

MAGE-C2在肺腺癌中的表达及临床意义

郭康 刘梦实 徐萍 李红梅

【摘要】背景与目的 本研究旨在探讨黑色素抗原C2 (melanoma antigen-C2, MAGE-C2) 在肺腺癌组织及癌旁组织中的表达, 及其在肺癌诊断及预后方面的临床指导意义。方法 利用荧光定量PCR和Western blot方法检测MAGE-C2 mRNA和MAGE-C2蛋白在87例肺腺癌患者的癌组织及癌旁组织中的表达。结果 肺腺癌组织中MAGE-C2 mRNA及MAGE-C2蛋白存在高表达 (53/87, 60.9%), 而癌旁组织中无MAGE-C2 mRNA和MAGE-C2蛋白的表达; 统计学分析后发现, MAGE-C2的表达情况与年龄、性别、吸烟史无明显相关性 ($P>0.05$), 而与肿瘤分期、是否转移及分化程度相关 ($P<0.05$); MAGE-C2高表达对患者总生存率有不利的影响 ($P<0.05$)。结论 MAGE-C2在肺腺癌组织中存在高表达, 并与肿瘤分期及是否转移存在相关性, 有望成为一种新型的肺腺癌诊断、治疗及预后标志物。

【关键词】肺肿瘤; 肿瘤标志物; 黑色素抗原C2

Expression and Clinical Significance of MAGE-C2 in Lung Adenocarcinoma

Kang GUO, Mengshi LU, Ping XU, Hongmei LI

Cancer Center, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China

Corresponding author: Hongmei LI, E-mail: lihongmei161@163.com

【Abstract】 Background and objective The aim of this study is to detect the expression of melanoma antigen-C2 (MAGE-C2) in lung adenocarcinoma tissues and adjacent non-cancerous tissues and analyze its clinical significance. **Methods** The expression level of MAGE-C2 mRNA and MAGE-C2 protein were measured in 87 cases of lung adenocarcinoma tissues and adjacent non-cancerous tissues were detected by Real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot. **Results** Over-expression of the MAGE-C2 mRNA and MAGE-C2 protein were observed in lung adenocarcinoma tissues (53/87, 60.9%), but nor in adjacent non-cancerous tissues. The expressions of MAGE-C2 mRNA and MAGE-C2 protein were closely associated with clinical stage, metastasis and differentiation ($P<0.05$). The expression rate of MAGE-C2 mRNA had no relationship with gender, age, smoking ($P>0.05$). The expression of MAGE-C2 had an adverse effect on overall survival rate ($P<0.05$). **Conclusion** Over-expression of the MAGE-C2 mRNA and protein is existed in lung adenocarcinoma. The high expression of MAGE-C2 may be closely related to the occurrence and development in lung adenocarcinoma. MAGE-C2 may predict a poor prognosis and could be as a novel lung adenocarcinoma molecule marker.

【Key words】 Lung neoplasms; Tumor marker; MAGE-C2

This study was supported by the grant from Science and Technology Research Foundation of Qingdao City (to Hongmei LI)(No.09-1-1-9-nsh).

肺癌是世界范围内最常见的肿瘤之一, 而且其发病死亡率居首位^[1], 是威胁人类生命健康的主要恶性肿瘤。其中肺腺癌的发病率逐年升高, 已经跃居肺癌发病率首位^[2]。研究^[2]证实, 早期诊断和治疗是提高肺癌患者生存率的关键。肿瘤标志物因其检测方便、成本低等优点可广泛用于肺癌的筛查, 对肺癌早期诊断、组织学分型、预后判断及疗效评价等方面有重要价值^[3]。肿瘤标志

丸抗原 (cancer-testis antigen, CTA) 是一类新的肿瘤标志物, 在多种肿瘤中存在表达, 而在正常组织中仅表达于睾丸和胎盘组织^[4]。黑色素抗原C2 (melanoma antigen-C2, MAGE-C2) 是CTA的一种, 最初发现于黑色素瘤细胞, 后被证实存在多种肿瘤中存在表达^[5,6], 而其在肺腺癌中的研究却很少。本实验通过荧光定量PCR (realtime fluorescence quantitative PCR, RTFQ-PCR) 及Western blot方法检测MAGE-C2 mRNA及蛋白在肺腺癌中的表达情况, 并分析其与肺腺癌临床病理特征及总生存率之间的关系, 以期发现一种新的肺腺癌标志物。

