

## · 临床研究 ·

# XAGE-1基因在肺癌组织中的表达 及其与临床特点的关系

赖群 张立堂 孙彦

**【摘要】** 背景与目的 研究证实XAGE-1作为一种癌胚抗原在多种肿瘤中高表达。本研究旨在探讨XAGE-1基因在肺癌组织中的表达水平及其与临床特点的关系。方法 肺癌患者85例，提取肺癌组织和癌旁组织总RNA，巢式PCR反应扩增XAGE-1四种剪接体基因，分析基因表达情况及其与临床特点的关系。结果 32.94% (28/85) 肺癌患者癌组织阳性表达XAGE-1基因，在各种类型肺癌中，59.46% (22/37) 的腺癌与21.74% (5/23) 鳞癌患者癌组织阳性表达XAGE-1基因；XAGE-1b基因的表达与肺癌病理类型有相关性 ( $P < 0.05$ )，腺癌阳性表达率明显高于鳞癌，而与肺癌的性别、年龄及临床分期无相关性 ( $P > 0.05$ )。结论 XAGE-1基因在肺癌尤其腺癌组织中高表达，该基因可以作为免疫治疗的靶基因。

**【关键词】** XAGE-1基因；CT抗原；肺肿瘤；临床特点

**【中图分类号】** R734.2 DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2010.08.07

## Association of XAGE-1 Gene Expression with Clinical Characteristics of Lung Cancer

Qun LAI, Litang ZHANG, Yan SUN

Department of Thoracic Surgery, Central Hospital of Coal Group of Zaozhuang, Zaozhuang 277011, China

Corresponding author: Qun LAI, E-mail: tjll@163.com

**【Abstract】** **Background and objective** XAGE-1 is a cancer-testis (CT) antigen which was demonstrated to be expressed at a significant frequency and to be immunogenic in some tumors. The aim of this study is to explore the association between XAGE-1 gene expression and the clinical characteristics of lung cancer. **Methods** Tumor tissue and adjacent lung tissue samples from 85 patients were screened for expression of the four XAGE-1 transcript variants by nest PCR. The correlations between XAGE-1b gene expression and several clinical characteristics were analyzed. **Results** 32.94% (28/85) of lung cancer samples were positive for XAGE-1 gene. 59.46% (22/37) of the adenocarcinoma samples and 21.74% (5/23) of the squamous cell carcinoma samples were positive for one of the four XAGE-1 transcript variants. The frequent of XAGE-1b gene in adenocarcinoma was much higher than that in squamous cell carcinoma. There were not any important correlation between XAGE-1b gene expression and clinical characteristics, such as gender, age and clinical stage. **Conclusion** XAGE-1 gene is highly expressed in lung adenocarcinoma and XAGE-1 may be a promising immunotherapeutic target for lung cancer.

**【Key words】** XAGE-1 gene; CT antigen; Lung neoplasms; Clinical characteristics

CT抗原 (cancer-testis antigen) 是一类在除睾丸、胎盘等以外的正常组织中几乎不表达的抗原，但可在多种肿瘤组织中表达，目前包括MAGE、BAGE、GAGE、NY-ESO-1、SSX等44种家族成员的CT抗原被发现<sup>[1]</sup>。通过RT-PCR及免疫组化方法在肺癌、肝癌、卵巢肿瘤及前列腺癌等多种肿瘤中均表达CT抗原，同时研究<sup>[1]</sup>证实CT抗原可在肿瘤患者体内诱导特异性的细胞免疫及体液免疫应答。XAGE-1是1999年通过生物信息学技术发现的一种新的CT抗原，属于GAGE/PAGE家族，XAGE-1基因定位于Xp11.21-Xp11.22，包括XAGE-1a、XAGE-1b、XAGE-1c、

XAGE-1d四种剪切体，利用RT-PCR及Northern blot发现XAGE-1基因在Ewing's肉瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、肝癌等多种肿瘤中表达<sup>[2,3]</sup>。本实验研究XAGE-1四种不同剪接体在肺癌组织中表达情况并分析其与临床特点的关系，为XAGE-1作为肺癌免疫治疗靶点提供理论依据。

### 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 随机选取2008年1月-2009年3月在我院胸外科住院手术患者85例 (男性60例、女性25例，平均年龄56.5岁)；腺癌37例，鳞癌23例，大细胞癌15例，小细胞肺癌10例，所有病例均经过病理证实，患者签署知情

作者单位：277100 枣庄，山东省枣庄矿业集团中心医院心胸外科 (通讯作者：赖群，E-mail: tjll@163.com)

同意书。手术过程中，肺叶或全肺切除后，立即切取肿瘤组织及距肿瘤组织>5 cm的癌旁组织各3块，每块约0.5 g，置入无菌、去RNA酶的冻存管，立即投入液氮中，后转入-80 °C冰箱保存。

