

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.06.013

# 癌-睾丸抗原 MAGE-A1、A3、A4 在视网膜母细胞瘤中的表达

林 泉\*, 梁 皓, 严宇清, 何剑峰

## Expression of Cancer-Testis Antigen Genes in Retinoblastoma

LIN Quan\*, LIANG Hao, YAN Yu-qing, HE Jian-feng

Department of Ophthalmology, First Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

(\* Present: Visual Science and Optometry Center of the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021)

Corresponding Author: LiangHao, E-mail: lianghao505@yahoo.com.cn

**Abstract: Objective** To detect the mRNA expression of three CTAs (MAGE-A1, A3, A4) in retinoblastoma (RB) tissues and investigate the possibility of applying these antigens as the target antigens for RB specific immunotherapy. **Methods** With reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), the mRNA expression of MAGE-A1, A3, A4 in 15 cases of RB tissues, 12 cases of nontumorous retina tissues and 22 cases of normal ocular region tissues were detected. The results of expression and related clinical parameters were analyzed with statistic analysis software. **Results** Among 15 cases of RB tissues, MAGE-A1, A3, A4 mRNA were detected in 33.33%(5/15), 46.67%(7/15), 33.33%(5/15), respectively. At least one of these three MAGEs were detected in 11 cases of RB tissues(73.33%), and at least two of these three MAGEs were detected in 5 cases of RB tissues(33.33%). None of these three MAGEs can be detected in the 12 cases of nontumorous retina tissues and 22 cases of normal ocular region tissues. **Conclusion** With expressive frequency in RB, no relationship was found between the expression of these three MAGE genes and related clinical parameters ( $P > 0.05$ ). MAGE-A1, A3, A4 might be potential target antigens for specific immunotherapy of RB.

**Key words:** Retinoblastoma; Cancer-testis antigen; Cancer immunotherapy

**摘要:目的** 了解视网膜母细胞瘤(RB)组织癌-睾丸抗原(CTA)基因 MAGE-A1、A3、A4 的表达,探讨这些基因成为 RB 特异性免疫治疗靶抗原的可能性。**方法** 人 RB 组织 15 例,对照组为 12 例非肿瘤病变视网膜组织及 22 例正常眼部组织。采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测上述组织 MAGE-A1、A3、A4 的 mRNA 表达情况,并根据肿瘤病理分级、肿瘤大小、临床分期等临床指标进行统计学分析。**结果** 15 例 RB 组织中, MAGE-A1、A3、A4 的表达率分别为 33.33%(5/15)、46.67%(7/15)和 33.33%(5/15),有 73.33%(11/15)的 RB 组织至少表达一种 MAGE 基因,33.33%(5/15)的 RB 组织至少表达两种 MAGE 基因。12 例非肿瘤病变视网膜组织及 22 例正常眼部组织三种 MAGE 基因均不表达。**结论** MAGE-A1、A3、A4 基因在 RB 组织中有一定频率的表达, MAGE-A1、A3、A4 的表达率与病人的性别、年龄和临床分期,肿瘤大小及病理分级均无相关性( $P > 0.05$ )。MAGE-A1、A3、A4 有望成为 RB 特异性免疫治疗的靶抗原。

**关键词:** 视网膜母细胞瘤; 癌-睾丸抗原; 肿瘤免疫治疗

**中图分类号:** R739.7<sup>+</sup>2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2010)06-0656-04

## 0 引言

RB 是儿童最常见的致盲及致命性眼内恶性肿瘤之一。其恶性程度非常高,传统的手术、放疗及化疗的疗效不佳。免疫治疗是利用特异性抗原对肿瘤进行治疗,创伤小、针对性强,对 RB 无疑是一种较好的治疗选择。“MAGE”这个术语源于黑色素瘤抗原(melanoma antigen-encoding),MAGE-A1 是免疫学家发现的第一个人肿瘤特异性抗原<sup>[1]</sup>,随着研究的不断

收稿日期:2009-02-08;修回日期:2009-08-05

基金项目:广西自然科学基金资助项目(桂科青 0542052);  
广西卫生厅科研基金资助项目(Z2006049)

