DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.15.030
第25卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 15
2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

文章编号:1000-5404(2003)15-1385-04

论著

非小细胞肺癌内 TRAG-3 抗原的表达及其临床意义

朱 波[1],陈正堂[1],程晓明[2],张国桥[1],吴玉章[3] (第三军医大学:[1]附属新桥医院全军肿瘤治疗中心;[2]附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037;[3]基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 检测非小细胞肺癌内肿瘤抗原TRAG-3的表达情况,分析TRAG-3表达与术前新辅助化疗及肿瘤分期的关系。方法 用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和免疫组化的方法检测了共48例非小细胞肺癌患者的手术切除标本中TRAG-3抗原的表达。结果 正常肺组织和癌旁组织中未见TRAG-3表达;48例肺癌标本中,共有26例(54%)非小细胞肺癌表达TRAG-3抗原,其中22例肺腺癌中有16例(73%)表达,而20例肺鳞癌中有8例(17%)表达,两者差异显著;术前化疗对TRAG-3的表达无显著影响;TRAG-3抗原的表达率与肿瘤的分期无关。结论 非小细胞肺癌内有较高比例的TRAG-3抗原表达;TRAG-3抗原在非小细胞肺癌内的表达与术前化疗及肿瘤分期无关。

关键词:非小细胞肺癌;TRAG-3;肿瘤/睾丸抗原;免疫治疗
中图法分类号:R392.2;R446.6;R734.202 文献标识码:A

Expression of TRAG-3 antigen in non-small cell lung carcinoma and its clinical significance

ZHU Bo, CHEN Zheng-tang, CHENG Xiao-ming, ZHANG Guo-qiao, WU Yu-zhang (Cancer Center of PLA, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To detect TRAG-3 expression in non-small cell lung carcinoma and analyze the relationship between its expression and neoadjuvant chemotherapy and tumor grading. Methods TRAG-3 expressions in 48 surgical samples of non-small cell lung carcinoma were detected by reverse-transcription polymerase reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry. Results RT-PCR and immunohistochemistry revealed that there was no TRAG-3 antigen expression in normal lung tissues and adjacent tissues, but 26 (54%) samples expressing TRAG-3 antigen in 48 samples of non-small cell lung carcinoma, only 8 (17%) expressing TRAG-3 antigen out of 20 samples of squamous carcinoma and 16 (73%) expressing TRAG-3 antigen in 22 samples of adenocarcinoma. Preoperative chemotherapy had no effect on TRAG-3 expression. There was no statistical significance between the expression of TRAG-3 and tumor grading. Conclusion There is a high proportion of TRAG-3 expression in non-small cell lung carcinomas, especially in lung adenocarcinomas. Expression of TRAG-3 in non-small cell lung carcinomas is not associated with preoperative chemotherapy and tumor grading.

Key words: non-small cell lung carcinoma; TRAG-3; cancer/testis antigen, immunotherapy

自1989年首次发现肿瘤特异性抗原(Tumor specific antigen, TSA)以来,已有几十种TSA和肿瘤相关抗原(Tumor associated antigen, TAA)被发现、鉴定,并成为肿瘤免疫学发展的基础。肿瘤/睾丸抗原(Cancer/testis antigen, CT antigen)是组成TSA和TAA的最主要部分,正常情况下,CT抗原仅在睾丸组织中有少量表达,但在多种不同组织来源的恶性肿瘤组织中,该抗原却被激活而有不同程度的表达[1]。迄今为止,已发现有多种CT抗原在非小细胞肺癌中有不同程度的表达,如MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-12和NY-ESO-1等[2~5],表达率在15%~80%。泰素耐药相关基因(Taxol resistant associated antigen, TRAG-3)编码的TRAG-3肿瘤抗原是由Duan等[6]在寻找泰素耐药基因时发现的一个新的CT抗原,该抗原在多种恶性转化的肿瘤细胞株内呈现高表达,如非小细胞肺癌EKVX和NCI-H322M细胞株等[7],而对其在肺癌组织内的表达情况,尚待进一步研究。本研究用逆转录聚合酶链式反应(Reverse-transcription polymerase reaction, RT-PCR)和免疫组化的方法检测了48例非小细胞肺癌患者手术标本内TRAG-3的表达,分析了其表达与肺癌术前化疗及肿瘤分期的关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源