本研究受青岛市科技局科研项目 (No.09-1-1-9-nsh) 资助
作者单位: 266003 青岛, 青岛大学附属医院肿瘤中心 (通讯作者: 李红梅, E-mail: lihongmei161@163.com)

1 资料与方法

1.1 病例资料 选取青岛大学附属医院胸外科2010年3月-2011年3月肺腺癌患者87例,分别取肺腺癌组织及癌旁组织10 g剪碎后储存于-80 °C备用。癌旁组织取自癌组织旁5 cm以外的组织。所有患者均为接受过放化疗,并均已经病理诊断证实,且无其他恶性疾病及自身免疫性疾病。临床分期采用国际肿瘤-淋巴结-转移(tumor-node-metastasis, TNM)分期方法。

1.2 总RNA提取和cDNA合成 取冰冻肺腺癌组织及癌旁组织各50 mg-100 mg,利用RNAsimple Total RNA Kit提取总RNA,利用超微量核酸蛋白检测仪检测RNA纯度。再利用FastQuant RT Kit (with gDNase)进行cDNA合成。所有试剂盒均为天根科技有限公司提供,具体操作均按说明书进行。

1.3 荧光定量PCR检测 使用上述合成的cDNA为模板,利用SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)试剂盒进行荧光定量PCR检测。所使用MAGE-C2上游引物为:5'-AAAGTCA GCACAGCAGAGGAG-3',下游引物为:5'-TCTTCAGGA GCAGCAGGTAAA-3'。先95 °C预变性15 min,再与荧光定量PCR仪(Bio-Rad仪器)内扩增40个循环(95 °C变性10 s,55 °C退火20 s,72 °C延伸20 s),然后进行融解曲线分析。所有试剂盒均为天根科技有限公司提供,具体操作按说明书进行^[7]。

1.4 Western blot检测 将冻存的组织标本取出称重,每100 mg加入500 μL蛋白裂解液,置于匀浆器中研磨,冰上裂解30 min,离心(12,000 r/min)收集上清液,使用BCA法测定蛋白浓度。将蛋白于10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转膜1.5 h,5%BSA封闭1 h后,分别加入MAGE-C2兔抗人单克隆抗体(1:1,000)及GAPDH小鼠抗人单克隆抗体(1:1,000),4 °C孵育过夜漂洗,加二抗(1:2,000)室温孵育1 h后加发光试剂,暗室曝光显

示条带^[8]。

1.5 随访 对87例患者进行长期随访,随访时间从诊断日期开始至最终观察日期或死亡日期。记录患者的总生存时间。

1.6 统计学方法 所有数据采用SPSS 19.0统计学软件进行分析。计量资料以Mean±SD表示,采用t检验;计数资料采用 χ^2 检验;生存分析采用Kaplan-Meier法及Cox风险比例回归模型,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MAGE-C2 mRNA在肺腺癌及癌旁组织中的表达 超微量核酸蛋白检测仪检测RNA纯度,选取A260/A280的比值在1.8到2.1之间的样本用于合成cDNA。荧光定量PCR结果显示MAGE-C2 mRNA在肺腺癌组织存在表达(53/87,60.9%),而在癌旁组织中无表达。

2.2 MAGE-C2蛋白在肺腺癌及癌旁组织中的表达 Western blot结果与荧光定量PCR检测结果一致,在肺腺癌组织中检测到MAGE-C2蛋白的表达(53/87,60.9%)(图1),而在癌旁组织中无表达。

2.3 MAGE-C2 mRNA及蛋白表达与肺腺癌临床病例特征之间的关系 将MAGE-C2 mRNA及蛋白表达情况与肺腺癌患者的临床病理资料结合进行分析。我们发现,MAGE-C2 mRNA及蛋白表达阳性组与表达阴性组之间在临床分期、是否转移、分化程度方面存在统计学差异(P<0.05)(表1);在MAGE-C2 mRNA表达阳性组中,晚期、低分化、转移组的表达量明显高于早期、高/中分化、无转移组(P<0.05)(图2);但与患者的年龄、性别、吸烟史之间无明显相关性(P>0.05)(表1)。

