

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.04.006

· 基础研究 ·

MAGE-A1和MAGE-A3在脑胶质瘤组织中的表达及其临床意义

国丽茹^a, 王淑彬^a, 桑梅香^b, 陈丽^a, 孟令振^a, 单保恩^c (河北医科大学第四医院 a. 全科医学科; b. 科研中心; c. 肿瘤研究所免疫研究室, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 探讨黑色素瘤抗原基因-A1(MAGE-A1)和MAGE-A3在脑胶质瘤组织中的表达及其临床意义。**方法:** 选取2006年1月至2010年1月河北医科大学第四医院神经外科手术切除的78例脑胶质瘤组织标本和15例车祸死亡捐献者的正常脑组织标本。用RT-PCR法检测胶质瘤组织中MAGE-A1和MAGE-A3的表达, 分析其表达水平与患者预后的关系; 用MSP-PCR术检测MAGE-A1和MAGE-A3基因启动子区的甲基化状态, 分析两者表达与甲基化之间的关系; 用RT-PCR法检测胶质瘤U251和U87细胞中MAGE-A1和MAGE-A3表达以及经DNA甲基转移酶抑制剂5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)和组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素A(TSA)联合作用后两者的表达水平。**结果:** 78例胶质瘤组织中MAGE-A1和MAGE-A3 mRNA阳性表达率分别为65.34%和38.46%, 而在15例正常脑组织中未发现2种mRNA表达。MAGE-A1阳性组患者5年生存率较阴性组低($P<0.05$)。MAGE-A1和MAGE-A3基因启动子区去甲基化水平与其在mRNA水平上的表达均有显著的相关性(均 $P<0.01$)。未经5-Aza-CdR和TSA处理的U87细胞未见MAGE-A1和MAGE-A3 mRNA的表达, U251细胞则有少量表达。单独给予TSA不能引起MAGE-A1和MAGE-A3基因的表达激活, 单独给予5-Aza-CdR或与TSA合用可以引起该2个基因的表达激活, 且两者合用的作用优于单独给药。**结论:** 脑胶质瘤组织中有不同程度的MAGE-A1和MAGE-A3基因表达, MAGE-A1基因表达与患者的预后不良相关。DNA启动子区甲基化和组蛋白乙酰化是MAGE-A1和MAGE-A3基因表达激活的重要机制。

[关键词] 胶质瘤; U87细胞; U251细胞; 黑色素瘤抗原基因-A1; 黑色素瘤抗原基因-A3; DNA甲基化; 组蛋白乙酰化

[中图分类号] R730.26; R739.41 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)04-0402-07

Expression and clinical significance of melanoma antigen genes MAGE-A1 and MAGE-A3 in glioma tissues

GUO Liru^a, WANG Shubin^a, SANG Meixiang^b, CHEN Li^a, MENG Lingzhen^a, SHAN Baoen^c (a. Department of General Medicine; b. Research Centre; c. Department of Tumor Immunotherapy, Institute of Oncology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the expressions of melanoma antigen genes MAGE-A1 and MAGE-A3 in glioma tissues and to explore their clinical significance. **Methods:** Seventy-eight surgically resected glioma specimens and 15 normal brain tissue samples from donors suffered traffic accident were collected at the Department of Neurosurgery, the Fourth Hospital of Hebei Medical University between January 2006 and January 2010, and the mRNA expressions of MAGE-A1 and MAGE-A3 in collected tissues were detected with RT-PCR; their associations with the overall survival of patients were also analyzed. The promoter methylation status of the two genes was observed with methylation specific PCR, and the relationship between the gene expressions and promoter methylation status was analyzed. The expressions of MAGE-A1 and MAGE-A3 genes in U251 and U87 glioma cell lines were detected by RT-PCR before and after the treatment with DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-CdR and/or histone deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA). **Results:** The positive expression rates of MAGE-A1 and MAGE-A3 genes in glioma tissues were 65.34% and 38.46%, respectively; however, the two genes were not detected in 15 cases of normal brain tissues. The 5-year overall survival of patients in MAGE-A1 positive expression group was shorter than that of negative expression group ($P<0.05$). There was significant correlation between the mRNA expressions of two genes and their promoter methylation status (all $P<0.01$). There was no mRNA expressions of MAGE-A1 and MAGE-A3 in U87 cells untreated with 5-Aza-CdR and TSA, but a small amount of MAGE-A1 mRNA and MAGE-A3 mRNA were detected in U251 cells. TSA alone could not activate the expression of MAGE-A1 and MAGE-A3 genes. 5-Aza-CdR alone or in

