

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.04.013

MAGE-A9 和 MAGE-A11 基因在乳腺癌组织中的表达及其临床意义

侯淑芸^{1,2}, 桑梅香², 单保恩² (1. 河北医科大学第三医院 肿瘤科, 河北, 石家庄 050051; 2. 河北医科大学第四医院 科研中心, 河北, 石家庄 050011)

[摘要] **目的:**探讨黑素瘤抗原 MAGE-A9 和 MAGE-A11 在乳腺正常组织、乳腺良性病变、乳腺癌组织中的表达以及甲基化酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR) 和组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素 A (TSA) 对 MAGE-A9 和 MAGE-A11 基因表达的影响。**方法:**应用 RT-PCR 和免疫组化方法检测 60 例乳腺正常组织、60 例乳腺良性病变及 60 例乳腺癌组织 (标本均取自河北医科大学第四医院乳腺中心 2007 年 11 月至 2008 年 5 月乳腺手术治疗患者) 中 MAGE-A9 和 MAGE-A11 mRNA 及其蛋白的表达, 分析其与乳腺癌患者临床病理学特征的关系。RT-PCR 检测乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 经 5-Aza-CdR 和 TSA 单独或联合作用后 MAGE-A9 和 MAGE-A11 mRNA 表达量的变化。**结果:**乳腺癌组织中 MAGE-A9 mRNA 和蛋白阳性表达率分别为 45% (27/60) 和 43.3% (26/60), MAGE-A11 mRNA 和蛋白阳性表达率分别为 66.7% (40/60) 和 63.3% (38/60), 而乳腺正常组织及良性病变组织中均未发现 MAGE-A9、MAGE-A11 mRNA 及其蛋白的表达。MAGE-A9、MAGE-A11 mRNA 和蛋白的表达与乳腺癌患者的年龄、病理类型、临床分期、肿瘤大小、淋巴转移、瘤栓及孕激素受体的表达均无明显关系 ($P > 0.05$), 但与人表皮生长因子受体 2 (HER-2) 和雌激素受体 (ER) 的表达有关 ($P < 0.05$)。未经药物处理的 MCF-7、MDA-MB-231 细胞未见 MAGE-A9 和 MAGE-A11 mRNA 表达; 单用 5-Aza-CdR 处理后可见 MAGE-A9 和 MAGE-A11 基因重新表达, 联合应用 5-Aza-CdR 和 TSA 处理可使 MAGE-A9、MAGE-A11 基因的表达量进一步增加 ($P < 0.05$); 而 TSA 单独处理对基因表达没有影响 ($P > 0.05$)。**结论:**乳腺癌组织中 MAGE-A9 和 MAGE-A11 的表达与 ER 和 HER-2 的表达有关, 5-Aza-CdR 单用或联合应用 TSA 可诱导和增强 MAGE-A9 和 MAGE-A11 mRNA 的重新表达, 说明 DNA 的去甲基化和组蛋白乙酰化可能是调控人类肿瘤细胞 MAGE 表达的重要机制。

[关键词] 乳腺癌; MAGE-A9; MAGE-A11; 5-氮杂-2'-脱氧胞苷; 曲古抑菌素 A

[中图分类号] R737.9; R730.23

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)04-0428-09

Expression of melanoma antigen genes in human breast cancer: Association with major demographic and pathophysiologic variables and effect of drug treatment

Hou Shuyun^{1,2}, Sang Meixiang², Shan Baoen² (1. Department of Oncology, Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei, China; 2. Research Center, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** The purpose of our study was to analyze the expression of melanoma antigen genes MAGE-A9 and MAGE-A11 in benign and malignant breast cancer specimens and in breast cancer cell lines following drug treatment. **Methods:** Tissue specimens were obtained from tumor-free breast ($n = 60$), benign breast cancer ($n = 60$) and malignant breast cancer ($n = 60$), respectively. The mRNA abundance and protein content of MAGE-A9 and MAGE-A11 in these specimens were determined by RT-PCR and immunohistochemistry respectively and were analyzed for their associations with the major demographic, physiologic and pathologic variables. To examine the influence of chemotherapeutic drugs on MAGEs in breast cancer, MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR), a DNA methylase inhibitor, and trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor, either each alone or both together,

[基金项目] 河北省自然科学基金资助项目 (No. H2012206077)。Project supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. H2012206077)

