

·技术与方法·

SEREX技术筛选及鉴定食管癌肿瘤抗原

遇 珑, 胡 海, 冉宇靓, 彭良平, 李江伟, 杨治华

Human Esophageal Carcinoma Antigens Screened by Serologic Analysis of Recombinant cDNA Expression Libraries (SEREX)

YU Long, HU Hai, RAN Yu-Liang, PENG Liang-Ping, LI Jiang-Wei, YANG Zhi-Hua

中国医学科学院肿瘤研究所
细胞生物及分子生物学室,
北京 100021

Department of Cellular and
Molecular Biology,
Cancer Institute,
Chinese Academy of Medical
Sciences,
Beijing, 100021,
P. R. China

通讯作者: 杨治华

Correspondence to: YANG Zhi-Hua

Tel: 86-10-87788439

Fax: 86-10-67783169

E-mail: yang_zhihua_prof@yahoo
.com.cn

基金项目: 国家科技攻关计划

(No. 2004BA703B05)

Grants: National Key Technologies

R&D Program of China

(No. 2004BA703B05)

收稿日期: 2006-05-29

修回日期: 2006-08-23

[ABSTRACT] **BACKGROUND & OBJECTIVE:** In malignant transformation, mutant gene products and dysregulated proteins can become tumor antigens and activate immunoreactions. Therefore, auto-antibodies exist in sera of cancer patients. Serologic analysis of recombinant cDNA expression libraries (SEREX) using autologous and allogenic patient sera provides a powerful approach to identify tumor antigens. This study was to identify esophageal cancer antigens with SEREX for serologic diagnosis, gene therapy, and immune therapy. **METHODS:** Expression library of cDNA from esophageal squamous cell carcinoma was constructed. SEREX screened out 21 positive clones from the 1.6×10^6 clones in the established library. The 21 positive clones were subcloned to monoclonality and submitted to *in vivo* excision of pBluescript phagemids. The nucleotide sequences of cDNA inserts were analyzed with DNASIS and BLAST software on EMBL and GenBank. According to the bioinformatics analyses, serologic immunoreactions of 4 colons in 10 samples of esophageal cancer serum and 10 samples of normal control serum were further detected by SADA. **RESULTS:** Of the 21 positive clones, 4 had no homology to any known genes, 17 were known fragments which were defined as antigens of esophageal cancer for the first time. The serologic immunoreaction rates of 4 selected antigens, including Ribosomal protein S4, and so on, were 40%, 60%, 70%, and 30%, respectively, in cancer sera, and 0%, 10%, 20%, and 20%, respectively, in normal sera. **CONCLUSIONS:** Antigens, such as Ribosomal protein S4, are frequently involved in serologic immunoreactions of esophageal cancer. The 21 antigens identified by the present study can be used as potential targets for gene therapy and serologic biomarkers of esophageal cancer.

KEYWORDS: Esophageal neoplasm; Tumor antigen; SEREX; cDNA expression library

【摘要】 背景与目的: 正常细胞向癌细胞转化过程中, 突变的基因或各种异常表达的蛋白可以成为肿瘤抗原诱导机体的免疫反应, 因此肿瘤患者的血清中存在着与肿瘤相关的自身抗体。重组 cDNA 表达文库血清学分析法 (serological analysis of recombinant cDNA expression libraries, SEREX) 是利用肿瘤患者血清中的自身抗体筛选、鉴定肿瘤抗原的技术。本研究拟采用 SEREX 的方法寻找食管癌自身抗体的相关肿瘤抗原, 鉴定与食管癌发生、发展相关的基因和免疫治疗分子靶点, 并为食管癌的诊断提供候选血清标志物。方法: 用食管癌组织建立库容量达 1.6×10^6 pfu 的 cDNA 表达文库, SEREX 筛选获得 21 个不同 cDNA 序列的阳性克隆, 进一步使用 SADA 法分析其中 4 个抗原在 10 例食管癌及 10 例正常人血清中的反应。结果: 在 Homo sapiens desmin (DES) 等 21 个阳性克隆中, 4 个克隆与已知 EST 序列明显无同源性, 另外 17 个克隆与已知基因高度同源。Ribosomal protein S4 等 4 个抗原与食管癌患者和正常人血清反应阳性率分别为 40% 和 0%、60% 和 10%、70% 和 20%、30% 和 20%。结论: Ribosomal protein S4 等 4 个抗原普遍参与了食管癌患者的体液免疫反应, 与食

