

XAGE-1b 基因与肿瘤的关系及研究进展^①

龙满美¹, 黄小英², 马韵^{1②}, 姚金光², 龙喜带^{2,3③}

- (1. 广西医科大学第一附属医院病理科, 广西 南宁 530021 E-mail: longmanmei1989@163.com;
2. 右江民族医学院病理学教研室, 广西 百色 533000;
3. 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海 200127)

关键词: XAGE-1b; 肿瘤-睾丸抗原; 癌症疫苗

中图分类号: R730.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2014)05-0783-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-5817.2014.05.057

XAGE-1b 基因是 XAGE 亚科, 属于 GAGE 家族的一员。这个基因强烈表达于尤文氏肉瘤, 腺泡状横纹肌肉瘤和正常睾丸。该基因编码的蛋白含有一个核定位信号, 并与其他 GAGE/PAGE 蛋白质共用一个相似性序列。因为表达模式和序列的相似性, 这种蛋白也属于 CT(癌-睾丸)抗原家族。该基因的选择性剪接, 除了替代转录起始位点, 还产生多个转录变异体。

1 XAGE-1b 基因结构

XAGE-1b 基因的全称为 X 抗原家族, 成员 1b (X antigen family, member 1b), 也称为癌症/睾丸抗原家族 12, 成员 1b (cancer/testis antigen family 12, member 1b)。2000 年, Liu 等^[1]研究发现, XAGE-1 基因定位于人类 X 染色体短臂, 具体位置为 Xp11.22, 在多种肿瘤中有表达。XAGE-1 有 4 种转录异构体, 分别命名 XAGE-1a, XAGE-1b, XAGE-1c 和 XAGE-1d^[2]。其中, XAGE-1b 是 XAGE-1 最主要的转录本存在形式, 具有表达谱广、表达率高及免疫原性强等特点。从 GeneBank 了解到, XAGE-1b 基因 mRNA 表达的相关序列有三类: NM_001097594.2, NM_001097596.2, NM_001097595.1。基因组坐标 (GRCh37): X:52,238,809-52,243,953。隶属于长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 类。lncRNA 是一类转录本长度超过 200nt、不编码蛋白的 RNA, 能在表观遗传、转录及转录后水平上调控基因表达, 参与了 X 染色体沉默、基因组印记以及染色质修饰、转录激活、转录干扰、核内运输等多种重要的调控过程, 与人类疾病的发生、发展和防治都有着密切联系。

2 XAGE-1b 蛋白结构及生物学功能

XAGE-1b 蛋白编码为 GIFTs: 33, GC 地址: GCOXP052239。XAGE-1b 长度约 5145 bp, 其产物是一种含有 81 个氨基酸的蛋白质, 其编码的蛋白质与 GAGE/PAGE 家族在 COOH 端成员有很强的同源性。

近年来多个研究发现, XAGE-1b 被异常激活和成比例地表达于不同类型的肿瘤组织中。在除睾丸、胎盘组织和脑组织以外的正常组织中几乎不表达^[3], 但大量表达在乳腺癌、前列腺癌、肺癌、肝癌、尤文氏肉瘤、黑色素瘤和横纹肌肉瘤^[4]。XAGE-1b mRNA 在肺癌、肝癌、前列腺癌表达近三分之一, 但是 XAGE-1b 蛋白表达似乎仅限于肺癌, 尤其是腺癌。因其可引起癌症患者自发地体液免疫和细胞介导的免疫反应, 有望成为

癌症疫苗。

3 XAGE-1b 的调节机制

XAGE-1b 调节表达的分子学机制, 一直都是科学研究的热点和难点, 至今仍不是十分清楚。在过去的十几年中, 许多研究人员已经广泛地提及 CpG 岛在癌症异常甲基化^[5]。抑癌基因启动子中的 CpG 位点异常甲基化已经得到传统上认可; 甲基化标记, 在正常细胞中总是非甲基化, 可用于甲基化分析, 也可应用于癌症检测。对那些正常的甲基化位点, 在癌细胞的异常甲基化的改变, 将成为癌细胞本身的标志物。

