

· 短篇论著 ·

NY-ESO-1 和 MAGE-A1 蛋白在肺癌中的表达及临床意义

孙发政 万国峰 肖欣

【摘要】目的 研究 NY-ESO-1 及 MAGE-A1 蛋白在肺癌中的表达,分析其与临床病理参数的关系,为肺癌的免疫治疗提供理论依据。**方法** 采用免疫组织化学的方法检测 NY-ESO-1 及 MAGE-A1 蛋白在 73 例肺癌中的表达并与癌旁组织、26 例肺良性病变、20 例正常肺组织进行比较。**结果** 73 例肺癌标本中, NY-ESO-1 阳性表达率 45.21% (33/73), MAGE-A1 阳性率 56.16% (41/73), 癌旁组织、肺良性肿瘤、正常肺组织中阳性率为 0, 有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。NY-ESO-1 在肺癌中的表达与肺癌病理分型、临床分期、组织分化程度及淋巴结转移有关 ($P < 0.05$)。MAGE-A1 在肺癌中的表达与肺癌病理分型、组织分化程度有关 ($P < 0.05$), 与临床分期、淋巴结转移无关 ($P > 0.05$)。**结论** NY-ESO-1 和 MAGE-A1 对肺癌患者的诊断、鉴别和预后判断有着重要的指导意义。

【关键词】 肺肿瘤; 免疫组织化学; NY-ESO-1 蛋白; MAGE-A1 蛋白

肿瘤睾丸抗原 (cancer-testis antigen, CTA_g) 只在肿瘤中表达, 在正常组织 (睾丸和胎盘除外) 中均不表达, 在体内可引发细胞免疫和体液免疫, 是肿瘤诊断及治疗研究中最有价值的一类抗原。本研究应用免疫组织化学的方法检测 CT 抗原家族中 NY-ESO-1 (recombinant human new york esophageal squamous cell carcinoma) 和 MAGE-A1 (melanoma antigen-1) 蛋白在 73 例肺癌中的表达情况, 分析其与临床病理参数之间的关系, 为肺癌的诊断、鉴别、预后判断及为手术后相关治疗提供理论依据。

一、材料与方法

1. 标本来源: 选取 2002 年 7 月至 2009 年 12 月在济南军区总医院胸外科手术治疗并经病理证实、病史资料完整、组织蜡块保存良好的病例作为本课题的研究对象, 所有患者术前均未接受化疗和放疗及其他相关治疗。其中肺癌病例 73 例。鳞癌 27 例, 腺癌 30 例, 小细胞肺癌 16 例。按组织分化程度分为高、中、低分化组, TNM 分期分为 I ~ IV 期, 其中 I 期 15 例, II 期 18 例, III ~ IV 期 40 例。有淋巴结转移 41 例, 无淋巴结转移 32 例。良性病变组 26 例, 其中结核球 11 例, 炎性假瘤 6 例, 错构瘤 8 例, 纤维化结节 1 例。正常肺组织组 20 例 (距离肿块边缘 5 cm 以上正常肺组织或另一叶正常肺组织, 并经病理学检查未见癌细胞)。

鼠抗人 NY-ESO-1 单克隆抗体购自美国 Zymed 公司, MAGE-A1 单克隆抗体购自 NEOMARKERS 公司。免疫组化试剂盒 (SP-kit) 购于北京中山生物有限公司。

2. 免疫组织化学染色步骤 (S-P 法): 免疫组织化学染色采用 S-P 法, 用 PBS 代替一抗做阴性对照, 操作按试剂盒说明书进行。简述如下: 根据病理切片的核片结果, 选取肺癌组织丰富的石蜡块, 普通切片机连续切片, 切片厚度 4 μm 。脱蜡至水化, 微波抗原修复; 依次加入过氧化氢和正常非免疫动物血清封闭, 各孵育 10 min; 滴加一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 依次滴加生物素标记二抗和链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液, 各孵育 10 min; DAB 显色, 苏木精复染。

3. 免疫组织化学阳性染色结果的判定: NY-ESO-1、MAGE-A1 阳性均为细胞质棕黄色着色, 部分细胞核着色。按染色强度及阳性细胞数量进行分级。染色强度评分: 未着色为 0 分; 浅黄色为 1 分; 棕黄色为 2 分; 棕褐色为 3 分。阳性细胞数评分: 阳性细胞数 $< 10\%$ 为 0 分; $11\% \sim 25\%$ 为 1 分; $26\% \sim 50\%$ 为 2 分; $> 50\%$ 为 3 分。两项相加后分四级: 0 ~ 1 分为“-”, 2 分为“+”, 3 ~ 4 分为“++”, 5 分及以上为“+++”。

4. 统计学分析: 组间构成比或率的比较采用 Chi-square test 检验, 单项有序资料采用 Ridit 分析, 双向有序属性不同的资料采用 Spearman 等级相关分析法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

