

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2002.05.03

肿瘤睾丸抗原(CTA)在肺癌中的表达

赵辉 沈晨阳 王丹蕾 张国良 王俊

【摘要】 目的 检测多种肿瘤睾丸抗原(CTA)基因在肺癌中的表达。方法 用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法对35例肺癌患者癌组织和癌旁正常肺组织进行MAGE-1、-3,SSX-1、-2、-4、-5和NY-ESO-1 mRNA表达检测。随机抽取每种CTA基因的3例RT-PCR扩增产物的目的片段进行DNA序列测定。结果 35例肺癌标本中MAGE-1、-3,SSX-1、-2、-4、-5和NY-ESO-1的表达率分别为34.3%(12/35)、57.1%(20/35)、17.1%(6/35)、17.1%(6/35)、20.0%(7/35)、25.7%(9/35)和37.1%(13/35)。正常肺组织中7种CTA基因均无表达。肿瘤组织中7种基因至少有1种表达的几率是26/35(74.3%),两种或两种以上同时表达几率是23/35(65.7%)。测序结果表明RT-PCR产物确为CTA基因。结论 CTA在肺癌主动免疫治疗中是一种合适的、有前景的攻击靶点。同时,多种CTA的联合表达为多效价CTA疫苗在肺癌免疫治疗中的应用提供了理论基础。

【关键词】 肺肿瘤 肿瘤抗原 MAGE SSX NY-ESO-1

【中图分类号】 R734.2 ;R730.51

Expression of cancer-testis antigens in human lung cancer ZHAO Hui, SHEN Chenyang, WANG Danlei, ZHANG Guoliang, WANG Jun. Department of Thoracic Surgery, People's Hospital, Peking University, Beijing 100044, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the expression of cancer-testis antigen(CTA) in human lung cancer. **Methods** Reverse-transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) was used to investigate the expression of the MAGE-1, -3, SSX-1, -2, -4, -5 and NY-ESO-1 genes in 35 lung cancer samples and corresponding non-tumorous lung tissues. Three samples selected randomly from each CTA PCR product were sequenced. **Results** In 35 tumor samples, the MAGE-1, -3, SSX-1, -2, -4, -5 and NY-ESO-1 mRNA expression rates were 34.3%(12/35), 57.1%(20/35), 17.1%(6/35), 17.1%(6/35), 20.0%(7/35), 25.7%(9/35) and 37.1%(13/35), respectively. The positive rate was 74.3%(26/35) for at least one of these genes expression, and 65.7%(23/35) for two or more genes coexpression. No non-tumorous lung tissue was positive for these genes. The DNA sequence confirmed that the RT-PCR products were truly CTA cDNA. **Conclusion** The cancer-testis antigens are potential targets for antigen-special immunotherapy of lung cancer. The coexpression pattern of these antigens provides a theoretic foundation for developing a polyvalent lung cancer vaccine.

【Key words】 Lung neoplasms Tumor antigen MAGE SSX NY-ESO-1

肿瘤特异性免疫治疗既能有效杀伤全身各处肿瘤细胞,又能特异性识别肿瘤及非肿瘤细胞,故已成为肺癌生物治疗中的研究热点。肿瘤睾丸抗原(cancer-testis antigen, CTA)是一类肿瘤特异性抗原,只在肿瘤中表达,在正常组织(睾丸和胎盘除外)中均不表达,因而成为肿瘤疫苗研究中最有价值的一类抗原^[1]。目前有关这一类抗原在肺癌中的表达情况在国外报道较少,而在国内尚无报道。为进一步了解多种CTA在肺癌患者中的分布及联合表达情况,本实验应用RT-

PCR方法对35例肺癌患者肿瘤组织中多种CTA的表达进行了检测,以期CTA疫苗用于肺癌患者的免疫治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院1999年6月至2002年1月的35例肺癌标本,男20例,女15例,平均年龄67.2岁(36~78岁)。术中取材,先取远离肿瘤的正常肺组织(距肿瘤边缘5 cm以上)经无RNA酶水冲洗以清除可能污染的瘤细胞,再取肿瘤组织。组织块直径0.5 cm,即刻分装,放入液氮中保存。瘤体及癌旁正常组织均有病理切片证实。根据术后病理报告,本组中肺鳞癌18

