

· 论 著 ·

酶免疫组化技术检测 MAGE-A3 抗原在肺癌组织中的表达*

向 波¹, 陆倩雯¹, 韩秀晶¹, 林云恩², 杨 玲¹, 范婷婷¹, 廖伟娇^{1△}

(广州医学院第一附属医院: 1. 检验科; 2. 病理科 510120)

摘要:目的 检测黑色素瘤抗原 A3(MAGE-A3)在原发性肺癌组织中的表达情况,并探讨其临床意义。方法 应用间接酶免疫组化技术检测 MAGE-A3 抗原在 48 例肺癌组织中的表达情况,并分析其与肺癌分型和淋巴结转移的关系。结果 48 例肺癌患者中有 29 例(60.4%)为 MAGE-A3 抗原表达阳性,19 例(39.6%)为 MAGE-A3 抗原表达阴性;肺腺癌、肺鳞癌、肺腺鳞癌和小细胞肺癌的阳性率分别为 80.0%、31.3%、75.0% 和 33.3%;肺腺癌组的阳性率显著高于肺鳞癌组($\chi^2=9.744, P<0.05$),淋巴结转移组和非淋巴结转移组的阳性率差异无统计学意义($\chi^2=0.001, P>0.05$)。结论 MAGE-A3 抗原在肺癌组织中有较高的表达率,肺腺癌组 MAGE-A3 的表达阳性率显著高于肺鳞癌组,肺癌淋巴结转移组和非淋巴结转移组的阳性率差异无统计学意义。

关键词:黑色素瘤; 肺肿瘤; 免疫组织化学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.10.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)10-1022-02

Detection of the expression of MAGE-A3 in lung carcinoma tissues by enzyme immunohistochemical methods*

Xiang Bo¹, Lu Qianwen¹, Han Xiujing¹, Lin Yun'en², Yang Ling¹, Fan Tingting¹, Liao Weijiao^{1△}

(1. Department of Laboratory; 2. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, 510120, China)

Abstract: Objective To detect the expression of MAGE-A3 in primary lung carcinoma tissues and explore its clinical significance. **Methods** Indirect enzyme immunohistochemical method was performed to detect the expression of MAGE-A3 in 48 cases of primary lung cancer tissues. The correlation between MAGE-A3 and the histological types of primary lung cancer and lymph node metastasis. **Results** Among the 48 cases of patients with lung cancer, 29 (60.4%) cases were positive with MAGE-A3 and 19 (39.6%) were negative. The positive rates of MAGE-A3 in lung adenocarcinoma (LA), lung squamous cell carcinoma (LSqCa), lung adenosquamous carcinoma (LASCa) and small cell lung cancer (SCLC) were 80.0%, 31.3%, 75.0% and 33.3%. The positive rate of MAGE-A3 in LA group was higher than that of LSqCa group ($\chi^2=9.744, P<0.05$), but there was no statistical difference of it between lymph node metastasis group and non-lymph node metastasis group ($\chi^2=0.001, P>0.05$). **Conclusion** The expression of MAGE-A3 was more frequent in lung carcinomas, especially in LA, the positive rate of which was higher than LSqCa, while the expression of MAGE-A3 was not significantly associated with lymph node metastasis.

Key words: melanoma; lung neoplasms; immunohistochemistry

肺癌是目前世界恶性肿瘤死亡率之首,其发病率和死亡率呈上升趋势^[1]。专家预计其上升趋势至少还要延续 20~30 年,到 2025 年,中国每年死于肺癌的患者将接近 100 万^[2]。目前肺癌的治疗手段以手术、化疗、放疗为主,这些方法的治疗效果并不能令人满意,特别是对于较晚期和已发生转移的病例。随着现代肿瘤学、肿瘤免疫学理论的飞速发展,以肿瘤免疫治疗为基础的生物治疗正日益受到大家的重视,以适宜的肿瘤特异性抗原为靶点,对肿瘤患者进行免疫治疗的方法有着巨大的潜力,值得深入研究、开发和利用。

