

· 短篇论著 ·

MAGE-A 在非小细胞肺癌淋巴结
微小转移诊断中的价值

王晓陶 W. Sienel B. Passlick

首都医科大学附属北京天坛医院呼吸内科 (北京市 100050)

关键词 黑色素瘤抗原基因 非小细胞肺癌 微小转移

肺癌是目前最常见的恶性肿瘤之一,已成为威胁人类健康最主要的疾病。对于无转移的非小细胞肺癌(NSCLC)患者,尽管经手术完全切除肿瘤,仍有大约40%患者手术后2年内复发,5年生存率仅为60%左右,复发主要原因是常规的组织病理学方法无法发现残留的微小转移的癌细胞。黑色素瘤抗原基因(melanoma antigen gene, MAGE)家族中包括-A、-B、-C、-D、-E和-F六个亚家族。目前的研究表明多种肿瘤表达MAGE-A1、-A2、-A3、-A4、-A6和-A12^[1],在肺癌细胞中的阳性率达70%左右^[2,3]。本研究用Real-Time RT-PCR方法检测黑色素瘤基因A(MAGE-A)在NSCLC患者局部淋巴结的表达,探讨其作为肿瘤标记物在肺癌纵隔淋巴结微小转移诊断中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选取德国慕尼黑大学 München-Gauting 医院2003年4月至2004年5月确诊为NSCLC未接受其它治疗的30例手术患者,其中男20例,女10例;年龄52~76岁。经病理常规检查证实为鳞癌22例,腺癌5例,鳞癌3例。鳞癌16例,腺癌9例,大细胞癌5例。有淋巴结转移者8例。

1.1.1 实验组 从手术的30例NSCLC患者获得经病理学证实未发现癌细胞的纵隔淋巴结95组,鳞癌患者淋巴结44组,腺癌患者淋巴结33组,大细胞癌患者淋巴结18组。

1.1.2 对照组 1)从12例手术的非癌症患者获得纵隔淋巴结18组作为阴性对照。2)选取15例NSCLC患者原发肿瘤组织,观察MAGE-A mRNA的表达。

在手术中获得的淋巴结和肿瘤组织立即放入RNA溶液,储存在-20℃冰箱中。

1.2 MAGE-A 基因的检测

1.2.1 RNA 提取 提取总RNA所用试剂盒为RNeasy Midi Kit, QIAGEN。将淋巴结(重量30~250mg)放入液氮中速冻。在预冷的容器中研磨成细粉末,转移至15ml的试管中。加入4ml提取缓冲液RLT,涡旋混匀。根据试剂盒的说明进行操作,提取总RNA。用Biophotometer仪测定RNA浓度。用无RNase水校正零点。

1.2.2 肺癌细胞A549培养与RNA提取 选用NSCLC细胞系A549。用RPMI 1640加5%~10%小牛血清培养A549细胞,收集总数为 5×10^6 的细胞进行RNA提取,步骤同淋巴结的RNA提取。

1.2.3 c-DNA 合成 所用试剂盒为1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR(AMV)⁺, Roche。在20μl的反应体系中含组织RNA 500ng, 10×反应缓冲液2.0μl, 随机引物p(dN)6 2.5μl, dNTPs混合液2.0μl, AMV反转录酶1.0μl, 25mmol/L MgCl₂ 2.5μl。先将RNA变性:65℃, 15min。然后加入反应混合物溶液,设定PCR仪(带热盖的自动化热循环反应仪)程序:25℃保温10min, 42℃反应1h, 95℃处理5min以变性反转录酶,然后4℃保存1~2h或在-20℃长期保存备用。同时设阳性对照:肺癌细胞A549,阴性对照为水。

1.2.4 Real-Time PCR 所用引物为MAGE-A,参考基因为Cyclophilin B(CPB),所用试剂盒为LightCycler-MAGE(A1; A2; A3/6) quantification kit, LightCycler-CPB quantification kit。LightCycler faststart DNA master SYBR green 1 kit(Search GmbH公司, Heidelberg, 德国)。1)建立反应体系:在无离心管中加入PCR反应混合物溶液,其反应成分为:PCR等级水12.0μl, LC引物2.0μl, LC DNA Master Sybr[®] Green I 2.0μl, 模板4.0μl, 总体积为