例 肺腺癌 11 例 ,类癌 2 例 ,小细胞肺癌 4 例 ;其中淋巴阳性 26 例 ,淋巴阴性 9 例。本实验以正常睾丸组织作为阳性对照。

1.2 方法

1.2.1 组织标本总 RNA 的提取 取液氮中保存的标本约 0.1 g ,加 TRIzol 1 ml(GIBCO 公司)研磨 ,经三氯甲烷分层 ,异丙醇沉淀 ,体积分数 0.75 的乙醇洗涤干燥 ,将所得总 RNA 溶于无 RNA 酶的水中 ,经变性甲醛/琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度计鉴定质量后 ,保存于 -70℃ 冰箱备用。

1.2.2 cDNA 的合成(20 μl 反应体系) 取 RNA 5 μg ,加入随机引物 50 pmol(Promega 公司) ,M-MLV 逆转录酶 200 U(GIBCO 公司) ,RNasin 20 U(Promega 公司)等 ,37℃ 孵育 60 min ,95℃ 灭活酶 5 min ,所得逆转录产物用于 PCR 扩增。每个逆转录 cDNA 产物均在扩出 β-actin 后再进行目的基因的扩增 ,以保证模板 cDNA 的质量。

1.2.3 CTA 基因的 PCR 扩增 分别用来自肺癌组织和癌旁正常肺组织的单链 cDNA 为模板进行 PCR 反应 ,对 MAGE-1、-3 ,SSX-1、-2、-4、-5 以及 NY-ESO-1 基因的表达进行检测。引物设计参见文献 2、3 ,引物合成由上海申友生物技术公司完成。引物序列及扩增产物大小见表 1。PCR 反应条件及参数(30 μl 体系) :1.5 μl 逆转录产物 ,10 μmol/L 的特异性上、下游引物各 1 μl ,5 U/μl Taq DNA 聚合酶 0.5 μl ,10 mmol/L dNTP MIX 1 μl ,25 mmol/L MgCl₂ 2 μl ,10 × PCR 反应缓冲液 3 μl。反应条件 :MAGE-1 94℃ 1 min ,72℃ 3 min ;MAGE-3 94℃ 1 min ,72℃ 4 min ;SSX-1 94℃ 1 min ,58℃ 45 s ,72℃ 1 min ;SSX-2 :94℃ 1 min ,67℃ 45 s ,72℃ 1 min ;SSX-4 :94℃ 1 min ,60℃ 45 s ,72℃ 1 min ;SSX-5 :94℃ 1 min ,64℃ 45 s ,72℃ 1 min ;NY-ESO-1 94℃ 1 min ,64℃ 45 s ,72℃ 1 min ;β-actin 94℃ 45 s ,55℃ 45 s ,72℃ 45 s。所有反应均经预变性 ,94℃ 5 min ,扩增 35 个循环 ,72℃ 后延伸 15 min。反应结束后 ,分别取 5 μl PCR 反应产物 ,经 1% 的凝胶电泳 ,溴化乙锭染色鉴定 ,照相。

1.2.4 CTA 基因 cDNA 的序列测定 随机抽取上述 7 种 CTA 的阳性 PCR 产物(各 3 例)进行纯化和序列测定。PCR 产物纯化采用 QIAGEN 公司 QIAEX II Gel Extraction Ki(150)试剂盒 ,操作按说明书进行。DNA 序列测定由上海申友生物技术公司完成。

1.2.5 统计学处理 χ^2 检验。

表 1 RT-PCR 引物序列及扩增片段大小

Tab 1 Primers used in RT-PCR and the fragment size of PCR products

Gene	Sequence	Fragment size(bp)
MAGE-1		
S	5'-CGGCCGAAGGAACCTGACCCAG-3'	421
AS	5'-GCTGGACCCCTCACTGGGTTC-3'	
MAGE-3		
S	5'-TGGAGGACCAGAGCCCC-3'	725
AS	5'-GGACGATATCAGGAGCCCTGC -3'	
SSX-1		
S	5'-CTAAAGCATCAGAGAAGAGAAGC -3'	421
AS	5'-AGATCTCTTATTAATCTCTCAGAAA -3'	
SSX-2		
S	5'-GTGCTCAAATACCAGAGAAGATC -3'	435
AS	5'-TTTTGGGTCCAGATCTCTCTG-3'	
SSX-4		
S	5'-AAATCGTCTATGTGATGAAGCT -3'	413
AS	5'-GGTCCGTGATCTCTCTCAATAAC -3'	
SSX-5		
S	5'-GTTCTCAAATACCACAGAAGATG -3'	324
AS	5'-CTCTGCTGGCTTCTCGGGCG-3'	
NY-ESO-1		
S	5'-CACACAGGATCCATGGATGCTGCAGATGGG -3'	461
AS	5'-CACACAAAGCTTGGCTTAGCCGCTCTGCCCTG-3'	
β-actin		
S	5'-CTCGGTACTCTCTTCTTCTGG-3'	335
AS	5'-GCTTACATGCTCAGATCCCACTTAA -3'	