73 例肺癌标本中, NY-ESO-1 阳性表达 33 例, 阳性率 45.21% (33/73), MAGE-A1 阳性表达 41 例, 阳性率 56.16% (41/73), 癌旁组织、肺良性肿瘤、正常肺组织中均无 NY-ESO-1 和 MAGE-A1 表达。

NY-ESO-1 在腺癌中的表达明显高于鳞癌、小细胞癌 ($\chi^2 = 7.51, P = 0.02$), MAGE-A1 在腺癌中的表达明显高于鳞癌、小细胞癌 ($\chi^2 = 13.13, P = 0.001$), 有明显统计学差异。见表 1。

NY-ESO-1 在肺癌 III ~ IV 期中的阳性表达率和表达强度明显高于 I 期、II 期, 有显著统计学差异 ($r_s = 0.303, P = 0.009$)。而 MAGE-A1 在 III ~ IV 期中的表达与 I 期、II 期相比无明显统计学差异 ($r_s = -0.024, P = 0.839$)。NY-ESO-1 在低分化肿瘤组中的表达高于中、高分化肿瘤组 ($r_s = 0.340, P = 0.003$)。MAGE-A1 在低分化肿瘤中的表达也明显高于中、高分化肿瘤组 ($r_s = 0.390, P = 0.001$)。NY-ESO-1 表达阳性率与淋巴结转移有相关性 ($P < 0.05$), MAGE-A1 表达阳性率与淋巴结转移无明显相关性 ($P > 0.05$)。见表 2。

三、讨论

以手术为主的综合治疗是当前肺癌治疗的主要方法, 但术后复发、转移均较常见。如何清除残存的肿瘤细胞, 控制肿瘤细胞的生长与播散, 是目前困扰肺癌治疗的一大难题。针对肿瘤特异性抗原的免疫治疗, 既能特异性识别肿瘤及非肿瘤细胞, 又能有效杀伤全身各处肿瘤细胞, 已成为恶性肿瘤生物治疗中的研究热点。NY-ESO-1 蛋白由肿瘤细胞产生, 能诱导自发的体液免疫和细胞免疫反应, 诱导 CTL 细胞反应特异性杀伤肿瘤细胞^[1], 在未来肿瘤的辅助治疗尤其是免疫治疗中有重要应用前景^[2]。

表1 NY-ESO-1、MAGE-A1 表达与病理分型的关系

病理分型	例数	NY-ESO-1 表达					MAGE-A1 表达				
		-(例)	+ ~ + + + (例)	阳性率(%)	χ^2 值	P 值	-(例)	+ ~ + + + (例)	阳性率(%)	χ^2 值	P 值
腺癌	30	9	21	70.00	7.51	0.02	5	25	83.33	13.13	0.001
鳞癌	27	18	9	33.33			20	7	25.93		
小细胞癌	16	13	3	18.75			7	9	56.25		

表2 NY-ESO-1、MAGE-A1 表达与临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	NY-ESO-1 表达(例)					MAGE-A1 表达(例)						
		-	+	++	+++	r_s 值	P 值	-	+	++	+++	r_s 值	P 值
临床分期						0.303	0.009					-0.024	0.839
I	15	11	2	1	1			6	4	5	0		
II	18	13	4	1	0			7	3	8	0		
III ~ IV	40	16	14	8	2			19	6	13	2		
组织分化程度						0.340	0.003					0.390	0.001
高	7	5	1	1	0			4	2	1	0		
中	31	22	7	2	0			20	3	8	0		
低	35	13	13	5	4			8	8	17	2		
淋巴结转移						-1.94	0.04					-0.157	0.870
无	32	22	7	2	1			13	8	11	0		
有	41	18	14	6	3			19	5	15	2		

黑色素瘤抗原-1(melanoma antigen-1, MAGE-A1)是应用细胞毒T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)克隆技术在黑色素瘤细胞中发现了第1个肿瘤睾丸抗原;目前已经发现了24个MAGE家族成员,它们均位于X染色体上,根据其在染色体上分布的区域不同,将MAGE家族分为A、B、C、D、E、F六个亚家族。

