

MAGE - 10 基因在肝细胞肝癌中的表达及临床意义

赵海涛 芮静安 赵屹^① 王少斌 陈曙光 王瑜^① 冷希圣^② 陈慰峰^①

北京协和医院基本外科(北京,100032)

【摘要】 目的 探讨 MAGE - 10 基因与肝细胞肝癌(HCC)患者临床指标及转移复发的关系。 方法 用 RT - PCR 的方法测定 31 例 HCC 癌组织及相应癌旁组织和 10 例肝硬化组织 MAGE - 10 基因表达,对全部 RT - PCR 扩增产物中目的基因片段进行 DNA 测序以证实其为 MAGE - 10 基因,31 例 HCC 测定 AFP、岩藻糖苷酶(AFU)、抗 HCV、HBsAg、AFPmRNA、肿瘤直径等临床指标。 结果 31 例 HCC 组织中 MAGE - 10 基因表达的阳性率为 51.6% (16/31),明显高于癌旁组织 0% (0/31) ($\chi^2 = 18.95, P < 0.01$), HCC 组织中 MAGE - 10 基因表达的阳性率与血清 AFP、AFU、抗 HCV、HBsAg、AFPmRNA 水平及肿瘤大小无关 ($P > 0.05$)。10 例肝硬化组织中未见 MAGE - 10 基因的表达。 结论 MAGE - 10 基因在 HCC 组织中特异高表达,其阳性率与 HCC 患者肿瘤标志物无关。

【关键词】 MAGE - 10 基因 肝细胞肝癌
中图分类号 R735.7 R730.3 文献标识 :A 文章编号 :1009 - 6604(2002)06 - 0419 - 03

Expression of MAGE - 10 genes in human hepatocellular carcinoma and its clinical significance Zhao Haitao , Rui Jingan , Zhao Yi , et al. Department of General Surgery , Peking Union Medical College Hospital , Beijing 100032 , China

【Abstract】 Objective To study the relationship between the expression of MAGE - 10 genes and the clinical parameters of metastasis and recurrence of patients with Hepatocellular carcinoma(HCC). **Methods** The expression of MAGE - 10 genes in tumor tissues , liver tissues adjacent to tumor and hepatocirrhosis tissues was examined by RT - PCR method. The relationship between positive expression rate of MAGE - 10 genes and clinical parameters of metastasis and recurrence(such as AFP , AFU , Anti - HCV , HBsAg , AFPmRNA , diameter of tumor) in patients with HCC were studied. **Results** The positive expression rate of MAGE - 10 genes significantly higher in tumor tissues than that in the surrounding tumor tissues (51.6% vs. 0% , $\chi^2 = 18.95, P < 0.01$). There was no relationship between the positive expression rate of MAGE - 10 gene and tumor marker ($P > 0.05$). There was no expression of MAGE - 10 in hepatocirrhosis tissues of 10 cases. **Conclusions** There was a high frequency of MAGE - 10 genes expression in HCC , but it is unrelated to the tumor markers , metastasis and recurrence of HCC.

【Key word】 MAGE - 10 gene Hepatocellular carcinoma

MAGE 是一类肿瘤相关抗原基因^[1],属 CT(cancer/testis) 抗原,它们编码的蛋白在多种恶性肿瘤中表达,而在正常组织,除睾丸和胎盘外,均不表达^[2-13]。MAGE - 10 是几种 MAGE 基因中研究最少的一种,目前只见到有关胃癌 9% 和肝癌 30% 表达率的报道^[10,13]。MAGE - 10 基因长 2.5kb , MAGE - 10 蛋白位于细胞核中,胞浆中检测不出^[14]。MAGE - 10 编码的蛋白已在多种恶性肿瘤患者的血清中检测到,并有较高浓度表达^[14-17],提示其可能成为一个有广泛用途的天然主动性免疫疫苗。本文探讨肝细胞肝癌(HCC)患者癌组织中 MAGE - 10 基因的阳性表达与肿瘤复发和转移的一些指标的关系,为 HCC 患者的预防、诊断、治疗及预后提供理论依据。

材料与方法

一、一般资料

41 例肝组织均取自前北京邮电总医院肝癌研究所,其中 HCC 31 例,肝硬化 10 例。HCC 患者中男 20 例,女 11 例。年龄 24 岁 ~ 70 岁。通过 CT 及切除标本测量肿瘤直径,观察是否存在门静脉瘤栓,有无包膜,肿瘤形态。通过病理结果判断有无肝硬化,病毒感染。血清中 AFP、AFU 含量由邮电总医院检验科测定。生存期以两年为界,转移复发以 1 年为界,详细资料见表 1。

