

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.09.016

MAGE-A9 在结直肠癌中的表达及临床意义*

陈建平¹, 陈 茜², 施秀英¹, 关 茜¹, 孔 俊¹, 张 曙³, 朱慧君³, 王旭东^{1△}

(1. 南通大学附属医院检验科, 江苏南通 226001; 2. 南通大学公共卫生学院医学检验系, 江苏南通 226019; 3. 南通大学附属医院病理科, 江苏南通 226001)

[摘要] **目的** 观察黑色素瘤相关抗原家族(MAGE)-A9 在结直肠癌组织中的表达变化, 并探讨其意义。**方法** 收集 2006 年 1 月至 2008 年 12 月南通大学附属医院初诊的 203 例结直肠癌患者标本, 采用实时定量聚合酶链反应分析(qRT-PCR)检测结直肠癌患者癌组织及其对应癌旁正常组织中 MAGE-A9 mRNA 的表达。通过免疫组织化学法检测 203 例结直肠癌与其对应癌旁组织中 MAGE-A9 蛋白的表达, 并分析其与结直肠癌临床病理特征及患者预后的相关性。**结果** MAGE-A9 在结直肠癌组织中阳性率高于癌旁正常结直肠组织($P < 0.05$)。MAGE-A9 蛋白表达与肿瘤分化程度($P = 0.011$)、TNM 分期($P = 0.003$)、肿瘤浸润深度($P = 0.001$)和淋巴结转移($P = 0.003$)等临床病理特征有关。生存分析显示 MAGE-A9 表达与结直肠癌患者预后关系密切。**结论** MAGE-A9 在结直肠癌组织中表达增加, 提示预后不良。

[关键词] 黑色素瘤相关抗原家族-A9; 结直肠肿瘤; 逆转录聚合酶链反应; 免疫组织化学; 生存分析

[中图分类号] R446.61 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)09-1200-04

Expression of MAGE-A9 in colorectal cancer and its clinical significance*

CHEN Jianping¹, CHEN Qian², SHI Xiuying¹, GUAN Qian¹, KONG Jun¹, ZHANG Shu³, ZHU Huijun³, WANG Xudong^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China; 2. Faculty of Laboratory Medicine, School of Public Health, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226019, China; 3. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

[Abstract] **Objective** To observe the expression change of melanoma-associated antigen(MAGE)-A9 in colorectal cancer (CRC) tissue and to explore its significance. **Methods** The samples in 23 cases of initially diagnosed CRC in the Affiliated Hospital of Nantong University from January 2006 to December 2008 were collected. The quantitative real-time(qRT)-PCR was adopted to detect MAGE-A9 mRNA expression in cancer tissue and corresponding paracancerous tissue. Its correlation with the clinicopathological features and prognosis was analyzed. **Results** The positive rate of MAGE-A9 in CRC tissue was significantly higher than that in paracancerous normal tissue($P < 0.05$). MAGE-A9 protein expression in CRC was related to the clinicopathological features such as tumor differentiation degree($P = 0.011$), TNM stage($P = 0.003$), tumor infiltration depth($P = 0.001$) and lymph node metastasis($P = 0.003$). The survival analysis showed that the expression of MAGE-A9 was closely related to the prognosis of CRC patients. **Conclusion** MAGE-A9 expression is increased in CRC tissue, suggesting the poor prognosis.

[Key words] melanoma-associated antigen-A9; colorectal neoplasia; reverse transcriptase polymerase chain reaction; immunohistochemistry; survival analysis

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是一种全球最常见的消化道恶性肿瘤,是世界第3高发恶性肿瘤,其病死率居恶性肿瘤第4位^[1]。在过去的几十年里,尽管各种检测方法、新型外科技术、辅助疗法及靶向生物疗法等技术迅猛发展使得CRC患者的5年生存率有所提高,但是CRC患者总体生存率仍然较低^[2]。因此,深入研究CRC发生、发展的相关基因,寻找CRC早期诊断及治疗的有效生物靶点,不仅具有重要的研究价值,而且具有巨大的临床应用前景。黑色素瘤相关抗原家族(melanoma-associated antigen, MAGE)首先从黑色素瘤中发现,是一组肿瘤相关抗原^[3],目前已经发现了60多个成员。MAGE-A是MAGE的亚家族, MAGE-A基因在多种肿瘤异常表达^[4]。MAGE-A9是新近被发现的MAGE-A家族的成员,研究发现其在黑色素瘤、喉癌、非小细胞肺癌、多发性骨髓瘤及肝癌中异常表达,并且与肿瘤的发生、发展密切相关^[5-6]。但是,目前有关MAGE-A9在CRC组织中的表达及其临床意