20.0 μl。2) Real-Time PCR 反应: 使用 LightCycler™ PCR 仪, 设定程序: 变性 95 10min, 延伸 95 10s, 68 10s, 72 16s, 40 个循环。PCR 结束后自动进入熔点曲线分析: 95 0s, 58 10s, 95 0s。退火: 40 30s。3) 标准曲线: 相对定量分析将 A549 肺癌细胞的 RNA 分别配为浓度 500、100、20、4、0.8ng/μl, 合成 cDNA, 用引物 MAGE-A、CPB 进行 Real-Time PCR 反应, 用 LightCycler 分析软件产生标准曲线。4) 数据分析: 使用 LightCycler 相对定量分析软件进行数据分析。MAGE-A mRNA 的表达用相对率来表示:

$$\frac{\text{MAGE-A 浓度(患者) / CPB 浓度(患者)}}{\text{MAGE-A 浓度(A549) / CPB 浓度(A549)}}$$

1.3 统计学方法

使用 SPSS 11.0 软件, 采用 χ^2 检验对 MAGE-A mRNA 的表达与组织学类型、肿瘤大小和淋巴结分期进行统计学分析。

2 结果

2.1 实验组淋巴结 MAGE-A mRNA 的表达

95 例淋巴结中 MAGE-A 阳性表达率为 17.9% (17/95), 其中鳞癌为 25.0% (11/44), 腺癌为 6.1% (2/33), 大细胞癌为 22.2% (4/18)。各组织类型之间阳性率比较 $P=0.08$ 。

2.2 阴性对照组 MAGE-A 的表达

阴性对照组 18 组淋巴结取自 12 例患者, 手术后病理证实为非肺癌疾病。本组淋巴结中, 未发现 MAGE-A 基因的表达。

2.3 NSCLC 组织 MAGE-A 的表达

15 例 NSCLC 患者的肿瘤组织中 12 例表达 MAGE-A mRNA, 阳性率为 80.0%, 其中 7 例鳞癌标本均表达 MAGE-A, 5 例腺癌标本中 3 例标本为 MAGE-A 阳性, 3 例大细胞癌标本中 2 例标本为 MAGE-A 阳性。

2.4 NSCLC 患者的分子生物学期

根据 MAGE-A mRNA 的表达, 患者的淋巴结分期发生明显变化。22 例 N₀ 期患者中 8 例 (36.4%) 上调为 N₁-N₂ 期, 5 例 N₁ 期患者中 1 例上调为 N₂ 期。3 例 N₂ 期患者病理证实无癌细胞转移的淋巴结 MAGE-A mRNA 表达均为阳性, 见表1。

2.5 MAGE-A mRNA 表达与病理特征的关系

MAGE-A mRNA 的表达与组织学类型、肿瘤大小和淋巴结分期进行统计学分析, 结果显示不同的组织学类型、肿瘤大小和淋巴结分期与 MAGE-A mRNA 的表达差异无显著性 ($P>0.05$)。

表 1 30 例 NSCLC 患者淋巴结 MAGE-A mRNA 的表达 例 (%)

临床特征	MAGE-A mRNA 阴性	MAGE-A mRNA 阳性
性别		
女	6 (60.0)	4 (40.0)
男	12 (60.0)	8 (40.0)
组织学分型		
鳞癌	8 (50.0)	8 (50.0)
腺癌	8 (88.9)	1 (11.1)
大细胞癌	2 (40.0)	3 (60.0)
组织学淋巴结分期		
N ₀	14 (63.6)	8 (36.4)
N ₁	4 (80.0)	1 (20.0)
N ₂	0 (0)	3 (100)
合计	18 (60.0)	12 (40.0)

3 讨论

MAGE-A 家族是由位于染色体 Xq28 上的 12 个密切关联的基因组成。在目前被研究的肿瘤中大多数表达 MAGE-A1、-A2、-A3、-A4、-A6 和 -A12。MAGE-A 基因在除睾丸、胎盘以外的正常组织中均不表达。

