

人类黑色素瘤相关抗原 A9 在早期宫颈癌中的表达研究

高新萍, 石若冰, 何海鹏, 张惠, 刘金, 李雅钗, 刘丹阳, 梁义娟

摘要 目的 检测人类黑色素瘤相关抗原 A9(MAGE-A9)在正常宫颈和早期宫颈癌组织中的表达,探讨其在早期宫颈癌中的致病机制及临床病理特征之间的关系。方法 收集宫颈癌组织 69 例、宫颈上皮内瘤变(CIN)组织 30 例和正常宫颈组织标本 20 例,应用免疫组织化学 SP 法检测 MAGE-A9 的表达,应用统计学方法分析其与年龄、FIGO 分期、组织病理学分级及淋巴结转移等因素间的关系。另取 20 例宫颈癌、15 例 CIN、15 例正常的新鲜组织,应用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法检测不同宫颈组织中 MAGE-A9 基因及其蛋白的表达水平。结果 MAGE-A9 在正常宫颈组织不表达,CIN 及宫颈癌组织中均有表达,阳性表达率分别为 5.00%、13.33%、47.83%,组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。其在早期宫颈癌的表达与 FIGO 期、组织病理学分级、淋巴结转移有关,与年龄、组织类型无关。RT-qPCR 结果提示,宫颈癌组织中的 MAGE-A9 表达量明显高于 CIN 及正常组织,宫颈癌组与正常组及 CIN 组间差异有统计学意义($P < 0.05$),而 CIN 与正常组织之间差异无统计学意义。结论 MAGE-A9 在正常宫颈、CIN 及宫颈癌组织中均有表达,阳性表达率随着疾病的进展而增高,提示在宫颈癌的发生发展中 MAGE-A9 具有重要作用。

关键词 宫颈癌; MAGE-A9; 免疫组化; PCR

中图分类号 R 713.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)01-0119-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.025

子宫颈癌是常见的恶性肿瘤之一,发病人群越来越年轻化,其发病机制尚未完全明确。人类黑色素瘤相关抗原-A9(melanoma-associated antigen-A9, MAGE-A9)为 MAGE-A 基因家族的一员^[1]。有研究^[2]显示 MAGE-A9 在多种肿瘤组织呈高表达,但在子宫颈癌中的表达研究报道尚少。此实验通过免疫组织化学检测 MAGE-A9 在宫颈癌组织中的表达,应用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测不同宫

颈组织中 MAGE-A9 基因的表达,探讨 MAGE-A9 在子宫颈癌中的表达及临床意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 整理 2012 年 6 月~2016 年 6 月河北大学附属医院患者临床资料。收集存档蜡块标本,其中正常宫颈组织 20 例、宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)组织 30 例、宫颈癌组织 69 例,临床分期标准: I A ~ I B 期 50 例、II A 期 19 例,年龄 31~63 岁,中位年龄 52 岁。采用免疫组织化学 SP 法检测各组中 MAGE-A9 表达及分布,记录入组患者临床病理参数及年龄。另收集本院手术切除的新鲜宫颈组织标本。宫颈病变手术室取材的标本是宫颈活检明确诊断后行宫颈锥切术或子宫全切及广泛子宫全切的宫颈标本,正常宫颈组织,选自因子官良性病变切除全子宫患者(术前液基薄层学检测未见异常)。将标本置于 EP 管中,立刻放入液氮罐,尽快运送至医院中心实验室进行预处理。用组织剪将组织剪成约小块,每个 1.5 ml EP 管分装约 100 mg 组织,置于 -80 °C 冰箱保存,分装,避免反复冻融。运用 RT-qPCR 检测 MAGE-A9 基因的表达情况。采用统计学方法对结果进行分析。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化染色 将存档石蜡包块连续切片,厚度约 4 mm,经二甲苯 I、II 级脱蜡处理,经无水乙醇 I 级、II 级脱水,0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液抗原修复,滴加适量 3% H₂O₂,以消除内源性过氧化物酶的活性,滴加一滴正常山羊血清封闭液(试剂 A),室温放置 15 min,每张切片滴加适当稀释的 MAGE-A9 一抗工作液约 50 μl(上海 Abcom 贸易有限公司);空白对照组滴加 PBS 液约 50 μl,置于 4 °C 冰箱过夜孵育。滴加适当稀释二抗 50 μl(试剂 B),滴加过氧化物酶标记链霉卵白素(试剂 C),DAB 溶液显色,光镜下阅片。以胎盘组织做阳性对照。显微镜下观察细胞核见棕黄色颗粒为 MAGE-A9 阳性细胞。