二、材料

1. 肝组织标本 31 例 HCC 组织及癌旁组织,10 例肝硬化的肝硬化组织均取自北京邮电总医院肝癌研究所,并经病

^① 北京大学基础医学院免疫学系
^② 北京大学人民医院外科
万方数据

理证实。手术时先取患者癌旁组织(距癌病变边界 5cm 外，组织 ,分别切成直径 0.5cm 小块 ,立即保存于液氮中。术后经病理证实无癌变) ,更换刀具后再取癌组织和肝硬化

表 1 MAGE – 10 基因的表达与临床指标的关系

临床指标		MAGE – 10 表达		
		阳性例数	阴性例数	阳性率(%)
性别	男性	10	10	50.0
	女性	6	5	54.5
年龄	< 40 岁	5	3	62.5
	> 40 岁	11	12	47.8
肿瘤直径	< 5cm	3	2	60.0
	> 5cm	13	13	50.0
门静脉癌栓	有	4	2	66.7
	无	12	13	48.0
包膜	完整	8	7	53.3
	不完整	8	8	50.0
肿瘤形态	单发	9	9	50.0
	多发	7	6	53.8
HBV 感染	有	14	13	51.9
	无	2	2	50.0
HCV 感染	有	3	1	75.0
	无	13	14	48.1
肝硬化	无或轻度	9	7	56.3
	中或重度	7	8	46.7
AFP	正常(< 20μg/L)	2	1	66.7
	升高	14	14	50.0
AFU	正常(< 198nKat)	2	2	50.0
	升高	14	13	51.9
AFPmRNA	阳性	12	8	60.0
	阴性	4	7	30.8
生存期	< 2 年	11	7	61.1
	> 2 年	5	8	38.5
转移复发	< 1 年	6	4	60.0
	> 1 年	10	11	47.6

MAGE – 10 基因表达阳性率与各临床指标关系的比较 P 值均 > 0.05

2. 引物 扩增 MAGE – 10 片段(485bp)的 PCR 引物委托上海生物工程公司合成。序列如下 : P1 :5′ – GAG CAG ACA GGC CAA CCG – 3′ ,P2 5′ – AAG GAC TCT GCG TCAGGC – 3′。

3. 细胞系 :以表达 MAGE – 10 阳性的 SK – MEL – 37cDNA 此细胞系由澳大利亚 Ludwig Institute for Cancer Research , Melbourne Tumour Biology Branch 提供。

4. 主要试剂 :Tag DNA 聚合酶(上海生物工程公司) ,M – MLV 逆转录酶 ,Oligc dT ,dNTPs ,1kb plus Marker ,Trizol ,EcoR1 (均购自 Promega) , superscript™ II (Gibco BRL)。

三、方法

1. 总 RNA 提取 取 100mg 液氮中保存组织 ,于液氮中研成碎末后加入 Trizol ,经三氯甲烷分层 ,异丙醇沉淀 ,75% 乙醇洗涤干燥后 将所得 RNA 溶于无 RNA 酶的纯水中 ,分光光度计定量 ,电泳检测质量 ,无明显 18S 及 28S 者予以舍弃。

2. cDNA 的合成 取约 5μg 总 RNA ,加 1μl Oligc (dT) ,双蒸水补足 12μl ,70℃水浴 10 分钟 ,冰上冷却 4μl 逆转录缓冲液 ,1μl 10mM dNTPs ,2μl 0.1M DTT ,上述反应体系 42℃水浴 2 分钟 ,加 1μl superscript™ II 逆转录酶 ,42℃孵育 1 小时 ,70℃ 15 分钟灭活酶 ,冻存于 – 20℃。

万方数据

3. PCR 反应体系 :上述逆转录产物 2μl ,PCR 缓冲液 10μl , dNTPS , P1 及 P2 ,TagDNA 聚合酶 ,双蒸水补足 50μl。 PCR 反应条件为 95℃变性 2 分钟 ,接由 95℃变性 20 秒 ,67℃退火 40 秒及 72℃延伸 40 秒组成的 35 个循环 ,最后 72℃延伸 7 分钟。每份标本均设 G3PDH 对照。PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳分析。EB 染色鉴定 ,数码照相机照像。扩增出的 cDNA 阳性片段为 485bp。

