

基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.05.002

肿瘤-睾丸基因在中国人群髓母细胞瘤中的表达

关庆凯¹, 张彩凤², 夏永华³, 王仲伟¹, 黄立勇¹, 周祥¹

(河南省新乡医学院第一附属医院 1. 神经外科; 2. 消化内科; 3. 皮肤性病科, 新乡 453100)

【摘要】目的:研究肿瘤-睾丸(Cancer-testis, CT)基因在中国人群髓母细胞瘤中表达的情况。**方法:**收集 25 例髓母细胞瘤病例, 分别采用 RT-PCR 和免疫组化检测髓母细胞瘤 CT 基因和蛋白的表达, 并结合分型进行分析。**结果:**non X-CT 抗原之间相比, 肿瘤分型之间的差异两两之间具有统计学意义($P < 0.05$)。25 例病例至少表达 1 个 CT 基因。GAGE 是最常表达的 CT 基因, 25 例病例有 17 例(68%)存在。19/20(95%)的病例中发现存在 X-CT 基因的共表达, 而只有 1/18(5.6%)的病例存在 non X-CT 基因的共表达。所有病例中单克隆抗体 CT 7-33(MAGEC1)是染色阳性反应最多的蛋白。对 CT 基因 mRNA 的表达和患者的临床参数(如年龄及临床结果)进行了统计学分析, 并显示两者之间无显著相关性。**结论:**在分子水平上, CT 抗原在 10 个 CT 基因中至少有 1 个存在。很多 CT 基因有 mRNA 水平的表达, 却很少有蛋白水平的表达。

【关键词】髓母细胞瘤; 肿瘤-睾丸抗原; 基因**【中国图书分类法分类号】**R737.21**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2011-11-17

Cancer-testis gene expression in medulloblastoma of the Chinese population

GUAN Qingkai¹, ZHANG Caifeng², XIA Yonghua³, WANG Zhongwei¹, HUANG Liyong¹, ZHOU Xiang¹(1. Department of Neurosurgery; 2. Department of Gastroenterology; 3. Department of Dermatovenereology,
the First Affiliated Hospital, Xinxiang Medical College)

【Abstract】**Objective:** To study the cancer-testis (CT) gene expression in medulloblastoma of the Chinese population. **Methods:** Totally 25 medulloblastoma cases were collected. RT-PCR and immunohistochemical methods were used to detect medulloblastoma CT gene and protein expression respectively, combined with genotyping analysis. **Results:** Tumor types were statistically different between each other in non X-CT antigens ($P < 0.05$). CT gene was expressed in at least 1 case among 25 cases. GAGE was the most commonly expressed CT gene, existing in 17 cases (68%). CT-X gene co-expression was found in 19/20 cases (95%) while non X-CT gene co-expression in 1/18 cases (5.6%). Among all cases, monoclonal antibody CT 7-33 (MAGEC1) was the most positive protein staining. The CT gene mRNA expression and clinical parameters (such as age and clinical outcome) were statistically analyzed, displaying no significant correlation. **Conclusion:** At the molecular level, CT antigen exists in at least one CT gene. Many CT genes have mRNA expression, but few have protein expression.

【Key words】medulloblastoma; cancer-testis antigen; gene

髓母细胞瘤(Medulloblastoma)由 Bailey 与 Cushing 于 1925 年首先报道, 是好发于儿童的颅内恶性肿瘤, 是中枢神经系统恶性程度最高的神经上皮性肿瘤之一^[1]。肿瘤-睾丸抗原(Cancer-testis antigen, CTA)是一类具有特异性表达模式的肿瘤相关抗原, 具有加速肿瘤形成, 抵抗肿瘤细胞凋亡, 促进肿瘤细胞增殖转移等生物学功能, 且能引起细胞、体液免疫