肺癌标本取自我院胸外科2000—2002年手术切除肺癌标本,经我院病理科证实为非小细胞肺癌,10例正常肺组织和癌

作者简介:朱 波(1974—),男,江苏省常熟市人,博士,医师,主要从事肿瘤免疫及肿瘤疫苗方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68774701

收稿日期:2002-07-10;修回日期:2002-12-13

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

旁组织取自部分肺癌患者。病例资料完整病例共48例，其中男性30例，女性18例；年龄35～72(56±0.45)岁；根据WHO肺癌病理分型，肺腺癌22例，肺鳞癌20例，肺大细胞癌6例；其中26例肺癌患者术前曾接受1～2周期的化疗，另外22例术前未接受任何治疗；所有病例按国际临床病理分期法分期，Ⅰ～Ⅱ期36例，Ⅲ～Ⅳ期12例。用于RT-PCR的标本取材后于1～3 h内放进液氮保存，用于免疫组化的标本经福尔马林固定，石蜡包埋，常规切片。

1.2 主要试剂

细胞总RNA提取试剂采用Boehringer Mannherim(BM)公司提供的Tripure Isolation Regent；AMV购于Promerga公司；PCR引物由上海生物工程有限公司(Sagon)合成；*Taq*酶、Oligo(dT)$_{18}$等试剂均购自Sagon；TRAG-3多克隆抗体是用纯TRAG-3蛋白免疫兔而制备的兔血清，由美国哈佛医学院马萨诸塞州综合医院血液/肿瘤科Seiden教授惠赠；免疫组化试剂盒(SP-kit)购于北京中山生物有限公司。

1.3 肺癌组织和正常肺组织总RNA提取

根据BM公司提供的方法进行，Tripure裂解组织后用氯仿抽提，异丙醇沉淀RNA，75%乙醇洗涤。提取的RNA溶于经焦磷酸二乙酯(Diethylpyrocarbonate，DEPC)处理的水中，－20 ℃保存待用。提取的RNA其A_{260}/A_{280}在1.8～2.0，说明总RNA纯度较高。同时，经1.2%甲醛变性凝胶电泳分析显示18 S和28 S两条带完整，其间可见雾状的mRNA，表明RNA无明显降解。

1.4 逆转录反应(Reverse transcription reaction，RT)

反应体系中加入总RNA 4 μg，Oligo(dT)$_{18}$ 0.5 μg，10 mmol/L dNTP 2 μl，RNase抑制剂20 U，逆转录酶1 μl，42 ℃反应1 h，逆转录完毕后95 ℃变性10 min，冰上冷却后于－70 ℃冰箱保存备用。以上所有步骤中使用的器材均经过DEPC处理，操作过程中注意防止DNA污染。

1.5 聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction，PCR)

PCR引物的设计采用免疫研究所DNAstar软件进行，引物序列如下：β-actin：sense 5′-GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AG-3′，antisense 5′-TTG TAA CCA CCT GGG ACG ATA TGG-3′；TRAG-3：sense 5′-GCT GGC CTG CCT TCA CTG TC-3′，antisense 5′-CAC CCT GTT GGC TAT TTA TCT GG-3′。β-actin和TRAG-3目的片段长度分别为311 bp和457 bp。PCR反应体系内含cDNA 2.0 μl，10× Buffer 5.0 μl，dNTP mixture 2.0 μl，25 mmol/L $MgCl_2$ 3.0 μl，sense primer 1.5 μl，antisense primer 1.5 μl，去离子无菌水35 μl，*Taq*酶1 μl，94 ℃变性10 min后开始循环：94 ℃变性60 s→58 ℃退火60 s→72 ℃延伸60 s，共30个循环，最后72 ℃延伸10 min后经1.5%琼脂糖凝胶电泳，摄影。每项实验重复3次以上。

