DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.008
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
1146 2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)10-1146-03

MAGE-12 mRNA在肺癌中的表达及其意义

李艳秋,吴玉章,倪 兵,贾正才 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨肺癌组织中MAGE-12 mRNA的表达及其意义。方法 采用RT-PCR技术,检测了MAGE-12在50例临床病人肺癌标本中mRNA水平的表达。结果 50例临床肺癌标本中有17例表达(17/50,34%),且肺鳞癌(15/33,45.5%)与肺腺癌(2/17,11.8%)有显著差异($P<0.05$)。结论 MAGE-12基因在肺癌有较高的表达率,基于MAGE-12基因及其产物作为新的疫苗可能是一个有前途的治疗肺癌的免疫治疗方法。

关键词:肿瘤抗原;MAGE-12;肺癌;RT-PCR
中图法分类号:R392.11;R394.2;R734.202 文献标识码:A

Expression of tumor antigen MAGE-12 mRNA in lung cancer and its significance

LI Yan-qiu, WU Yu-zhang, NI Bing, JIA Zheng-cai (Insititute of Immunology of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of MAGE-12 mRNA in lung cancer and its relationship with pathological types. Methods The expression of MAGE-12 gene was detected in samples of 50 cases of clinical lung cancer with RT-PCR. The results were analyzed with their pathological types. Results MAGE-12 expression was found in 17 samples (34%), and the positive rate was significantly different in squamous cell carcinomas (45.5%, 15/33) and in adenocarcinoma (11.8%, 2/17). Conclusion MAGE-12 mRNA is expressed in lung cancer in a high level, implying tumor vaccines based on MAGE-12 or its product may be contributive in the treatment of lung cancer.

Key words: tumor antigen; lung cancer; MAGE-12; RT-PCR

在过去十几年里,肿瘤抗原的研究取得了很大的进步,这为肿瘤特异性免疫治疗奠定了良好的基础。MAGE-12是1994年首先在人黑色素瘤细胞系DM150[1]中被发现,此后在人黑色素瘤细胞系LB373[2,3]等中被发现的肿瘤特异性抗原。它表达于各种组织型的肿瘤中,而在正常组织细胞(除睾丸和胎盘外)却不表达,提示是较为理想的靶抗原。目前,除有报道MAGE-12在胃癌有表达[4]外,在其它肿瘤中是否表达还未见报道。MAGE-12与MAGE-2、MAGE-3有高度同源性[4],且MAGE-2和MAGE-3在肺癌中有较高比例的表达,而肺癌在人类为常见多发病,因此本研究以MAGE-12为例,采用RT-PCR技术,检测了MAGE-12在50例临床肺癌标本中mRNA水平的表达,为基于MAGE-12的临床主动免疫治疗手段研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞系

LB373-MEL人黑色素瘤细胞系,比利时Ludwig癌症研究所馈赠,表达肿瘤抗原MAGE-12。

1.2 标本

标本来自第三军医大学附属大坪医院2000年1月至2001年4月50例肺癌病人手术切除的标本。每例标本,经液氮-70 ℃保存。

1.3 试剂

氯仿、异丙醇、75%乙醇、Tripure试剂(BOEHRINGER MANNHEIM公司),Taq酶及缓冲液、逆转录酶及缓冲液、RNA酶抑制剂、氯化镁、dNTP、DEPC(均购于华美生物制剂有限公司)、IMDM培养基(HyClone)、胎牛血清(HyClone)、胰酶(HyClone)、L-精氨酸(上海康达氨基酸厂)、L-天冬酰胺(上海试剂三厂)、L-谷氨酰胺(政翔化学试剂研究所)、雌二醇(MERCK)、氢化可的松(上海化学试剂采购供应站分装厂)、转铁蛋白(Sigma)、中性胰岛素溶液(徐州万邦生物化学制药厂)。

1.4 细胞培养

人黑色素瘤细胞系LB373-MEL,体外常规培养。LB373-MEL的培养基选用IMDM,并加以10%胎牛血清、116 μg/ml精氨酸、36 μg/ml天冬酰胺、219 μg/ml谷氨酸、200 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素、100 μg/ml转铁蛋白,5 μg/ml胰岛素、30 nmol/L亚硒酸钠、10 nmol/L雌二醇、10 nmol/L氢化可的松。

1.5 总的RNA的分离

1.5.1 细胞RNA的抽提 对于表达肿瘤抗原MAGE-12的LB373-MEL单层贴壁生长细胞株总的RNA分离,按购自Roche的Tripure试剂盒说明书进行。