作者介绍:关庆凯(1981-), 男, 住院医师,**研究方向:**脑外科常见病。**通信作者:**王仲伟, 男, 副主任医师,

Email: wangzhongweiwz@163.com

基金项目:河南省教育厅自然科学研究**资助项目(编号):**2011A320017。

应答^[2]。目前已发现 96 个 CTA, 分别由 15 个基因家族和 31 种基因编码, 具体基因及编号见表 1。根据 CTA 定位是否在 X 染色体上, 可将 CTA 基因分为两大类: ① X-CTA, 定位于 X 染色体上, 包括 MAGE、GAGE、NY-ESO-1 等; ② non X-CTA, 则定位在不同的染色体上, 如 SCP-1、CT9 等^[1]。作为肿瘤标记物, 在临床应用方面, CTA 用于肿瘤的诊断、转移监测及防治^[3]。随着研究的深入, 发现有些 CTA 并不严格限制表达于正常睾丸, 在一些正常组织中也有表达。现已发现胎儿时期的卵巢能表达多种 CTA, 成人的卵巢也有少量表达^[1]。由于中国人群对髓母细胞瘤中 CTA 的存在方面了解还很少。因此, 我们通过对 10 个肿瘤-睾丸(Cancer-testis, CT)

基因在髓母细胞瘤中 mRNA (RT-PCR 法) 和蛋白质(免疫组化法)表达水平分析中国人群中 CT 基因的表达,以期用于临床,用于治疗的靶点。现将研究结果报告如下。

1 对象和方法

1.1 对象

本研究共 25 例髓母细胞瘤病例,其中 13 位儿童(平均年龄 4.5 岁)和 12 位成人(平均年龄 26.2 岁)。按组织学分类 20 例属于典型髓母细胞瘤,3 例为纤维组织增生型,2 例为大细胞型髓母细胞瘤。髓母细胞瘤肿瘤组织采样在患者手术前进行,组织切除后立即急冻并储存于液氮。

1.2 髓母细胞瘤的 CT 基因表达分析^[4]

分析了 7 个 X-CTA mRNA 水平的表达,它们分别是:NY-ESO-1 (CT6)、MAGEA1 (CT1)、MAGEA4 (CT1)、MAGEA3/A6 (CT1)、MAGEC1 (CT7)、MAGEC2 (CT10)、GAGE (CT4) 以及 3 个 non X-CT 基因 SYCP1 (CT8)、SLCO6A1 (CT48)、TPTE (CT44) 的 mRNA 表达水平。Trizol 法提取 RNA (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)。分光光度法测定 RNA 含量,变性琼脂糖凝胶电泳以 28 S rRNA 和 18 S rRNA 条带强度为标准用来评估样品的质量。使用常规逆转录方法产生用于 RT-PCR 的第 1 链 cDNA。使用表 1 中的引物进行 10 个基因的 PCR 扩增。

表 1 RT-PCR 的引物和检测的 CT 基因扩增片段大小

Tab. 1 RT-PCR primers and CT gene amplification fragment size

CT 基因	引物	扩增片段 (bp)
SYCP1	F: 5'-GAGCTGCTATCCCTTGTC-3' R: 5'-TGAAGCTTGTGCACTGTG-3'	425
SLCO6A1	F: 5'-TGGCAACTACACTGCCAGGA-3' R: 5'-CGGGTCTGGCATCAATAAAA-3'	447
NY-ESO-1	F: 5'-GCTTCAGGGCTGAATGGAT-3' R: 5'-AAAAACACGGGCAGAAAGC-3'	307
MAGEA1	F: 5'-GCTGGAACCCCTACTGGTTGCC-3' R: 5'-CGGCCGAAGGAACCTGACCCAG-3'	421
MAGEA3/6	F: 5'-GAAGCCGGCCCAGGCTCG-3' R: 5'-GGAGTCCTCATAGGATTGGCT-3'	423
MAGEA4	F: 5'-GAGCAGACAGGCCAACCG-3' R: 5'-AAGGACTCTGGCTCAGGC-3'	445
MAGEC1	F: 5'-GACGAGGATCGTCAGGTAGC-3' R: 5'-ACATCCTCACCCCTCAGGAGGG-3'	623
MAGEC2	F: 5'-GGAAATCTGACGGATCGGA-3' R: 5'-GGAATGGAACGCCCTGGAAC-3'	356
GAGE1	F1: 5'-GACCAAGACGCTACGTAG-3' R1: 5'-CCATCAGGACCACATCTTC-3' F2: 5'-GACCAAGGCCCTATGTAC-3' R2: 5'-CCATCAGGACCACATCTTC-3'	243