作者单位:530021 南宁,广西医科大学第一附属医院眼科(\*现工作单位:530021 南宁,广西壮族自治区人民医院视光中心)

通信作者:梁皓, E-mail: lianghao505@yahoo.com.cn

作者简介:林泉(1976-),男,硕士,主治医师,主要从事肿瘤及晶状体病研究

深入,目前已找到 23 个 MAGE 家族成员,它们均位于人 X 染色体上<sup>[2]</sup>。根据其在染色体上分布区域不同,将 MAGE 家族分为 A、B、C、D、E、F 等 6 个亚家族。其中,MAGE-A 亚家族具有 12 个成员,均位于人染色体 Xq28。在 MAGE 家族的 6 个亚家族中,A、B、C 三个亚家族具有独特的表达特征,即除睾丸和胎盘组织外,其在正常组织中不表达,主要表达于以黑色素瘤为主的肿瘤组织中,是肿瘤特异性抗原,可诱导机体产生细胞、体液免疫。然而,目前对 RB 中的 MAGE 基因的表达情况仍不甚清楚。为此本研究采用 RT-PCR 法分析 15 例 RB 组织及 12 例非肿瘤病变视网膜组织、22 例眼部正常组织中 MAGE-A1、A3、A4 基因 mRNA 水平的表达情况,旨在评价其作为 RB 特异性免疫治疗潜在靶位的可能性。

### 1 资料与方法

1.1 临床资料 所有标本均来源于广西医科大学第一附属医院眼科 2004 年 9 月~2006 年 11 月的住院病人。其中 RB 标本 15 例,男 7 例,女 8 例,年龄 2~60 月,平均年龄(23.07±15.24)月,眼内期 9 例,青光眼期 4 例,眼外期 2 例,均行眼球摘除术,所有标本均经术后病理确诊,其中未分化型 7 例,分化型 8 例。非肿瘤病变视网膜组织 12 例,均为非肿瘤病变眼部疾病眼球摘除或眼内容物剜出病例,男 7 例,女 5 例,年龄 13~90 月,平均年龄(30.58±20.48)月。眼部正常组织 22 例(眼外肌 12 例,眼睑皮肤组织 5 例,结膜组织 5 例)取自眼外肌手术,眼表手术及眼部整形手术,男 12 例,女 10 例,年龄 13~98 月,平均年龄 33.77±21.48(月)。所有标本取材前均经患者家属同意。组织离体后(10 分钟内)置于经 DEPC 水处理且消毒的 EP 管中液氮速冻,然后转置 -70℃ 低温冰箱保存,直至使用。

1.2 组织 RNA 的提取及 cDNA 的合成 取冻存的标本 100 mg, Trizol 法抽提组织总 RNA,所得 RNA 经琼脂糖凝胶电泳和测定 OD 值,确定无降解后,取 3 μg 总 RNA,用逆转录酶(TAKARA 公司)合

成 cDNA。所得 cDNA 通过 PCR 扩增看家基因以检测 cDNA 的质量。将合格的 cDNA 分装, -20℃ 保存,备用。

1.3 3 种 CTA 基因的 PCR 检测 取 1 μl cDNA 于 25 μl 反应体系,采用 TAKARA 公司的 TaqDNA 聚合酶进行 PCR 检测。PCR 循环数均为 35 个循环,引物(上海生工生物公司)序列、扩增产物片段长度和反应条件,见表 1。每轮 PCR 反应中,均采用正常人睾丸 cDNA 为阳性对照,不加模板为空白对照。PCR 完毕后,取 5 μl 产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察拍照。并随机选择 PCR 阳性产物各 4 份行双向 DNA 测序。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件,率的比较采用  $\chi^2$  检验,应用 Spearman 相关分析对 MAGE-A1、A3、A4 在 RB 中表达的相关性进行分析, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