2.4 MAGE-C2 mRNA与患者预后之间的关系 通过对87例随访数据进行Kaplan-Meier法生存分析,我们发现MAGE-C2 mRNA及蛋白表达阳性组与表达阴性组之间在总生存期上存在明显差异(Log-rank=7.541,P<0.05)(图3)。利用Cox风险比例回归模型对87例患者的7个因素进行分析,这7个因素分别为:年龄、性别、吸烟史、分化程度、临床分期、是否转移、MAGE-C2表达,结果发现,临床分期、是否转移、MAGE-C2表达分别为肺腺癌预后不良的独立因素。MAGE-C2 mRNA及蛋白高表达对患者总生存期产生不利影响(RR=2.813,95%CI 1.714-4.616,P=0.017)(表2),并可能与临床分期、是否转移间存在协同作用。

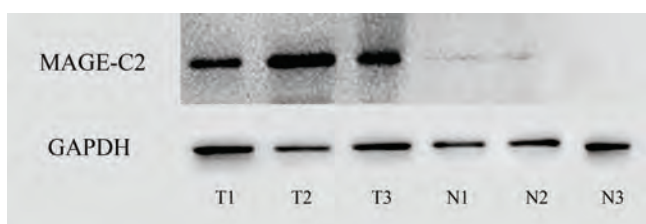


图1 Western blot检测MAGE-C2蛋白在肺腺癌及癌旁组织中的表达情况
Fig 1 Expression of MAGE-C2 protein was detected in lung adenocarcinoma and adjacent non-cancerous tissue by Western blot. MAGE-C2: melanoma antigen-C2.

表 1 MAGE-C2 mRNA及蛋白表达情况与临床病理特征的关系

Tab 1 Relationship between expression level of MAGE-C2 mRNA and protein and clinical characteristics of patients

Clinical characteristics	Cases (n)	MAGE-C2 mRNA and MAGE-C2 protein expression		χ^2	P
		Positive	Negative		
All patients	87				
All tissues				47.306	<0.01
Tumor	87	53	34		
ANCT	87	0	87		
Gender				0.940	>0.05
Male	41	23	18		
Female	46	30	16		
Age (Year)				1.247	>0.05
≥60	23	12	11		
<60	64	41	23		
Smoking				0.917	>0.05
Non-smoker	25	17	8		
Smoker	62	36	26		
TNM stage				5.455	<0.05
I+II	52	27	25		
III+IV	35	26	9		
Differentiation				5.744	<0.05
Well/Mod	18	7	11		
Poor	69	46	23		
Metastasis				6.069	<0.05
Negative	46	23	23		
Positive	41	30	11		

ANCT: adjacent non-cancerous tissue; TNM: tumor-node-metastasis.

3 讨论

CTA抗原基因编码的肿瘤抗原能在多种肿瘤组织中表达，但在正常组织中仅限于睾丸和胎盘组织，但是睾丸不表达人类白细胞抗原（human leukocyte antigen, HLA），因此不会在体内产生相应抗体^[9,10]。Jassim等^[11]的研究发现CTA的异位表达能引发人体的免疫反应，在血液中产生相应抗体，这为CTA在早期肿瘤诊断方面的应用提供了依据^[12]。另外，由于CTA这种免疫原性及表达限制性，CTA在肿瘤的诊断及免疫治疗方面存在巨大的潜在价值。

MAGE-C2是CTA家族中的一员，可在肿瘤细胞的胞质内被降解成九肽或十肽，然后作为抗原表位，与细胞内的HLA分子结合后呈递到细胞膜^[13]，从而诱导机体免疫系统产生相应抗体。在本研究中，我们检测了87例肺腺癌患者癌组织及癌旁组织中MAGE-C2 mRNA及蛋白的表达情况，结果发现，MAGE-C2 mRNA及蛋白表达于