4. 克隆连接及序列测定 对扩增出的 cDNA 阳性片段进行回收纯化 ,用 T4 DNA 连接酶将纯化的 cDNA 阳性片段连于载体 pGEM – T ,转化于 DH5a 菌株内 ,在 LA 培养基(加 IPTG 和 X – GUL)上培养 ,37℃过夜 ,取白斑于 LA 过夜培养。用 QIAGEN 试剂盒提质粒 ,经 EcoR1 酶切鉴定 ,以 T7 和 SP6 为引物进行正反向的序列测定。

5. AFP、AFU 及肝炎病毒的测定 应用 ELISA 的常规方法进行。

6. AFP mRNA 取患者外周血行 RT – PCR 方法检验。

7. 统计方法 :χ² 检验。

结 果

31 例 HCC 组织中 MAGE – 10 基因表达的阳性率为

51.6%(16/31),明显高于癌旁组织 0%(0/31)($\chi^2 = 18.95$, $P < 0.01$)。部分标本 PCR 产物电泳结果见图 1,阳性标本显示阳性 485bp 片段。测序结果与 Genbank 检索的 MAGE - 10 基因外显子序列一致。10 例肝硬化组织中未见 MAGE - 10 基因的表达。MAGE - 10 基因的表达与患者血清 AFP、AFU、HBsAg、AFPmRNA 水平、肿瘤包膜情况、转移、复发、预后等均无关($P > 0.05$),见表 1。

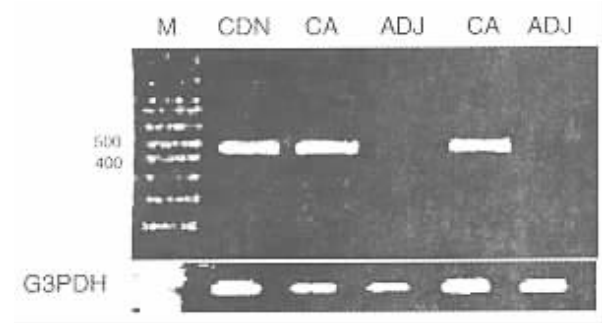


图 1 MAGE - 10RT - PCR 产物电泳图

注 :阳性带位于 400bp ~ 500bp 之间 ,为 485bp ,CON 是 SK - MEL - 37 cDNA RT - PCR 结果作为阳性对照。CA 为 HCC 组织 ,ADJ 为癌旁组织。下图是 G3PDH RT - PCR 扩增结果作为内参照 ,所有样本均为阳性。

讨 论

MAGE - 10 基因长 2.5kb ,用其蛋白重组物免疫小鼠可以得到一单克隆抗体 6C1 ,证明 MAGE - 10 是 72 - kDa 蛋白。用 6C1 单抗对表达 MAGE - 10 的细胞系进行免疫组化研究 ,发现 MAGE - 10 蛋白位于细胞核中 ,胞浆中检测不出^[14]。MAGE - 4 和 MAGE - 10 的抗原在肿瘤中表达较多 ,在自然条件下这两种 MAGE 蛋白就存在可以被 HLA - A2 呈递的抗原形式。MAGE - 10 是位于氨基酸序列 254 ~ 262 位置的一段九肽(GLYDGMEHL)^[15] ,MAGE - 4 则是一段位于 230 ~ 239 位点的十肽(GGYDGREHTV)^[16]。MAGE - 10 基因编码肿瘤相关抗原 ,可被自身特异性杀伤性 T 淋巴细胞(CTL)识别 ,产生效应 ,CTL 特异性杀伤肿瘤细胞作用 ,可用于制备抗原肽疫苗 ,用于多种恶性肿瘤的预防和治疗^[14,15]。

本研究结果显示 HCC 患者癌组织中 MAGE - 10 基因的表达率 51.6%(16/31)明显高于癌旁组织中 0%(0/31)($P < 0.01$) ,比日本报道的表达率 31.8%(7/22)高^[13]。本实验阳性结果均经测序证实 ,充分保证其可靠性 ,故此种差异可能为样本量大小导致。值得注意的是日本学者研究的患者群中 81.8%(18/22)伴丙型肝炎 ,本实验研究的患者群中 87.1%(27/31)伴乙型肝炎 ,此种差异是否与不同的病毒感染有关因例数少难下结论 ,尚有待进一步研究。研究结果提示以 MAGE - 10 基因编码抗原作为 HCC 免疫治疗的攻击靶点有较好的特异性 ,因此使临床将其编码蛋白作为免疫原 ,用于肝癌免疫治疗成为可能。