1.6 免疫组织化学S-P染色

参照文献[8]，简述如下：病理切片先经高温、高压抗原修复，然后3%过氧化氢室温下10 min，0.1 mol/L PBS漂洗3次，5%山羊血清37 ℃置30 min，吸弃血清，加1∶100稀释的兔抗人TRAG-3多克隆抗体，37 ℃放置3 h，0.1 mol/L PBS漂洗3次，加1∶200稀释的生物素标记的二抗(Ig/Bio)，37 ℃置2 h，0.1 mol/L PBS漂洗3次，加1∶200稀释HRP/SP复合物，37 ℃置2 h，0.1 mol/L PBS漂洗3次，DAB法显色5 min，脱水、透明、DPX封片，照相。免疫组化对照：用血清稀释液代替一抗，其余步骤同前。

1.7 结果判断

RT-PCR结果判断：所有标本提取的RNA，逆转录成cDNA后经β-actin PCR证实逆转录成功，PCR扩增TRAG-3目的片段长度为457 bp，如有与目的片段相符条带则为阳性，相反为阴性。免疫组化结果的判断：光镜下观察肿瘤细胞胞浆出现棕黄色颗粒为阳性，高倍镜下取4个不同视野，各计数200个细胞，按阳性细胞所占的百分率分为(＋)(＋＋)(＋＋＋)，(－)阴性，无阳性细胞；≤30%为(＋)、30%～50%为(＋＋)和≥50%为(＋＋＋)。

1.8 统计学处理

采用SPSS10.0软件进行，采用χ^2检验。

2 结果

2.1 非小细胞肺癌、正常肺组织及癌旁组织内TRAG-3的表达

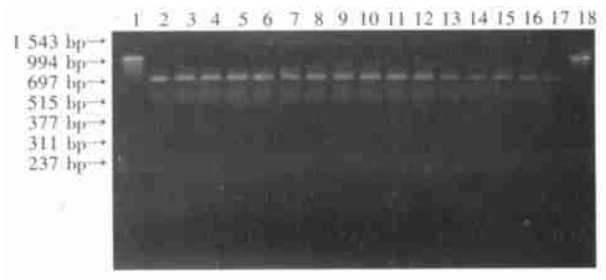
48例肺癌组织标本经RT-PCR证实，均能扩增出β-actin特异性目的片段311 bp，见图1，说明所有肺癌标本总RNA提取，逆转录反应成功。RT-PCR结果显示，26例肺癌组织内能扩增出特异性TRAG-3条带，片段长度符合预先引物设计时的预计长度457 bp，见图2。免疫组化显示，阳性反应主要定位于肺癌细胞的胞浆内，未见正常细胞阳性反应，见图3、4。结果显示，10例正常肺组织和6例癌旁组织TRAG-3表达均为阴性；48例肺癌患者中，TRAG-3表达阳性率为54%(26/48)，其中肺腺癌16例(73%)、肺鳞癌8例(17%)及大细胞肺癌2例(33%)，肺腺癌中的表达率与肺鳞癌相比有显著差异($P<0.05$)，见表1。

表1 非小细胞肺癌、正常肺癌组织及癌旁组织内**TRAG-3**的表达

Tab 1 Expressions of TRAG-3 in non-small cell lung carcinoma, normal lung tissues and tumor-adjacent tissues

Diagnosis/histological type	*n*	Positive samples (%)
Non-small cell lung carcinoma	48	26(54)
Adenocarcinoma	22	16(73)*
Large cell carcinoma	6	2(33)
Squamous carcinoma	20	8(17)
Normal lung tissues	10	0(0)
Adjacent tissues	6	0(0)

*: $P<0.05$ *vs* lung squamous carcinoma



1, 18: PCR markers; 2～17: Samples from non-small cell lung carcinomas

图1 16例非小细胞肺癌组织β-**actin**的**RT-PCR**结果

Fig 1 Results of RT-PCR for β-actin in 16 samples of 48 non-small cell lung carcinomas

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



1, 18: PCR markers; 2 ~ 17: Samples from non-small cell lung carcinomas

图 2　20 例非小细胞肺癌组织 TRAG-3 的 RT-PCR 结果

Fig 2　Results of RT-PCR for TRAG-3 in 20 samples of 48 non-small cell lung carcinomas