[作者简介] 侯淑芸 (1980 -), 女, 河北石家庄人, 博士, 主治医师, 主要从事肿瘤免疫学研究, E-mail: hsymonkey@163.com

[通信作者] 单保恩 (Shan Baoen, corresponding author), E-mail: baoenshan1962@hotmail.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.3872/j.issn.1007-385X.2014.04.013.html>

and mRNA levels of *MAGE-A9* and *MAGE-A11* were assessed by RT-PCR. **Results:** *MAGE-A9* and *MAGE-A11* transcripts were detected in 45% and 66.7% of breast cancer specimens respectively and *MAGE-A9* and *MAGE-A11* proteins in 43.3% and 63.3% of cancer specimens, respectively. *MAGE-A9* and *MAGE-A11* expression was positively correlated with the expression of estrogen receptor (ER) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) in cancer specimens ($P < 0.05$). Neither transcripts nor proteins of *MAGE-A9* and *MAGE-A11* were detected in normal control specimens. While 5-Aza-CdR alone induced the expression of *MAGE-A9* and *MAGE-A11* in the test cell lines, TSA alone showed no effects. However, TSA was able to enhance 5-Aza-CdR-induced *MAGE-A* transcription ($P < 0.01$). **Conclusion:** *MAGE-A9* and *MAGE-A11* are tumor-specific antigens. Both DNA hypermethylation and histone deacetylation are possible mechanisms underlying *MAGE-A9* and *MAGE-A11* gene silencing.

[**Key words**] breast cancer; *MAGE-A9*; *MAGE-A11*; 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR); trichostatin A (TSA)

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(4): 428-436]

乳腺癌是世界上常见的恶性肿瘤,其治疗是当前肿瘤免疫学研究的热点。黑素瘤抗原基因(melanoma antigen gene, *MAGE*)是癌睾丸抗原(CTA)家族成员,其在除睾丸以外的正常人体组织中均不表达,但在多种肿瘤组织中高表达,其编码的抗原可被自体细胞毒性T淋巴细胞所识别,诱导出对相应肿瘤细胞的特异性杀伤,从而达到治疗肿瘤的目的。因此,*MAGE*抗原肽是一种CTL介导的肿瘤特异性免疫治疗的理想靶分子。基因表达的调控主要通过遗传学和表遗传学两种机制实现,表遗传学包括DNA甲基化和去甲基化、组蛋白乙酰化和去乙酰化。已有多种肿瘤的发生发展证明与基因的正常甲基化和乙酰化有关。本研究对乳腺正常组织、乳腺良性病变以及乳腺癌组织中*MAGE-A9*和*MAGE-A11*的表达情况进行了研究,并分析其与乳腺癌患者临床病理特征之间的关系;应用DNA甲基化抑制剂5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)和组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素A(trichostatin A, TSA)处理乳腺癌细胞,分析其对基因表达的影响,探索*MAGE-A9*和*MAGE-A11*表达的分子生物学机制。

1 材料与方法

1.1 标本来源

60例乳腺正常组织、60例乳腺良性病变(纤维瘤及腺病)及60例乳腺癌组织标本均随机取自河北医科大学第四医院乳腺中心2007年11月至2008年5月女性乳腺手术治疗的患者。全部病例均有完整的临床病理资料,包括患者的年龄、肿瘤大小、病理类型、临床分期、淋巴结转移、有无瘤栓、ER、PR及HER-2状态等。患者术前均未行放疗、化疗和内分泌治疗。乳腺正常组织为距离癌组织边缘5cm以上且外观正常的组织,所有标本均避开坏死、炎症部位,均经病理组织学检查证实。标本在手

术切除后立即放入液氮中速冻,随后迅速保存于 -80°C 冰箱。本研究经河北医科大学第四医院医学伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

60例乳腺癌患者,其中年龄 <40 岁的3例,40~60岁的38例, >60 岁的19例;按照1997年国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)乳腺癌TNM分期标准:I期9例,II期35例,III期16例;按照全国乳腺癌专业会议制定的病理分类方案:浸润性导管癌33例,浸润性小叶癌17例,乳腺髓样癌10例;肿瘤体积 $<2\text{ cm}^3$ 者24例,2~5 cm^3 者28例, $>5\text{ cm}^3$ 者8例;有淋巴结转移者36例,无淋巴结转移者24例;雌激素受体(estrogen receptor, ER)阳性者48例,ER阴性者12例,人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)阴性者(-/+)37例,HER-2阳性者(++/+++)23例;孕激素受体(progesterone receptor, PR)阳性者47例,阴性者13例;瘤栓阳性者25例,阴性者35例。

1.2 主要试剂

人乳腺癌细胞系MCF-7、MDA-MB-231由本实验室提供;RPMI1640培养基、L-15培养基购自GIBCO公司;5-Aza-CdR和TSA购自美国Sigma公司;TRIzol购自美国Invitrogen公司;反转录试剂盒、GoTaq Green Master Mix购自美国Fermentas公司;PCR引物由上海生物工程技术有限责任公司负责合成纯化;兔抗人*MAGE-A9*和*MAGE-A11*多克隆抗体均购自美国Epitomics公司。

1.3 细胞培养与抑制剂处理

人乳腺癌细胞系MCF-7用含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素、8% NaHCO_3 的RPMI 1640培养液、MDA-MB-231用含100 U/ml青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素、8% NaHCO_3 的L-15培养液,于 37°C 、5% CO_2 环境下培养,2~3 d用0.25%

胰蛋白酶消化传代一次。

取对数生长期细胞进行实验,用0.25%胰蛋白酶消化成细胞悬液,以40%~50%密度接种于细胞培养瓶中,分组如下:

对照组:同期培养的不加任何药物处理的细胞;实验组:(1)5-Aza-CdR组:5 μmol/L 5-Aza-CdR 培养72 h;(2)TSA组:0.5 μmol/L TSA 培养24 h;(3)5-Aza-CdR及TSA组:5 μmol/L 5-Aza-CdR 培养48 h后再加0.5 μmol/L TSA 继续培养24 h。细胞贴壁后24 h后按分组进行干预,对照组每24 h更换培养液一次,实验组每24 h更换含相应浓度5-Aza-CdR和(或)TSA的培养液一次。

1.4 RT-PCR检测乳腺正常组织、良性病变及癌组织中MAGE-A9和MAGE-A11 mRNA的表达

取新鲜组织标本及药物处理前后细胞,TRIzol试剂提取总RNA。RNA溶于去RNA酶水,紫外分

光光度法检测RNA浓度和纯度。纯度在1.8~2.0之间的为合格RNA。以5 μg总RNA作为模板,按试剂盒说明书行逆转录为cDNA,然后进行PCR扩增。PCR反应条件:MAGE-A9:95℃预变性3 min,95℃30 s,56℃30 s,72℃30 s,反应30个循环,最后72℃延伸5 min;MAGE-A11:95℃预变性3 min,95℃30 s,56℃30 s,72℃30 min,反应35个循环,最后72℃延伸5 min;GAPDH:95℃预变性3 min,95℃20 s,58℃20 s,72℃20 s,反应22个循环,最后72℃延伸5 min。PCR产物2%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪采集分析图片。用无菌双重蒸馏水作为空白对照,GAPDH为内参对照。将MAGE-A9和MAGE-A11与GAPDH吸光度值的比值作为其mRNA表达水平的相对值,计算条带的吸光度。实验重复3次,取其平均值进行分析。引物序列及扩增条件见表1。

表1 RT-PCR引物序列
Tab.1 Primer sequences for RT-PCR

Gene	Primer Sequence	Annealing (t/℃)	Length (bp)
MAGE-A9	Forward:5'-CGTTGAGTGTGATGGGGGTG-3'	56	245
	Reverse:5'-ATAAAGGGATGGGTAGCAGATGG-3'		
MAGE-A11	Forward:5'-CACCTCCCTCAACCTCTCTTATG-3'	56	411
	Reverse:5'-ACTCCCTCTCCCTCTCTCTCA-3'		
GAPDH	Forward:5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3'	58	247
	Reverse:5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'		

1.5 免疫组化法检测MAGE-A9和MAGE-A11蛋白的表达

按SP免疫组织化学试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)说明书操作方法,检测石蜡切片中MAGE-A9和MAGE-A11蛋白的表达。兔抗人MAGE-A9多克隆抗体以1:50稀释,兔抗人MAGE-A11多克隆抗体以1:200稀释,生物素化山羊抗兔二抗和辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素(三抗)为试剂盒中的原液。DAB显色后,苏木精复染,酒精梯度脱水,中性树胶封片。结果判断:细胞核或细胞质含棕黄色颗粒者为表达阳性细胞。按阳性细胞所占百分率分:<5%为0分,6%~10%为1分,11%~20%为2分,21%~50%为3分,>50%为4分;按阳性细胞的染色强度分:无染色(与背景颜色相似)为0分,轻度染色(淡黄色)为1分,中度染色(棕黄色)为2分,重度染色(棕褐色)为3分。以上2项评分之和作为该患者的总评分:≤2分为阴性,>2分为阳性。

1.6 统计学处理

采用SPSS13.0统计学软件,计数资料采用χ²检验和Fisher确切概率法,相关性分析采用Spearman's相关检验,一致性比较采用Kappa系数检验,计量资料采用完全随机的单因素方差分析,P<0.05或P<0.01表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MAGE-A9和MAGE-A11 mRNA在乳腺正常组织、良性病变、癌组织中的表达

60例乳腺癌组织中有40例MAGE-A11 mRNA表达阳性,阳性率为66.7%;有27例组织中MAGE-A9 mRNA表达阳性,阳性率为45%,而60例乳腺正常组织及60例乳腺良性病变组织中均未见MAGE-A9和MAGE-A11 mRNA表达,两者比较差异有统计学意义(P<0.01,见图1)。

2.2 MAGE-A9和MAGE-A11蛋白在乳腺正常组织、良性病变及癌组织中的表达

MAGE-A9和MAGE-A11蛋白均主要表达于乳

腺癌细胞的胞质中,部分表达于细胞核。60 例乳腺癌中有 26 例 *MAGE-A9* 蛋白表达阳性,阳性率为 43.3%;有 38 例 *MAGE-A11* 蛋白表达阳性,阳性率为 63.3%(图 2)。而 60 例乳腺正常组织及 60 例乳腺良性病变组织中均未见 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* 蛋白的表达(图 3,图 4)。