[基金项目] 河北省医学科学研究重点课题计划资助项目(No. 20150365)。Project supported by the Key Project Plan of Medical Science Research in Hebei Province (No. 20150365)

[作者简介] 国丽茹(1976-), 女, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事神经病学及肿瘤相关的临床研究, E-mail: glrdoctor@163.com

[通信作者] 单保恩(SHAN Baoen, corresponding author), 博士, 主任医师, 博士生导师, 主要从事肿瘤免疫学的研究, E-mail: baoenshan@hotmail.com

combination with TSA could activate the expression of both genes, and the combined effect was better than that of single administration. **Conclusion:** There are different degrees of MAGE-A1 and-A3 expression in glioma tissues, and the expression of MAGE-A1 is a negative prognostic factor for glioma patients. DNA promoter methylation and histone acetylation are important mechanisms of the activation of MAGE-A1 and MAGE-A3 expression.

[Key words] glioma; U87 cell; U251 cell; MAGE-A1; MAGE-A3; DNA methylation; histone acetylation

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(4): 402-408. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.04.006]

脑胶质瘤是一种最常见的神经系统原发性肿瘤,其生长方式呈浸润性,使手术难以彻底切除,且预后不理想^[1]。特异性肿瘤免疫治疗是一种更有效、更特异的治疗方法^[2]。黑色素瘤抗原基因(melanoma antigen gene, MAGE)是癌睾丸抗原(cancer testis antigen, 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CTL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^[3]。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异常甲基化和乙酰化有关^[4]。本研究应用RT-PCR法和甲基化特异性PCR(methylation specific polymerase chain reaction, MSP-PCR)技术对MAGE-A1及MAGE-A3的表达及其表达机制进行研究,并探讨MAGE-A1及MAGE-A3的表达与患者预后的关系,以期为脑胶质瘤患者的治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 组织标本、细胞系及主要试剂

收集2006年1月至2010年1月河北医科大学第四医院神经外科手术切除的78例脑胶质瘤组织标本,均经病理学证实且术前均未接受手术、放疗和化疗。其中男性45例,女性33例,平均年龄(49.8±8.6)岁(22~79岁)。参照2000年WHO神经系统肿瘤分类指南:I级9例、II级16例、III级17例、IV级36例。患者手术前均告知并签署知情同意书。15例取自车祸死亡捐献者正常脑组织标本作为阴性对照。所有标本入液氮中,于-80℃冰箱中保存。

人脑星形胶质细胞系U87由河北医科大学第四医院科研中心提供,人胶质瘤细胞系U251购自中国科学院细胞库。在含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素、8%NaHCO₃高糖DMEM培养基中培养。

TRIzol购自美国Invitrogen公司,逆转录试剂盒、Wizard DNA纯化试剂盒购自美国Promega公司,5-氮杂-2-脱氧胞苷(5-aza-CdR)和曲古霉素A(TSA)

购自Sigma公司,PCR引物由北京赛百盛基因技术有限公司负责合成纯化。

1.3 RT-PCR法检测胶质瘤组织中MAGE-A1和MAGE-A3 mRNA的表达

用TRIzol提取组织中总RNA,按试剂盒说明书逆转录合成cDNA。以MAGE-A1、MAGE-A3引物和GAPDH引物行PCR扩增,引物序列:MAGE-A1 F为5'-GCCTGCTGCCCTGACGAGAG-3',R为5'-AGGAGAGACCTAGGCAGGTG-3';MAGE-A3 F为5'-ATTCTCGCCCTGAGCAACGAG-3',R为5'-GACGACACTCCCCAGCATT-3';GAPDH F为5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3',R为5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。扩增条件:95℃预变性5 min,95℃30 s、59℃30 s、72℃1 min,共35个循环,最后72℃延伸5 min。1.5%琼脂糖凝胶电泳检验扩增结果,以GAPDH基因作为内参照,将条带MAGE-A1和MAGE-A3与GAPDH灰度值的比值作为其mRNA表达水平的相对值,计算条带的灰度值。实验重复3次。