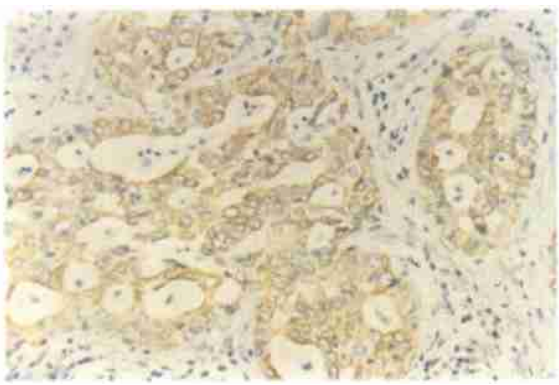


图 3　肺腺癌内 TRAG-3 抗原的表达　(S-P× 100)

Fig 3　Expression of TRAG-3 antigen in lung adenocarcinoma (S-P× 100)

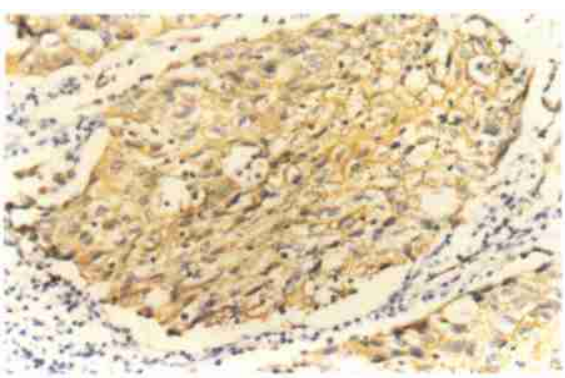


图 4　肺鳞癌内 TRAG-3 抗原的表达　(S-P× 100)

Fig 4　Expression of TRAG-3 antigen in lung squamous carcinoma　(S-P× 100)

2.2　非小细胞肺癌内 TRAG-3 表达的临床意义分析

在 26 例术前接受化疗的患者中有 14 例 TRAG-3 表达阳性, 阳性率为 53.8%; 在 22 例术前未曾接受化疗的患者中有 12 例 TRAG-3 表达阳性, 阳性率为 55%, 两者无显著差异($P>0.05$), 见表 2。在 36 例Ⅰ~Ⅱ期的肺癌患者中有 18 例 TRAG-3 表达阳性, 阳性率为 50%; 在 12 例Ⅲ~Ⅳ期的肺癌患者中有 8 例 TRAG-3 表达阳性, 阳性率为 75%, 但二者无显著差异($P>0.05$), 见表 3。

表 2　TRAG-3 表达与肺癌患者术前化疗之间的关系

Tab 2　Relationship between expression of TRAG-3 and preoperative chemotherapy

Preoperative treatment	*n*	Positive samples (%)
With preoperative chemotherapy	26	14(53.8) *
Without preoperative chemotherapy	22	12(55.0)

*: $P>0.05$ *vs* group without pretreatment of chemotherapy

表 3　TRAG-3 与肿瘤分期的关系

Tab 3　Relationship between TRAG-3 expression and tumor grading

Tumor grade	*n*	Positive samples (%)
Ⅰ ~ Ⅱ	36	18(50)
Ⅲ~ Ⅳ	12	8(75) *

*: $P>0.05$ *vs* group in the stages of Ⅰ ~ Ⅱ

3　讨论

当今肿瘤免疫治疗的靶点主要包括[9~11]: ①肿瘤/睾丸抗原(Cancer/testis antigen, CT); ②黑色素瘤细胞分化抗原; ③正常基因的点突变产物; ④在恶性肿瘤中过表达的抗原; ⑤病毒抗原。其中, CT 抗原家族为近年来肿瘤疫苗研究的热点靶分子, 是在肿瘤免疫领域研究中引起人们极感兴趣的课题。目前已知的 CT 抗原家族包括 MAGE、BAGE、GAGE、NY-ESO-1、SSX、SCP-1、CT7、TRAG-3 和 CT10 等 10 余种, 已有大量报道其在不同肿瘤中有不同程度表达, 但除睾丸、胎盘外, 在正常组织和良性肿瘤中不表达, 并发现在不同分化状态和恶性程度的肿瘤中所表达出其家族成员表达差异, 而且其表达的编码蛋白可激活特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)介导的抗肿瘤免疫应答。因此, 寻找 CT 抗原阳性的肿瘤患者并针对该类抗原的特异性免疫治疗, 已成为肿瘤免疫治疗的热点之一。