1.2.2 RT-qPCR 将组织在液氮下磨碎,用 TRIzol

2017-07-21 接收

基金项目: 河北省政府资助临床医学优秀人才培养和基础课题研究项目(编号: 361007); 2016 年河北省医学科学研究重点课题计划项目(编号: 20160381)

作者单位: 河北大学附属医院妇科,保定 071000

作者简介: 高新萍,女,副主任医师;

梁义娟,女,主任医师,硕士研究生导师,责任作者, E-mail: 810718847@qq.com

试剂盒提取 RNA,紫外分光光度仪进行 RNA 浓度和纯度的测定,利用 Pubmed 查找基因的序列号,上海生科公司利用基因序列号合成相关基因的实时定量 PCR 引物, MAGE-A3, 上游引物序列: 5'-GGGGGTGTATGTTGGGAAGG-3'; MAGE-A3 下游引物序列: 5'-GATGGGTAGCAGATGGGCTC-3'; 内参 GAPDH 上游引物序列: 5'-GCACCGTCAAGGCT-GAGAA-3', GAPDH 下游引物序列: 5'-AGGTCCAC-CACTACACGTTT-3'。PCR 反应条件: 95 °C 预热 10 min,热循环参数: 95 °C、10 s,64 °C、30 s,72 °C、32 s,共 40 个循环。所取数据根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算 mRNA 相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件对结果进行统计分析,计量资料采用单因素方差分析,计数资料采用率或构成比表示,临床病理学特征中的表达水平采用 χ^2 检验分析方法,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MAGE-A9 在正常宫颈组织、CIN 组织和早期宫颈癌组织中的表达情况 MAGE-A9 蛋白主要表达于细胞质中,少量表达细胞核中,呈淡黄色~棕褐色染色,MAGE-A9 蛋白的染色强度随着宫颈病变程度的加重而增强。MAGE-A9 在正常宫颈组织、CIN、早期宫颈癌组织中的阳性表达率分别为 5.00%、13.33%、47.83%;正常宫颈组织中 1 例表达呈阳性、19 例表达呈阴性;在 CIN 组织中 4 例表达呈阳性、26 例表达呈阴性;在宫颈癌 69 例阳性中有 33 例表达呈阳性、36 例表达呈阴性。宫颈癌组表达高于 CIN 组及正常宫颈组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 MAGE-A9 在早期宫颈癌组织中表达与临床病理特征间的关系 MAGE-A9 主要定位于细胞质中,细胞核中也有少量表达。50 例 I 期患者标本中阳性表达例数 18 例、阳性率为 36.00%;而在 19 例 II A1 期患者标本中,阳性表达例数 15 例、阳性率 78.95%; MAGE-A9 在 I 期、II A1 期阳性表达率依次增高;两组间比较,差异有统计学意义 ($P = 0.001$)。同时 MAGE-A9 的表达在 G1、G2、G3 组阳性表达率分别为 40.00%、35.48%、77.78%,随着组织病理学的级别升高而增强,三组间比较,差异有统计学意义 ($P = 0.012$)。在淋巴结转移的病例中阳性表达率分别为 80.00%,两组间比较,差异有统计学意义 ($P = 0.028$)。而年龄、病理类型之间比较