黑色素瘤抗原 A3(MAGE-A3)为黑色素瘤抗原家族的一员,它不仅表达于大部分的黑色素瘤,而且还以较大比例表达于多种组织类型的各种肿瘤,如原发性肝癌、结肠癌、肺癌等,但在正常组织细胞(除睾丸和胎盘外)却不表达,为肿瘤特异性的共同抗原,因而被认为是肿瘤特异性免疫治疗的理想免疫原^[3-5]。本文旨在研究肺癌组织中 MAGE-A3 抗原的表达情况,为以 MAGE-A3 抗原为靶点对肺癌患者进行特异性免疫治疗提供理论依据,同时为肺癌的发生、发展、转移、预后等进

一步研究提供有价值的的数据,现将相关情况报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 48 例肺癌患者手术切除癌组织标本由本院病理科提供,其中腺癌 25 例,鳞癌 16 例,腺鳞癌 4 例,小细胞肺癌 3 例。

1.2 试剂 人 MAGE-A3 的小鼠单克隆抗体(M01, clone 6D10)购自 Abnova 亚诺法生技股份有限公司,Envision™ 两步法免疫组化试剂盒为 Dako 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 操作步骤 肺癌标本常规石蜡包埋,切片厚 3 μm , 65 $^{\circ}\text{C}$ 烤片 2 h,常规脱蜡至水;抗原修复采用 EDTA(pH8.0)微波修复;自然冷却后过蒸馏水,滴加 3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,室温孵育 10 min,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,2 min \times 3 次;加入 1:100 稀释的 MAGE-A3 单克隆抗体至覆盖标本,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBS 冲洗,5 min \times 3 次;加入 HRP 标志的二抗至覆盖标本,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, PBS 冲洗,5 min \times 3 次;加入 DAB 在显微镜下控制显色,自来水充分冲洗,苏木素复染,

* 基金项目:广州医学院第一附属医院科研基金(y200910gyfy);广州医学院青年基金资助项目(2010A08)。

△ 通讯作者, E-mail: liaoweijiao@163.com。

脱水透明,封片后在显微镜下观察。

1.3.2 实验对照 恶性黑色素瘤标本如上操作为阳性对照。恶性黑色素瘤标本和正常肺组织标本,以 PBS 代替一抗如上操作为空白对照。正常肺组织标本如上操作为阴性对照。另外,每张切片设 HE 常规染色。

1.4 结果判断 根据阳性细胞在全部组织细胞中所占比例以及阳性细胞染色强度判定实验结果。A:按显色细胞数记分,阳性细胞数小于或等于 1/3 为 1 分,阳性细胞数 1/3~2/3 为 2 分,阳性细胞数大于或等于 2/3 为 3 分。B:按细胞显色深浅记分,无阳性反应细胞为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。积分数为:A×B,A×B=0 判断为(-),A×B≥1 判断为(+),或者 A×B=1~2 判断为(+),A×B=3~4 判断为(++),A×B=6~9 判断为(+++)。

1.5 统计学处理 所获数据采用统计分析系统 SPSS 17.0 软件进行处理,统计学分析采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 MAGE-A3 抗原在肺癌组织中的总阳性率 恶性黑色素瘤阳性对照细胞质可见明显染色,结果(+++)~(+++),空白对照和阴性对照无明显染色,结果(-);48 例肺癌组织标本中有 29 例可见细胞质染色(+~+++),总阳性率 60.4% (29/48)。

2.2 MAGE-A3 抗原在各型肺癌组织中表达情况 见表 1。采用 SPSS 17.0 统计软件对肺腺癌和肺鳞癌的表达阳性率进行统计分析显示,肺腺癌组的 MAGE-A3 的表达阳性率高于肺鳞癌组($\chi^2=9.744, P<0.05$)。

2.3 肺癌 MAGE-A3 抗原表达与淋巴结转移的关系 48 例肺癌病例中 23 例为淋巴结转移,其余 25 例仅浸润胸膜或未见转移(设为非淋巴结转移组),肺癌的淋巴结转移与 MAGE-A3 表达之间的关系见表 2。采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析:肺癌淋巴结转移组和非淋巴结转移组的阳性率差异无统计学意义($\chi^2=0.001, P>0.05$)。