经 Spearman's 相关分析和 Kappa 系数检验得出,*MAGE-A9*($r = 0.967, K = 0.966, P = 0.000$)和 *MAGE-A11*($r = 0.929, K = 0.927, P = 0.000$)mRNA 与蛋白表达具有一致性,呈正相关。

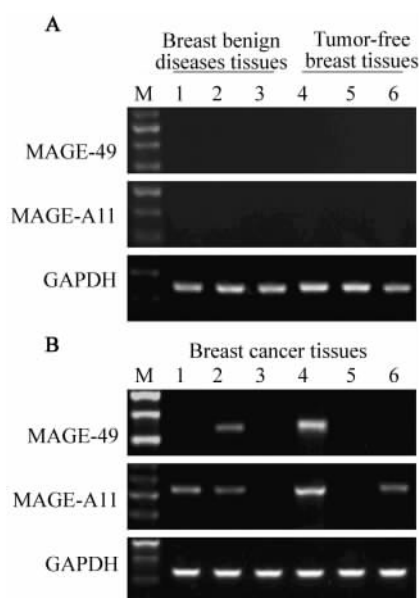


图 1 RT-PCR 法检测乳腺正常组织、良性病变、癌组织中 *MAGE-A9*,*MAGE-A11* mRNA 的表达

Fig. 1 The expression of *MAGE-A9*, *MAGE-A11* in human breast benign diseases tissues, tumor-free breast tissues and breast cancer tissues by RT-PCR analysis

A: Lanes 1-3, breast benign diseases tissues;
Lane 4-6, tumor-free breast tissues;
B: Breast cancer tissues; M: Marker

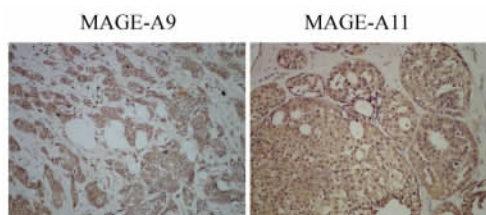


图 2 免疫组织化学法检测乳腺癌组织中 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* 蛋白的表达($\times 200$)

Fig. 2 Immunohistochemical analysis of *MAGE-A9* and *MAGE-A11* expression in human breast cancer tissues($\times 200$)

2.3 *MAGE-A9*、*MAGE-A11* mRNA 和蛋白表达与乳腺癌患者临床病理指标的关系

相关性分析结果(表 2)显示,*MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* mRNA 和蛋白表达与乳腺癌患者的年龄、病理类型、瘤栓、临床分期、肿瘤大小、淋巴转移、PR 表达均无明显关系($P > 0.05$),与 HER-2 和 ER 的表达有关($P < 0.05$);HER-2 和 ER 阳性的乳腺癌患者,其 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* mRNA 及其蛋白的阳性表达率均高于 HER-2 和 ER 阴性的乳腺癌患者。

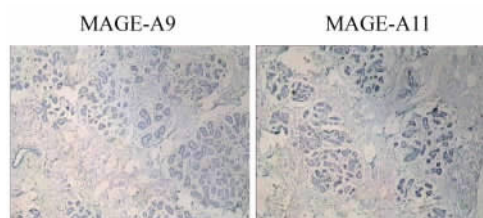


图 3 免疫组织化学法检测乳腺正常组织中 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* 蛋白的表达($\times 200$)

Fig. 3 Immunohistochemical analysis of *MAGE-A9* and *MAGE-A11* expressions in tumor-free breast tissue ($\times 200$)

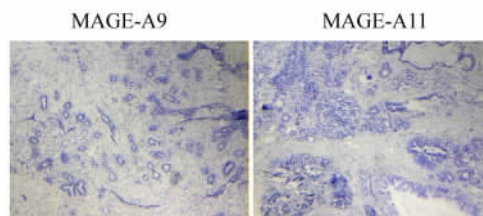


图 4 免疫组织化学法检测乳腺良性病变中 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* 蛋白的表达($\times 100$)

Fig. 4 Immunohistochemical analysis of *MAGE-A9* and *MAGE-A11* expressions in human breast benign diseases specimens($\times 100$)

2.4 抑制剂处理前后乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 细胞中 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* mRNA 表达水平的变化

RT-PCR 结果(图 5)显示,未经抑制剂处理的 MCF-7、MDA-MB-231 细胞未见 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* mRNA 表达。单用 5-Aza-CdR 后可见 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* 基因重新表达,与对照组相比差别有统计学意义($P < 0.01$)。与单独应用 5-Aza-CdR 相比较,联合应用 5-Aza-CdR 和 TSA 使 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* 基因表达进一步增加,差别有统计学意义($P < 0.01$)。TSA 单独作用对基因表达没有影响($P > 0.05$)。

表2 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* mRNA 表达与乳腺癌患者临床病理学特征的关系(*n*)

Tab. 2 Association between *MAGE-A9* and *MAGE-A11* mRNA expressions and the clinicopathological features of breast cancer patients (*n*)