多数肺腺癌组织中（53/87, 60.9%），而在癌旁组织中未检测到MAGE-C2 mRNA及蛋白的表达。因此，MAGE-C2有潜力作为一种新型的肺腺癌标志物，其在血清中产生的特异性抗体可广泛用于肺癌的筛查。另外，通过分析MAGE-C2 mRNA及蛋白的表达情况与肺腺癌临床病理特征之间的关系，我们发现，MAGE-C2 mRNA及蛋白的表达阳性组与表达阴性组在肺腺癌的临床分期、是否转移及分化程度方面存在明显统计学差异（ $P<0.05$ ），并且在晚期、低分化、转移组的表达量明显高于早期、高/中分化、无转移组。这一结果提示，MAGE-C2的高表达可能对肿瘤细胞的分化、转移有促进作用，其具体机制有待进一步研究。

利用Cox风险比例回归模型及Kaplan-Meier法对随访数据进行生存分析后，我们发现，MAGE-C2的高表达同临床分期、是否转移一样，为肺腺癌不良预后的独立因素。MAGE-C2表达越高，预后相对越差。因此，我们认为，MAGE-C2不仅可以用于肺腺癌的诊断，而且可

表 2 肺腺癌预后因素的Cox风险回归模型分析

Tab 2 Cox multivariate analysis of prognostic factors of lung adenocarcinoma

Variables	RR	95%CI	P value
MAGE-C2	2.813	1.714-4.616	0.017
Gender	0.908	0.523-1.577	0.732
Age	0.989	0.967-1.012	0.359
Smoking history	1.780	0.983-3.222	0.057
Clinical stage	2.120	1.266-3.550	0.004
Differentiation	1.073	0.598-1.926	0.814
Metastasis	4.014	2.416-8.016	<0.000,1

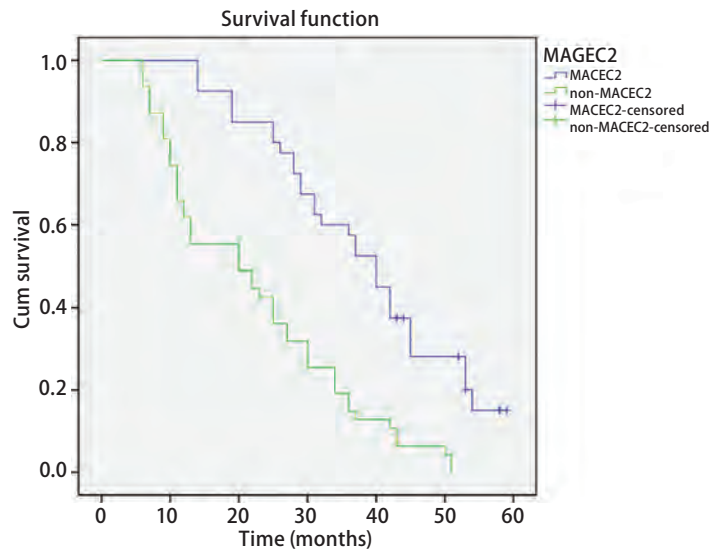


图 3 MAGE-C2 mRNA及蛋白的表达情况与肺腺癌患者总生存率之间的关系 (Kaplan-Meier法)

Fig 3 Relationship between expression of MAGE-C2 mRNA and protein and overall survival rate of lung adenocarcinoma patients (Kaplan-Meier method)