目前认为,黑色素瘤、膀胱癌和肝癌是CTAg基因高度表达肿瘤,肾癌和结肠癌为该基因低度表达肿瘤。我们的研究结果显示,在肺癌中NY-ESO-1及MAGE-A1蛋白的阳性表达率分别为45.21%和56.16%,而在癌旁组织、肺良性肿瘤、正常肺组织中均无NY-ESO-1和MAGE-A1表达,说明肺癌也是NY-ESO-1、MAGE-A1抗原高度特异性表达肿瘤,对肺癌的诊断及鉴别有重要意义。CTAg表达呈现簇生趋势,即一些肿瘤可同时表达多种CTAg,而其他肿瘤则无CTAg表达。Luo等^[3]检测21例肝细胞癌组织中MAGE-A1、GAGE、SSX-1和SYCP-1等10种CTAg基因的表达,发现43%的标本至少表达两种。Tajima等^[4]研究9种CTAg基因在肺癌中表达,结果发现同时有2个或更多CTAg表达者占57%,认为这种成簇表达的现象与CTAg基因在肿瘤中的活化/脱抑制过程有关。由此推测,CTAg的表达可能不是单个基因独立激活的过程,可能存在协同作用。我们对NY-ESO-1、MAGE-A1在肺癌中的单独和协同表达情况进行检测,结果显示,NY-ESO-1、MAGE-A1在肺癌中的联合检测时65.49%(50/73)的患者至少有一种抗原表达,同时表达2种CTAg占总数的20.54%。说明CTAg簇生表达的特性在肺癌中同样存在,联合多个、有协同作用的CTAg检测,可明显提高肺癌诊断的敏感性。另外也提示单价NY-ESO-1或MAGE-A1疫苗用于免疫治疗显得过于单薄^[5]。制备CT抗原多价疫苗,可以提高免疫效果,使能够接受肿瘤特异性抗原免疫治疗的肺癌人群比例明显增加^[6]。

NY-ESO-1和MAGE-A1抗原与肺癌临床指标之间的相关性一直受到人们的关注^[7],有文献报道NY-ESO-1表达与恶性肿瘤组织分级、转移和预后有关^[8-9]。Kurashige等^[10]认为CTAg基因在肿瘤不同病理分期的表达有差异,病期越晚NY-ESO-1基因的表达率越高。在食管恶性肿瘤中NY-ESO-1和MAGE-A1的表达与肿瘤的复发、转移、预后密切相关^[11]。我们的研究显示NY-ESO-1在临床分期早、分化程度高、无淋巴结转移肺癌的表达阳性率明显低于临床分期晚、分化程度差、有淋巴结转移的肺癌。而MAGE-A1的表达与淋巴结转移、临床分期无明显相关性,结果提示同一家族内的不同抗原在同一肿瘤中的表达率也存在差异。本研究还发现NY-ESO-1和MAGE-A1抗原在腺癌中均呈高表达状态,差别有显著统计学意义。这一结果提示在常规病理不能明确病理分型时,NY-ESO-1、MAGE-A1的表达可作为一项重要的参考指标。

总之,CTAg对肺癌的诊断、鉴别及预后的判断有着重要的指导意义,并且多价CTAg疫苗的应用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^[12],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,使更多的肿瘤患者得到有效治疗。

参 考 文 献

[1] Zhao Y, Zheng Z, Khong HT, et al. Transduction of an HLA-DP4-restricted NY-ESO-1 specific TCR into primary human CIM + lymphocytes. J Immunother, 2006, 29: 398-406.
 [2] Karbach J, Gnjatich S, Bender A, et al. Tumor-reactive CD8 + T-cell responses after vaccination with NY-ESO-1 peptide, CpG 7909 and Montanide ISA-51: association with survival. Int J Cancer, 2010, 126: 909-918.
 [3] Luo G, Huang S, Xie X, et al. Expression of cancer-testis genes in hum-

- all hepatocellular carcinomas. *Cancer Immun*, 2002, 2; 11.
- [4] Tajima K, Obata Y, Tamaki H, et al. Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer. *Lung Cancer*, 2003, 42; 23-33.
- [5] Yin B, Liu G, Wang XS, et al. Expression profile of cancer-testis genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Oncol*. 2011 Mar 9.
- [6] Rao M, Chinnasamy N, Hong JA, et al. Inhibition of histone lysine methylation enhances cancer-testis antigen expression in lung cancer cells; implications for adoptive immunotherapy of cancer. *Cancer Res*, 2011, 71; 4192-4204.
- [7] Shigematsu Y, Hanagiri T, Shiota H, et al. Clinical significance of cancer/testis antigens expression in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2010, 68; 105-110.
- [8] Konishi J, Toyooka S, Aoe M, et al. The relationship between NY-ESO-1 mRNA expression and clinicopathological features in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*, 2004, 11; 1063-1067.
- [9] Svobodová S, Browning J, MacGregor D, et al. Cancer-testis antigen expression in primary cutaneous melanoma has independent prognostic value comparable to that of Breslow thickness, ulceration and mitotic rate. *Eur J Cancer*, 2011, 47; 460-469.
- [10] Kurashige T, Noguchi Y, Saika T, et al. Ny-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: correlation with tumor grade. *Cancer Res*, 2001, 61; 4671-4674.
- [11] Bujas T, Marusic Z, Peric Balja M, et al. MAGE-A3/4 and NY-ESO-1 antigens expression in metastatic esophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Histochem*, 2011, 55; e7.
- [12] Tajima K, Obata Y, Tamaki H, et al. Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer. *Lung Cancer*, 2003, 42; 23-33.
- (收稿日期: 2012-07-25)
(本文编辑: 张岚)

孙发政, 万国峰, 肖欣. NY-ESO-1 和 MAGE-A1 蛋白在肺癌中的表达及临床意义[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2012, 6(24): 8315-8317.