1.4 MSP-PCR法检测胶质瘤组织中MAGE-A1及MAGE-A3的启动子区甲基化状态

从胶质瘤组织中提取DNA,用亚硫酸氢钠处理DNA后,用MSP法进行扩增。MSP引物由上海生物工程技术有限公司负责合成和纯化,用无菌去离子水稀释,引物终浓度为10 μmol/L,序列如下:MG1M F为5'-ATTTAGGTAGGATTTCGTTTTC-3',R为5'-AAACTAAAACGTCTTCCCGCG-3';MG1U F为5'-ATTTAGGTAGGATTTGGTTTTT-3',R为5'-AAACTAAAACATCTTCCCACA-3';MG3M F为5'-CGTTTTGAGTAACGAGCGAC-3',R为5'-ACTAAAACGACGAAAATCGACG-3',R为5'-TGTTTTGAGTAATGAGTGAT-3';GAPDH F为5'-ACTAAAACAACAAAACTAACA-3'。扩增条件:(1)MG1M和MG3M:95℃预变性10 min,94℃30 s、54℃1 min、72℃1 min,共35个循环,最后72℃延伸6 min;(2)MG3U:95℃预变性10 min,94℃30 s、47℃1 min、72℃1 min,共35个循环,最后72℃延伸6 min;(3)MG1U:95℃预变性10 min,94℃30 s、45℃1 min、72℃1 min,共35个循环,最后72℃延伸6 min。1.5%琼脂糖凝胶电泳检验扩增结果,在相

应位置上可见清晰特异的目的基因条带。非甲基化阳性对照采用正常睾丸组织基因组DNA, 正常人外周血DNA作为甲基化阳性对照, 空白对照用灭菌双蒸水取代DNA模板进行PCR。为进行MSP检测的质量控制, 随机选取10%标本进行重复实验。取各基因MSP产物50 μ l, 上、下游引物各10 μ l, 用3730测序仪进行DNA双向测序分析, 经序列测定序列中未发生甲基化胞嘧啶(C)经亚硫酸氢盐处理后转变为胸腺嘧啶(T), 序列中已发生甲基化的胞嘧啶则也无变化。实验重复3次。

1.5 RT-PCR法检测5-aza-CdR及TSA对U87、U251细胞MAGE-A1和MAGE-A3表达的影响

选取低表达MAGE-A1及MAGE-A3基因的胶质瘤U251细胞和不表达这两个基因的U87细胞进行培养, 并应用DNA甲基转移酶抑制剂5-aza-CdR及组蛋白去乙酰化酶抑制剂TSA对细胞进行处理, 根据给药方式分为9组, 第1~3组5-aza-CdR终浓度均为0 μ mol/L, TSA终浓度分别为0、0.5、1.0 μ mol/L, 第4~6组5-aza-CdR终浓度均为2.5 μ mol/L, TSA终浓度分别为0、0.5、1.0 μ mol/L, 第7~9组5-aza-CdR终浓度均为5.0 μ mol/L, TSA终浓度分别为0、0.5、1.0 μ mol/L, 每瓶细胞均于给药培养24 h及48 h更换培养液并重新加药, 药物刺激72 h更换无药物的新鲜培

养液, 再培养48 h后, 收集细胞, 提取RNA, 用RT-PCR法检测处理前后U251和U87细胞中MAGE-A1和MAGE-A3基因的表达情况。实验重复3次。

1.6 统计学处理

用SPSS11.5统计学软件对数据进行处理。计数资料采用 χ^2 检验, 计量资料采用析因方差分析。相关性分析采用Spearman相关检验, 生存分析采用Kaplan-Meier方法和Log-Rank检验。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MAGE-A1和MAGE-A3 mRNA在胶质瘤组织中高表达

RT-PCR检测结果(图1)显示, 15例正常脑组织中均未发现MAGE-A1和MAGE-A3 mRNA表达; 78例胶质瘤组织中MAGE-A1 mRNA阳性表达率为65.38%(51例), 其中III~IV级(高级别)胶质瘤阳性率显著高于I~II级(低级别)胶质瘤[79.25% vs 36.00%, $\chi^2=14.036$, $P<0.01$]; MAGE-A3 mRNA表达阳性率为38.46%(30例), 其中III~IV级胶质瘤表达阳性率与I~II级胶质瘤差异无统计学意义[39.62% vs 36.00%, $\chi^2=0.094$, $P>0.05$]。