Clinicopathological features	<i>N</i>	<i>MAGE-A9</i> mRNA		χ^2	<i>P</i> *	<i>MAGE-A11</i> mRNA		χ^2	<i>P</i> *
		+	-			+	-		
Ages(<i>t/a</i>)				2.372	0.366			0.399	0.895
<40	3	2	1			2	1		
40-60	38	19	19			26	12		
>60	19	6	13			12	7		
Tumor size (<i>V/cm</i> ³)				3.125	0.246			2.687	0.263
<2	24	8	16			13	11		
>2 and <5	28	16	12			21	7		
>5	8	3	5			6	2		
Pathological type				5.104	0.08			5.312	0.064
Invasive ductal breast cancer	33	19	14			26	7		
Invasive lobular breast cancer	17	6	11			8	9		
Medullary breast cancer	10	2	8			6	4		
Clinical stage				3.326	0.190			2.461	0.305
I	9	2	7			4	5		
II	35	19	16			24	11		
III	16	6	10			12	4		
Lymph node metastasis				0.180	0.672			1.250	0.264
Yes	36	17	19			26	10		
No	24	10	14			14	10		
Tumor embolus				2.095	0.148			0.549	0.459
+	25	14	11			18	7		
-	35	13	22			22	13		
ER				4.865	0.027			5.742	0.017
+	48	25	23			36	12		
-	12	2	10			4	8		
PR				1.358	0.244			0.601	0.438
+	47	23	24			33	14		
-	13	4	9			7	6		
HER-2				6.16	0.013			4.266	0.039
-/+	37	12	25			21	16		
++/###	23	15	8			19	4		

* Pearson's chi-square test or continuity corrected pearson's chi-square test or fisher's exact test

表 3 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* 蛋白表达与乳腺癌患者临床病理学特征的关系(*n*)Tab. 3 Association between *MAGE-A9* and *MAGE-A11* protein expressions and the clinicopathological features of breast cancer patients (*n*)

Clinicopathological features	<i>N</i>	<i>MAGE-A9</i>		χ^2	<i>P</i> *	<i>MAGE-A11</i>		χ^2	<i>P</i> *
		+	-			+	-		
Ages(<i>t/a</i>)				3.621	0.209			0.548	0.808
<40	3	2	1			2	1		
40-60	38	19	19			25	13		
>60	19	5	14			11	8		
Tumor size (<i>cm</i> ³)				4.188	0.116			2.943	0.231
<2	24	7	17			12	12		
>2 and <5	28	16	12			20	8		
>5	8	3	5			6	2		
Pathological type				4.186	0.122			3.257	0.203
Invasive ductal breast cancer	33	18	15			24	9		
Invasive lobular breast cancer	17	6	11			8	9		
Medullary breast cancer	10	2	8			6	4		
Clinical stage				2.658	0.273			4.232	0.117
I	9	2	7			3	6		
II	35	18	17			23	12		
III	16	6	10			12	4		
Lymph node metastasis				0.045	0.832			3.062	0.08
Yes	36	16	20			26	10		
No	24	10	14			12	12		
Tumor embolus				2.807	0.094			1.386	0.239
+	25	14	11			18	7		
-	35	12	23			20	15		
ER				4.344	0.037			4.311	0.038
+	48	24	24			34	14		
-	12	2	10			4	8		
PR				1.067	0.302			1.270	0.260
+	47	22	25			32	15		
-	13	4	9			6	7		
HER-2				4.671	0.031			5.967	0.015
- / +	37	12	25			19	18		
++/+++	23	14	9			19	4		

* Pearson's chi-square test or continuity corrected pearson's chi-square test or fisher's exact test