义的相关报道较少。本研究拟观察MAGE-A9在CRC组织及相邻癌旁组织中的表达变化,以及其与患者预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 以2006年1月至2008年12月在南通大学附属医院行手术治疗、临床资料完整且保留蜡块的203例CRC患者为研究对象,男130例,女73例;年龄45~83岁(中位年龄64.1岁)。所有CRC患者在手术前均未经相关抗肿瘤治疗,如放疗、化疗或手术前免疫治疗等,并排除死于术后并发症的患者。所有标本诊断标准、组织学类型和临床分期按照2003版WHO肿瘤组织学分类标准及美国癌症联合委员会和国际抗癌联盟分期系统分别进行病理分类及TNM分期^[7-8]。每份组织标本由该院两名病理学医师进行病理诊断。本次研究所有患者均签署知情同意书,并经过该院人类研究伦理委员会批准。

1.2 方法

* 基金项目:南通市科技计划资助项目(MS22015055)。 作者简介:陈建平(1982-),主管技师,硕士,主要从事临床免疫检验工作。

△ 通信作者, E-mail: Wnagxudong88@hotmail.com。

1.2.1 qRT-PCR 测定 MAGE-A9 mRNA 表达通过实时定量聚合酶链反应分析(qRT-PCR)进行测定。选取 23 例新鲜 CRC 及相应癌旁正常组织标本, TRIZOL(美国 Life Technologies 公司)提取 RNA。按试剂盒说明书进行逆转录为 cDNA, 后进行 PCR 扩增。PCR 反应条件如下: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 反应 40 个循环。以 GAPDH 作为内参, 比较癌组织及癌旁组织 MAGE-A9 基因相对表达量。GAPDH 引物如下: 5'-CAA TGA CCC CTT CAT TGA CC-3' (上游引物)和 5'-GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG-3' (下游引物), 202 bp。MAGE-A9 基因特异性引物如下: 5'-CAC TGT ATG TCA TCT CTG-3' (上游引物)和 5'-ACT ACT GTC ATT CAT TAA CT-3' (下游引物), 280 bp。试验重复 3 次, 取平均值进行分析。

1.2.2 免疫组织化学染色 本研究采用 EnVision 二步法进行免疫组织化学染色分析, 试剂盒选购于北京中杉金桥生物技术有限公司。严格按照操作说明书进行石蜡切片中 MAGE-A9 蛋白检测。MAGE-A9 兔抗人单克隆抗体购自美国 San Diego 公司, 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。显色液进行免疫组织化学显色, 不定时在显微镜下观察显色程度; 苏木素复染, 梯度乙醇脱水后封片、拍照。阴性对照以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗。由该院病理科医师阅片, 每张切片随机取 5 个 400 倍视野。按着色强度评分如下: 细胞无着色得 0 分, 细胞着浅黄色得 1 分, 细胞着棕黄色得 2 分, 细胞着棕褐色得 3 分。按阳性细胞比例评分如下: 阳性细胞百分比 0%~10% 得 1 分, 阳性细胞百分比大于 10%~50% 得 2 分, 阳性细胞百分比大于 50%~80% 得 3 分, 阳性细胞百分比大于 80%~100% 得 4 分。将细胞着色强度和阳性细胞比例的乘积作为 MAGE-A9 着色分数结果进行判读: ≥ 3 判为高表达, < 3 判为低表达^[9-10]。