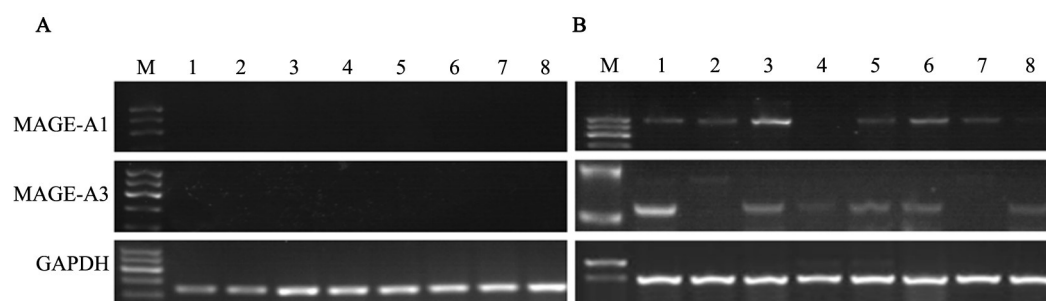


图1 正常脑组织(A)和脑胶质瘤组织(B)中MAGE-A1和MAGE-A3 mRNA的表达

Fig. 1 mRNA expressions of MAGE-A1 and MAGE-A3 in normal brain tissues (A) and glioma tissues (B) by RT-PCR

2.2 MAGE-A1 mRNA阳性表达与胶质瘤患者OS之间的关系

用Kaplan-Meier法分析MAGE-A1和MAGE-A3 mRNA表达与患者OS率之间的关系(图2)发现, MAGE-A1 mRNA阳性表达患者5年OS率较阴性表达患者低($\chi^2=7.964$, $P<0.05$; 图2A), MAGE-A3 mRNA阳性表达患者的OS率与阴性表达患者无显著性差异($\chi^2=1.057$, $P>0.05$; 图2B)。

2.3 MAGE-A1、MAGE-A3启动子区去甲基化状态及其与MAGE-A1、MAGE-A3 mRNA之间的关系

MAGE-A1、MAGE-A3基因在正常脑组织和胶质瘤组织中的去甲基化率分别为0.00%(0/15)、

64.10%(50/78)及0.00%(0/15)和41.03%(32/78)(图3), 两者差异有统计学意义(MAGE-A1: $\chi^2=20.796$, $P<0.05$; MAGE-A3: $\chi^2=9.382$, $P<0.05$)。

MAGE-A1、MAGE-A3启动子区去甲基化的脑胶质瘤组织中mRNA表达水平显著高于启动子区甲基化的胶质瘤组织(MAGE-A1: 0.141 ± 0.069 vs 0.032 ± 0.007 , $P=0.000$; MAGE-A3: 0.067 ± 0.007 vs 0.007 ± 0.003 , $P=0.000$)。经Spearman相关分析和卡方检验得出, MAGE-A1($r=0.691$, $\chi^2=37.289$, $P=0.000$)、MAGE-A3($r=0.680$, $\chi^2=36.066$, $P=0.000$)基因启动子区去甲基化与其在mRNA水平上的表达呈正相关。

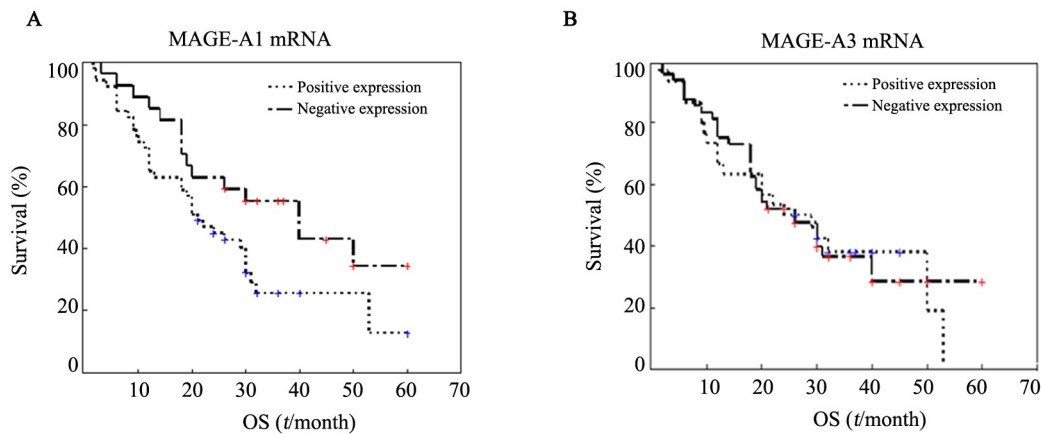
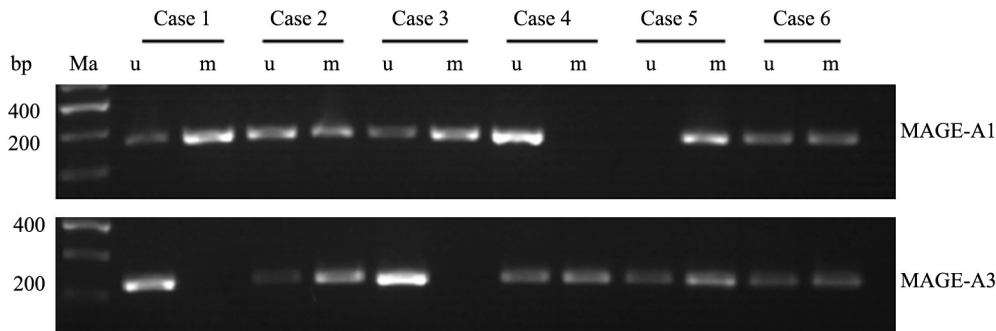