表 1 各型肺癌组织中 MAGE-A3 的表达情况

病理分型	阳性(n)	阴性(n)	总数(n)	阳性率(%)
肺腺癌	20	5	25	80.0
肺鳞癌	5	11	16	31.3
肺腺鳞癌	3	1	4	75.0
小细胞肺癌	1	2	3	33.3
合计	29	19	48	60.4

表 2 肺癌的淋巴结转移情况与 MAGE-A3 表达的关系

转移情况	阳性(n)	阴性(n)	总数(n)	阳性率(%)
淋巴结转移	14	9	23	60.9
非淋巴结转移	15	10	25	60.0
合计	29	19	48	60.4

3 讨 论

肿瘤免疫学指出,肿瘤抗原的天然蛋白及其细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)表位能诱导特异性 CTL 的产生,从而使部分患者的肿瘤缩小或完全消退。MAGE-A3 基因编码的九肽:苯丙氨酸-亮氨酸-色氨酸-甘氨酸-脯氨酸-精氨酸-丙氨酸-亮氨酸-缬氨酸(FLWGPRALV),可与 HLA-I 类分子形成复合物,

递呈到细胞表面,成为所谓“肿瘤排斥抗原”,并为 CTL 识别,诱导 CTL 对肿瘤细胞特异性杀伤。因此,MAGE-A3 基因在肿瘤细胞的表达情况是影响肿瘤免疫治疗的重要因素^[6]。探讨中国肺癌人群 MAGE-A3 表达情况具有更为重要意义,因为中国人群 HLA-I 类分子中 HLA-A2 表达较高(54%),而 MAGE-A3 基因产物 MZ2-D 上具有可被 HLA-A2 分子识别呈递的肽段 FLWGPRALV,因此对于以 MAGE-A3 抗原为靶点对中国肺癌患者进行特异性免疫治疗的研究,具有更高的实用价值和更为广阔的应用前景。

目前,有关 MAGE-A3 抗原在肺癌组织中表达情况的研究国内外均有报道,但多集中在 mRNA 水平,有关蛋白水平的表达报道相对较少且结果不大一致^[7]。而 mRNA 水平的基因阳性表达并不等于抗原蛋白的表达,只有抗原蛋白的表达才可诱导 CTL 对该肿瘤细胞的特异性识别与杀伤,因此抗原蛋白的表达与机体免疫应答的关系更直接、更密切。本次实验研究采用免疫组化(IHC)技术,是 1 种更形象、直观的技术,能将抗原的定位等体现出来,准确地反映抗原本质;而且 IHC 技术在实验影响因素、实验条件的控制、操作的简易程度方面具有优越性,是研究本抗原表达及应用较合适的方法。

本次实验的结果显示,肺癌 MAGE-A3 抗原的阳性表达率为 60.4%(29/48),提示将 MAGE-A3 作为肺癌免疫靶向治疗靶抗原具有可行性。对于 MAGE-A3 抗原阳性的肺癌患者,可直接进行 MAGE-A3 的特异性免疫治疗。而对于 MAGE-A3 阴性的患者,是否可通过诱导表达或接种等途径而促使其表达,从而作为免疫治疗靶点,有待进一步的研究。目前,将 MAGE 抗原肽直接接种到肿瘤患者体内的研究在国外已经展开,并且在黑色素瘤、非小细胞肺癌、头颈部鳞癌等肿瘤患者中已进行了临床实验,为 MAGE 抗原肽更为广泛而有效地运用于肿瘤的治疗提供了依据^[8]。而联合 MAGE-A3 瘤苗治疗和手术切除的 I b 和 II 期 NSCLC 患者的多国联合实验已经开始进行^[9]。