1.5.2 RNA的定量和纯度测定 RNA样本的纯度根据在260 nm和280 nm吸光度比值(A_{260}/A_{280})来测算,鉴定的结果显示A_{260}/A_{280}的比值在1.6~2.0。RNA的浓度根据下式计算:RNA的浓度(μg/ml)=A_{260}×40×稀释倍数

1.6 cDNA合成

总的RNA用0.1%DEPC水稀释成终浓度1.5 μg/μl,加特异性引物1 μl,70 ℃变性10 min,置冰浴5 min;在同一PCR管里依次加入:特异性引物1 μl(7.5 ng/μl),AMV 1 μl(10 000 U/ml),5×buffer 5 μl,DNTP 1.5 μl(10 mmol/L),Rnaseire 0.5 μl(40 U/μl),dH_2O(DEPC)14 μl混匀稍加离;42 ℃,60 min逆转录合成第一链

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(2001CB510001)
作者简介:李艳秋(1972-),女,辽宁省兴城市人,硕士,主管技师,主要从事肿瘤疫苗方面的研究,现在沈阳军区总医院检验科,沈阳 110015。电话:(024)23051301
通信作者:吴玉章,电话:(023)68752680
收稿日期:2002-02-05;修回日期:2002-07-10

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

cDNA; －20℃贮存 cDNA。

1.7　PCR 扩增以检测 MAGE-12 的表达

肿瘤抗原 MAGE-12 的引物(由计算机软件包 DNAstar 辅助设计)

上游: 5′-GAG CCA GGG AGC CAT TCA CAA AG 3′

下游: 5′-GGA TCA CTG CCG GGG ACC TG　　3′

人源的β-actin 的引物(由计算机软件包 DNAstar 辅助设计)

上游: 5′-TGC GCA GAA AAC AAG ATG AGA TT　　3′

下游: 5′-TGG GGG ACA AAA AGG GGG AAG G　　3′

肿瘤抗原 MAGE-12 的引物位于外显子 3333-3355、3756-3737, 扩增产物为 424 bp, 退火温度为 60.2℃。人源的β-actin 的引物位于 1251～1273、1688～1667, 扩增产物为 438 bp, 退火温度为 54.3 ℃。

以上引物由上海生工生物工程公司合成。

PCR 反应体系: 常规体系。

本方法采用热启动技术, 在 PCR 仪(9600 Gene Amp PCR System, PE, USA)上完成。具体方案按下面设定进行: 94 ℃, 10 min→加 Taq 酶 1 μl→94 ℃, 50 s→58 ℃, 30 s→72 ℃, 50 s, 35 个循环→72 ℃, 10 min→4 ℃保存。

1.8　PCR 产物鉴定

10 μl 样本＋2 μl 载样缓冲液点样, 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳(加 EB 至终浓度为 0.5 μg/ml), 电泳缓冲液采用 0.5× TBE, 100 V, 在水平电泳仪(Hoefer HE33, Pharmacia Biotech.)上电泳 90 min 后, 放入凝胶分析系统(ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech)中观察, 并与分子量标准进行对照, 以鉴定扩增产物的确切性, 采用紫外光对凝胶进行摄影。

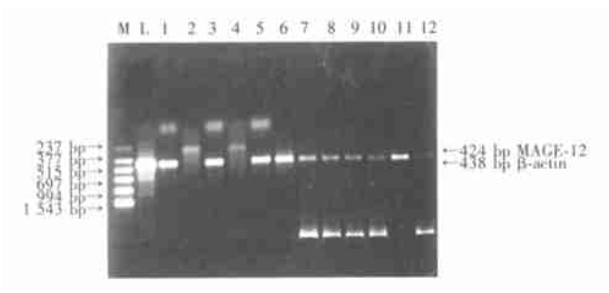
1.9　统计学处理

采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　MAGE-12 基因在肺癌中的表达

LB373－MEL 人黑色素瘤细胞系为阳性对照, 表达 MAGE-12 mRNA。在 50 例肺癌组织中表达率为 34%(17/50), 肺鳞癌中表达率 45.5%(15/33), 肺腺癌中表达率 11.8%(2/17)。在 50 例正常肺组织中均不表达 MAGE-12 mRNA, 见图 1。



M: PCR marker; L: Positive control; 1, 3, 5: MAGE-12 in lung squamous cell carcinomas with high differentiation; 2: No expression in high-differentiated squamous cell carcinomas; 4: No expression in low-differentiated adenocarcinoma; 6: MAGE-12 in low-differentiated lung adenocarcinoma; 7, 8, 9, 10, 11, 12: β-actin control of lines 1, 2, 3, 4, 5, and 6 respectively