管癌患者血清的反应阳性率明显高于正常人的血清。本研究发现的 21 个食管癌抗原可作为食管癌治疗的潜在分子靶点和食管癌诊断新的候选血清学标志物。

关键词:食管肿瘤;肿瘤抗原;SEREX;cDNA 表达文库

中图分类号:R73 文献标识码:B

文章编号:1000-467X(2007)01-0100-06

食管癌是常见恶性肿瘤,其发病率及死亡率高。我国食管癌发病和死亡人数分别占全球食管癌发病和死亡人数的 53.86%和 49.26%,其死亡率位居所有肿瘤的第四位^[1]。正常细胞向癌细胞转化过程中,突变的基因或各种异常表达的蛋白可以成为肿瘤抗原诱导机体的免疫反应,在肿瘤患者血清中可以检测到肿瘤相关抗原的自身抗体^[2]。进一步的研究发现在肿瘤患者和正常人的血清中肿瘤自身抗体存在显著性差异^[3],提示自身抗体也有可能作为乳腺癌早期诊断的标志物。重组 cDNA 表达文库血清学分析法 (serological analysis of recombinant cDNA expression libraries, SEREX) 是利用肿瘤患者血清中的自身抗体筛选、鉴定肿瘤抗原的技术^[4-6]。该技术已鉴定得到了多达上千种肿瘤相关的自身抗原。本研究采用 SEREX 技术筛选、鉴定食管癌相关抗原,以期对食管癌免疫治疗血清诊断提供候选的分子靶点和血清分子标志物。

1 材料与方法

1.1 材料

食管癌组织来自河南省林州市肿瘤医院的 1 例男性食管癌患者,48 岁,中分化鳞状细胞癌,T3N1M0。手术获取的癌组织和患者血清采集后立即-80℃冻存备用。10 例术前血清来自中国医学科学院肿瘤医院食管癌患者,包括 4 例高分化鳞癌、5 例中分化和 1 例低分化鳞癌,另收集 10 例来自婚检自愿者的健康正常人血清,采集后立即分装-80℃冻存备用。

1.2 方法

1.2.1 食管癌组织 mRNA 的提取 取食管癌组织 500 mg,按照 mRNA 提取试剂盒 mRNA PolyATtract System 1000

的说明书进行。提取的 mRNA 溶于无 RNase 去离子水,测 A_{260}/A_{280} 值,1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。取 6μg mRNA 用于 cDNA 文库的构建。

1.2.2 cDNA 表达文库的构建 cDNA 表达文库的构建使用 Stratagene 公司提供的 ZAP-cDNA[®] Library Construction Kit。第一链 cDNA 合成使用 Thermoscript RT 高温逆转录酶 (Invitrogen),其余参照建库试剂盒说明书进行。文库 4℃保存,筛选之前不扩增。

1.2.3 大肠杆菌/噬菌体裂解液的制备 从四环素平板中挑取单克隆 XL1-Blue-MRF' 宿主菌,于含有 $MgSO_4$ 和麦芽糖的 LB 培养基中培养至 A_{600} 在 0.4 和 1.0 之间。3 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 10 mmol/L $MgSO_4$ 重悬细菌沉淀至 A_{600} 约为 0.5,取 600 μl 菌液加入 7×10^3 pfu 的 λ-ZAP 空载噬菌体,37℃孵育 15 min 后加入 8 ml NZY/琼脂糖顶层胶,混匀后铺于 18 cm 直径的含有 NZY/Agar 底层胶的平板上,37℃扩增培养过夜。然后于平板中加入 10 ml 偶联缓冲液 (0.1 mol/l $NaHCO_3$, pH 8.3),4℃振荡洗脱 16 h。收集洗脱液,超声破碎未完全裂解的大肠杆菌。经紫外分光光度法进行蛋白定量。

1.2.4 大肠杆菌/噬菌体裂解液与 CNBr-Sepharose 4B 柱料的偶联 偶联的过程基本按照 Amersham 公司提供的说明书进行。偶联后用含有 0.02%叠氮钠的 TBS 平衡凝胶介质,4℃保存待用。根据公式计算偶联率以初步估计柱料的偶联效率:偶联率=(偶联前裂解液蛋白的量-偶联后裂解液蛋白的量)/偶联前裂解液蛋白的总量。

1.2.5 血清标本的吸收 采用患者血清对文库进行免疫学筛选之前,必须排除血清中存在的与细菌和噬菌体反应的抗体。采用偶联有感染 λ-ZAP 空载噬菌体的 XL1-Blue-MRF' 宿主菌蛋白的 CNBr-Sepharose 4B 柱料对血清进行预吸收。去除与血清中与大肠杆菌/噬菌体蛋白反应的抗体成分。用含有 1% BSA 的 1×TBS 1:10 稀释血清后,按照 1:1 的体积比与偶联了大肠杆菌/噬菌体裂解蛋白的柱料混合,4℃轻度振荡过夜,收集血清。血清重复吸收 3