本次实验中,肺癌 MAGE-A3 抗原表达的阳性率高于刘庆伦等^[10]的报道结果,而且本次实验中肺鳞癌组的阳性表达率低于腺癌组,与李秋泽等^[11]采用 RT-PCR 方法测得的 MAGE-A3 在肺鳞癌中表达较高的结果不一致,原因可能有以下几点:(1)影响抗原表达的因素有很多,所测定的标本处于不同的癌症进展阶段,从而使 MAGE-A3 的表达有差异。国外有研究表明,不同阶段的非小细胞肺癌患者 MAGE-A3 表达水平有明显不同,揭示肿瘤的进展与 MAGE-A3 抗原的表达有关^[12];另外,不同人种表达不同的 HLA 分子类型也会导致 MAGE-A3 表达的不同。(2)本次实验采用的研究方法是间接酶免疫组化法,实验的影响因素也可能导致一定的假阳性或假阴性,如切片的显色不好会影响到结果判断。(3)样本的抽样误差引起。

多项研究发现,在 MAGE-A3 抗原阳性的肺癌患者中,术后长期存活率明显高于 MAGE-A3 抗原阴性患者,而肿瘤转移率则明显低于阴性患者。本实验对 48 例肺癌的转移情况也进行了统计分析,结果发现肺癌淋巴结转移组和非淋巴结转移组的阳性率差异无统计学意义。探讨 MAGE-A3 表达与肺癌转移的相关性,有待于进一步大样本量的研究。

参考文献

[1] 程梅莲,刘峰,李小琴.血清内皮抑素水平在肺癌早期诊断中应用研究[J].国际检验医学杂志,2009,30(1):39-40.(下转第 1026 页)

组(CIN II ~CIN III)以高危型 HPV16、52、58、18、56 和 68 最为常见;55 例宫颈癌检出 10 种高危亚型 HPV,他们分别是 HPV16、33、18、58、56、52、59、35、53 和 66。虽然不同病变级别间感染型别存在差异,但高危型 HPV16、58、18、52、33 在不同病变级别组均占有一定优势,提示上述型别具有较高致病性,尤其是感染率最高的 HPV16 亚型,随宫颈病变级别的增高其感染率明显上升,在宫颈炎和低度病变组分别为 3.82% 和 4.60%,而在高度病变组和宫颈癌组的感染率高达 28.21% 和 56.36%,组间差异有统计学意义($P < 0.01$),说明 HPV16 致癌性更强。由此可见,HPV 基因型与宫颈癌病变程度明显相关,特别是高危型 HPV16、58、18、52、33 的持续性感染是导致宫颈癌发生的最主要原因之一^[9]。

目前,HPV 多重感染与宫颈病变关系的研究较少。据报道,HPV 在宫颈鳞癌组织中的检出率为 99%,在宫颈鳞状上皮中为 94%。HPV 多重感染与宫颈病变呈正相关,随着宫颈病变级别增加,多重感染呈上升趋势,但宫颈癌除外^[10]。多重感染表明,机体免疫清除机制清除病毒不利,预示病情进展。亦有研究显示,随宫颈病变级别增加,多重感染率趋于下降,且宫颈鳞癌 HPV 感染趋于单一高危型^[11]。HPV 感染有四重、五重,甚至七重感染报道,在相关的研究中,从正常组织到 CIN II 的不同病变中,多型别感染比例随病变级别上升逐渐增加,由宫颈炎的 7.3% 升高到 CIN III 的 14.3%,在 CIN II 及宫颈癌中比例有所下降,而仍高于宫颈炎组的比例。虽差异无统计学意义,但在一定程度上说明多型别感染对宫颈病变以及宫颈癌的发展起促进作用,有待进一步研究。本研究同时发现,HPV 多重感染有年龄集中趋势,小于 40 岁者 HPV 多重感染率较高($P < 0.05$),可能与性生活频率、性伴侣数量多有关。

本研究利用 DNA 杂交技术这一高通量基因检测技术,仅需 1 次扩增,即可同时检测 23 种高、低危型 HPV DNA。该方法具有高通量、高灵敏度、特异性好、可监测多重感染等优点,可用于宫颈癌等疾病的早期预警和诊断,适用于大规模临床筛查及推广应用^[12]。

参考文献

[1] Iftner T, Eberle S, Iftner A, et al. Prevalence of low-risk and high-risk types of human papillomavirus and other risk factors for HPV infection in Germany within different age groups in women up to 30 years of age: an epidemiological observational study[J]. J Med Virol, 2010, 82(11): 1928-1939.