## 1.2 方法

**1.2.1 组织细胞RNA提取** 取约0.2 g肺癌组织及癌旁组织于液氮中研磨，加入Trizol试剂，提取总RNA，Trizol试剂购自美国Invitrogen公司，严格按照试剂说明书进行提取。所得RNA用DEPC处理过的水溶解，-80 °C保存备用。取少量RNA在紫外分光光度计260 nm和280 nm下确认浓度和纯度。

**1.2.2 肺癌细胞系A549培养与RNA提取** 用含10%小牛血清的RPMI-1640培养A549细胞，收集总数为 $5 \times 10^6$ 个细胞利用Trizol试剂进行RNA提取，DEPC处理过的水溶解后-80 °C保存备用。

**1.2.3 巢式PCR** 采用cDNA第一链合成试剂盒进行合成，该试剂盒购自加拿大Fermentas公司，严格按照试剂说明书进行操作，所得cDNA在-20 °C保存。根据文献<sup>[2]</sup>的方法略有改动进行巢式PCR扩增，在50  $\mu$ L PCR反应体系中包括0.4  $\mu$ mol/L引物、1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、200 mmol/L dNTP及2.5 U GoldTaq酶，第一轮PCR模板为4.0  $\mu$ L cDNA，选用外侧引物进行扩增，反应条件如下：95 °C预变性5 min，94 °C、30 s，60 °C、45 s，72 °C、60 s，35个循环，72 °C延伸7 min；从第一轮PCR产物中取出1.0  $\mu$ L作为第二轮PCR模板，反应条件为：95 °C预变性5 min，94 °C、30 s，58 °C、30 s，72 °C、30 s，30个循环，72 °C延伸7 min；同时以GAPDH（PCR产物为138 bp）为内参考基因同时进行扩增，PCR产物以2%琼脂糖凝胶进行电泳观察结果。

**1.2.4 PCR产物测序分析** 每个阳性条带所对应的PCR产物进行测序，测序得到的序列利用BLAST程序在GenBank上进行序列分析。

**1.3 统计学分析** 采用SPSS 10.0统计软件对数据进行统计分析，利用Fisher's精确概率法及Pearson's chi square检验进行XAGE-1b基因表达与临床及病理特点相关性分析，以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

## 2 结果

**2.1 XAGE-1基因在肺癌组织中表达情况** 收集85例肺癌组织和癌旁组织，提取RNA后利用巢式PCR检测XAGE-1四种不同剪接体基因的表达情况，结果发现部分肺癌

组织表达XAGE-1b、XAGE-1d基因，而不表达XAGE-1a、XAGE-1c基因，A549细胞系表达XAGE-1b基因（图1），PCR产物经测序后与GenBank进行序列比对后证实为目的基因，癌旁组织中均不表达XAGE-1基因。在各种类型肺癌中，59.46%（22/37）的腺癌组织表达XAGE-1基因（XAGE-1a 0/37；XAGE-1b 17/37；XAGE-1c 0/37；XAGE-1d 6/37），其中1例腺癌组织同时表达XAGE-1b与XAGE-1d基因。21.74%（5/23）鳞癌组织表达XAGE-1基因（XAGE-1a 0/23；XAGE-1b 4/23；XAGE-1c 0/23；XAGE-1d 1/23），15例大细胞癌组织中仅检测到2例癌组织表达XAGE-1b基因，而10例小细胞癌组织中均未检测到XAGE-1基因表达。

**2.2 XAGE-1b基因表达与腺癌、鳞癌临床特点的关系** 目前研究认为XAGE-1b具有较高的免疫原性和较高的表达率，我们分析了37例腺癌与23例鳞癌组织标本XAGE-1b基因的表达与性别、年龄、病理类型及临床分期的关系（表1）。统计结果表明XAGE-1b基因的表达与肺癌病理类型有相关性（ $P < 0.05$ ），腺癌阳性表达率明显高于鳞癌，而与肺癌的性别、年龄及临床分期无相关性（ $P > 0.05$ ）。由于对病例生存期随访时间较短，故有待于对病例进行继续随访，以便分析XAGE-1b基因的表达与患者生存期之间的关系。