有报道称, 癌症/睾丸抗原的某些相关基因的转录调控是 DNA 水平特异的启动子甲基化^[6]。XAGE-1 的 5 端有一个典型的 CpG 岛跨越 302 个碱基, 应用计算机的程序 (MacVector 序列分析软件) 分析已知的转录因子结合位共同的基因组核苷酸序列, 确定了潜在的转录因子在 XAGE-1 基因启动子区的位点, 有许多潜在的 Sp1 结合位点以及对其他转录因子如 Oct-1, C/EBP 和 NF κ B 结合位点。通过共转染 Sp1 的表达载体和 XAGE-1 的结构, 发现 Sp1 的共转染导致了 XAGE-1 启动子活性显著增加, 从而证实 Sp1 的作用作为 XAGE-1 基因启动子的正调控元件^[7]。

有学者提出 CpG 岛甲基化可能是该基因表达调控的潜在机制, 并通过二硫化物修饰的 DNA 和 COBRA 的测序测定 XAGE-1 mRNA 的表达在正常细胞和癌细胞相关基因的甲基化状态, 揭示了 XAGE-1 基因启动子甲基化密集的 CpG 岛的正常细胞和癌细胞不表达该基因; 一旦这种甲基化丢失, 该基因则高表达在正常睾丸和癌细胞系中; 另外, 将 XAGE-1 基因启动子富含的 CpG 岛的片段连接到荧光素酶报告基因, 构建并瞬时转染这种构造 HCT116 细胞, 证实启动子的转录调节性的区域结合 CpG 岛, 并证明 CpG 岛体外甲基化导致启动子活性的丧失^[8]。

总的来说, 这些研究表明, 在正常和癌组织中 XAGE1 的表达是由 CpG 岛甲基化基因中的启动子调控的。

4 XAGE-1b 与肿瘤的关系

4.1 XAGE-1b 与尤文氏肉瘤 XAGE-1b 是在多种肿瘤组织中表达的 CT 抗原, 在不同类型的肿瘤基因表达分析表明, 尤文氏肉瘤和黑色素瘤中 XAGE-1b 的表达最高。用 Northern 印迹和 RNA 斑点印迹发现, XAGE-1b 高表达在 7/8 例尤文氏细胞系和 4/9 例尤文氏肉瘤的患者样本^[1]。

① 基金项目: 国家自然科学基金 (81160255, 81372639); 上海市教委科研创新项目 (13YZ035); 广西自然科学基金 (2013GXNSFAA019251); 广西教育厅科研创新项目 (201204LX674); 上海市曙光计划 (13SG19)

② 通讯作者, E-mail: yunandama@hotmail.com

③ 通讯作者, E-mail: sjtulongxd@263.net

4.2 XAGE-1b与黑色素细胞瘤 研究发现在黑色素细胞瘤进展的不同阶段,XAGE-1b 仅仅表达于转移瘤中(38%, $n = 61$),在非典型型($n = 10$)和原发性黑色素瘤($n = 8$)的表达均为阴性^[9]。说明其与肿瘤的侵袭力密切相关,标志着黑色素细胞瘤的进展并可能成为黑色素瘤预后的标志。

4.3 XAGE-1b与急性白血病 学者通过 RT-PCR 检测 114 例急性白血病患者,分析了 XAGE-1 的 4 个转录体基因,发现 14/63 例(22.22%)急性髓细胞性白血病样本和 10/51 例(19.61%)急性淋巴细胞白血病样本 XAGE-1b 的基因呈阳性,提示 XAGE-1b 基因成比例表达在人类急性白血病,并且其表达和临床特征,如性别、白血病类型之间没有重要关系^[3]。