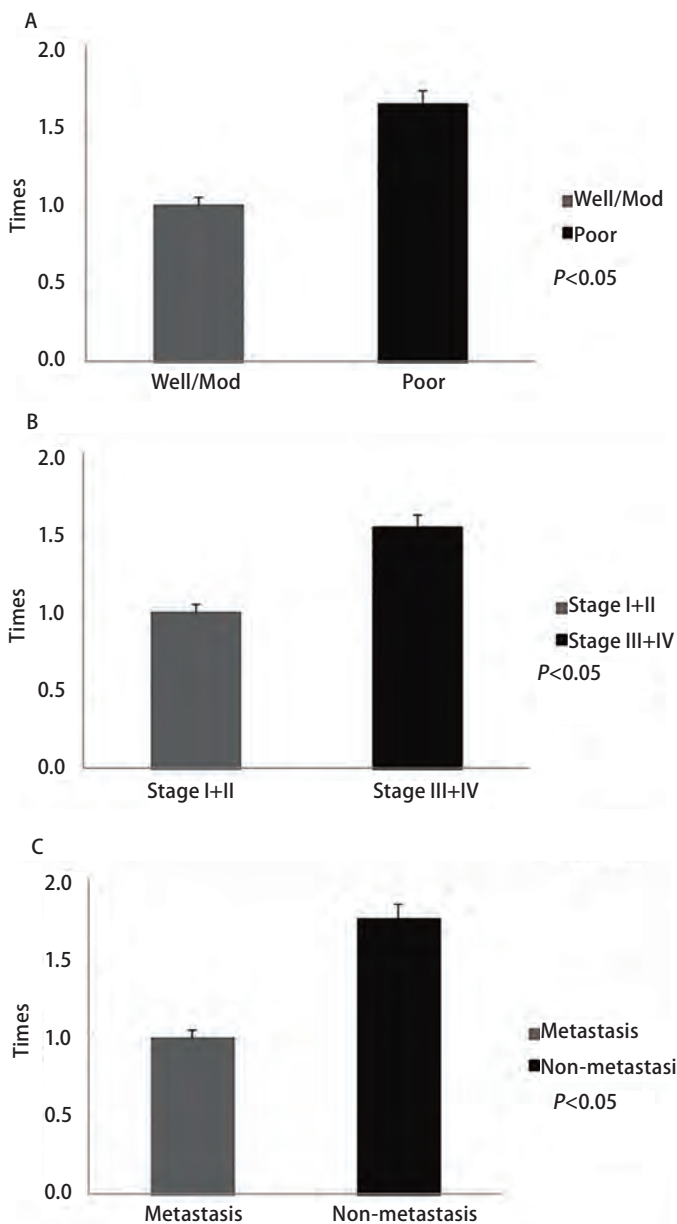


图 2 荧光定量PCR检测MAGE-C2 mRNA在肺腺癌中的表达情况。A: MAGE-C2 mRNA在高/中分化组和低分化组的表达情况 (以高/中分化组为标准, 低分组的荧光表达量); B: MAGE-C2 mRNA在(I期+II期)组和(III期+IV期)组的表达情况 (以I期+II期组为标准, III期+IV期组的荧光表达量); C: MAGE-C2 mRNA在转移组和无转移组的表达情况 (以无转移组为标准, 转移组的荧光表达量)。

Fig 2 Expression of MAGE-C2 mRNA was detected in lung adenocarcinoma by realtime fluorescent quantitative PCR. A: MAGE-C2 mRNA expression in well/mod differentiation group and poor differentiation group (Compared to well/mod differentiation group, expression of MAGE-C2 mRNA in poor differentiation group); B: MAGE-C2 mRNA expression in stage I+II group and stage III+IV group (Compared to stage I+II group, expression of MAGE-C2 mRNA in stage III+IV group); C: MAGE-C2 mRNA expression in metastasis group and non-metastasis group (Compared to metastasis group, expression of MAGE-C2 mRNA in non-metastasis group).

以作为肺腺癌不良预后的指标。另外，由于其特殊的免疫原性及表达限制性，MAGE-C2可能作为肺腺癌免疫治疗的靶点。体外培养能结合MAGE-C2的细胞毒性T淋巴细胞，进而特异性杀伤体内肿瘤细胞，而不对正常组织造成损害，减少了肿瘤治疗的副反应^[14]。同时，阻断MAGE-C2相关的信号转导途径^[15]，可能达到延缓肿瘤转移、改善患者的预后目的。相信此方面的研究将会对肿瘤的临床治疗产生重大影响。