1.3 免疫组化法

采用石蜡切片,免疫组化试剂盒(北京经纬博恒生物科技开发有限责任公司)进行分析。显微镜下根据肿瘤细胞免疫阳性的部分对免疫组化染色的程度进行评估并分级如下:-(阴性),无染色;局部(F),<5%;+,5%~25%;++,>25%~50%;+++,>50%~75%;++++,>75%。

>25%~50%;++,>50%~75%;++++,>75%。

1.4 统计学分析

采用 SAS13.0 统计软件包进行统计分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料的比较采用 χ^2 检验直接概率法,以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 non X-CTA 与 X-CTA 之间肿瘤分型、性别、年龄之间的比较(见表 2)

从表 2 可以看出:non X-CTA 之间相比,肿瘤分型之间的差异两两之间具有统计学意义($\chi^2 = 2.43, P < 0.05$)。其他研究变量之间的差异均没有统计学意义(性别、年龄 χ^2 分别为 1.02、1.32, P 均大于 0.05)。

表 2 non X-CTA 与 X-CTA 之间肿瘤分型、性别、年龄之间的比较

Tab. 2 Comparasion of tumor type, gender, age between non X-CTA and X-CTA

资料类别	n	基因分型	
		non X-CTA	X-CTA
肿瘤分型			
典型	20	17	20
大细胞型	2	0	2
纤维组织增生型	3	2	3
性别			
男	14	13	14
女	11	11	11
年龄			
儿童	13	13	13
成人	12	11	12

2.2 RT-PCR 示例(见图 1)

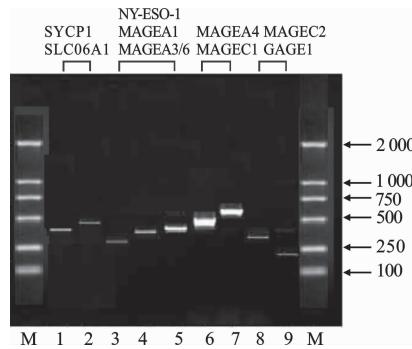


图 1 RT-PCR 示例

Fig. 1 RT-PCR sample

2.3 RT-PCR 结果总结(见表 3)

25 例病例(100%)至少表达 1 个 CT 基因。其中,GAGE 是最常表达的 CT 基因,25 例病例有 17 例(68%)存在,其次是 MAGEA3/6(14/25, 56%)、SYCP1(12/25, 48%)、SLCO6A1(8/25, 32%)、MAGEC1(7/25, 28%)、NY-ESO-1(7/25, 28%)、MAGEA4(7/25, 28%)、MAGEC2(6/25, 24%) 和 MAGEA1(4/25, 16%)。所有髓母细胞瘤样本都没有检测到 TPTE 的表达。在 19/20(95%)的病例中发现存在 X-CT 基因的共表达,而只有 1/18(5.6%)的病例存在 non X-CT 基因的

表 3 髓母细胞瘤中 CT 基因的表达
Tab. 3 CT gene expression in medulloblastoma

编 号	髓母细胞瘤 类 型	non X-CTA						X-CTA													
		SY CP1			SLC 06A1		NY- ESO-1	NY- ESO-1			MAG EA1		MAGEA3/ A6		MAG EA4		MAGEC1/ 57B CT7		MAGEC2/ CT10		GA GE
		RT- PCR	RT- PCR	RT- PCR	RT- PCR	E9	RT- PCR	MA 454	RT- PCR	M3 H67	RT- PCR	57B	RT- PCR	CT7- 33	RT- PCR	CT10- #5	RT- PCR	#23			
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
1	典型	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-			
2	典型	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-			
3	典型	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-			
4	典型	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-			
5	纤维组织增生型	-	+	-	+	-	-	-	++	F	+	-	++	-	-	-	-	-			
6	典型	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	++	-	-	-	-	-			
7	典型	-	+	-	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-	+	-			
8	典型	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	++			
9	典型	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-			
10	典型	+	-	-	-	-	+	+	++	-	-	+	-	-	-	-	++	-			
11	典型	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-			
12	典型	+++	-	-	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-	+	-	+++	-			
13	典型	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	++	+	+++	-	+	+			
14	大细胞型	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	++	-	+	-			
15	纤维组织增生型	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-			
16	典型	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
17	大细胞型	-	-	-	-	-	+	-	++	-	+	-	++	-	-	-	+	-			
18	典型	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-			
19	典型	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-			
20	典型	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
21	纤维组织增生型	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-			
22	典型	+	-	+	-	-	-	-	++	-	+	-	+	-	+	-	+	-			
23	典型	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
24	典型	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-			
25	典型	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-			

