)	0.147
> 5	23/30(76.7)		6/30(20.0)	
WHO grade				
I - II	18/24(75.0)	0.485	2/24(8.3)	0.255
III - IV	23/27(85.2)		6/27(22.2)	

51例脑胶质瘤患者血清OY-*TES-1*抗体阳性率为15.7%(8/51)。抗体 D_{50} 均值为 0.811 ± 0.283 , 明显高于健康人血清抗体均值($P < 0.01$)。在各种病理类型的胶质瘤中, OY-*TES-1*抗体阳性率各异; 其中I~II级星型细胞瘤患者抗体阳性率为25%(4/16)、II~III级星型细胞瘤患者为11.1%(1/9); 1/2室管膜瘤、1/11多形性胶质母细胞瘤和1/1髓母细胞瘤患者可检测到OY-*TES-1*抗体; 而间变性星型细胞瘤等6种胶质瘤患者未检测到OY-*TES-1*抗体(图2)。

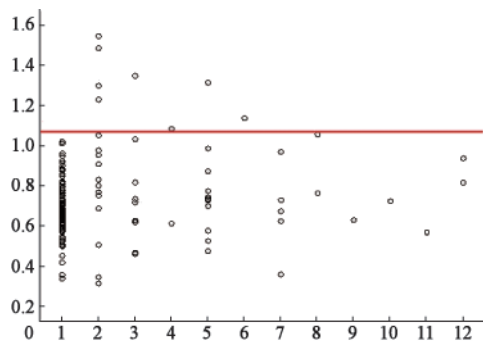


图2 ELISA 检测血清OY-*TES*-1抗体

Fig. 2 Detection of sera OY-*TES*-1 antibody with ELISA

1: Normal; 2: Astrocytoma (WHO I - II); 3: Astrocytoma (WHO III - IV); 4: Pseudopapillary; 5: Glioblastoma; 6: Medulloblastoma; 7: Anaplastic astrocytoma; 8: Pilocytic astrocytoma; 9: Pleomorphic xanthoastrocytoma; 10: Fibrillary astrocytoma; 11: Oligodendroglioma; 12: Ganglioglioma.

3 讨 论

本研究结果证实在脑胶质瘤中OY-*TES*-1 mRNA亦有较高的阳性率。由于基因的转录还涉及到诸多调节机制,故mRNA的表达不能完全代表其蛋白的表达情况;目前有关OY-*TES*-1蛋白在卵巢癌中表达率为69%^[10],在肝细胞癌中为40%^[11]。因此,下一步尚需了解OY-*TES*-1蛋白在胶质瘤中表达情况。

本研究结果同时证实胶质瘤血清OY-*TES*-1抗体的阳性表达率为15.7%(8/51),同时再次证实在健康人血清中无相应的抗体,表明OY-*TES*-1抗体具有肿瘤特异性。尽管统计学分析显示OY-*TES*-1抗体的出现与临床指标无关联,但值得注意的是,恶性程度高(III~IV级)的胶质瘤更易产生OY-*TES*-1抗体,这可能与肿瘤浸润生长快、损伤血-脑脊液屏障严重有关。下一步需要扩大病例数,尤其是恶性程度高的胶质瘤,同时需要对抗体进行动态的观测,才能真正了解其临床意义。此外,OY-*TES*-1作为一种抗原能在胶质瘤患者体内引起体液免疫反应,但当它被MHC I类分子呈递至肿瘤细胞的表面时,也有可能诱导产生细胞免疫反应。最近已有研究鉴定出一个OY-*TES*-1的HLA-A24限制性抗原肽,用该抗原肽诱导的细胞毒T细胞(cytotoxic T cell, CTL)能在体外特异性地杀伤OY-*TES*-1 mRNA阳性的肺癌细

胞株^[12]。虽然这是一个体外实验的研究,但提示OY-*TES*-1在体内可引起细胞免疫反应。

本研究结果显示,OY-*TES*-1 mRNA在胶质瘤中具有较高的阳性率,并能在胶质瘤患者体内引起体液免疫反应,提示OY-*TES*-1用于胶质瘤免疫治疗具有潜在的临床应用价值。

[参 考 文 献]

- [1] GURNEY J G, KADAN-LOTTICK N. Brain and other central nervous system tumors: rates, trends, and epidemiology [J]. *Curr Opin Oncol*, 2001, 13(3): 160-166.
- [2] UEDA Y, SHIMIZU K, ITOH T, et al. Induction of peptide-specific immune response in patients with primary malignant melanoma of the esophagus after immunotherapy using dendritic cells pulsed with MAGE peptides [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2007, 37(2): 140-145.
- [3] YAMANAKA R. Dendritic-cell- and peptide-based vaccination strategies for glioma [J]. *Neurosurg Rev*, 2009, 32(3): 265-273.
- [4] CABALLERO O L, CHEN Y T. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(11): 2014-2021.
- [5] UEDA Y, SHIMIZU K, ITOH T, et al. Induction of peptide-specific immune response in patients with primary malignant melanoma of the esophagus after immunotherapy using dendritic cells pulsed with MAGE peptides [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2007, 37(2): 140-145.
- [6] ONO T, KURASHIGE T, HARADA N, et al. Identification binding protein sp32 precursor as a human cancer/testis antigen [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(6): 3282-3287.
- [7] WHITEHURST A W, XIE Y, PURINTON S C, et al. Tumor antigen acrosin binding protein normalizes mitotic spindle function to promote cancer cell proliferation [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(19): 7652-7661.
- [8] GURE A O, STOCKERT E, ARDEN K C, et al. CT10: a new cancer-testis (CT) antigen homologous to CT7 and the MAGE family, identified by representational difference analysis [J]. *Int J Cancer*, 2000, 85(5): 726-732.
- [9] 王峰, 范蓉, 莫发荣, 等. 癌睾丸抗原OY-*TES*-1基因的克隆、表达及纯化 [J]. *中国免疫学杂志*, 2006, 22(12): 16-19.
- [10] TAMMELA J, UENAKA A, ONO T, et al. OY-*TES*-1 expression and serum immunoreactivity in epithelial ovarian cancer [J]. *Int J Oncol*, 2006, 29(4): 903-910.
- [11] 范蓉, 黄巍, 肖绍文, 等. OY-*TES*-1在肝细胞癌中的表达及抗体血清学分析 [J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(32): 3307-3312.
- [12] OKUMURA H, NAGUSHI Y, UANAKA A, et al. Identification of an HLA-A24-restricted OY-*TES*-1 epitope recognized by cytotoxic T cell [J]. *Microbiol Immunol*, 2005, 49(11): 1009-1016.

(收稿日期: 2011-04-27 修回日期: 2011-07-19)