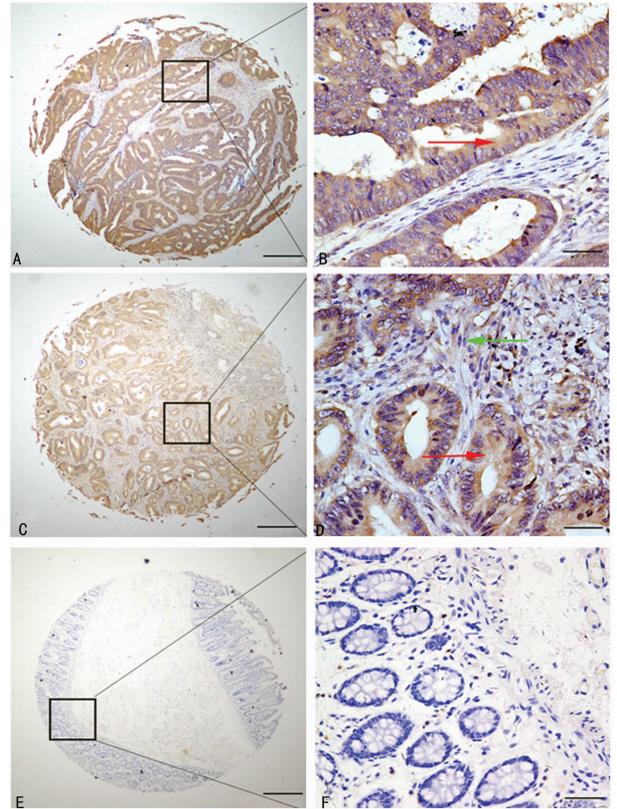
1.3 统计学处理 所有数据应用 SPSS20.0 软件进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用配对 *t* 检验分析; 计数资料采用率表示, 比较通过 χ^2 检验进行评估; 生存曲线采用 Kaplan-Meier 分析; 单因素及多因素分析采用 Cox 回归模型进行分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MAGE-A9 mRNA 在癌组织及癌旁组织中的表达 MAGE-A9 mRNA 在癌组织和癌旁组织中的相对表达水平分别是 44.92 ± 8.03 和 3.81 ± 0.93 ($P < 0.05$)。MAGE-A9 mRNA 在癌组织中的表达是癌旁组织中的 11.8 倍。

2.2 MAGE-A9 蛋白在癌组织及癌旁组织中的表达 免疫组织化学结果显示, MAGE-A9 蛋白在癌组织和癌旁组织中的高表达率分别是 83.25% (169/203) 和 15.76% (32/203), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。MAGE-A9 蛋白主要定位于 CRC 细胞的细胞质(图 1), 个别 CRC 组织标本中 MAGE-A9 蛋白定位于间质细胞。

2.3 MAGE-A9 在 CRC 组织的表达与患者临床病理参数的关系 CRC 组织中高表达的 MAGE-A9 与患者肿瘤分化程度、TNM 分期、肿瘤浸润深度和淋巴结转移有关 ($P < 0.05$), 见表 1, 而与患者年龄、性别、肿瘤位置、组织学类型及术前 CEA 水平临床病理参数无关。另外, 有 5 例病例存在远处转移。



A、B、C、D: CRC 组织中 MAGE-A9 呈阳性表达; E、F: MAGE-A9 在癌旁组织中呈阴性表达; 红色箭头: MAGE-A9 定位于细胞质; 绿色箭头: MAGE-A9 定位于间质细胞; A、C、E: $\times 40$; B、D、F: $\times 400$

图 1 免疫组织化学法检测 CRC 组织和癌旁组织中 MAGE-A9 蛋白的表达

表 1 CRC 组织中 MAGE-A9 表达与患者临床病理特征的关系[n(%)]

项目	n	低表达(n=94)	高表达(n=109)	r	P
性别				3.304	0.069
男	130	54(41.54)	76(58.46)		
女	73	40(54.79)	33(45.21)		
年龄(岁)				0.137	0.711
<60	75	36(48.00)	39(52.00)		
≥ 60	128	58(45.31)	70(54.69)		
位置				2.508	0.113
结肠	153	66(43.14)	87(56.86)		
直肠	50	28(56.00)	22(44.00)		
组织学类型				0.348	0.555
腺癌	182	83(45.60)	99(54.40)		
其他 ^a	21	11(52.38)	10(47.60)		
分化程度				6.462	0.011
低	34	9(26.47)	25(73.53)		
高、中度	169	85(50.30)	84(49.70)		
TNM 分期				11.497	0.003
0~I	46	31(67.39)	15(32.61)		
II	80	35(43.75)	45(56.25)		
III~IV	77	28(36.36)	49(63.64)		
浸润深度				13.207	0.001
Tis+ T1	7	3(42.86)	4(57.14)		
T2	44	31(70.45)	13(29.55)		
T3,4b	152	60(39.47)	92(60.53)		
淋巴结转移				13.960	0.003
N0	125	66(52.80)	59(47.20)		

续表 1 CRC 组织中 MAGE-A9 表达与患者临床病理特征的关系[n(%)]

项目	n	低表达(n=94)	高表达(n=109)	r	P
N1a	38	19(50.00)	19(50.00)		
N1b	20	7(35.00)	13(65.00)		
N1c,2a,b	20	2(10.00)	18(90.00)		
术前 CEA(ng/mL)				1.219	0.270
≤15	121	59(48.76)	62(51.24)		
>15	27	10(37.04)	17(62.96)		
不确定	55	25(45.45)	30(54.55)		

a: 混合腺癌(管状、黏液状)10 例;黏液癌 8 例;印戒细胞癌 2 例;腺鳞癌 1 例

2.4 MAGE-A9 的表达与 CRC 患者预后的关系 基于单因素 Cox 回归分析,MAGE-A9 表达是 CRC 患者不良预后的危险因素($P<0.01$),肿瘤部位、肿瘤分化、TNM 分期、肿瘤浸润深度、淋巴结转移及术前 CEA 水平均是影响 CRC 患者预后的相关因素($P<0.01$),见表 2。对上述影响患者预后的因素进一步进行多因素 Cox 风险比例函数模型分析。结果表明,MAGE-A9 表达、肿瘤部位、肿瘤分化、TNM 分期和术前 CEA