图 1　6 例标本中的 MAGE-12(424 bp 片段)的逆转录 PCR

Fig 1　RT-PCR electrophoresis of MAGE－12 (424 bp fragment) in 6 lung cancer cases

2.2　MAGE-12 表达与病理分型分化关系的分析

MAGE-12 在 50 例肺癌组织中表达率为 34%(17/50), 其中肺鳞癌中表达率 45.5%(15/33), 肺腺癌中表达率 11.8%(2/17), 二者间表达的差异有显著性意义($P<0.05$)。而在高分化, 中分化, 低分化肺鳞癌表达率分别为 50%, 50%, 36.4%; 在高分化, 中分化, 低分化肺腺癌中表达率分别为 20%, 0, 16.7%。分化高低间表达的差异无显著性意义($P>0.05$), 见表 1。

表 1　MAGE-12 在肺癌组织中基因表达与病理分型之间关系

Tab 1　Correlation between MAGE-12 gene expression and pathological typing and grading in lung cancer

Pathological type and grade	*n*	Number of positive	Rate of expression(%)
Squamous cell carcinoma	33	15	45.5
Well differentiate	10	5	50.0
Moderate differentiate	12	6	50.0
Low differentiate	11	4	36.4
Adenocarcinoma	17	2	11.8
Well differentiate	5	1	20.0
Moderate differentiate	6	0	0
Low differentiate	6	1	16.7

3　讨论

尽管在很早以前就提出了用疫苗来治疗肿瘤这一想法, 但长期以来一直因无法找到肿瘤特异抗原或标记物而进展缓慢。直到 20 世纪 80 年代, 才摒弃了以往从体液免疫探索抗原的旧思路, 而从特异性细胞毒性 T 细胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)入手, 比利时 Boon 等[5] 首次成功地分离出了人黑色素瘤 MAGE 抗原, 并建立了克隆肿瘤抗原的技术路线, 现以分离并确认了至少 15 种 MAGE 家族成员。此家族不仅表达于黑色素瘤上, 还不同程度地表达于各种类型的其它肿瘤上。MAGE 的表达和肿瘤的发生发展及预后关系十分密切[4]。本研究首次报道了 MAGE-12 mRNA 在肺癌中的表达, 为 MAGE 家族成员在肿瘤中的表达提供有价值的线索。为组织表达分析提供依据, 组织表达分析可以提供目标基因的组织表达谱, 从而有利于基因功能的推测和进一步研究策略的确定。

本组资料显示, MAGE-12 mRNA 在肺癌表达率为 34%(17/50), 表明以 MAGE-12 基因及其编码抗原作为肺癌的免疫治疗的攻击靶点有较好的特异性。实验中检测的 50 例正常肺组织均不表达 MAGE-12 mRNA, 说明该基因具有肿瘤特异性, 有望在肺癌的早期诊断, 微转移灶检测和预后判断等临床应用上发挥其重要作用。本实验结果显示 MAGE-3 与 MAGE-12 有高度同源性[4], 且拥有共同表位 FLWGPRALV[1]。MAGE-3 在肺癌总表达率为 46%, 在肺鳞癌中的表达率为 90%, MAGE-3 的肿瘤治疗性疫苗在体内能诱导特异性 CTLs 的产生, 并在一些病例取得了一定的疗效, 但总的效

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

果不理想。原因之一是受单一一种 MAGE 成员在一种肿瘤的表达率所限，疫苗的有效了率还不够高[4]。因此，本研究的发现为 MAGE-3 与 MAGE-12 联合应用，提高疫苗的抗原性，提高其诱导细胞免疫应答的能力治疗肺癌提供有利依据。MAGE 家族成员包含一系列关系紧密的基因，我们检测的 50 例肺癌是否还表达其它的基因，值得进一步研究。我们检测的 50 例肺癌中 MAGE-12 的蛋白表达及其定位有待进一步研究。

总之，本研究结果提示，MAGE-12 基因在肺癌有较高表达率，基于 MAGE-12 基因及其产物作为新的疫苗可能是一个有前途的治疗肺癌的免疫治疗方法。

参考文献：

[1] Min D, Raymond J B, Christopher J, *et al*. Cloning and analysis of MAGE-1 related genes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 202(1): 549－555.