2.1 三种 MAGE 基因在 RB 组织中的表达 在 15 例 RB 组织中,MAGE-A1 的表达率为 33.33% (5/15), MAGE-A3 的表达率为 46.67% (7/15), MAGE-A4 的表达率为 33.33% (5/15), 12 例非肿瘤病变视网膜组织及 22 例眼部正常组织均不表达所检测的三种 MAGE 基因,见图 1。三种 MAGE 基因在 RB 中的表达率分别与后两者相比,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。对三种 MAGE 基因 PCR 产物的测序结果进行 GenBank 检索,证实扩增的片段为目的基因。

2.2 三种 MAGE 基因在 RB 中的共同表达情况 15 例 RB 组织中,73.33% (11/15) 的标本表达至少一种 MAGE 基因,33.33% (5/15) 的标本表达至少两种 MAGE 基因,13.33% (1/15) 的标本同时表达三种 MAGE 基因,26.67% (4/15) 的标本不表达任何一种 MAGE 基因。

2.3 三种 MAGE 基因的表达与各临床病理指标的关系 三种 MAGE 基因的表达均与所分析的各临床病理指标无关( $P>0.05$ ),见表 2。

表 1 MAGE 基因 RT-PCR 引物序列、产物片段和反应条件  
Table 1 Primers, PCR product and analysis of RT-PCR reaction condition

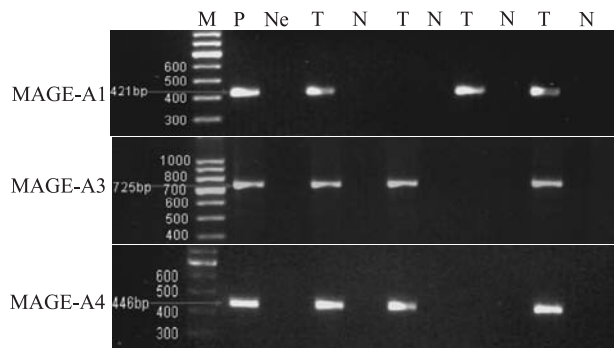
Genes	PCR primer sequence	Sequence length	Temp&Time			cycles
			Denaturation	Annealing	Extension	
MAGE-A1	P:5'CGG CCG AAG GAA CCT GAC CCA G 3' R:5'GCT GGA ACC CTC ACT GGG TTG CC 3'	421 bp	94℃ 1 min	68.5℃ 1 min	72℃ 1 min	35
MAGE-A3	P:5'TGG AGG ACC AGA GGC CCC C 3' R:5'GGA CGA TTA TCA GGA GGC CTG C 3'	725 bp	94℃ 1 min	68℃ 1 min	72℃ 1 min	35
MAGE-A4	P:5'GAG CAG ACA GGC CAA CCG 3' R:5'GCC TGA CGC AGA GTC CTT 3'	446 bp	94℃ 1 min	68℃ 1 min	72℃ 1 min	35

表 2 三种 MAGE 基因表达与 RB 临床病理指标的关系

Table 2 Correlation of the expression of MAGE in RB and clinicopathologic parameters

Item	n	MAGE-A1			MAGE-A3			MAGE-A4		
		(+)	(+)%	P	(+)	(+)%	P	(+)	(+)%	P
Gender										
Male	7	1	14.29	0.165	2	28.57	0.216	2	28.57	0.500
Female	8	4	50.00		5	62.50		3	37.50	
Age* (months)										
≤24	9	3	33.33	1.000	5	55.55	0.435	3	33.33	1.000
>24	6	2	33.33		2	33.33		2	33.33	
Clinical stage										
Intraocular stage	9	4	44.44	0.383	4	44.44	0.851	2	22.22	0.344
Glaucoma stage	4	1	25.00		3	0.75		2	50.00	
Extraocular stage	2	0	0		0	0		1	50.00	
Tumor size (mm)										
≤15	6	1	16.67	0.297	2	33.33	0.435	3	50.00	0.297
>15	9	4	44.44		5	55.55		2	22.22	
Differentiation										
Poor	7	1	14.29	0.165	3	42.86	0.800	2	28.57	0.738
Well	8	4	50.00		4	50.00		3	37.50	