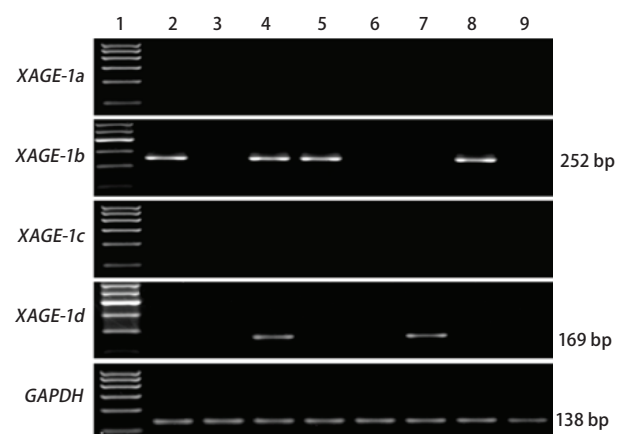


图1 XAGE-1基因在肺癌组织及癌旁组织中的表达。1: 100 bp DNA ladder; 2: A549细胞系; 3: 癌旁组织; 4、5: 腺癌组织; 6、7: 鳞癌组织; 8: 大细胞肺癌组织; 9: 小细胞肺癌组织。XAGE-1b、XAGE-1d和GAPDH的PCR产物大小分别为252 bp、169 bp和138 bp。

Fig 1 Expression of XAGE-1 gene in lung tumor tissues and adjacent tissues. 1: 100 bp DNA ladder; 2: A549 cell line; 3: tumor adjacent tissue; 4, 5: adenocarcinoma; 6, 7: squamous cell carcinoma; 8: large cell lung cancer; 9: small cell lung cancer. The sizes of PCR products are 252 bp, 169 bp and 138 bp for XAGE-1b, XAGE-1d and GAPDH, respectively.

表 1 XAGE-1b基因表达与腺癌、鳞癌患者临床特点的关系

Tab 1 The correlation between XAGE-1b gene expression and several clinical characteristics of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma

	XAGE-1b (+)	XAGE-1b (-)	Total	P
Gender				0.559 9
Male	16	26	42	
Female	5	13	18	
Age (year)				0.573 3
≥60	15	24	39	
<60	6	15	21	
Histology				0.028 9
Adenocarcinoma	17	20	37	
Squamous cell carcinoma	4	19	23	
Clinical stage				0.165 9
I	5	17	22	
II-III	16	22	38	

### 3 讨论

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一，其中非小细胞肺癌占70%-80%，目前手术及化疗效果特别是晚期患者效果不佳，免疫治疗是一种新的治疗方法，而免疫治疗的基础就是必须寻找特异性表达的肿瘤抗原。研究证实CT抗原具有较高的免疫原性，可以诱发机体的肿瘤特异性的细胞免疫和/或体液免疫杀伤肿瘤细胞，同时CT抗原仅在睾丸、胎盘等正常组织中表达，但在多种肿瘤组织中高表达，具有较高的肿瘤特异性，因此，CT抗原是肿瘤免疫治疗特别是肿瘤疫苗治疗的理想靶抗原，以NY-ESO-1、MAGE-A、SSX抗原为基础的肿瘤疫苗已进入临床试验阶段<sup>[4-6]</sup>。研究<sup>[7]</sup>发现在非小细胞肺癌组织中也表达MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-12、NY-ESO-1等多种CT抗原。

XAGE-1是一种在多种肿瘤组织中表达的CT抗原，通过RT-PCR及Northern blot研究发现XAGE-1b基因在PC3（前列腺细胞系）、MDA-MB-231（肺癌细胞系）、OVCAR（卵巢细胞系）、FEM-X（黑色素瘤细胞系）、HUT102（T细胞淋巴瘤细胞系）、U937（组织细胞性淋巴瘤细胞系）、A-172（神经胶质细胞瘤细胞系）均有表达，同时有临床研究发现XAGE-1b基因在Ewing's肉瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、肝癌等多种肿瘤组织中表达，在前列腺癌和黑色素瘤的研究中还发现XAGE-1b基因表达与肿瘤的临床分期有关<sup>[2,3]</sup>。本研究采用巢式PCR技术检测XAGE-1四种不同剪接体在肺癌中表达情况，结果显示32.94%（28/85）肺癌患者癌组织阳性表达XAGE-1基因，其中27.06%（23/85）肺癌患者癌组织阳性表达XAGE-1b基因，与国外报道的30.61%

（15/49）肺癌患者癌组织阳性表达XAGE-1b基因略有差异，本研究还检测了肺癌组织中XAGE-1d基因表达情况，研究发现8.24%（7/85）患者癌组织阳性表达XAGE-1d基因，低于Nakagawa等<sup>[8]</sup>报道的表达阳性率（12.24%，6/49），可能与病例数及病理类型组成不同有关。本研究证实XAGE-1b具有较强的免疫原性和较高的表达率，本实验重点分析了XAGE-1b基因的表达与临床特点的关系，结果发现XAGE-1b基因的表达与肺癌病理类型有相关性（ $P < 0.05$ ），腺癌阳性表达明显高于鳞癌，与肺癌的性别、年龄及临床分期无相关性（ $P > 0.05$ ），提示在肺腺癌中可以优先选择该基因作为瘤苗及免疫治疗靶点。Shimono等<sup>[9]</sup>鉴定出HLA-DRB1\*0410限制的XAGE-1b<sub>37-48</sub>多肽可以产生XAGE-1b特异性的CD4<sup>+</sup>T细胞，Kikuchi等<sup>[10]</sup>已经报道患者在手术后XAGE-1b可以诱导CD8<sup>+</sup>T细胞抗微小残留病变从而延长患者的存活时间，从而进一步为XAGE-1作为肿瘤治疗的靶点提供了理论基础。