4.4 XAGE-1b与肺癌 近年来,关于 XAGE-1b 在肿瘤组织中的表达研究逐渐增多。有学者通过免疫组化、免疫荧光和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)等方法发现 XAGE-1b 在非小细胞肺癌(NSCLC)中高表达^[10]。XAGE-1b 的特异性 CTL 对自体 XAGE-1b 表达阳性的肿瘤细胞比自体 XAGE-1b 的基因阴性的肿瘤细胞或自体 XAGE-1b 的表达阳性癌细胞有更强的溶解效果,而该特异性 CTL 对正常肺上皮细胞无杀伤活性^[11]。这些结果可用于开发简单有效的癌症/睾丸抗原为基础的免疫治疗 NSCLC。研究者们调查了 XAGE-1b 的表达与 NSCLC 患者生存期之间的相关性。预先对这些样本 HLA I 类的表达进行了评估。XAGE-1b 的表达与总生存率无相关性;然而,XAGE-1b 和 HLA I 类同时表达,生存时间延长($P = 0.019$);此外,XAGE-1b 的结合下调 HLA I 类的表达时,生存期缩短($P = 0.01$);癌巢浸润性肿瘤 CD8⁺ T 细胞表达 XAGE-1b 和 HLA I 类的密度明显高于其他组。调查结果表明,XAGE-1b 和 HLA I 类表达引起手术后微小残留病灶 CD8⁺ T 细胞应答,并延长 NSCLC 患者的生存期^[12]。同时有学者对肺癌的类型及临床特征进行研究,发现 XAGE-1 基因阳性的肺癌样品为 32.94%(28/85),在腺癌样品为 59.46%(22/37)和鳞状细胞癌样本为 21.74(5/23),这提示 XAGE-1b 的基因在腺癌中表达明显高于鳞状细胞癌,并提出 XAGE-1b 基因表达与临床特征之间没有任何重要的相关性,如性别,年龄,临床分期^[13]。目前,已有多个学者的研究证明 XAGE-1b 可以显著表达在 NSCLC,尤其是腺癌。因此,XAGE-1b 基因是一个可以表达显著频率,并具有免疫原性的 NSCLC 的 CT 抗原。

4.5 XAGE-1b与涎腺腺样囊性癌 Zhou 等^[14]研究发现,涎腺腺样囊性癌细胞(ACC-M)在体内和体外表达下调与 XAGE-1b 下调增殖表型相关,并提出 XAGE-1b 的表达促进了 ACC-2 细胞在体内和体外的增殖,影响 ACC-2 细胞在裸鼠体内的转移和跨膜侵袭。XAGE-1b 干扰能抑制 ACC-M 细胞在体外增殖和裸鼠皮下移植瘤生长,XAGE-1b 在 ACC-2 细胞系中过表达表明其在体内和体外增殖速度更快,跨膜和转移能力更强,并且在肿瘤组织中的血管生成更多。这些研究都提示 XAGE-1b 的基因能够直接或间接地影响血管生成,导致涎腺腺样囊性癌的发生和转移。

4.6 XAGE-1b与前列腺癌 为了评估癌症疫苗靶向 XAGE-1 的可行性,有学者^[15]研究了 XAGE-1 转录物的 4 个变体,及 XAGE-1 参与前列腺癌患者的体液免疫应答。采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)分析 XAGE-1a,b,c,d mRNA 在 54 例前列腺癌标本和 8 例良性前列腺增生症(BPH)的表达。观察 54 例前列腺癌标本,XAGE-1b 的 mRNA 的表达为 14 例(25.93%),而 XAGE-1a,c 和 d mRNA 表达分别是 1、1 和 3,在 8 例 BPH 标本未观察到 XAGE-1 转录物的变体。这表明 XAGE-1b 在前列腺癌组织的特异性较高,有望成为未来前列腺癌的靶向治疗靶点。

4.7 XAGE-1b与肝癌 Gong L 等^[16]通过免疫组织化学检测 HCC 患者 XAGE-1 蛋白的表达,反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和实时 RT-PCR 检测来分析 XAGE-1 基因的表达。在 96 例 HCC 患者的组织中检测到 XAGE-1 三种亚型(XAGE-1b,XAGE-1c 和 XAGE-1d)。三种类型的 XAGE-1 转录变异体频繁的表达在肝癌组织中并表现出较高的特异性,XAGE-1b,XAGE-1c 和 XAGE-1d 的阳性表达率分别是 41.7%(40/96),15.6%(15/96)和 26.0%(25/96),XAGE-1b 是主要的类型,但在癌旁组织和正常的肝组织未检测到。此外,XAGE-1 蛋白在 40.6%(39/96)HCC 患者被检测到,但在癌旁组织和正常肝组织未检测到。同时,对 XAGE-1 的临床相关性表达进行了分析,发现 XAGE-1b 与患者的年龄、性别、肿瘤大小、TNM 分期、血清 AFP 水平和感染肝炎病毒无关,并且 XAGE-1b 阳性的患者 2 年生存率较低。XAGE-1b 在肝癌组织中高表达,尤其是 XAGE-1b 的特殊性,使其可以预测肝癌患者的预后,有望成为肝癌抗原特异性免疫治疗的新靶点。