以往的研究显示, 非小细胞肺癌内表达多种 CT 抗原[2~4], 如 MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-12、NY-ESO-1 等。TRAG-3 是 Duan 等[6] 在寻找 Taxol 耐药基因时用差异显示的方法在卵巢癌细胞株中发现的一个新基因。随后的研究显示[7], TRAG-3 在多种组织来源的肿瘤细胞株中有表达, 而在正常组织内(胰腺、肾脏、骨骼肌、肝脏、肺脏、胎盘、心脏和脑)未见 TRAG-3 表达。而对 TRAG-3 抗原在肿瘤组织中的表达目前研究仅局限在黑色素瘤。

本研究检测了 48 例非小细胞肺癌患者手术切除标本、10 例正常癌组织及 6 例癌旁组织内 TRAG-3 的表达, 在 48 例非小细胞肺癌标本中, TRAG-3 抗原表达

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的阳性率为54%，其中肺腺癌的阳性率(73%)高于肺鳞癌(17%)，这一结果与 Wu 等[4] 近期检测的 MAGE-12 在非小细胞肺癌内表达情况相反，他们发现，在肺鳞癌中 MAGE-12 的表达阳性率明显高于肺腺癌，这说明 CT 抗原家族各成员在表达模式上存在一定的差异。由于 TRAG-3 最初是在一泰素耐药的卵巢癌细胞株中发现的，因此我们推测：TRAG-3 的表达可能与化疗药物诱导有关，所以我们分析了这 48 例肺癌患者的病例资料。结果表明，肺癌患者的术前化疗对 TRAG-3 的表达并无影响。而且其表达与肿瘤的分期也无明显的相关性。

本研究结果表明，非小细胞肺癌内 TRAG-3 抗原表达率较高，肺腺癌的表达率明显高于肺鳞癌。肿瘤患者术前化疗对 TRAG-3 的表达无影响，而肺癌患者的肿瘤分期与 TRAG-3 的表达也无明显的联系。本研究还提示，发展基于 TRAG-3 抗原的免疫治疗可望用于半数以上的非小细胞肺癌患者，尤其是肺腺癌患者。

参考文献：

[1] Sigalotti L, Coral S, Altomonate M, *et al*. Cancer testis antigen expression in mesothelioma: role of DNA methylation and bioimmunotherapeutic implication[J]. Br J Cancer, 2002, 86(6): 979—982.

[2] Gotoh K, Yatabe Y, Sugiura T, *et al*. Frequency of MAGE-3 gene expression in HLA-A2 positive patients with non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 1998, 20(2): 117—125.

[3] Weynants P, Lethe B, Brasseur F, *et al*. Expression of mage genes by non-small-cell lung carcinomas[J]. Int J Cancer, 1994, 56(6): 826—829.

[4] Wu Yuzhang, Li Yanqiu, Lin Yidan. Expression of MAGE-12 in lung cancer[J]. Lung Cancer, 2002, 35(1): 95.

[5] Jungbluth A A, Chen Y T, Stockert E, *et al*. Immunohistochemical analysis of NY-ESO-1 antigen expression in normal and malignant human tissues [J]. Int J Cancer, 2001, 92(6): 856—860.

[6] Duan Z, Feller A J, Toh H C, *et al*. TRAG-3, a novel gene, isolated from a taxol-resistant ovarian carcinoma cell line[J]. Gene, 1999, 229(1—2): 75—81.

[7] Feller A J, Duan Z, Penson R, *et al*. TRAG-3, a novel cancer/testis antigen, is overexpressed in the majority of melanoma cell lines and malignant melanoma[J]. Anticancer Res, 2000, 20(6B): 4147—4151.