Note: \*: Age grouping according to monocular RB diagnosis time of chinese ophthalmology(2005, P2225)



M: Marker (100~1 000 bp); P: positive control; Ne: negative control; T: tumor; N: normal

图 1 MAGE-A1、A3、A4 基因 RT-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳分析

Figure 1 Electrophoretic analysis of RT-PCR amplification products of MAGE-A1、A3、A4 genes

### 3 讨论

CTA 是应用免疫学或分子生物学的方法发现的一大类肿瘤特异性抗原,其编码基因具有如下共同特征:其 mRNA 表达仅限于肿瘤和睾丸组织,其他正常组织均不表达<sup>[3]</sup>。以 CTA 的抗原肽为主所构建的疫苗是目前肿瘤抗原疫苗应用的热点。CTA 迄今已经发现有 20 个家族超过 100 个成员,其发现过程主要是依靠 T 细胞抗原决定簇的克隆和血清筛选重组表达 cDNA 文库(Serological iden-

tification of antigens by recombinant expression cloning, SEREX),由此 CTA 分为可被 T 淋巴细胞识别的抗原和被血清抗体识别的抗原,一些 CTA 实际上可以同时引发细胞和体液免疫反应,其中包括 MAGE-A1、A3、A4<sup>[4]</sup>。

自 Van der Bruggen 等<sup>[1]</sup>于 1991 年发现了 MAGE-A1 基因以来,十多年来,人们已在不同肿瘤组织中发现多个 MAGE 基因,各 MAGE 基因间的同源性高达 80%~99%,组成 MAGE 基因家族。MAGE-A1、A3、A4 是 MAGE-A 亚家族成员中重要成员,人们已在黑色素瘤、肺癌、乳腺癌、结直肠癌、胃癌、肝癌、膀胱癌、精原细胞瘤、头颈部鳞癌、食管癌、白血病、淋巴瘤和肉瘤等恶性肿瘤中检测到了 MAGE-A1、A3、A4 基因的表达<sup>[1,5-7]</sup>。目前,有关 MAGE-A1、A3、A4 基因在 RB 组织中的表达情况,尚不曾见到国内外文献报道。

MAGE-A 基因亚家族是极有价值的肿瘤抗原,已显示出良好的应用前景,以 MAGE-A1、A3 抗原肽作为靶抗原的疫苗已经分别应用于临床试验,并且显示出良好的临床疗效<sup>[8]</sup>。MAGE 蛋白在细胞质内可被降解为短肽(多为九肽或十肽),在与 HLA 分子结合后,被递呈至细胞膜上为 CTL 所识别,并诱导细胞免疫应答<sup>[9]</sup>。Tahara 发现 68% 的肝癌表达 MAGE-A1 基因,如果使用它们的产物免疫病人,分别有 30% 的 HLA-A2 阳性的肝癌患者病情

好转,还有 40% 的 HLA-A24 阳性患者也可能受益<sup>[10]</sup>。Klein 等<sup>[11]</sup>将连接有 MAGE-A1 基因的腺病毒载体导入骨髓来源的 DC(树突细胞)后,免疫表达 MAGE-A1 的 B16F10 黑色素瘤细胞肿瘤模型,导致肺转移率显著下降,生存期延长,部分动物达到了长期治愈的效果。Thurner 等<sup>[12]</sup>用 MAGE-A3 编码的抗原肽 MAGE-3A1(EVDPIGHLY)负载 DC,用于治疗Ⅳ期黑色素瘤患者,研究结果提示负载 MAGE-A3 抗原的树突状细胞可以扩增特异性的 CTL 甚至在晚期癌症患者中也可以使肿瘤退变。