注: -, 阴性; +, 阳性

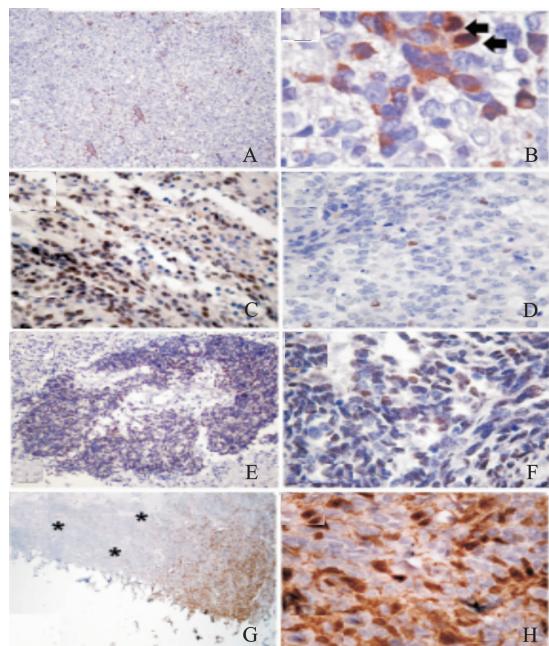
共表达。X-CT 基因共表达多发生在对 MAGE 基因家族反应阳性的病例中, 因为 12/18 (66.7%) 病例表达不止 1 个 MAGE 基因。在本研究分析的 10 个 CT 基因中, 2 例大细胞型髓母细胞瘤表达其中的 7 个, 包括 6 个 MAGE 基因。值得注意的是, 6 例大细胞型和纤维增生型髓母细胞瘤全部共表达 10 个 CT 基因中的 2~7 个。

2.4 免疫组化结果总结(见图 2)

所有病例中单克隆抗体 CT 7-33(MAGEC1) 是染色阳性

反应最多的抗体, 2/25 的病例免疫反应阳性。但是, 这 2 例表达 MAGEC1 的病理类型不同, 且髓母细胞瘤染色显示只有不超过肿瘤 25% 的部位被染色(A、B 组)。M3H67(C、D 组), 57B(E、F 组) 和克隆(G、H 组), 每个抗体只有 1 例病例免疫反应阳性, 表现出相同的限制性表达模式。所有对免疫组织化学检测阳性的病例其 RT-PCR 检测也为阳性。虽然每个肿瘤亚型的样本数量有限, 但是对 CT 基因 mRNA 的表达和患者的临床参数(如年龄及临床结果)进行了统计学分

析,显示两者之间无显著相关性($P > 0.05$)。



A、E、G 图(10 \times), B、C、D、F、H 图(40 \times)

A. 低倍镜下髓母细胞瘤显示 CT7-33 局部染色;B. 与肿瘤细胞局部集聚相似,可见许多细胞质但只有少量细胞核免疫染色(粗黑箭头);C. 大多数肿瘤细胞 M3H67 单抗的核染色区域;D. 髓母细胞瘤在不同区域偶尔存在核免疫反应;E. 低倍镜下髓母细胞瘤 57B 单抗的免疫染色,显示不同类的反应阳性区域;F. 特殊的核免疫反应;G. 髓母细胞瘤大部分免疫阴性(*)区域中单抗免疫阳性的概貌;H. 显示细胞质和细胞核染色