S Sense ; AS :Antisense

2 结果

2.1 提取组织总 RNA 的定量和定性分析 所有标本均经紫外分光光度仪检测所提取总 RNA 的浓度及纯度 ,ODA260/ODA280 > 1.8。经变性甲醛/琼脂糖凝胶电泳分析 ,所提取总 RNA 在约为 4.5 kb 和 1.9 kb 处分别有两条亮带(28S RNA 和 18S RNA) ,且 28S 的荧光强度约为 18S 的 2 倍 ,表明 RNA 未发生降解 ,其分子量分布正常。

2.2 CTA 基因在肺癌中的表达 35 例肺癌中 MAGE-1、-3 ,SSX-1、-2、-4、-5 和 NY-ESO-1 的表达率分别为 34.3%(12/35) ,57.1%(20/35) ,17.1%(6/35) ,17.1%(6/35) ,20.0%(7/35) ,25.7%(9/35) 和 37.1%(13/35) (图 1)。正常肺组织 7 种 CTA 基因均无表达。肿瘤组织中至少有 1 种基因表达的几率是 26/35 (74.3%) ,两种或两种以上同时表达的几率是 23/35 (65.7%)。测序结果表明 7 种 CTA 基因的 RT-PCR 产物与 GeneBank 检索的序列一致 ,证实所得的目的基因序列是正确的。本研究还发现 ,CTA 基因的表达与患者年龄、性别、肺癌病理类型、分期以及有无淋巴结转移无明显关系($P > 0.05$)。

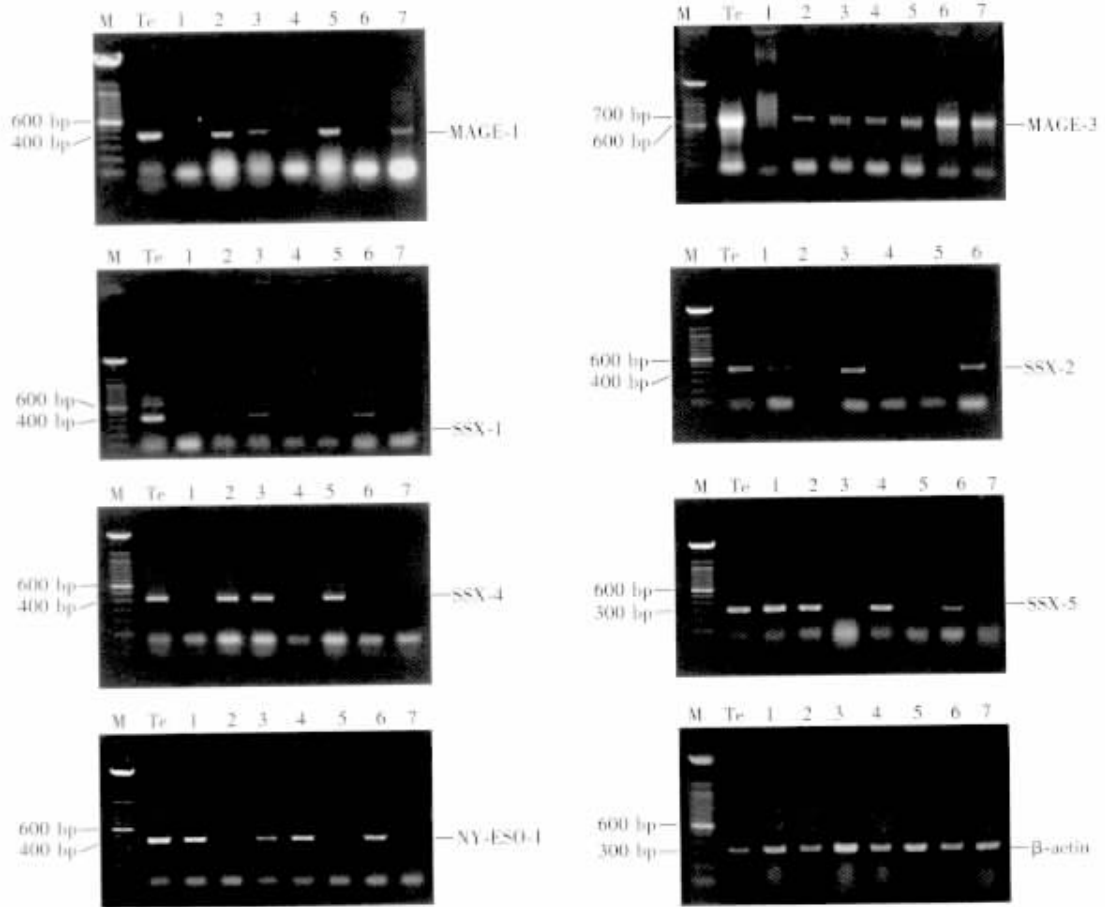


图 1 MAGE-1、-3, SSX-1、-2、-4、-5, NY-ESO-1 以及 β -actin 基因表达的 RT-PCR 检测结果

M :DNA Marker ; Te :睾丸组织 ; 1~7 肺癌组织

Fig 1 Expression of cancer-testis antigens in lung cancer specimens detected by RT-PCR