图2 MAGE-A1(A)和MAGE-A3(B)基因表达与患者OS的关系
Fig. 2 Relationship between OS and MAGE-A1 (A) and MAGE-A3 (B) gene expression



U: Presence of unmethylated genes; M: Presence of methylatedgenes;
Ma: DNA marker I; Case 1,2,3,6 in MAGE-A1: Gliomas are partly unmethylated; Case 4 in MAGE-A1: Glioma is unmethylated;
Case 5 in MAGE-A1: Glioma is fully methylated; Case 1, 3 in MAGE-A3: Gliomas are unmethylated; Case 2, 4, 5, 6 in MAGE-A3:
Gliomas are party unmethylated

图3 胶质瘤组织中 MAGE-A1 和 MAGE-A3 甲基化分析
Fig.3 Methylation analysis of MAGE-A1 and MAGE-A3 in glioma tissues

2.4 TSA 和 5-aza-CdR 对 U87 和 U251 细胞 MAGE-A1 和 MAGE-A3 mRNA 表达水平的影响

RT-PCR 检测结果(图4)显示,未经 TSA 和 5-aza-CdR 处理的 U87 细胞中未见 MAGE-A1 和 MAGE-A3 mRNA 的表达,未经抑制剂处理的 U251 细胞有少量 MAGE-A1 mRNA (0.055 ± 0.001) 表达,极少量 MAGE-A3 mRNA (0.003 ± 0.000) 表达。对 RT-PCR 检测 MAGE-A1 和 MAGE-A3 在 U87 和 U251 细胞中 mRNA 表达的灰度值进行析因分析,单独给予 TSA 不能引起 MAGE-A1 (U87: $F=100.620, P<0.01$; U251: $F=285.727, P<0.01$) 和 MAGE-A3 (U87: $F=584.646, P<0.01$; U251: $F=41.422, P<0.01$) 基因的表达激活,单独给予 5-Aza-CdR (U87 细胞 MAGE-A1: $F=1\ 196.656, P<0.01$; MAGE-A3: $F=7\ 542.246, P<0.01$ 。U251 细胞 MAGE-A1: $F=2\ 259.899, P<0.01$; MAGE-A3: $F=261.377, P<0.01$) 或与 TSA 合用 (U87 细胞 MAGE-A1: $F=40.814, P<0.01$; MAGE-A3: $F=171.861, P<0.01$ 。U251 细胞 MAGE-A1: $F=180.629, P=0.000$; MAGE-

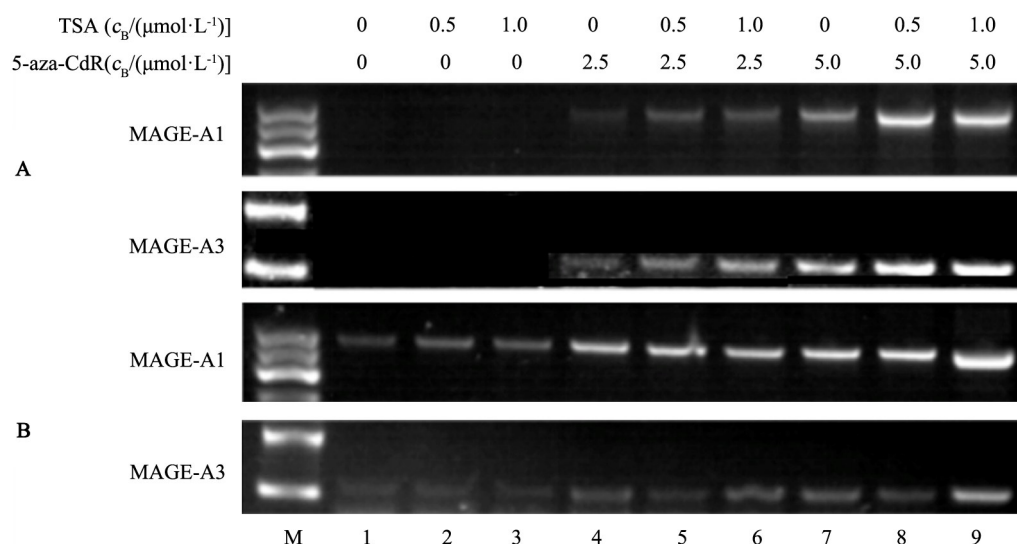
A3: $F=23.827, P=0.000$) 可以引起 2 个基因的表达激活,且两者合用的作用优于单独给药。