图 2 髓母细胞瘤的免疫组化染色

Fig. 2 Immunohistochemical stains of the medulloblastoma

3 讨 论

髓母细胞瘤预后很差,并且对它的治疗伴发严重的副反应。肿瘤免疫学领域最新进展为髓母细胞瘤患者提供新的治疗方法,例如使用疫苗靶向免疫治疗。CTA 在正常组织几乎不表达而在一些肿瘤中广泛存在,这一特点使其成为免疫治疗理想的靶点^[5]。根据 CT 基因在 X 染色体上的定位,可将典型的 CT 基因与位于其他染色体的 non X-CT 基因相区别。国外研究者发现白色人种在 13/20(65%) 的髓母细胞瘤病例中存在 X-CT 基因的共表达,而只有 1/18(5.6%) 的病例存在 non X-CT 基因的共表达。X-CT 基因共表达多发生在对 MAGE 基因家族反应阳性的病例中,因为 11/17(64.7%) 病例表达不止 1 个 MAGE 基因。

本研究收集 25 例髓母细胞瘤病例,分别采用 RT-PCR 和免疫组化法检测髓母细胞瘤 CT 基因和

蛋白的表达,并结合分型进行分析。本研究发现 CT 基因在中国人群髓母细胞瘤中表达的情况:100% 在 10 个 CT 基因中至少有 1 个存在,这是一个崭新的发现,可用基因的手段初诊髓母细胞瘤。25 例病例中有 25 例(100%) 至少表达 1 个 CT 基因。GAGE 是最常表达的 CT 基因,25 例病例有 17 例(68%) 存在。所有髓母细胞瘤样本都没有检测到 TPTE 的表达。本研究发现 19/20(95%) 的病例中发现存在 X-CT 基因的共表达,而只有 1/18(5.6%) 的病例存在 non X-CT 基因的共表达。X-CT 基因的 RT-PCR 分析中,最常见 5 个 MAGE 基因的共表达。MAGE 基因家族中,最常见 MAGEA3/6 表达,而 MAGEC1、C2 和 A4 表现出较低表达频率。本研究中 MAGEA3/6 高频率表达与它在其他恶性肿瘤中的表达水平相符,如黑色素瘤和非小细胞肺癌^[6]。鉴于上述论证,CT 基因及其共表达、TPTE 表达的检测对中国人群髓母细胞瘤具有良好的诊断价值。

此外,6 个 MAGEC2 检测阳性病例都没有检测到剪接变体 MAGEC2M,它的产生归因于第 2 外显子和第 3 外显子之间出现 1 个额外的外显子,且它存在于正常组织。MAGEA1 和 NY-ESO-1 在我们研究的髓母细胞瘤中低表达。GAGE 是表达频率最高的单个 CT 基因。最近 1 个对儿科各种肿瘤(不包括髓母细胞瘤)进行的研究报道,除了骨肉瘤外, GAGE1 基因在其他肿瘤中都是低表达^[6,7]。

本研究通过 RT-PCR 分析发现 44% 的髓母细胞瘤病例存在 SYCP1,其参与减数分裂染色体配对。在许多其它类型的肿瘤,包括乳腺癌(65%)、淋巴瘤、结肠癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、脑膜瘤、少突胶质细胞瘤、星形细胞瘤 II 级和 IV 级中一直报导有 SYCP1 表达,其中星形细胞瘤中表达最高^[8]。SLCO6A1 编码 1 种有机阴离子跨膜运输蛋白,并认为负责运送硫酸脱氢表雄酮和甲状腺,在肺癌、膀胱癌和食道癌以及正常睾丸中表达。其在膜上的定位和在正常组织中有限的表达表明 SLCO6A1 可能是多种肿瘤(包括髓母细胞瘤)抗体靶向免疫治疗的靶点。

研究中常见多个 CT 基因共表达,其中主要为 X-CT 基因,少量 non X-CT 基因(5.6%)。据报道,CT 基因的表达与各种肿瘤病理阶段的进展和预后差相关,其中包括高等级星形细胞瘤,即间变性星形细胞瘤和胶质母细胞瘤^[9,10]。然而,没有发现 CTA 表达与组织学亚型(如纤维组织增生型或大细胞型髓母细胞瘤)或与患者的年龄之间有相关性。CTA