M :DNA marker ; Te :Testis tissues ; 1-7 Lung cancer tissues

3 讨论

肿瘤抗原的寻找、鉴定及其性质分析是肿瘤免疫学研究的核心内容,也是实现人类肿瘤特异性免疫治疗的前提条件。90 年代以来,人们应用肿瘤特异性 CTL 法以及用肿瘤患者血清抗体筛选肿瘤细胞 cDNA 表达文库中的肿瘤抗原(serological analysis of recombinant cDNA expression library, SEREX)等方法,已发现并分离出多种肿瘤抗原。其中,CTA 已成为肿瘤疫苗研究中最有价值的一类抗原^[1]。目前已知的 CTA 多达十余种,如 MAGE 家族、BAGE 家族、GAGE 家族以及 SSX 家族、NY-ESO-1、HOM-Tes-14/SCP-1 等^[4,5],其中部分肿瘤睾丸抗原肽疫苗已试用于多种肿瘤的临床治疗,并取得较好的效果^[6-8]。

MAGE 基因是应用肿瘤特异性 CTL 法从黑色素瘤中发现并分离出的第一个人类肿瘤特异性抗原基因。

人工合成的 MAGE-1、-3 基因编码的抗原肽已作为疫苗用于黑色素瘤、肝癌等恶性肿瘤的 I、II 期临床治疗,并取得较好疗效^[6,7]。本组实验发现 MAGE-1、-3 在肺癌中的表达率较高,分别为 34.3% 和 57.1%,与国外文献报告 MAGE-1、-3 在肺癌的表达率(36% 和 60%)相近^[2]。提示以 MAGE 抗原作为靶点的主动免疫治疗在肺癌领域具有较广阔的应用前景。

SSX 基因是近年来应用 SEREX 法从黑色素瘤中新发现的一组 CTA 基因^[9],迄今已发现 5 个家族成员,分别命名为 SSX-1、-2、-3、-4、-5。它们在肿瘤发生发展中的作用目前尚不清楚,但除 SSX-3 外,它们在多种肿瘤组织中均有表达,而在除睾丸以外的正常组织中均不表达。这一特点使 SSX 基因编码的抗原可能成为某些肿瘤特异性主动免疫治疗合适的攻击靶点^[3]。目前有关 SSX 基因在肺癌中的表达研究较少,在中国人群肺癌中的表达尚未见报道。本组实验发现

SSX-1、-2、-4、-5 在肺癌中的表达率分别为 17.1%、17.1%、20.0% 和 25.7%；与 Scanlan 等^[4]报告的 SSX-2、-4 在肺癌中的表达率(15% 和 20%) 基本相符。然而,以 SSX 抗原为靶点用于肺癌的主动免疫治疗尚存在诸多问题。首先,SSX 基因虽在肺癌中表达,但其表达率均偏低,难以在多数肺癌患者中发挥作用;其次,目前研究尚未发现 SSX 基因编码的抗原能在肿瘤患者体内诱导出特异性的细胞免疫反应^[3]。由此可见,SSX 基因能否成为肺癌特异性免疫治疗的理想靶点,仍需更深入的研究加以证实。

NY-ESO-1 是 Chen 等^[10]应用 SEREX 法从食管癌中分离出的一种 CTA。研究显示,NY-ESO-1 是一种分子量为 22 ku(kD) 的疏水蛋白,功能尚不清楚,其编码基因位于染色体 Xq28^[11]。目前认为 NY-ESO-1 是现知的免疫原性最强的一种肿瘤抗原,在 40%~50% 的 NY-ESO-1 阳性肿瘤患者体内可检测出 NY-ESO-1 抗体和针对 NY-ESO-1 的 CD8⁺ T 淋巴细胞反应^[12]。Jger 等^[8]用 NY-ESO-1 的 3 个抗原肽,注射于不同部位的皮内,在 12 例晚期肿瘤患者中,取得了较好的效果。其中 7 例病情稳定,转移灶部分消退。本实验发现 NY-ESO-1 在肺癌中的表达率为 37.1%,均高于 Cher^[10]和 Scanlan^[4]等报告的 NY-ESO-1 在肺癌中的表达率(16.7% 和 21%),这可能与样本量大小或发病的人群、地区不同有关。