[8] 蔡文琴，王伯沄. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994. 406—408.

[9] Rosenberg S A. Progress in human tumor immunology and immunotherapy [J]. Nature, 2001, 411(6835): 380—384.

[10] Jager Elke, Jager Dirk, Knuth Alexander. Clinical cancer vaccine trials [J]. Curr Opin Immunol, 2002, 14(2): 178—182.

[11] Houghton A N, Gold J S, Blachere N E. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma[J]. Curr Opin Immunol, 2001, 13(2): 134—140.

（编辑 郭建秀）

（上接 1384 页）

有效地延缓心脑血管或微血管等并发症的发生发展[3]。长达 6 年的高血压的最佳治疗的临床研究表明：通过积极的降压治疗，能使糖尿病合并高血压的病人心血管事件的减少胜于不合并糖尿病的病人，心血管事件明显下降 51%。1 周召开一次病友联谊会，邀请病情好转后的患者为嘉宾，以部分具体的数据及事例，晓之以理，让病人明白自己的疾病并非为不治之症，关键在于要重视疾病。让患者平衡饮食，邀请营养师切合病人的身高、体重、经济条件、饮食习惯以及食品来源情况等方面进行食谱设计，严格限制钠盐的摄入，每日 4～6 g 左右。指导患者在病情允许的情况下进行适当的运动，根据病人的血糖、血压情况，与医生一起拟定不同患者的运动计划，年龄在 55 岁以下，病情稳定的患者鼓励其跑步、跳交谊舞、游泳等，年龄稍大的患者主要以散步为主。

2.3 住院治疗后期，症状好转后，要求严格控制目标

空腹血糖应控制在 5.1～6.1 mmol/L；餐后 2 h 的血糖控制在 7.0～7.8 mmol/L；糖化血红蛋白应控制在 6%～7%；血压应降到＜130/85 mmHg；已有肾病表现的病人当尿蛋白为 0.25～1 g/d，理想血压为＜130/80 mmHg；尿蛋白＞1 g/d，理想血压为＜125/75 mmHg。当病情好转，各项指标接近正常的同时，向病人提出这些目标，鼓励患者以前的成绩，勉励他们积极争取病情的进一步好转。让患者出院后坚持血糖的监测，每周最好分别抽查三餐前后及睡前各 1 次，如果条件差，至少每周 1 次，血压要随时监测，每季度查糖化血红蛋白 1 次，每半年监测尿白蛋白 1 次。

2.4 出院指导，以糖尿病的基础护理为主

叮嘱患者长期坚持合理饮食，合理进餐；鼓励患者运动持之以恒；让病人了解出院后服用的降糖药物的剂量与用法，注意药物的副作用和使用的注意事项；教会病人胰岛素的抽吸与注射；教会病人血糖的监测以及监测日记的记录；为患者准备糖尿病病历卡，卡中注明患者姓名、联系电话、就诊医院、就诊医院的联系电话等；最终要让患者明白长期治疗的意义。

3 体会

目前，大部分患者自我保健意识不强，对疾病知识的了解不多及了解欲望不强。有的患者没有严重并发症的时候，没有特殊不适，一般不会引起的重视，所以，在整个住院期间的健康教育中，时刻提醒患者糖尿病合并高血压的危害，要以具体数据、事例为证，不要盲目的灌输自我护理技巧。作为健康教育的工作者，应努力提高自身素质，不断完善健康教育的方法，才能使健康教育工作持之以恒地深入开展。

关键词：糖尿病；高血压；健康教育

中图法分类号：R493 文献标识码：B

参考文献：

[1] 蒋国彦. 实用糖尿病学[M]. 北京：人民卫生出版社，1992. 264—268.

[2] Bild D. The control of hypertension in persons with diabetes: A public health approach[J]. Public Health Rep, 1987, 102(72): 522—529.

[3] Berger M, Muhlhauser I. Diabetes care and patient-oriented outcomes[J]. JAMA, 1999, 281(18): 1676—1678.

（编辑 张 宁）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net