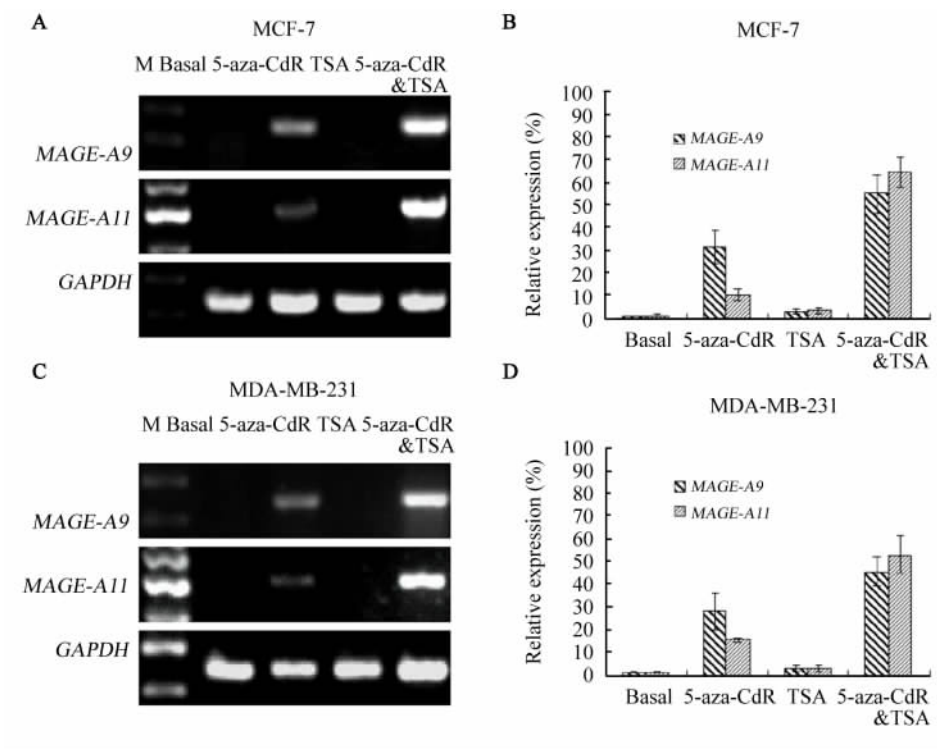


图5 5-Aza-CdR 和 TSA 作用前后 MCF-7、MDA-MB-231 细胞中 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* mRNA 表达变化
 Fig. 5 RT-PCR analysis for *MAGE-A9* and *MAGE-A11* mRNA expressions in cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 before and after treatment with 5-aza-CdR and/or TSA

3 讨论

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤,目前治疗仍以手术为主,放、化疗和内分泌治疗为辅。然而对于肿瘤的复发、转移以及晚期肿瘤却难以获得理想疗效,因此,建立特异性的肿瘤免疫疗法,使其成为重要的辅助治疗甚至主要治疗手段是目前研究的热点。而鉴定合适的靶抗原是抗原特异性肿瘤免疫治疗的第一步,也是最关键的一步。肿瘤抗原成为肿瘤免疫治疗靶点的重要条件是,其在肿瘤组织中高表达,但在正常组织中不表达或表达具有高度限制性,从而避免在肿瘤治疗的过程中发生自身免疫性疾病^[1]。*MAGE* 基因是 Van der bruggen 等^[2]于 1991 年从黑色素瘤细胞系中发现并分离出的第一个人类肿瘤特异性抗原基因,迄今为止,已有 60 多种 *MAGE* 抗原被相继发现^[3]。根据 *MAGE* 表达特异性和基因结构的不同,将 *MAGE* 家族分成了两个亚类,即 *MAGE-I* 和 *MAGE-II*^[4-5]。*MAGE-I* 类抗原为肿瘤特异性抗原,在除睾丸和胎盘以外的正常人体组织中均不表达,但在多种肿瘤组织中高表达^[6],*MAGE-II* 类抗原在正常的成人体细胞中均普遍表

达,因此不属于 CTA 的范畴^[7]。*MAGE-I* 包括 *MAGE-A*、*MAGE-B* 和 *MAGE-C* 亚家族;*MAGE-II* 包括 *MAGE-D*、*MAGE-E* 亚家族。其中,*MAGE-A* 亚家族包括 12 个成员 *MAGE-A1* ~ *MAGE-A12*^[8]。*MAGE-A* 亚家族具有更加严格的肿瘤特异性表达模式,因此成为了近年来肿瘤免疫学研究的热点。目前,研究最多、最深入的 *MAGE* 基因是 *MAGE-A1*、*MAGE-A3*、*MAGE-A4*。这些分子除在黑色素瘤^[9]中表达外,在乳腺癌^[10]、肝细胞癌^[11]、膀胱癌^[12]、非小细胞肺癌^[13]、结肠癌^[14]、宫颈癌^[15]、卵巢肿瘤^[16]中也均有表达。然而,关于该家族其他成员的研究报道还不多见,对 *MAGE-A* 家族在亚洲乳腺癌人群中表达的相关研究更是极少。

本研究首次采用 RT-PCR 和免疫组化的方法从基因和蛋白水平研究了 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* 在 60 例乳腺正常组织、乳腺良性病变和乳腺癌组织中的表达情况及其与临床病理特征的关系。结果显示,60 例乳腺癌组织中 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* mRNA 阳性表达率分别为 45% 和 66.7%,蛋白阳性表达率分别为 43.3% 和 63.3%,而所有的乳腺良性病变及乳腺正常组织中均未发现 *MAGE-A9* 和 *MAGE-*

A11 mRNA 和蛋白的表达,说明 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* 可作为肿瘤特异性抗原监测乳腺癌的发生,以及刺激机体产生免疫应答,进行肿瘤免疫治疗。*MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* mRNA 和蛋白的表达与乳腺癌患者的年龄、病理类型、临床分期、肿瘤大小、淋巴转移、瘤栓及 PR 的表达均无明显关系,而与 HER-2 和 ER 的表达有关,HER-2 和 ER 阳性的乳腺癌患者,其 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* mRNA 及蛋白的阳性表达率均高于 HER-2 和 ER 阴性的乳腺癌患者。ER 与乳腺癌的发生、发展及预后密切相关,并可指导乳腺癌患者的内分泌治疗^[17],HER-2 阳性表达是提示乳腺癌患者预后不良的一个重要指标,以及临床应用曲妥珠单抗等靶向药物的靶点^[18-20]。因此推测,*MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* 高表达也可能是乳腺癌患者预后不良的一个重要标志,并可能成为乳腺癌治疗的一个参考指标。当然,对于上述推论还需通过更多的病例研究来进一步证实。