复习文献发现,以往有关某一种 CTA 在肿瘤中的表达研究较多,而有关 CTA 在肿瘤,特别是在肺癌中联合表达的研究则很少^[4,13]。本实验首次在国内应用 RT-PCR 法对多种 CTA 在肺癌中的表达和联合表达情况进行检测,不仅证实了多种 CTA 在肺癌中均有不同程度的表达,在正常肺组织中均不表达,而且发现多种 CTA 在肺癌中的联合表达率,较上述任何一种单一 CTA 的表达率均明显增高。我们的研究结果显示,CTA 基因在肺癌中的表达具有明显的非单一性,其中 7 种基因至少有 1 种的表达率是 26/35(74.3%),而两种或两种以上联合表达率是 23/35(65.7%),均明显高于上述 CTA 中,在肺癌中单独表达率最高的 MAGE-3(57.1%)。这意味着在肺癌人群中能够接受肿瘤特异性抗原免疫治疗的比例明显增加。因此可以推测,联合多种 CTA 制备的多价肿瘤疫苗将可用于近 75% 的肺癌患者的免疫治疗。

综上所述,我们认为检测 CTA 在肺癌中联合表达的情况,有助于明确多效价 CTA 疫苗在肺癌免疫治疗中的价值,可为多效价 CTA 疫苗的应用提供理论依据。这不仅可使更多的肿瘤患者得到治疗,同时也可有效避免或减少因肿瘤抗原表达的个体差异和抗原调变所致的免疫逃逸,从而为肺癌主动免疫治疗提供一种合适的、有前景的攻击靶点。

参 考 文 献

- 1 Sahin U, Koslowski M, Tureci O, et al. Expression of cancer testis genes in human brain tumors. *Clin Cancer Res* 2000 *10*(10):3916-3922.
- 2 Soling A, Schurr P, Berthold F. Expression and clinical relevance of NY-ESO-1, MAGE-1 and MAGE-3 in neuroblastoma. *Anticancer Res* 1999 *19*(3B):2205-2209.
- 3 Tureci O, Chen YT, Sahin U, et al. Expression of SSX genes in human tumors. *Int J Cancer* 1998 *77*(1):19-23.
- 4 Scanlan MJ, Altorki NK, Gure AO, et al. Expression of cancer-testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene, CT9. *Cancer Lett* 2000 *150*(2):155-164.
- 5 Sahin U, Tureci O, Pfreundschuh M. Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 1997 *9*(5):709-716.
- 6 Hu X, Chakraborty NG, Sporn JR, et al. Enhancement of cytolytic T lymphocyte precursor frequency in melanoma patients following immunization with the MAGE-1 peptide loaded antigen presenting cell-based vaccine. *Cancer Res* 1996 *56*(11):2479-2483.
- 7 Reynolds SR, Oratz R, Shapiro RL, et al. Stimulation of CD8⁺ T cell responses to MAGE-3 and MELANA/MART-1 by immunization to a polyvalent melanoma vaccine. *Int J Cancer* 1997 *77*(6):972-976.
- 8 Jger E, Gnjatic S, Yasuhiro N, et al. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8⁺ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *PNAS* 2000 *97*(22):12198-12203.
- 9 Clark J, Rocques PJ, Crew AJ, et al. Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the (X;18)(p11.2;p11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nat Genet* 1994 *7*(4):502-508.
- 10 Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, et al. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *PNAS* 1997 *94*(5):1914-1918.
- 11 Chen YT, Boyer AD, Viars CS, et al. Genomic cloning and localization of CTAG, a gene encoding an autoimmunogenic cancer-testis antigen NY-ESO-1, to human chromosome Xq28. *Cytogenet Cell Genet* 1997 *77*(3-4):237-240.
- 12 Jungbluth AA, Chen YT, Stockert E, et al. Immunohistochemical analysis of NY-ESO-1 antigen expression in normal and malignant human tissues. *Int J Cancer* 2001 *92*(6):856-860.
- 13 Sahin U, Tureci O, Chen YT, et al. Expression of multiple cancer/testis (CT) antigens in breast cancer and melanoma: basis for polyvalent CT vaccine strategies. *Int J Cancer* 1998 *78*(3):387-389.

(收稿 2002-03-25 修回 2002-05-27)

(本文编辑 李蓓兰)