差异无统计学意义。见表 1。

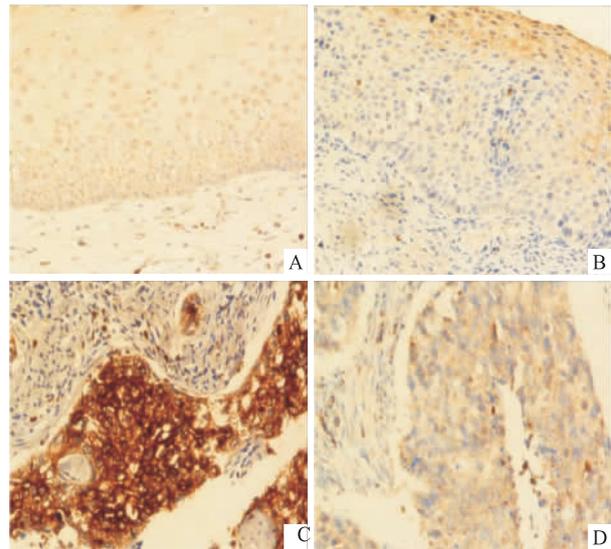


图 1 免疫组化法检测不同程度的子宫颈病变组织中 MAGE-A9 蛋白的表达 SP × 200

A: 正常子宫颈组织中, MAGE-A9 蛋白染色为淡黄色呈阴性表达; B: CIN 组织中, MAGE-A9 蛋白染色为淡黄色,呈阴性表达; C: 子宫颈癌组织中, MAGE-A9 蛋白染色为淡黄色,呈阴性表达; D: 子宫颈癌组织中, MAGE-A9 蛋白染色为棕褐色,呈强阳性表达

表 1 不同临床病理指标的宫颈癌组织中 MAGE-A9 蛋白的表达比较

类别	n	阳性例数 (n)	百分率 (%)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)					
≤50	36	16	44.44	0.345	0.557
>50	33	17	51.52		
临床分期					
I A ~ I B	50	18	36.00	10.177	0.001
II A	19	15	78.95		
病理分级					
G1	20	8	40.00	8.855	0.012
G2	31	11	35.48		
G3	18	14	77.78		
病理类型					
鳞癌	58	28	48.28	0.029	1.000
腺癌	11	5	45.45		
淋巴结转移					
有	10	8	80.00	4.852	0.028
无	59	25	42.37		

2.3 RT-PCR 检测基因 MAGE-A9 的 mRNA 水平结果显示,正常宫颈组、CIN 组、宫颈癌组的相对定量值分别为 0.182 ± 0.062 、 0.234 ± 0.087 与 0.642 ± 0.150 ,宫颈癌组与正常组及 CIN 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而正常组与 CIN 组之间差异无统计学意义。见图 2。

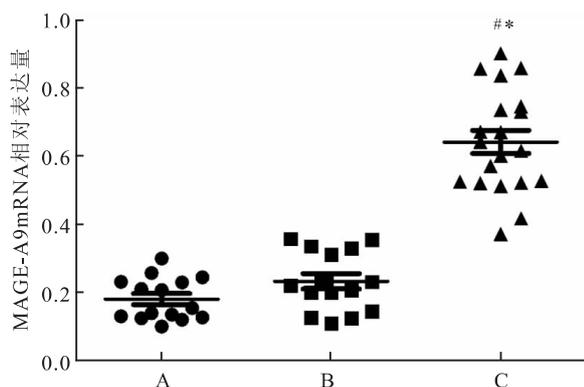


图2 不同临床病理指标的子宫颈癌组织中 MAGE-A9 基因的表达比较

A: 正常组织; B: CIN 组织; C: 宫颈癌组织; 与正常组织比较:

* $P < 0.05$; 与 CIN 组织比较: # $P < 0.05$

3 讨论

MAGE 是癌睾丸-抗原中研究较多的成员。第一个黑色素瘤相关抗原基因是在 1991 年由 van der Bruggen et al^[1] 分离克隆的,命名为 MAGE-1(后更名为 MAGE-A1)。MAGE-A 抗原在不同组织学来源和生殖细胞的多种癌症中表达。由于其相对较高的肿瘤特异性,是目前癌症免疫治疗的有吸引力的靶标^[3]。MAGE-A9 是 MAGE 家族的一员,MAGE-A9 cDNA 全长 945 bp,编码的蛋白产物约 315 个氨基酸,分子量约 35 ku。最近研究^[4]显示,MAGE-A9 有可能成为肿瘤治疗的潜在靶点。多项研究^[5-6]显示,MAGE-A9 通常在泌尿系统肿瘤中过度表达,并且可以提供膀胱癌和肾细胞癌中的预后信息。此外,MAGE-A9 在喉鳞状细胞癌,皮肤 T 细胞淋巴瘤,人食管鳞状细胞癌和肝癌中过表达^[7-11]。

本研究中,使用免疫组化评价了宫颈癌组织中的 MAGE-A9 蛋白表达,结果显示 47.83% 的病例显示 MAGE-A9 在细胞质中高表达。这与 Zhai et al^[12] 在肺癌中的研究结果相一致。Gu et al^[7] 在对肝癌中 MAGE-A9 蛋白的表达量研究显示,癌组织表达显著高于非癌组织。同样,曹克鑫等^[13] 通过免疫组织化学法对食管鳞癌中 MAGE-A9 的表达发现,MAGE-A9 在食管鳞癌组织中表达率为 50.94%。并且通过 RT-qPCR 研究结果显示 MAGE-A9 基因在正常食管组织中低表达,而在食管鳞癌组织中高表达。本研究结果显示宫颈癌组织中的 MAGE-A9 相对表达量明显高于 CIN 及正常组织。

Liu et al^[14] 在对 LSCC 患者 MAGE-A9 研究发

现,46.2% 患者 MAGE-A9 呈高表达,结合临床资料发现,MAGE-A9 的表达与临床分期,淋巴结转移和肿瘤大小相关。并且通过 Cox 的多变量分析显示,MAGE-A9 表达是 LSCC 患者独立预后不良因素。此外,在肝癌中 MAGE-A9 蛋白的表达水平与病理分级、门静脉侵袭、远处转移和 TNM 分期有关^[7]。本研究显示,MAGE-A9 的高表达与病理分级临床分期及淋巴结转移相关($P < 0.05$),而与患者年龄、病理组织类型差异无统计学意义。同样,Zhan et al^[15] 在对结直肠癌研究也发现 MAGE-A9 与淋巴结转移相关。因此推断 MAGE-A9 可能参与了宫颈癌的浸润与转移过程。

综上所述,MAGE-A9 在宫颈癌组织中表达异常增高,而在癌前病变及正常组织中呈低表达。通过与临床病理资料进行统计学研究表明,MAGE-A9 蛋白的表达与宫颈癌的发展及转移呈密切相关,通过对基因的检测表明,MAGE-A9 可能参与了宫颈癌的发生,其机制有待进一步研究。

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 [J]. Science, 1991, 254(5038): 1643-7.
- [2] Reardon E S, Hong J A, Straughan D M, et al. Pulmonary metastases exhibit epigenetic clonality: implications for precision cancer therapy [J]. Ann Thorac Surg, 2015, 100(5): 1839-48.
- [3] Lucas S, De Smet C, Arden K C, et al. Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis [J]. Cancer Res, 1998, 58(4): 743-52.
- [4] Brisam M, Rauthe S, Hartmann S, et al. Expression of MAGE-A1-A12 subgroups in the invasive tumor front and tumor center in oral squamous cell carcinoma [J]. Oncol Rep, 2016, 35(4): 1979-86.
- [5] Dannenmann S R, Hermanns T, Bransi A, et al. Spontaneous peripheral T-cell responses toward the tumor-associated antigen cyclin D1 in patients with clear cell renal cell carcinoma [J]. Cancer Immunol Res, 2013, 1(5): 288-95.
- [6] Hatiboglu G, Pritsch M, Macher-Goeppinger S, et al. Prognostic value of melanoma-associated antigen A9 in renal cell carcinoma [J]. Scand J Urol, 2013, 47(4): 311-22.
- [7] Gu X, Fu M, Ge Z, et al. High expression of MAGE-A9 correlates with unfavorable survival in hepatocellular carcinoma [J]. Sci Rep, 2014, 4: 6625.
- [8] Bergeron A, Picard V, LaRue H, et al. High frequency of MAGE-A4 and MAGE-A9 expression in high-risk bladder cancer [J]. Int J Cancer, 2009, 125(6): 1365-71.
- [9] Eichmüller S, Usener D, Thiel D, et al. Tumor-specific antigens in cutaneous T-cell lymphoma: expression and sero-reactivity [J].