总体来看，本研究成功证实了MAGE-C2在肺腺癌组织中存在高表达，并与肺腺癌的临床分期、是否转移及分化程度相关，对患者的总生存期有不良影响。这表明，MAGE-C2可作为一种肺腺癌诊断及预后标志物，并可作为免疫治疗靶点，在临床应用中存在巨大潜力。

参 考 文 献

- 1 De Angelis R, Sant M, Coleman MP, *et al.* Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of ERUOCARE-5-a population-based study. *Lancet Oncol*, 2014, 15(1): 23-34.
- 2 Rebecca Siegel MPH. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, 64(1): 9-29.
- 3 Lu XF, Yang XQ, Zhang ZM, *et al.* Meta-analysis of serum tumor markers in lung cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2010, 13(12): 1136-1140. [卢先锋, 杨雪琴, 张志敏, 等. 肺癌血清肿瘤标志物meta分析. *中国肺癌杂志*, 2010, 13(12): 1136-1140.]
- 4 Kim YD, Park HR, Song MH, *et al.* Pattern of cancer/testis antigen expression in lung cancer patients. *Int J Mol Med*, 2012, 29(4): 656-662.
- 5 Ghadban T, Perez DR, Vashist YK, *et al.* Expression of cancer testis antigens CT10 (MAGE-C2) and GAGE in gastrointestinal stromal tumors. *Eur J Surg Oncol*, 2014, 40(10): 1307-1312.
- 6 Curioni-Fontecedro A, Nuber N, Mihic-Probst D, *et al.* Expression of MAGE-C1/CT7 and MAGE-C2/CT10 predicts lymph node metastasis in

- melanoma patients. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21418.
- 7 Jiang M, Zhang C, Wang J, *et al.* Adenosine A(2A)R modulates cardiovascular function by activating ERK1/2 signal in the rostral ventrolateral medulla of acute myocardial ischemic rats. *Life Sci*, 2011, 89(5-6): 182-187.
- 8 Jiang MY, Chen J, Wang J, *et al.* Nitric oxide modulates cardiovascular function in the rat by activating adenosine A2A receptors and inhibiting acetylcholine release in the rostral ventrolateral medulla. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2011, 38(6): 380-386.
- 9 Li HM, Guo K, Yu Z, *et al.* Diagnostic value of protein chips constructed by lung-cancer-associated markers selected by the T7 phagedisplay library. *Thoracic Cancer*, 2015, 6(4): 469-474.
- 10 Chen YT, Boyer AD, Viars CS, *et al.* Arden KC. Genomic cloning and localization of CTAG, a gene encoding an autoimmunogenic cancer-testis antigen NY-ESO-1, to human chromosome Xq28. *Cytogenet Cell Genet*, 1997, 79(3-4): 237-240.
- 11 Jassim A, Ollier W, Payne A, *et al.* Analysis of HLA antigens on germ cells in human semen. *Eur J Immunol*, 1989, 19(7): 1215-1220.
- 12 Smith HA, McNeel DG. Vaccines targeting the cancer testis antigen SSX-2 elicit HLA-A2 epitope-specific cytolytic T cells. *J Immunother*, 2011, 34(8): 569-580.
- 13 Daudi S, Eng KH, Mhawech-Fauceglia P, *et al.* Expression and immune responses to MAGE antigens predict survival in epithelial ovarian cancer. *PLoS One*, 2014, 9(8): e104099.
- 14 Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, *et al.* Identification of AKAP-4 as a new cancer/testis antigen for detection and immunotherapy of prostate cancer. *Prostate*, 2012, 72(1): 12-23.
- 15 Doyle JM, Gao J, Wang J, *et al.* MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases. *Mol Cell*, 2010, 39(6): 963-974.

(收稿: 2015-12-01 修回: 2016-01-23 接受: 2016-01-25)

(本文编辑 南娟)



Cite this article as: Guo K, Liu MS, Xu P, *et al.* Expression and Clinical Significance of MAGE-C2 in Lung Adenocarcinoma. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2016, 19(2): 88-92. [郭康, 刘梦实, 徐萍, 等. MAGE-C2在肺腺癌中的表达及临床意义. *中国肺癌杂志*, 2016, 19(2): 88-92.] doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2016.02.09