[2] Panelli M C, Bettinotti M P, Lally K, *et al*. A tumor-infiltrating lymphocyte from a melanoma metastasis with decreased expression of melanoma differentiation antigens recognizes MAGE-12[J]. J Immunol, 2000, 164(8): 4 382－4 392.

[3] Francis Brasseur. Melanoma: Brussels Melanoma Cell Lines[M]. Human Cell Culture Vol. 1: 275－282.

[4] 贾正才，吴玉章. MAGE 家族研究进展[J]. 国外医学肿瘤学分册，2000, 27(增刊)：42－45.

[5] Knuth A, Wolfel T, Klehmann E, *et al*. Cytolytic T-cell clones against an autologous human melanoma specificity study and definition of three antigens by immunoselection[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(8): 2 804－2 808.

[6] Luescher I F, Romero P, Kuznetsov D, *et al*. HLA photoaffinity labeling reveals overlapping binding of homologous melanoma-associated gene peptides by HLA-A1, HLA-A29, and HLA-B44[J]. J Biol Chem, 1996, 271(21): 12 463－12 471.

（编辑 王 红）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)10-1148-01

宫腔镜诊治宫颈妊娠 1 例

Report of a case of cervical pregnancy diagnozed and treated by endoscopy

余 琴 （重庆医科大学第一附属医院妇产科，重庆 400016）

患者，23 岁。钳刮术后 2 月余，不规则阴道流血 1 月余，当地医院 B 超提示，宫体颈部弱回声块影，尿 HCG(＋)，考虑为绒癌转入我院，门诊以过期流产于 2002 年 3 月 4 日收入院。患者因流血时间长，继发感染，暂给予抗感染治疗，等待进一步诊治。于 3 月 5 日抽血查 HCG 浓度为 1134 IU，3 月 8 日 B 超提示宫颈管内异常回声 9 mm× 6 mm。为进一步明确诊断，于 3 月 11 日在局麻下行宫腔镜检查，宫腔内未见异常，宫颈管右侧后壁见约 2.5 cm× 2 cm× 2 cm 大小囊块，暗紫色与淡黄色相间，有边界，考虑宫颈妊娠。局部注射 MTX 50 mg，术后出血偏多，填塞纱布 4 块，24 h 取出后无明显活动性出血。3 月 13 日复查血 HCG 630 IU，下降明显，再次给予全身用药，MTX 50 mg 肌注，次日用四氢叶酸钙 6 mg 肌注解毒。每间隔 5 d 抽血查 HCG 1 次，于 3 月 27 日报告，30.2 IU。患者一般情况好，血、尿常规正常，肝、肾功能正常，B 超提示宫颈管内低弱回声，阴道流血逐渐减少，住院 25 d 出院。1 个月后随访，HCG＜ 10 IU，B 超宫颈管内无异常回声，提示患者已痊愈。

讨论

宫颈妊娠是一种罕见的异位妊娠，是指胚芽种植生长在子宫颈管[1]，临床常误诊为早孕或不全流产，其发病率为 0.55/万～4/万，占异位妊娠的 0.1%[2]。

宫颈妊娠不多见，但若宫颈妊娠观察不仔细，诊疗不明确，流产会导致出血不止，紧急情况下需切除子宫。宫腔镜检查可以明确诊断宫颈妊娠，通过镜下直接将药物注入胚胎组织可起到直接抑制滋养细胞分裂增殖，并致其死亡，病灶逐渐萎缩而痊愈。患者过分紧张、焦虑、恐惧，如果不进行心理疏导，可能导致治疗失败。因此，除医师的准确诊治外，认真细致的监护，尤其是心理护理是不可缺少的措施。该患者通过我们的护理活动，情绪稳定、压力减小，疾病康复令人满意。

宫腔镜诊治宫颈妊娠疾病有着重要的临床意义，具有对人体伤害小、疗效好等优点，可以在有经验的医生操作下使用。

关键词：宫腔镜；诊断治疗；宫颈妊娠
中图法分类号：R774.226 文献标识码：B

参考文献：

[1] 谢雅明. 5-Fu 局部注射治疗宫颈妊娠 1 例报告[J]. 广西医药，1999, 21(1)：122.

[2] 殷诗荣，段志珍，汪德萍. 子宫动脉栓塞治疗宫颈妊娠的护理[J]. 护理学杂志，2001, 16(1)：37.

（编辑 张大春）

作者简介：余 琴(1964－)，女，重庆市人，护师，主要从事宫腔镜诊治子宫疾病的辅助技术及临床护理方面的研究。电话：(023)69012396

收稿日期：2002-06-28；修回日期：2002-09-06

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