由于 MAGE-A 高特异性, 只在肿瘤中表达, 已被作为肿瘤标记物进行临床研究, 但单个 MAGE 基因表达率低。Siendl 等^[4]用 RT-PCR 方法研究了 204 例临床 或 期 NSCLC 患者的原发肿瘤 MAGE-A3 的表达, 其阳性率为 39.2% (80/204)。Yoshimatsu 等^[2]对 57 例肺癌患者手术标本用 RT-PCR 方法检测 MAGE-A1、-2、-3 的表达, 发现 20.9% (9/43) 表达 MAGE-A1, 30.2% (13/43) 表达 MAGE-A2, 45.8% (22/48) 表达 MAGE-A3; 28 例患者标本表达 MAGE-A1、-A2、-A3, 18 例 (64.3%) 表达至少一种 MAGE 基因。10 例 (35.7%) 表达 2 种或 3 种 MAGE 基因, 10 例 (35.7%) 不表达 MAGE 基因。Park 等^[5]采用多种 MAGE-A 识别引物 MMRP, 明显提高了 MAGE-A 基因表达率, 在肺癌中 MAGE 1-6 基因表达为 75.0% (9/12)。

我们采用 MMRP 并使用 LightCycler 系统来检测肺癌在淋巴结中的微小转移。对于原发肺癌的肿瘤标本, MAGE-A 表达的阳性率为 80.0%。在阴性对照组中未见 MAGE-A mRNA 表达。此结果表明 MAGE-A 对 NSCLC 的检测有高度的特异性和较高的敏感性。本研究中经病理检测无肿瘤细胞扩散的 95 组淋巴结中, 表达 MAGE-A 基因的阳性率为 17.9%, N₀ 期患者的阳性率为 36.4% (8/22), 表明用同步 RT-PCR 方法检测 MAGE-A mRNA 的表达可

以发现常规病理学方法不能发现的微小转移肿瘤细胞。我们的结果与 Kufer 等^[6]研究结果相近。Kufer 等用 RT-PCR 方法研究 MAGE- A1、- A2、- A3/6、- A4 和 - A12 在不同肿瘤患者骨髓的表达, 以发现微小转移的肿瘤细胞, 33 例肺癌患者中有 11 例单侧骨髓表达至少一种 MAGE 基因, 其中鳞癌为 6/20 例, 腺癌为 3/10 例, 大细胞癌 1/2 例, 小细胞癌 1 例, 阳性率为 33%。

NSCLC 淋巴结微小转移的检测对于肿瘤切除术后精确分期、复发、预后的正确判断及合理治疗方案的选择具有十分重要的意义。MAGE- A 基因在肺癌中有高度的特异性表达, 利用这一特性, 将其作为肿瘤标志物检测肺癌患者纵隔淋巴结中微小转移的肿瘤细胞, 可使假阳性率降到最低。但其敏感性在原发肺癌中的表达达到 80.0%, 与其他肿瘤标志物如 CEA、CK19^[7,8]相比略低, 如能将两种或两种以上肿瘤标志物联合应用, 将会明显提高肺癌纵隔淋巴结中微小转移的肿瘤细胞检出的准确率。

参考文献

- 1 梁锐, 王芳, 畅继武. MAGE 的研究现状及展望[J]. 中国肿瘤临床, 2004, 31(21): 1257~1260
- 2 Yoshimatsu T, Yoshino I, Ohgami A, et al. Expression of the melanoma antigen- encoding gene in human lung cancer[J]. J Surg Oncol, 1998, 67(2): 126~129
- 3 Jheon S, Hyun DS, Lee SC, et al. Lung cancer detection by a RT- nested PCR using MAGE A1- 6 common primers [J]. Lung Cancer, 2004, 43(1): 29~37
- 4 Siem W, Varwerk C, Linder A, et al. Melanoma associated antigen (MAGE)- A3 expression in Stages and non- small cell lung cancer: results of a multi- center study[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2004, 25(1): 131~134
- 5 Park JW, Kwon TK, Kim IH, et al. A new strategy for the diagnosis of MAGE- expressing cancers[J]. J Immunol Methods, 2002, 266(1~2): 79~86
- 6 Kufer P, Zippelius A, Lutterbüse R, et al. Heterogeneous expression of MAGE- A genes in occult disseminated tumor cells: a novel multimarker reverse transcription- polymerase chain reaction for diagnosis of micrometastatic disease[J]. Cancer Res, 2002, 62(1): 251~261
- 7 敖亚洲, 胡建功, 高向华, 等. CEA mRNA 和 p53 蛋白在不同类型肺癌组织的表达[J]. 中国肿瘤临床, 2004, 31(16): 937~939
- 8 张宏伟, 于晓锋, 王晓杰. RT- PCR 法检测非小细胞肺癌患者外周血 CK19 mRNA 的临床意义 [J]. 中国肿瘤临床, 2005, 32(18): 1042~1044