关于 *MAGE* 表达的确切机制目前还不十分清楚。研究表明,人类体细胞中 *MAGE* 基因高度甲基化,而在胚胎细胞和恶性肿瘤细胞中则可能发生去甲基化而获得表达,*MAGE-A1* 基因启动子区 CpG 岛的甲基化/去甲基化是调控其表达的重要机制,应用 5-Aza-CdR 可诱导不表达 *MAGE* 的细胞重新获得表达^[21-22]。*MAGE* 基因的表达与组蛋白的乙酰化状态也有关系。组蛋白去乙酰化酶可通过甲基化 CpG 结合蛋白(MeCP2)连接在甲基化的 DNA 序列上,提高组蛋白去乙酰化酶活性,实现和 DNA 甲基化相互作用,使基因不易转录^[23-24]。Picard 等^[25]发现联合应用 DNA 甲基化酶抑制剂 5-Aza-CdR 和组蛋白去乙酰化酶抑制剂 MS-275 可协同增强膀胱癌细胞中 *MAGE-A9* 基因的表达。Wischniewski 等^[26]使用 5-Aza-CdR 和 TSA 分别处理肝癌、乳腺癌、结肠癌及前列腺癌细胞株,发现二者能协同诱导 *MAGE-A1*、*-A2*、*-A3* 和 *A12* 的表达,证明启动子的去甲基化和组蛋白乙酰化调控着人肿瘤细胞 *MAGE* 的表达。然而对于 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* 基因表达的调控机制的研究还未见报导。

本研究应用 5-Aza-CdR 和 TSA 处理乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 细胞株,探索 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* 基因表达的机制。5-Aza-CdR 作为甲基化抑制剂可抑制 DNA 甲基化,改变核染色质结构,进而恢复基因的表达;TSA 是一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂,除了抑制组蛋白去乙酰化酶活性外,还具有抗肿瘤效应,可诱导肿瘤细胞凋亡^[27-28]。未经药物处理的 MCF-7、MDA-MB-231 细胞未见 *MAGE-A9*

和 *MAGE-A11* mRNA 表达。单用 5-Aza-CdR 后可见 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* 基因重新表达,提示 DNA 去甲基化是 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* 基因表达的重要机制。TSA 单独作用对基因表达没有影响,而应用 5-Aza-CdR 培养 48 h 后加 TSA 继续培养 24 h,可使 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* 基因获得更显著的表达。因此推测,组蛋白的乙酰化和 DNA 的去甲基化在 *MAGE* 基因的表达中具有协同作用,但 DNA 去甲基化可能扮演主导作用,组蛋白乙酰化作用可能是 DNA 甲基化的继发事件。*MAGE* 基因在胚胎的发育过程中起着重要作用,胚胎结束后 *MAGE* 基因失活,其失活机制可能就是 DNA 甲基化和组蛋白去乙酰化;发生肿瘤时 *MAGE* 基因再次活化表达,并成为能被免疫系统识别和攻击的靶点^[29]。

总之,*MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* 特异性的表达于乳腺癌组织中,与乳腺癌患者的 HER-2 和 ER 的表达有关,提示 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* 基因在乳腺癌的发生发展中扮演了癌基因的角色,可成为乳腺癌诊断和提示预后的指标,也可作为肿瘤免疫治疗的新靶点。*MAGE-A3* 的多肽疫苗已进入 IV 期临床研究阶段,它可诱导特异性 CTL 的产生,使部分病人的肿瘤有所缩小甚至完全消退^[30-32]。组蛋白的乙酰化和 DNA 的去甲基化是 *MAGE-A9* 和 *MAGE-A11* 获得表达的重要机制。*MAGE* 基因的活化与肿瘤的发生密切相关,因此可以将 DNA 甲基化酶抑制剂和组蛋白去乙酰化酶抑制剂和传统的放、化疗联合应用来治疗肿瘤,这样即可减少各自毒性,又能获得更好的疗效,为治疗肿瘤开辟新的领域。

[参考文献]

- [1] Sang M, Lian Y, Zhou X, et al. MAGE-A family: attractive targets for cancer immunotherapy [J]. Vaccine, 2011, 29 (47): 8496-8500.
- [2] 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): 1643-1647.
- [3] Meek DW, Marcar L. MAGE-A antigens as targets in tumour therapy [J]. Cancer Lett, 2012, 324 (2): 126-132.
- [4] Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, et al. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5 (8): 615-625.
- [5] Chomez P, De Backer O, Bertrand M, et al. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family [J]. Cancer Res, 2001, 61 (14): 5544-5551.
- [6] Jungbluth AA, Busam KJ, Kolb D, et al. Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer [J]. Int J Cancer, 2000, 85 (4): 460-465.
- [7] Ohman Forslund K, Nordqvist K. The melanoma antigen genes-

any clues to their functions in normal tissues? [J]. *Exp Cell Res*, 2001, 265 (2): 185-194.