5 XAGE-1b 的最新进展

研究发现,XAGE-1b 在多种肿瘤组织中高表达,是肿瘤免疫治疗的理想靶基因。最新研究表明,XAGE-1b 能够显著阻碍黑色素瘤细胞的迁移和侵袭,其在肿瘤的进展过程发挥重要作用,研究者对 GAGE 和 XAGE-1 特定的 siRNA 能显著抑制黑色素瘤细胞的迁移进行研究,结果表明抑制 SSX4, XAGE1 和 GAGE 在癌细胞系表达干扰了肿瘤细胞的迁移和/或降低细胞生存能力^[17]。所观察到的 RNAi 诱导表型可能是 CT 抗原的表达的抑制,而不是一个脱靶效应的结果。这一发现多个 siRNA 的不同目标区域相同的基因具有相同的表型效应,表明这些效果确实依赖于基因的枯竭,敲除 XAGE1 和 GAGE 基因观察抑制细胞迁移和侵袭,表明这些基因可能对癌症的靶向治疗有用。使用汞途径分析系统检测到 XAGE-1b 调控的荧光强度代表位于转录因子下游的信号传导途径。XAGE-1b 的过表达通过缩短 G₀~G₁ 期,延长 G₂~M 期促进细胞生长,此外,XAGE-1b 的过表达通过诱导肿瘤坏死因子- α (TNF- α)增强抗凋亡作用^[18]。甲胎蛋白(AFP)是 HCC 的主要标记物。目前,诊断 HCC 的主要手段是测定血清 AFP 的水平。但是,临床上约 1/3 的 HCC 患者血清 AFP 阴性,目前尚无有效的血清学标记物来检测这些患者。有学者研究发现 XAGE-1b mRNA 在 HCC 患者外周血的检出率高达 80.8%,在 AFP 阴性 HCC 表达率为 82.4%,而且 AFP 与 XAGE-1b mRNA 的表达不具有相关性,这在很大程度上弥补了 AFP 阳性率方面的缺陷,显示出了 XAGE-1b mRNA 作为肝细胞癌分子标志物的优越性^[19]。因为,XAGE-1b mRNA 在多种肿瘤中表达,所以,它作为诊断 HCC 的指标缺乏一定的特异性。因此,AFP 与 XAGE-1b mRNA 联合检测或许是提高诊断准确率的较好方案^[20]。

6 结语

目前,肿瘤的诊断和治疗方式繁多,但真正疗效确切的方式寥寥无几,所以迫切地期待一个有效的方法攻克癌症这一难题。研究发现,XAGE-1b 广泛存在于多种恶性肿瘤细胞中,在肿瘤组织中高表达,其与肿瘤的发生、发展及转移关系密切。XAGE-1b 抗原具有免疫原性,是肿瘤免疫学和肿瘤生物治疗研究领域重要的研究对象,对肿瘤的免疫治疗和研究有广阔的应用前景。此外,XAGE-1b mRNA 可作为肿瘤的血清学标记物,协助诊断,提高检出率。由于其在肿瘤中的检测仍处于小范围的小样本初期临床研究阶段,目前并未普遍应用到临床中。如果能够大范围开展临床研究,将来可用于一些肿瘤标记物阴性患者的筛查。总的来说,我们对 XAGE-1b 的认识还十

分有限。XAGE-1b 对肿瘤的分子机制尚不清楚,可能与 CpG 岛的甲基化在基因的启动子调节有关。分析 XAGE-1b 的分子机制,为肿瘤的诊断和治疗找到新的靶点。对 XAGE-1b 的深入研究将会为肿瘤的诊断与治疗探索出更加有效的方法。未来我们期待能有更多的前瞻性研究来证明 XAGE-1b 在肿瘤免疫治疗中的价值,及其作为血清学标记物用于癌症诊断的重要意义。

参考文献:

- [1] Liu XF, Helman LJ, Yeung C, et al. XAGE-1, a new gene that is frequently expressed in Ewing's sarcoma[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(17): 4752-4755.
- [2] Woloszynska-Read A, James SR, Song C, et al. BORIS/CTCF expression is insufficient for cancer-germline antigen gene expression and DNA hypomethylation in ovarian cell lines[J]. *Cancer Immun*, 2010, 23(10): 6.
- [3] Ji Y, Zhang W, Wang J, et al. mRNA expression of the XAGE-1 gene in human acute leukemia[J]. *Int J Hematol*, 2010, 91(2): 209-212.
- [4] Egland KA, Kumar V, Duray P, et al. Characterization of overlapping XAGE-1 transcripts encoding a cancer testis antigen expressed in lung, breast, and other types of cancers[J]. *Mol Cancer Ther*, 2002, 1(7): 441-450.
- [5] Hamada T, Goto M, Tsutsumida H, et al. Mapping of the methyl pattern of the MUC2 promoter in pancreatic cancer cell lines, u bisulfite genomic sequencing [J]. *Cancer Lett*, 2005, 227(2): 175-184.
- [6] Sigalotti L, Coral S, Nardi G, et al. Promoter methylation controls the expression of MAGE2, 3 and 4 genes in human cutaneous melanoma[J]. *J Immunother*, 2002, 25(1): 16-26.
- [7] Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes[J]. *J Mol Biol*, 1987, 196(2): 261-282.
- [8] Jun HL, Sang PK, Edward G, et al. Activation of human cancer/testis antigen gene, XAGE-1, in tumor cells is correlated with CpG island hypomethylation [J]. *Int J Cancer*, 2005, 116(2): 200-206.
- [9] Zendman AJ, vanKraats AA, Den Hollander AI, et al. Characterization of XAGE-1b, a short major transcript of cancer/testis-associated gene XAGE-1, induced in melanoma metastasis[J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(2): 195-204.
- [10] Pandey JP, Namboodiri AM, Ohue Y, et al. Genetic variants of immunoglobulin γ and κ chains influence humoral immunity to the cancer-testis antigen XAGE-1b (GAGED2a) in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Clin Exp Immunol*, 2014, 176(1): 78-83.
- [11] Zhou Q, Guo AL, Xu CR, et al. A dendritic cell-based tumour vaccine for lung cancer: full-length XAGE-1b protein-pulsed dendritic cells induce specific cytotoxic T lymphocytes in vitro[J]. *Clin Exp Immunol*, 2008, 153(3): 392-400.
- [12] Kikuchi E, Yamazaki K, Nakayama E, et al. Prolonged survival of patients with lung Adenocarcinoma expressing XAGE-1b and HLA class I antigens[J]. *Cancer Immun*, 2008, 8: 13.
- [13] Lai Q, Zhang L, Sun Y. Association of XAGE-1 gene expression with clinical characteristics of lung cancer[J]. *Zhong Guo Fei Ai Za Zhi*, 2010, 13(8): 786-789.
- [14] Zhou B, Li T, Liu Y, et al. Promoting effects on the proliferation and metastasis of ACC tumor cell with XAGE-1b overexpression[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(5): 2323-2335.
- [15] Koizumi F, Noguchi Y, Saika T, et al. XAGE-1 mRNA expression in prostate cancer and antibody response in patients[J]. *Microbiol Immunol*, 2005, 49(5): 471-476.
- [16] Gong L, Peng J, Cui Z, et al. Hepatocellular carcinoma patients highly and specifically expressing XAGE-1 exhibit prolonged survival[J]. *Oncol Lett*, 2010, 1(6): 1083-1088.
- [17] Otavia L Caballero, Tzeela Cohen, Sita Gurung, et al. Effects of CT-Xp Gene Knock down in Melanoma Cell Lines[J]. *Oncotarget*, 2013, 4(4): 531-541.
- [18] Bo Zhou, Tingxiu Li, Yang Liu, et al. Preliminary study on XAGE-1b gene and its mechanism for promoting tumor cell growth[J]. *Biomedical Reports*, 2013, 1(4): 567-572.
- [19] 侯振宇, 宋玉亮, 潘泽亚, 等. 原发性肝癌患者血液中 xAGE-1b mRNA 的表达[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2008, 46(8): 622-623.
- [20] 张经中, 赵飞, 侯振宇, 等. XAGE-1b mRNA 在肝癌患者血液中的表达[J]. *中国现代医生*, 2012, 50(36): 38-39.

收稿日期: 2014-04-22; 修回日期: 2014-05-29