- Int J Cancer, 2003,104(4):482-7.
- [10] van Duin M, Broyl A, de Knecht Y, et al. Cancer testis antigens in newly diagnosed and relapse multiple myeloma: prognostic markers and potential targets for immunotherapy [J]. *Haematologica*, 2011, 96(11):1662-9.
- [11] Han L, Jiang B, Wu H, et al. Expression and prognostic value of MAGE-A9 in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(10):6734-42.
- [12] Zhai X, Xu L, Zhang S, et al. High expression levels of MAGE-A9 are correlated with unfavorable survival in lung adenocarcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016,7(4):4871-81.
- [13] 曹克鑫,温丰标,吴 恺,等. 人类黑色素瘤相关抗原 A9 在食管鳞状细胞癌中的表达及其与预后的关系 [J]. *中华实验外科杂志*,2015,32(8):1820-2.
- [14] Liu S, Sang M, Xu Y, et al. Expression of MAGE-A1, -A9, -A11 in laryngeal squamous cell carcinoma and their prognostic significance: a retrospective clinical study [J]. *Acta Otolaryngol*, 2016, 136(5):506-13.
- [15] Zhan W, Zhang Z, Zhang Y, et al. Prognostic value of MAGE-A9 expression in patients with colorectal cancer [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2016, 40(2):239-45.

Expression of human melanoma – associated antigen A9 in early cervical cancer

Gao Xinping, Shi Ruobing, He Haipeng, et al

(Dept of Gynecology, The Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000)

Abstract Objective To detect the expression of MAGE-A9 in normal cervix and early cervical cancer, and to explore the relationship between the expression of MAGE-A9 and the clinicopathological features of cervical cancer.

Methods The expression of MAGE-A9 was detected by immunohistochemical SP method in 69 cases of cervical cancer, 30 cases of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and 20 cases of normal cervical tissues. The expression of MAGE-A9 was analyzed by statistical method. The relationship between age, FIGO stage, histopathological grade and lymph node metastasis was analyzed by statistical method. The expression of MAGE-A9 gene in another 20 cases of cervical cancer, 15 cases of CIN and 15 cases of normal cervical tissues was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). **Results** The expression of MAGE-A9 was not detected in normal cervical tissues and CIN and cervical cancer tissues. The positive expression rates of MAGE-A9 were 5.00%, 13.33% and 47.83% respectively. There was significant difference between the two groups ($P < 0.05$). The expression of MAGE-A9 in early cervical cancer was related to FIGO stage, histopathological grade and lymph node metastasis, but not to age and histological type. The results of q-PCR showed that the expression of MAGE-A9 in cervical carcinoma was significantly higher than that in CIN and normal tissues ($P < 0.05$), but there was no significant difference between cervical carcinoma and normal group and CIN group. There was no significant difference between the two groups. **Conclusion** MAGE-A9 is expressed in normal cervix, CIN and cervical carcinoma, and the positive expression rate of MAGE-A9 is increased with the progression of the disease. It suggests that MAGE-A9 plays an important role in the development of cervical cancer.

Key words cervical cancer; MAGE-A9; immunohistochemistry; PCR