[8] De Plaen E, Arden K, Traversari C, et al. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family [J]. *Immunogenetics*, 1994, 40 (5): 360-369.

[9] Riker AI, Enkemann SA, Fodstad O, et al. The gene expression profiles of primary and metastatic melanoma yields a transition point of tumor progression and metastasis [J]. *BMC Med Genomics*, 2008, 28 (1): 13.

[10] Otte M, Zafrakas M, Riethdorf L, et al. MAGE-A gene expression pattern in primary breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2001, 61 (18): 6682-6687.

[11] Chen H, Cai S, Wang Y, et al. Expression of the MAGE-1 gene in human hepatocellular carcinomas [J]. *Clin Med J (Engl)*, 2000, 113 (12): 1112-1118.

[12] 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): 1365-1371.

[13] Peikert T, Specks U, Farver C, et al. Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2006, 66 (9): 4693-4700.

[14] Kim KH, Choi JS, Kim IJ, et al. Promoter hypomethylation and reactivation of MAGE-A1 and MAGE-A3 genes in colorectal cancer cell lines and cancer tissues [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12 (35): 5651-5657.

[15] Napolitano C, Bellati F, Tarquini E, et al. MAGE-A and NY-ESO-1 expression in cervical cancer: prognostic factors and effects of chemotherapy [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2008, 198(1): 99.

[16] Yakirevich E, Sabo E, Lavie O, et al. Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9 (17): 6453-6460.

[17] Yan L, Yang X, Davidson NE. Role of DNA methylation and histone acetylation in steroid receptor expression in breast cancer [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2001, 6 (2): 183-192.

[18] Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, et al. Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3 (4): 379-398.

[19] Yeon CH, Pegram MD. Anti-erbB-2 antibody trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer [J]. *Invest New Drugs*, 2005, 23 (5): 391-409.

[20] Rabindran SK. Antitumor activity of HER-2 inhibitors [J]. *Cancer Letters*, 2005, 227 (1): 9-23.

[21] De Smet C, Lurquin C, Lethé B, et al. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(11): 7327-7335.

[22] Weiser TS, Ohnmacht GA, Guo ZS, et al. Induction of MAGE-3 expression in lung and esophageal cancer cells [J]. *Ann Thorac Surg*, 2001, 71 (1): 295-301.

[23] Bestor TH. Gene silencing. Methylation meets acetylation [J]. *Nature*, 1998, 393 (6683): 311-312.

[24] Billard LM, Magdinier F, Lenoir GM, et al. MeCP2 and MBD2 expression during normal and pathological growth of the human mammary gland [J]. *Oncogene*, 2002, 21 (17): 2704-2712.

[25] Picard V, Bergeron A, Larue H, et al. MAGE-A9 mRNA and protein expression in bladder cancer [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120 (10): 2170-2177.

[26] Wischnewski F, Pantel K, Schwarzenbach H. Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in human cancer cells [J]. *Mol Cancer Res*, 2006, 4(5):339-349.

[27] Donadelli M, Costanzo C, Faggioli L, et al. Trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylases, strongly suppresses growth of pancreatic adenocarcinoma cells [J]. *Mol Carcinog*, 2003, 38 (2): 59-69.

[28] Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, et al. Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005, 45:495-528.

[29] Sang M, Wang L, Ding C, et al. Melanoma-associated antigen genes-an update [J]. *Cancer Lett*, 2011, 302 (2): 85-90.

[30] Gajewski TF, Fallarino F, Ashikari A, et al. Immunization of HLA-A²⁺ melanoma patients with MAGE-3 or MelanA peptide-pulsed autologous peripheral blood mononuclear cells plus recombinant human interleukin 12 [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7 (3 Suppl): 895s-901s.

[31] Marchand M, Punt CJ, Aamdal S, et al. Immunisation of metastatic cancer patients with MAGE-3 protein combined with adjuvant SBAS-2: a clinical report [J]. *Eur J Cancer*, 2003, 39 (1): 70-77.

[32] Karanikas V, Lurquin C, Colau D, et al. Monoclonal anti-MAGE-3 CTL responses in melanoma patients displaying tumor regression after vaccination with a recombinant canarypox virus [J]. *J Immunol*, 2003, 171 (9): 4898-4904.

[收稿日期] 2014 -02 -25 [修回日期] 2014 -05 -30
 [本文编辑] 阮芳铭

本期广告目录

沈阳三生制药有限责任公司	封二
德国美天旎生物技术有限公司	封三
碧迪医疗器械有限公司	封四
上海细胞治疗工程技术研究中心有限公司	前插页