综上所述，本实验研究发现XAGE-1基因在部分肺癌组织阳性表达，XAGE-1b基因表达与肺癌病理类型有关。但目前XAGE-1在肿瘤细胞中发挥的生物学功能仍然未知，下一步应进一步对XAGE-1在肿瘤发生发展中的生物学作用进行深入研究，以便为XAGE-1作为免疫治疗靶点提供理论依据。

### 参考文献

- 1 Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, et al. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(8): 615-625.
- 2 Zendman AJ, Van Kraats AA, Weidle UH, et al. The XAGE family of cancer/testis-associated genes: alignment and expression profile in normal tissues, melanoma lesions and Ewing's sarcoma. *Int J Cancer*, 2002, 99(3): 361-369.
- 3 Eglund KA, Kumar V, Duray P, et al. Characterization of overlapping XAGE-1 transcripts encoding a cancer testis antigen expressed in lung, breast, and other types of cancers. *Mol Cancer Ther*, 2002, 1(7): 441-450.
- 4 Marchand M, van Baren N, Weynants P, et al. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer*, 1999, 80(2): 219-230.
- 5 Bender A, Karbach J, Neumann A, et al. LUD 00-009: phase 1 study of intensive course immunization with NY-ESO-1 peptides in HLA-A2 positive patients with NY-ESO-1-expressing cancer. *Cancer Immun*, 2007, 7: 16.
- 6 Odunsi K, Qian F, Matsuzaki J, et al. Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/II specificities induces integrated humoral and

- T cell responses in ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(31): 12837-12842.
- 7 Tajima K, Obata Y, Tamaki H, *et al.* Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer. Lung Cancer, 2003, 42(1): 23-33.
- 8 Nakagawa K, Noguchi Y, Uenaka A, *et al.* XAGE-1 expression in non-small cell lung cancer and antibody response in patients. Clin Cancer Res, 2005, 11(15): 5496-5503.
- 9 Morishita Y, Uenaka A, Kaya S, *et al.* HLA-DRB1\*0410-restricted recognition of XAGE-1b37-48 peptide by CD4 T cells. Microbiol Immunol, 2007, 51(8): 755-762.
- 10 Shimono M, Uenaka A, Noguchi Y, *et al.* Identification of DR9-restricted XAGE antigen on lung adenocarcinoma recognized by autologous CD4 T-cells. Int J Oncol, 2007, 30(4): 835-840.
- (收稿: 2010-04-06 修回: 2010-04-20)  
(本文编辑 南娟)

· 启事 ·

## 《中国肺癌杂志》2011年征订启事

《中国肺癌杂志》(CN 12-1395/R, pISSN 1009-3419, eISSN 1999-6187)——我国第一本国内外公开发行的肿瘤专病杂志,创刊于1998年,为中文月刊,并有部分英文文章。中国工程院院士孙燕教授担任本刊名誉主编,天津医科大学总医院我国著名肺癌专家周清华教授任主编。另有来自美国、丹麦、意大利和日本的多位国际著名肺癌专家以及国内的100多位从事肺癌基础研究和临床防治工作的知名专家担任副主编和编委。

本刊以提高我国肺癌基础研究和临床研究水平,提供学习交流和学术争鸣的园地,促进国际学术交流,推动我国肺癌防治工作的发展为办刊宗旨。本刊已被收录为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊,为国家肿瘤学核心期刊。

本刊开设的主要栏目有报道肺癌防治研究的最新成果,基础与临床以及边缘学科等领域的论著、综述、述评、讲座、临床经验、病理(例)报道、新技术、新理论、短篇报道、继续教育和各类消息等。

《中国肺癌杂志》为月刊,国际标准开本(大16开),80页,每月20日正式出版,国内邮发代号为6-230,每册定价15.00元,全年180.00元。欢迎全国各级医院、医科院校、医学研究机构中从事肺癌基础与临床研究的医务人员、研究人员,以及相关专业的临床医生、医学生、实习生、研究生和医药管理人员等踊跃投稿和订阅本刊。

联系方式 编辑部地址:天津市和平区南京路228号  
邮政编码:300020  
电话:022-27219052; 022-27219219  
传真:022-27219052  
E-mail: cnlungca@gmail.com; cnlungca@yahoo.com.cn  
网址: <http://www.lungca.org>