3 讨论

胶质瘤是一组极具侵袭性和异质性的原发性脑肿瘤,占中枢神经系统恶性肿瘤的 80% 以上^[1],特异性肿瘤免疫治疗是一种更有效、更特异的治疗方法。鉴定合适的靶抗原是抗原特异性肿瘤免疫治疗的第一步,也是至关重要的一步。肿瘤抗原成为肿瘤免疫治疗靶点的条件是,其在肿瘤组织中高表达,而在正常组织中不表达或表达具有高度限制性,以此避免在治疗过程中发生自身免疫反应^[5]。MAGE 的第一个成员是在 1991 年被发现^[6],迄今为止,已有 60 多种 MAGE 抗原被发现。MAGE 家族根据它们的基因结构特征及在肿瘤中的表达形式分为两个亚组,即 MAGE-I 和 MAGE-II^[5]。MAGE-I 包括 MAGE-A、-B 和 -C 亚家族成员,这些抗原在正常成人组织中很少表达,但在各种肿瘤中高表达,包括黑色素瘤、

乳腺癌、前列腺癌、肺癌、食管鳞癌、胃癌、膀胱癌、卵巢癌、肝细胞癌和脑癌^[7]。MAGE-A 位于 X 染色体的

q28 位点, 包括 12 个家族成员, 命名为 MAGE-A1~A12^[8-9]。



A: The expression of MAGE-A1 and MAGE-A3 in U87 cells which were treated with 5-aza-CdR and TSA at different concentration;
B: The expression of MAGE-A1 and MAGE-A3 in U251 cells which were treated with 5-aza-CdR and TSA at different concentration;
The groups 1 to 3 were treated with TSA at 0, 0.5 and 1.0 $\mu\text{mol/L}$ and 5-aza-CdR at 0 $\mu\text{mol/L}$; The groups 4 to 6 were treated with TSA at 0, 0.5 and 1.0 $\mu\text{mol/L}$ and 5-aza-CdR at 2.5 $\mu\text{mol/L}$; The groups 7 to 9 were treated with TSA at 0, 0.5 and 1.0 $\mu\text{mol/L}$ and 5-aza-CdR at 5.0 $\mu\text{mol/L}$; M: DNA marker I

图4 5-Aza-CdR和TSA作用前后U87(A)、U251(B)细胞中MAGE-A1和MAGE-A3 mRNA的表达变化
Fig. 4 mRNA expressions of MAGE-A1 and MAGE-A3 in U87 cells (A) and U251 (B) cells before and after the treatment with 5-aza-CdR and/or TSA

胶质细胞和黑色素细胞都来源于神经外胚层, 所以胶质瘤和黑色素瘤可能有共同的生物学特点。尽管MAGE已经研究了20多年, 这些抗原在胶质瘤中的研究还是很有限的, 且结论也不尽相同。MENG等^[10]用免疫组化和Wb法研究了MAGE-A2在脑胶质瘤组织中的表达及其在胶质瘤患者预后判断中的意义, 发现胶质瘤组织中MAGE-A2 mRNA和蛋白表达水平显著高于正常脑组织, 单因素和多因素分析表明, 高MAGE-A2表达是胶质瘤患者总体生存不良的独立预后因素。在笔者先前的研究^[11]中, 采用免疫组化法检测了MAGE-A1、MAGE-A3和MAGE-A11蛋白在脑胶质瘤及正常脑组织中的表达, 并分析了这些蛋白表达水平与患者临床病例特征及预后的关系, 发现MAGE-A1、MAGE-A3和MAGE-A11蛋白在脑胶质瘤组织中有不同程度的表达, 而在正常脑组织中无表达, 可以作为理想的肿瘤免疫治疗靶点, 且多因素分析表明, MAGE-A1和MAGE-A11蛋白表达与患者的预后呈负相关。

