

肝细胞癌特异抗原的筛选 The Screening of Specific Antigens of Hepatocellular Carcinoma

罗国容 邓卓霖 Stenner F*, Sahin U*, Pfreundschuh M*
Luo Guorong Deng Zhuolin

(广西医科大学 南宁市滨湖路6号 530021)
(Guangxi Medical University, 6 Binhulu, Nanning, Guangxi, 530021)

摘要 应用重组克隆表达抗原的血清学鉴定技术, 从广西肝细胞癌中初步筛选出9个基因克隆, 与肝癌患者及其他人血清的反应证明对肝癌有特异性。DNA测序结果与基因库核对, 发现其中7个有同源结构; 2个为无同源结构的新分子。

关键词 肝细胞癌 特异抗原 重组克隆表达抗原的血清学鉴定 (SEREX)

中图法分类号 R 730.3; R 735.7

Abstract "Serological identification of antigens by recombinant expression cloning (SEREX)" technique was used for screening of specific antigens of hepatocellular carcinoma. Primarily, there were nine of gene clones that had been harvested from hepatocellular carcinoma tissues from Guangxi, a high epidemic area in southern China. These antigens reacted to the sera of other persons showed that they were specific for the hepatocellular carcinoma. Analysis of these 9 clonic gene sequences showed that seven of them with and two without homologous structures in gene bank.

Key words Hepatocellular carcinoma, specific antigen, serological identification of antigens by recombinant expression cloning (SEREX)

肝细胞癌 (HCC) 是死亡率最高的一种恶性肿瘤。广西 HCC 高发, 且从 70 年代到 90 年代增长幅度之大, 在全国 27 个省市调查中居首位^[1]。目前 HCC 的诊断和治疗亟待改善, 其中免疫学技术有广阔应用前景, 关键是要找到免疫系统能识别的 HCC 肿瘤抗原。上海肿瘤所 1995 年报道用 mRNA 差异显示技术研究 HCC 基因表达^[2], 但未涉及免疫学方面。本文报道用新的重组克隆表达抗原的血清学鉴定 (SEREX)^[3] 技术, 初步鉴定出 9 种 HCC 抗原。

1 材料及方法

应用外科切除的广西 HCC 癌组织, 分离总 RNA。用含 Xho 位点的寡脱氧胸苷酸 (dT) 作为引物合成 cDNA 第一链, 用 XhoI 内切酶消化 cDNA 片段, 克隆到 λZAP II 载体上并包装成噬菌体, 转染

到大肠杆菌 (XL1-Blue MRF⁺) 中。整个文库产生 1.5×10^6 个重组克隆。用 HCC 病人自身血清对表达文库进行筛选, 得出 94 个阳性克隆。已将 71 个克隆提交到 PBK-CMV 噬菌体剪切, 并对 55 个克隆进行了测序。得到的 DNA 序列用 DANsis 和 Blast 软件在电脑中核对。再用其他人血清检测了其中 9 种抗原的反应性。这些血清来自: 4 例 HCC 病人, 20 例其他恶性肿瘤病人, 20 例慢性病毒性肝炎 (B 或 C) 病人, 4 例肝硬化病人, 20 例健康人。

2 结果

9 个克隆已经作双向测序, 5 个克隆与已知基因有同源结构, 分别为动力素 (Kinectin), 14.5 Kda 未知蛋白, 衰老标记蛋白-30 (SMP-30), 连接素 (ankyrin), DNA 结合蛋白。2 个分别与乳酸脱氢酶 A 和血清白蛋白相关。还有 2 个克隆未找到同源结构, 可能是新的分子。它们与 HCC 患者血清及其他人血清起反应的情况见表 1。

1998-04-28 收稿。

* Med. Klinik und Poliklinik, Innere Medizin I, Universitaet des Saarlandes 66421 Homburg/Saar Germany.

表 1 9 种肝细胞癌抗原的同源结构及血清学检查

Table 1 Homologous structures and serological test of nine antigens of Hepatocellular carcinoma

克隆 Clone	同源结构 Homologous structure	HCC	其它肿瘤 Other cancers	HBV	HCV	肝硬化 Cirrhosis	正常人 The normal
1~8a	cg1 蛋白质 (动力素) Kinectin	4/5	0/20	0/10	0/10	0/4	0/20
22~5	衰老标记蛋白-30 Senescens marker protein	3/5	0/20	1/10	0/10	0/4	1/20
25~8	连接素 Ankyrin	4/5	5/20	5/10	1/10	0/4	0/20
6~8b	14.5 Kda 未知蛋白 Unknown protein	3/5	0/20	0/10	0/10	0/4	0/20
2~5.1	DNA-结合因子 DNA-bindender factor	4/5	5/20	3/10	0/10	0/4	2/20
2~3.2b	乳酸脱氢酶 A Lactatdehydrogenase A	4/5	0/20	0/10	0/10	0/4	3/20
29~5.1	血清白蛋白 Serum albumin	4/5	0/20	4/10	0/10	0/4	0/20
14~6	—	3/5	0/20	0/10	0/10	0/4	0/20
25~7	—	4/5	0/20	0/10	0/10	0/4	0/20