水平是影响 CRC 患者预后的主要因素,见表 2。Kaplan-Meier 法生存曲线显示高表达 MAGE-A9 组 CRC 患者的生存时间明显低于低表达 MAGE-A9 组($P<0.01$)。结肠肿瘤、低分化肿瘤、晚期 TNM 分期及术前高 CEA 水平患者的生存时间明显较短($P<0.01$),见图 2。

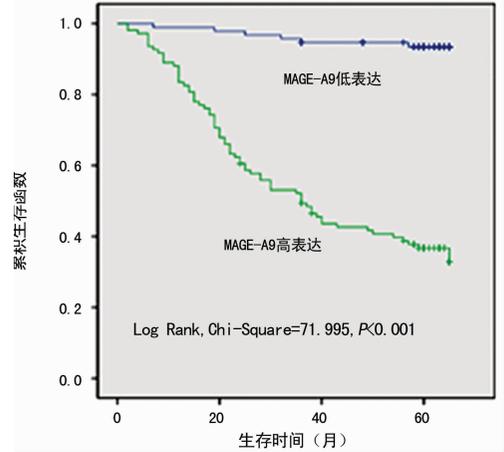


图 2 MAGE-A9 蛋白不同表达患者的生存曲线图

表 2 单因素和多因素分析临床病理特征对 5 年生存预后的影响

项目	单因素分析			多因素分析		
	n	P	95% CI	HR	P	95% CI
MAGE-A9 表达		<0.01	6.537~34.776	9.005	<0.01	3.766~21.536
高	109					
低	94					
年龄(岁)		0.736	0.678~1.735			
<60	75					
≥60	128					
性别		0.114	0.408~1.101			
男	130					
女	73					
位置		<0.01	2.044~6.099	2.601	0.004	1.369~4.942
结肠	153					
直肠	50					
组织学类型		0.350	0.292~1.547			
腺癌	182					
其他 ^a	21					
分化程度		<0.01	0.195~0.513	0.417	0.004	0.231~0.751
高、中分化	169					
低分化	34					
TNM 分期		<0.01	1.594~3.128	2.111	0.019	1.129~3.948
0~I	46					
II	80					
III~IV	77					
浸润深度		<0.01	2.673~19.244			
Tis+T1	7					
T2	44					
T3+4a	152					
淋巴结转移		<0.01	1.214~1.785			
N0	125					
N1a	38					
N1b	20					
N1c,N2a,2b	20					
术前 CEA(ng/mL)		<0.01	1.691~5.210	2.525	0.002	1.392~4.580
>15	27					
≤15	121					

续表 2 单因素和多因素分析临床病理特征对 5 年生存预后的影响

项目	单因素分析			多因素分析		
	<i>n</i>	<i>P</i>	95% <i>CI</i>	<i>HR</i>	<i>P</i>	95% <i>CI</i>
淋巴结阴性病例		0.634	0.689~3.127			
MAGE-A9 高表达	59					
MAGE-A9 低表达	66					

a:混合腺癌(管状、黏液状)10 例;黏液癌 8 例;印戒细胞癌 2 例;腺鳞癌 1 例

3 讨 论

MAGE 是从黑色素瘤细胞系中发现并分离出的肿瘤特异性抗原基因^[3]。MAGE 基因分为 MAGE-I 和 MAGE-II 两大亚组^[3]。MAGE-A 为 MAGE-I 的成员之一。MAGE-A1~MAGE-A12 是 MAGE-A 家族的几个亚型,其中 MAGE-A1 和 MAGE-A3 是科学家们研究较为透彻的两个亚型^[4,7]。近年来研究发现 MAGE-A9 在肝癌、食管腺癌、喉鳞状细胞癌等人类多种肿瘤组织中存在异常表达,并且与恶性肿瘤的侵袭转移、不良预后密切相关^[5-6]。有研究发现在某些肿瘤中 MAGE-A9 是进行个性化免疫疗法的潜在靶点^[8-10]。