本研究应用RT-PCR法从基因水平观察了MAGE-A1和MAGE-A3在78例神经外科手术切除的脑胶质瘤标本中的表达情况, 并与15例正常脑组

织标本做对比。发现胶质瘤组织中MAGE-A1和MAGE-A3 mRNA阳性表达率分别为65.34%和38.46%, 而在15例正常脑组织中均未发现MAGE-A1和-A3 mRNA表达。胶质瘤病理分级与胶质瘤的发生、发展及预后密切相关, 病理分级高是提示脑胶质瘤患者预后不良的一个重要指标^[12]。本研究中MAGE-A1 mRNA表达与胶质瘤病理级别显著相关, 高级别组的表达显著高于低级别组, 且MAGE-A1 mRNA表达阳性组患者的5年生存率明显高于阴性组, 由此推断, MAGE-A1的基因表达水平可作为判断胶质瘤预后的一个指标。MAGE-A3与胶质瘤的病理级别及患者的生存期相关性无统计学意义, 但两者均在胶质瘤表达, 而在正常组织中仅表达于睾丸组织(因为血睾屏障的存在), MAGE-A1和MAGE-A3可以作为肿瘤特异性免疫治疗的理想靶点。

MAGE-A基因在胶质瘤中表达的确切机制还不清楚。有些实验^[13-14]证明DNA甲基化在其表达调控中起着重要作用, 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, 其在正常体细胞, 除去胎盘和睾丸组织外, 均呈现甲基化状

态,而MAGE-A1启动子区在睾丸生殖细胞和表达该基因的肿瘤细胞呈现去甲基化状态。在一些肿瘤(如胃癌、肝细胞癌、乳腺癌以及黑色素瘤)中发现MAGE-A1和MAGE-A3的表达与基因组低甲基化相关^[16-18]。在胶质瘤中,MAGE-A1和MAGE-A3的表达与DNA启动子区去甲基化状态之间的关系尚不清楚。结合已有的研究及本研究对MAGE-A1和MAGE-A3启动子区甲基化状态的研究发现,MAGE-A1和MAGE-A3启动子区低甲基化率分别为64.10%和41.03%,与MAGE-A1和-A3 mRNA表达率65.38%和38.46%呈正相关,提示启动子区去甲基化与MAGE-A1和-A3基因表达相关,可能参与了这2个基因表达。

研究^[7]表明,MAGE基因的表达与组蛋白的乙酰化状态也有关系。有学者联合应用5-aza-CdR和TSA可以在乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌等细胞系中协同诱导MAGE-A1~A3以及-A12的表达。在本研究用5-aza-CdR和TSA联合处理胶质瘤U87和U251细胞,其中,U87细胞在空白对照组无MAGE-A1和-A3 mRNA的表达,在U251细胞无药物处理的空白对照组有少量表达。在仅有TSA刺激而无5-aza-CdR刺激的实验组,U87细胞这两种mRNA的表达,U251细胞的表达无明显变化。结果说明,单独的TSA作用并不能导致原本不表达MAGE-A1和-A3 mRNA的细胞重新表达这些基因,也不会使少量表达两种mRNA的细胞表达量增加。在5-aza-CdR高、低剂量组的U87均有两者的表达,高剂量组表达量高于低剂量组,U251均有两者表达的增强,高剂量组的作用较低剂量组强,从而进一步证实了DNA去甲基化在它们表达中的作用,且无论高剂量或是低剂量组联合TSA后两者表达更强,说明联合应用TSA和5-aza-CdR对于促进U87和U251细胞MAGE-A1和-A3表达具有协同作用。经析因分析,应用5-aza-CdR或者5-aza-CdR联合TSA应用对MAGE-A1和-A3 mRNA表达的影响存在显著性差异,两种药物之间有协同作用,从而进一步说明了MAGE-A1和-A3的表达机制除了启动子区DNA甲基化,很可能还包括了组蛋白乙酰化。高甲基化、转录抑制的基因通过用5-aza-CdR和TSA处理,可以再活化,而仅用TSA处理,并不能被激活,表明在基因转录控制中DNA甲基化起主导作用,组蛋白乙酰化起协同促进作用。

MAGE在多种人类肿瘤中表达,并通过不同机制参与肿瘤的发生、发展。尽管近年来在阐明MAGE家族的表现遗传调控方面的研究取得了很大进展,但控制其异常表达机制仍不完全清楚,还有许多问题有待进一步研究。更多针对MAGE家族功能