目前对 CTA 在 RB 中表达的研究,无论是从本实验还是已发表的文献来看均是刚起步,尚需进一步的研究。本实验结果显示 15 例 RB 组织中 MAGE-A1、A3、A4 的表达率分别为 33.33%、46.67% 和 33.33%,而在 12 例非肿瘤病变视网膜组织及 22 例眼部正常组织中均不表达。三种 MAGE 基因的表达与病人的性别、年龄和临床分期,肿瘤大小、病理分级之间无相关。虽然这三种 MAGE 基因的表达与临床病理指标无关,但 MAGE-A1、A3、A4 具有一定的表达率,这就使得利用这三种 CTA 作为肿瘤疫苗用于 RB 病人的特异性免疫治疗成为可能。此外,我们发现联合检测三种 CTA 可以覆盖 73.33%(11/15)的 RB 患者,这也为采用多价疫苗进行 RB 的免疫治疗提供了实验依据。本实验仅研究了 A1、A3、A4 在 RB 组织的表达,尚需对其他未检测的 CTA 行更广泛的筛查,以期筛选出能在 RB 中高表达的 CTA,届时,可与其他 CTA 一起制成多价疫苗,并联合其他肿瘤治疗手段,来提高肿瘤治疗的疗效。而多价疫苗的疗效要好于单一多肽疫苗,可以避免肿瘤抗原异质性表达的问题从而扩大了免疫治疗适用的范围<sup>[13]</sup>。研究中也发现同时表达三种 CTA 的标本较少(13.33%,1/15),加之尚需考虑到肿瘤抗原表达异质性及遗传性状不稳定性等因素的存在,因此有必要扩大检测范围,了解其他 CTA 基因家族在 RB 中的表达情况,从中筛选出更多高表达的 CTA,用于开发适合于大多数 RB 患者的多价疫苗。由于目前对于早期 RB 缺乏较好的诊断手段,我国的 RB 患者就诊时间往往已经很迟,故中晚期 RB 在国内仍以眼球摘除为主要治疗手段,缺乏其他非破坏性的治疗手术,给患儿带来终生的缺陷,严重影响其生存质量,甚至威胁其生命。而今后利

用 MAGE-A1、A3、A4 蛋白制作肿瘤疫苗为晚期 RB 患者的治疗带来了新的希望。

#### 参考文献:

- [1] Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma[J]. *Science*, 1991, 254(5038):1643-1647.
- [2] Yakirevich E, Sabo E, Dirnfeld M, et al. Morphometrical quantification of spermatogonial germ cells with the 57B anti-MAGE-A4 antibody in the evaluation of testicular biopsies for azoospermia[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2003, 11(1):37-44.
- [3] Yakirevich E, Sabo E, Lavie O, et al. Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(17):6453-6460.
- [4] Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, et al. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy[J]. *Immunol Rev*, 2002, 188:22-32.
- [5] De Plaen E, Arden K, Traversari C, et al. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family[J]. *Immunogenetics*, 1994; 40(5):360-369.
- [6] Lurquin C, DeSmet C, Brasseur F, et al. Two members of the human MAGEB gene family located in Xp21.3 are expressed in tumors of various histological origins[J]. *Genomics*, 1997, 46(3):397-408.
- [7] 严茂军, 赵劲民, 苏伟, 等. 结直肠癌中黑色素瘤抗原基因 mR-NA 的表达及意义[J]. *肿瘤防治研究*, 2008, 35(5):339-342.
- [8] Marchand M, van Baren N, Weynants P, et al. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1[J]. *Cancer*, 1999, 80(2):219-230.
- [9] Nolte A, Scheffold C, Slotty J, et al. Generation of melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes for allogeneic immunotherapy[J]. *Immunother*, 2003, 26(3):257-269.
- [10] Tahara K, Mori M, Sadanaga N, et al. Expression of the MAGE gene family in human hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 1999, 85(6):1234-1240.
- [11] Klein C, Bueler H, Mulligan RC. Comparative analysis of genetically modified dendritic cells and tumor cells as therapeutic cancer vaccines[J]. *Exp Med*, 2000, 191(10):1699-1708.
- [12] Thurner B, Haendle I, Roder C, et al. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma[J]. *Exp Med*, 1999, 190(11):1669-1678.
- [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[J]. *Cancer*, 1998, 78(3):387-389.

[编辑:贺文;校对:刘红武]