研究结果表明 MAGE - 10 基因与患者的年龄、性别无关 ,提示不同年龄、不同性别的患者肝癌组织中的 MAGE - 10 基因表达没有特异性 ,同时 MAGE - 10 基因与肿瘤标志物 AFP、AFU、AFPmRNA 等无关 ,与何种病毒感染、肝病背景亦无关 ,提示无法用现有临床指标进一步从肝癌患者中筛选万方数据

MAGE - 10 基因高表达人群。但 MAGE - 10 基因存在于癌组织中 ,目前已有报道其编码蛋白在血清中发现 ,对血清中其编码蛋白的检测有助于判断患者 MAGE - 10 基因是否阳性 ,可以更好的指导治疗。

随着我们对 MAGE 家族成员以及其它肿瘤相关抗原基因研究的深入 ,可能会发现更多有价值抗原基因 ,为 HCC 患者的诊断和治疗提供帮助。

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. Science , 1991 , 254 :1643 - 1647 .
2 Brasseur F , Rimoldi D , Lienard D , et al. Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. Int J Cancer , 1995 , 63 :375 - 380 .
3 Patard JJ , Brasseur F , Gil - Diez S , et al. Expression of MAGE genes in transitional - cell carcinomas of the urinary bladder. Int J Cancer , 1995 , 64 :60 - 64 .
4 Shichijo S , Tsunosue R , Masuoka K , et al. Expression of the MAGE gene family in human lymphocytic leukemia. Cancer Immunol Immunother 1995 , 41 :90 - 103 .
5 Lee KD , Eura M , Ogi K , et al. Expression of the MAGE - 1 , - 2 , - 3 , - 4 , and - 6 genes in non - squamous cell carcinoma lesions of the head and neck. Acta Otolaryngol , 1996 , 116 :633 - 639 .
6 Mori M , Inoue H , Mimori K , et al. Expression of MAGE genes in human colorectal carcinoma. Ann Surg 1996 , 224 :183 - 188 .
7 Nishimura S , Fujita M , Terata N , et al. Expression of MAGE genes in colorectal carcinomas. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi , 1997 , 20 :95 - 101 .
8 Sudo T , Kuramoto T , Komiya S , et al. Expression of MAGE genes in osteosarcoma. J Orthop Res , 1997 , 15 :128 - 132 .
9 Quillien V , Raoul JL , Heresbach D , et al. Expression of MAGE genes in esophageal squamous - cell carcinoma. Anticancer Res , 1997 , 17 (1A) :387 - 391 .
10 Li J , Yang Y , Fujie T , et al. Expression of the MAGE gene family in human gastric carcinoma. Anticancer Res , 1997 , 17 (5A) :3559 - 3563 .
11 Yamanaka K , Miyake H , Hara I , et al. Expression of MAGE genes in renal cell carcinoma. Int J Mol Med , 1998 , 2 :57 - 60 .
12 Hara I , Hara S , Miyake H , et al. Expression of MAGE genes in testicular germ cell tumors. Urology , 1999 , 53 :843 - 847 .
13 Suzuki K , Tsujitani S , Konishi I , et al. Expression of MAGE genes and survival in patients with hepatocellular carcinoma. Int J Oncol , 1999 , 15 :1227 - 1232 .
14 Shichijo S , Hayashi A , Takamori S , et al. Detection of MAGE - 10 protein in lung cancers. Int J Cancer , 1995 , 64 :158 - 165 .
15 Huang LQ , Brasserru F , Serrano A , et al. Cytolytic T lymphocytes recognize an antigen encoded by MAGE - A10 on a human melanoma. J Immunol , 1999 , 162 :6849 - 6854 .
16 Duffour MT , Chaux P , Lurquin C , et al. A MAGE - A4 peptid presented by HLA - A2 is recognized by cytolytic T lymphocytes. Eur J Immunol , 1999 , 29 :3329 - 3337 .
17 Takahashi K , Shichijo S , Noguchi M , et al. Identification of MAGE - 1 and MAGE - 10 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis. Cancer Res , 1995 , 55 :3478 - 3482 .

(2001 - 02 - 28 收稿)
(2001 - 09 - 20 修回)