[2] 虞善之, 马刚. 宫颈上皮内瘤变的临床研究进展[J]. 右江医学, 2009, 38(4): 489-491.

[3] 黄庆, 府伟灵, 周玉, 等. 基因芯片对人乳头瘤病毒的快速检测和分型[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(4): 476-478.

[4] 陈贤璟, 宋一一, 孙蓬明, 等. 全酿酒酵母 HPV16-E7 疫苗的构建及免疫原性研究[J]. 中国妇产科临床杂志, 2009, 10(2): 123-126.

[5] 姜晓曼, 黄民主, 张志魁, 等. HPV L1 壳蛋白在宫颈病变中的表达及与 HR-HPV DNA 的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(6): 554-556.

[6] Torres LA, Rojo HG, Torres RA, et al. Cervical cancer: current view of its epidemiology and risk factors[J]. Ginecol Obstet Mex, 2004, 72: 466-474.

[7] Ho GY, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural history of cervico-vaginal papillomavirus infection in young women[J]. N Eng J Med, 1998, 338(7): 423-428.

[8] 黄进波, 叶珊. 基因芯片检测人乳头瘤病毒 23 种亚型的应用评价[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2007, 21(2): 78-81.

[9] 孙蓬明, 陈贤璟, 林超琴, 等. 应用导流杂交基因芯片技术检测人乳头状瘤病毒亚型的临床意义[J]. 海峡预防医学杂志, 2010, 16(1): 4-7.

[10] 陶萍萍, 卞美璐, 李敏, 等. HPV 多重感染与宫颈病变关系探讨[J]. 妇产科临床杂志, 2006, 7(2): 94-96.

[11] Chang DY, Chen RJ, Lee SC, et al. Prevalence of single and multiple infection with human papillomaviruses in various grades of cervical neoplasia[J]. J Med Microbiol, 1997, 46(1): 54-60.

[12] 庞伟鸿, 刘红杏, 宁学玲, 等. 基因芯片检测技术在女性生殖道 HPV 分型感染中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(7): 630-631, 634.

(收稿日期: 2011-01-20)

(上接第 1023 页)

[2] 潘虹, 黄庆, 府伟灵. EGFR 信号通路基因突变与非小细胞肺癌的靶向性治疗[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(9): 869-871.

[3] Luo G, Huang S, Xie X, et al. Expression of cancer-testis genes in human hepatocellular carcinomas[J]. Cancer Immun, 2002, 2: 11.

[4] Li M, Yuan YH, Han Y, et al. Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(5): 1809-1814.

[5] 贾正才, 吴玉章. 肿瘤抗原 MAGE-A3 研究进展[J]. 免疫学杂志, 2001, 17(3): 28-31.

[6] 刘庆伦, 张昌卿, 冯凯涛. 非小细胞肺癌 MAGE-A3 基因产物的表达[J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 22(2): 138-140.

[7] 吴逸明, 巴月, 赵国强, 等. 肺癌组织中黑色素瘤抗原-3 基因 mRNA 的表达[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2002, 37(2): 153-156.

[8] Wang RF, Zheng G, Samuel FJ, et al. T cell-mediated immune re-

sponses in melanoma: implications for immunotherapy[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2002, 43(1): 1-11.

[9] 尤健, 王长利. 肺癌的免疫治疗进展[J]. 中国肿瘤临床, 2008, 35(17): 1015-1017.

[10] 刘庆伦, 张昌卿, 冯凯涛, 等. 非小细胞肺癌 MAGE-A3 抗原的表达[J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(2): 127-129.

[11] 李秋泽, 董子明, 赵国强, 等. 黑色素瘤抗原基因 MAGE-1、MAGE-3 和抑癌基因 p53 在肺癌中表达的研究[J]. 现代肿瘤医学, 2007, 15(8): 1106-1108.

[12] Sielen W, Varwerk C, Linder A, et al. Melanoma associated antigen(MAGE)-A3 expression in stages I and II non-small cell lung cancer: result of a multi-center study[J]. Eur J Candiorthorac Surg, 2004, 25(1): 131-134.

(收稿日期: 2011-03-05)