及表达调控的研究将为MAGE家族在更多肿瘤靶向性治疗的应用提供证据^[8]。本研究发现,MAGE-A1和-A3特异性表达于脑胶质瘤组织中,其中MAGE-A1基因表达与肿瘤病理分级相关,提示它可成为脑胶质瘤诊断和预后判断的指标,并可作为脑胶质瘤免疫治疗的新靶点。MAGE基因的活化与脑胶质瘤的发生发展相关,因此,将DNA甲基化酶抑制剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂和肿瘤免疫治疗及传统的治疗手段联合应用,可能为脑胶质瘤的治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] OMURO A, DEANGELIS L M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review[J]. JAMA, 2013, 310(17): 1842-1850. DOI:10.1001/jama.2013.280319.
- [2] NIZAMUTDINOV D, STOCK E M, DANDASHI J A, et al. Prognostication of survival outcomes in patients diagnosed with glioblastoma[J/OL]. World Neurosurg, 2018, 109: e67-e74[2018-11-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5729086/>. DOI: 10.1016/j.wneu.2017.09.104.
- [3] 侯淑芸, 桑梅香, 单保恩. MAGE-A9和MAGE-A11基因在乳腺癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2014, 21(4): 428-436. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2014.04.013.
- [4] 王雪玮, 史卫红, 王熙才. DNA甲基化在肿瘤中的调控机制及其在肺癌中的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(5): 558-566. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.05.018.
- [5] SANG M, LIANY, ZHOU X, et al. MAGE-A family: attractive targets for cancer immunotherapy[J]. Vaccine, 2011, 29 (47): 8496-8500. DOI:10.1016/j.vaccine.2011.09.014.
- [6] 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.
- [7] LIAN Y S, MENG L J, DING P G, et al. Epigenetic regulation of MAGE family in human cancer progression-DNA methylation, histone modification, and non-coding RNAs[J/OL]. Clin Epigenetics, 2018, 10(1): 115[2018-11-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6126015/>. DOI:10.1186/s13148-018-0550-8.
- [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] ROGNER U C, WILKE K, STECK E, et al. The melanoma antigen gene (MAGE) family is clustered in the chromosomal band Xq28[J]. Genomics, 1995, 29(3): 725-731. DOI:10.1006/geno.1995.9945.
- [10] MENG Q, LUO G, LIU B, et al. Melanoma-associated antigen A2 is overexpressed in glioma and associated with poor prognosis in glioma patients[J]. Neoplasma, 2018, 65(4): 604-609. DOI: 10.4149/neo_2018_170625N440.
- [11] GUO L R, SANG M X, LIU Q R, et al. The expression and clinical significance of melanoma-associated antigen-A1, -A3 and -A11 in glioma[J/OL]. Oncol Lett, 2013, 6(1): 55-62[2018-11-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3742726/>. DOI: 10.3892/ol.2013.1351.

- [12] ZHAO X, BAI H X, ZOU Y J, et al. Letter: Reoperation for recurrent high-grade glioma: does tumor genetics play a role?[J]. *Neurosurgery*, 2015, 76(4): E496-E497. DOI:10.1227/NEU.0000000000000666.
- [13] 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/OL]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(11): 7327-7335[2018-11-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC84726/>.
- [14] JAMES S R, CEDENO C D, SHARMA A, et al. DNA methylation and nucleosome occupancy regulate the cancer germline antigen gene MAGEA11[J/OL]. *Epigenetics*, 2013, 8(8): 849-863[2018-11-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3883788/>. DOI:10.4161/epi.25500.
- [15] XIE C, SUBHASH V V, DATTA A, et al. Melanoma associated antigen (MAGE)-A3 promotes cell proliferation and chemotherapeutic drug resistance in gastric cancer[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2016, 39(2): 175-186. DOI:10.1007/s13402-015-0261-5.
- [16] CUI Z, YU X, GUO L M, et al. Combined analysis of serum alpha-fetoprotein and MAGE-A3-specific cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood for diagnosis of hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Dis Markers*, 2013, 35(6): 915-923[2018-11-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3881391/>.
- [17] TESSARI A, PILLA L, SILVIA D, et al. Expression of NY-ESO-1, MAGE-A3, PRAME and WT1 in different subgroups of breast cancer: An indication to immunotherapy?[J]. *Breast*, 2018, 42: 68-73. DOI:10.1016/j.breast.2018.08.106.
- [18] DING X, WANG X, LIN M, et al. PAUPAR lncRNA suppresses tumorigenesis by H3K4 demethylation in uveal melanoma[J]. *FEBS Lett*, 2016, 590(12): 1729-1738. DOI:10.1002/1873-3468.12220.

[收稿日期] 2018-11-26

[修回日期] 2019-02-23

[本文编辑] 党瑞山