(2007- 04- 11 收稿) (2007- 06- 21 修回)

(邢颖校对)

(上接第 1309 页)

了 ER、PR、CK 低分子等基因产物的检测, 结果显示 PR、ER、CK 低分子均有不同程度的表达, 不仅可以说明我们成功的建立了子宫内膜癌裸鼠模型, 同时也证明了这些基因在子宫内膜癌的发生、发展中均起着重要作用, 这一结果为今后开展肿瘤生物学研究提供了参考。

本研究成功地建立了 HEC- 1B 人子宫内膜癌体内模型, 完整的重现了人子宫内膜癌自然临床病理过程, 为深入研究子宫内膜癌的生物学特性、组织发生、实验治疗和肿瘤免疫提供了良好的实验动物模型。

参考文献

- 1 Glinksky GV, Price JE, Glinksky VV, et al. Metcalf Inhibition of human breast cancer metastasis in nude mice by synthetic glycoamines[J]. Cancer Res, 1996, 56(23): 5319~5324
- 2 郭毅, 郭科军, 佟晓光, 等. 冻存复苏人卵巢皮质在裸鼠体内的发育及卵细胞的提取[J]. 生殖与避孕, 2003, 23(6): 355~356
- 3 Endo T, Toda M, Watanabe M, et al. In situ cancer vaccination with a replication- conditional HSV for the treatment of liver metastasis of colon cancer [J]. Cancer Gene Ther, 2002, 9(2): 142~148
- 4 Jones- Bolin S, Zhao H, Hunter K, et al. The effects of the oral, pan- VEGF- R kinase inhibitor CEP- 7055 and chemotherapy in orthotopic models of glioblastoma and colon carcinoma in mice[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(7): 1744~1753
- 5 Rygaard J. Induced leukemogenesis in mice, depressed blood clearance as a predisposing factor in induced leukemia [J]. Acta Unio Int Contra Cancrum, 1959, 15(1): 208~211
- 6 Malik ST, East N, Boraschi D, et al. Effects of intraperitoneal recombinant interleukin- 1 beta in intraperitoneal human ovarian cancer xenograft models: comparison with effects of tumour necrosis factor[J]. Br J Cancer, 1992, 65(5): 661~666
- 7 申良方, 刘新菊, 王聘, 等. E1A 基因对裸鼠移植瘤生长抑制及其初步作用机制的实验研究[J]. 中国肿瘤临床, 2007, 34(4): 198~207
- 8 张蕾, 温洪涛, 高冬玲, 等. Bcl- XL 反义寡核苷酸对裸鼠食管癌移植瘤抑制作用的研究[J]. 中国肿瘤临床, 2006, 33(5): 290~293
- 9 盛修贵, 孙建衡, 周春晓, 等. 人子宫内膜癌裸鼠模型的建立及其生物学特性的研究[J]. 中华妇产科杂志, 2002, 37(1): 33~35
- 10 罗营, 糜若然. 去势雌性裸小鼠人子宫内膜癌皮下移植瘤动物模型的建立[J]. 天津医科大学学报, 2004, 10(3): 391~393
- 11 施新猷, 王四旺, 顾为望, 等. 比较医学[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 2003. 478~480
- 12 陈爱平, 王和, 彭芝兰, 等. 人卵巢移植瘤和腹水瘤模型的建立及形态学观察[J]. 肿瘤, 2001, 21(2): 82~84

(2007- 05- 31 收稿) (2007- 08- 14 修回)

(韩豫生校对)