分子为血清阳性例数, 分母为检查例数; —: 未检测到同源结构; HCC: 肝细胞癌; 其它肿瘤: 成胶质细胞瘤、恶性黑色素瘤、肾癌、非何杰金病性淋巴瘤、卵巢癌 (或乳腺癌); HBV: B型病毒性肝炎; HCV: C型病毒性肝炎

Numerators are positive cases and denominators are cases detected; —: Unfound; HCC: Hepatocellular carcinoma; Other cancers: Glioblastoma melanotic cancer, nephroncus, non-Hodgkin's lymphocytoma, overioncus; HBV: Hepatitis B virus; HCV: Hepatitis C virus.

3 讨论

SEREX 技术是德国 Sahin 博士及其同事们建立的一项新技术, 已应用在人恶性黑色素瘤、肾癌、成胶质细胞瘤、何杰金氏病和食道癌等, 并从中检出多种肿瘤抗原, 确定了其分子结构^[3-5]。本文的实验工作是在他们的实验室中完成的。

本实验再次证明肿瘤抗原的存在带有普遍性, 这一事实在以往的病理与临床实践中都有体验, 例如形态学上常观察到恶性肿瘤周围组织中有淋巴细胞浸润, 就是宿主对瘤细胞的免疫反应。黑色素瘤和绒毛膜上皮癌等偶见自然消退就是一种免疫排斥反应。

自身合成的蛋白质引起免疫反应有多种可能, 如基因突变、胚胎性蛋白质新表达、病毒基因通过宿主细胞表达、基因过度表达等。如 P53 基因突变^[6]和突变 P53 蛋白过度表达^[7]已在广西肝癌被证明。

筛出的 9 种抗原, 主要与 HCC 患者血清起阳性反应, 阳性达 60%~80%, (3/5~4/5)。偶尔也与其它血清起反应, 如有 3 种抗原与健康人血清起反应, 阳性 5%~15%, 原因未明, 可能有隐性病毒性肝炎 B 感染。两种抗原与其他恶性肿瘤患者血清起反应, 占 25%, 这些恶性肿瘤中也可能有该抗原过度表达。值得注意的是, 检出的 HCC 抗原部分与 HBV 患者血清起反应, 但本研究未发现所检出的抗原分子与 HBV 有同源结构, 而本地区 HCC 与 HBV 关系最密切, 已知 HBV 基因可随意整合到 HCC 基因组中, 无特定整合部位^[8], 有可能激活某个基因而产生异常表达而诱导抗体产生。

总的来说, 9 种抗原都具有一定的特异性。逐项深入研究正在进行中, 这无疑会有基础理论和应用价值。应用方面, 如将这些抗原克隆转染到真核细胞中表达, 提纯后就可用于血清学诊断肝癌, 应用 2 种以上抗原作诊断, 结果进行综合分析则可减少假阳性或假阴性, 得出可靠结果。这些抗原的 T 细胞应答实验将有助于探讨 HCC 特异免疫治疗手段。

参考文献

- Li L D et al. . Analysis of variation trend and short term detection Chinese malignant tumor mortality during twenty years. Chinese J Oncol. 1997, 19: 3~9.
- 万大方等. 正常肝与肝癌细胞表达差异的 cDNA 克隆的研究. 中华医学杂志, 1995, 75: 606~608.
- Sahin U et al. . Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. Proc Natl Acad Sci USA. 1995, 92: 11810~11813.
- Sahin U et al. . Serological identification of human tumor antigen. Curr Opin Immunol. 1997, 9: 709~715.
- Chen Y T et al. . A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. Proc Natl Acad Sci USA. 1997, 94: 1914~1918.
- 邓卓霖等. 广西黄曲霉菌毒素高危区肝癌 P53 基因序列改变. 中华肿瘤杂志, 1997, 19: 18~20.
- 邓卓霖, 马韵, 罗虹. 南宁地区肝细胞性肝癌中突变型 P⁵³蛋白表达. 广西科学, 1995, 2 (1): 55~57.
- Slagle B L et al. . Hepatitis B virus integration event in human chromosome 17 P near the P53 gene identifies the region of the chromosome commonly detected in virus positive hepatocellular carcinomas. Cancer Res. 1991, 51: 49.

(责任编辑: 蒋汉明)