在本次研究中,本课题组运用 qRT-PCR 法及免疫组织化学法分别检测了 MAGE-A9 mRNA 和 MAGE-A9 蛋白在 CRC 肿瘤组织和相应癌旁组织中的表达差异。结果显示 MAGE-A9 mRNA 和蛋白在 CRC 患者肿瘤组织中的表达均明显高于癌旁组织。这些发现表明 MAGE-A9 在人类肿瘤中的多态性,预示 MAGE-A9 可能与肿瘤的发展和进程有关。

本研究比较分析了 MAGE-A9 表达与 CRC 患者临床病理参数及临床预后的关系。分析发现 MAGE-A9 高表达提示 CRC 患者肿瘤低分化、较晚的 TNM 分期或淋巴结转移。本次研究中只发现 5 例远处转移病例,由于样本量较少,因此没有评估 MAGE-A9 和远处转移的关系。这些结果表明 MAGE-A9 可能在 CRC 的发生、发展中起了重要作用。运用 Cox 比例风险回归模型进行单因素预后分析表明 MAGE-A9 表达、肿瘤部位、肿瘤分化、TNM 分期、肿瘤浸润深度、淋巴结转移及术前 CEA 水平与 CRC 患者预后有关。多因素预后分析进一步表明 MAGE-A9 高表达、肿瘤位置、肿瘤分化、TNM 分期和术前 CEA 水平都是影响 CRC 患者预后的主要独立因素。使用 Kaplan-Meier 法分析显示,MAGE-A9 低表达组 CRC 患者比 MAGE-A9 高表达组 5 年生存率长。这意味着 MAGE-A9 高表达提示临床预后差,MAGE-A9 的过表达是一个独立的预后不良的重要标志,并可能成为 CRC 治疗的一个参考指标。因此推断在结直肠癌患者中,MAGE-A9 从肿瘤早期即开始表达增高,在一定程度上起着癌蛋白的作用,其高表达在肿瘤细胞的生存、增殖中发挥了重要作用。此外,MAGE-A9 高表达可能会打破人体内微环境平衡,在促进肿瘤细胞的增殖和远处转移过程中起着重要的作用。其机制需要通过体外细胞实验研究进行深入探讨。

有研究报道在喉鳞状细胞癌 MAGE-A9 高表达于细胞质和间质细胞^[11]。值得注意的是,本研究中发现在少数 CRC 病例中 MAGE-A9 表达于间质细胞。这种现象可能需要进一步扩大样本量深入研究 MAGE-A9 在间质细胞表达的意义和潜在机制。

综上所述,本次研究结果显示 CRC 组织中 MAGE-A9 高表达,并与患者预后差密切相关。MAGE-A9 可能是 CRC 诊断、预测 CRC 患者预后的重要指标,同时可作为 CRC 的潜在

靶点个性化指导治疗方案的选择。

参考文献

- [1] 李道娟,李前,贺宇彤.结直肠癌流行病学趋势[J].肿瘤防治研究,2015,3(1):1-12.
- [2] HUANG C W, TSAI H L, CHEN Y T, et al. The prognostic values of EGFR expression and KRAS mutation in patients with synchronous or metachronous metastatic colorectal cancer[J]. BMC Cancer, 2013, 13(13):599.
- [3] BARKER P A, SALEHI A. The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease[J]. Neurosci Res, 2002, 67(6):705-712.
- [4] HAMAI A, MEMEO L, COLAROSSO C, et al. Expression of MAGE-A antigens is frequent in triple-negative breast cancers but does not correlate with that of basal-like markers[J]. Ann Oncol, 2011, 22(4):986-987.
- [5] 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):4871-4881.
- [6] 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):506-513.
- [7] VANTOMME V, DANTINNE C, AMRANI N, et al. Immunologic analysis of a phase I / II study of vaccination with MAGE-3 protein combined with the AS02B adjuvant in patients with MAGE-3-positive tumors[J]. J Immunother, 2004, 27(2):124-135.
- [8] XU Y, WANG C, ZHANG Y, et al. Overexpression of MAGE-A9 is predictive of poor prognosis in epithelial ovarian cancer[J]. Sci Rep, 2015, 5(5):12104.
- [9] GU X, FU M, GE Z, et al. High expression of MAGE-A9 correlates with unfavorable survival in hepatocellular carcinoma[J]. Sci Rep, 2014, 15(4):6625.
- [10] CORBIERE V, CHAPIRO J, STROOBANT V, et al. Antigen spreading contributes to MAGE vaccination-induced regression of melanoma metastases[J]. Cancer Res, 2011, 71(4):1253-1262.
- [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):6734-6742.