次。收集吸收后的血清,用含有 1% BSA 的 1×TBS 以最终 1:50 的稀释度稀释血清,加入 0.02%的叠氮钠防腐,4℃保存备用。

1.2.6 血清标本吸收效果的检测 吸收前、后的血清以最终 1:50 的稀释度,分别与转印有 λ-ZAP 空载噬菌体表达蛋白的硝酸纤维素膜反应,以检测血清吸收的效果。λ-ZAP 空载噬菌体感染 XL1-Blue-MRF' 宿主菌,共同铺于 90 mm 直径的含有 NZY/Agar 底层胶的平板上,37℃扩增培养至噬斑刚刚可见时,转印至经 10 mmol/L IPTG (Merck) 浸泡的硝酸纤维素膜上 37℃诱导表达 8h。将平板移至 4℃,放置 2 h。揭掉硝酸纤维素膜后,于 TBS/T 缓冲液 (含 0.1%吐温 20 的 TBS 缓冲液) 中洗涤 5 次,用 1% BSA/TBS 4℃封闭过夜。然后,硝酸纤维素膜分成两部分,分别与吸收前及吸收后血清室温反应 1 h。用 TBS/T 洗涤 5 次,然后与 1:2 500 稀释的碱性磷酸酶标记的羊抗人 IgG (Sigma) 二抗室温孵育 1 h。用 TBS/T 缓冲液洗涤 5 次,最后 1 次换用 TBS,加入至配制好的 NBT/BCIP 底物液中,暗室内显色。比较血清吸收前后硝酸纤维素膜的背景反应。

1.2.7 cDNA 文库的筛选 取 600 μl XL1-Blue-MRF' 菌液加入 7×10^3 pfu 的重组噬菌体,37℃孵育 15 min 后加入 8 ml NZY/琼脂糖顶层胶,混合后铺于 18 cm 直径的含有 NZY/Agar 底层胶的平板上,37℃扩增培养至噬斑刚刚可见时,转印至经 10 mmol/L IPTG 浸泡的硝酸纤维素膜上 37℃诱导表达 8 h。将平板移至 4℃,放置 2 h。硝酸纤维素膜自体血清室温反应 2 h,其它操作同血清标本吸收效果的检测。将与阳性显色斑对应的噬斑即为 cDNA 文库第一轮筛选的阳性噬菌体克隆。将第一轮筛选到的阳性克隆混合后进行第二轮筛选,但是同一个平板铺两张膜,一张与患者自体的血清反应,另一张则直接与羊抗人 IgG-AP 反应,两张膜同时显色。那些与自体血清反应阳性而直接与羊抗人 IgG-AP 二抗反应阴性的噬斑为文库第二次筛选的阳性克隆。

1.2.8 阳性克隆的内部剪切 按

Stratagene公司提供的说明书将含有插入序列的质粒转化为单链丝状噬菌体形式存在的 pBluescript 噬菌粒。噬菌粒感染 SOLR 菌后,用于碱裂解法小量提取质粒,以 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行双酶切,初步鉴定插入片段的大小。

1.2.9 核苷酸序列测定及生物信息学分析 测序由上海博亚公司完成。将测序所得核苷酸序列在各种核苷酸和蛋白质数据库中进行分析,主要包括核苷酸序列同源性分析、读码框分析、蛋白质序列同源性分析、SEREX 数据库分析、Locuslink 分析、UniGene 分析以及 SAGE 分析等等。

1.2.10 SADA (serum antibody detection array) 法检测抗原克隆与血清抗体的反应 按照 0.5 μ L/点 (相当于 500 pfu) 将各阳性克隆噬菌体及空载对照噬菌体点于事先制备好的含有 5 mmol/L IPTG 及 0.8% Agrose 的 LB 琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 倒置扩增过夜。然后转印至硝酸纤维素膜上 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 4~5 h。将平板移至 4 $^{\circ}$ C,放置 2 h。与吸收后的异体血清室温反应 1 h,步骤同 cDNA 文库筛选。

2 结 果

2.1 人食管癌 cDNA 表达文库构建结果

2.1.1 人食管癌组织 mRNA 的鉴定 从 300 mg 食管癌组织样品中共获得 mRNA 约 7.5 μ g。经紫外分光光度计测定,其 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} 的值分别为 2.01 和 1.98,证明 mRNA 纯度符合要求。纯化的 mRNA 在 1% 琼脂糖凝胶上呈一条从加样孔到 0.1 kb 左右的电泳拖带,且主要集中于 0.5~2.0 kb 之间,表明 mRNA 质量较好,无明显降解 (图 1)。

2.1.2 成功构建库容为 1×10^6 pfu 食管癌组织 cDNA 表达文库 以提取的 5 μ g 食管癌组织 mRNA 为模板,在合成 cDNA 第一链和第二链的同时随机掺入 32 P。电泳后放射自显影显示,cDNA 第一链和第二链均介于 0.5~5.0 kb 之间,主要集中在 1~3 kb 左右 (图 2)。得到的双链 cDNA 经末端补平后,并带 *EcoR* I、*Xho* I 酶切位点的两个粘性末端。这样得到的双链 cDNA 片段在

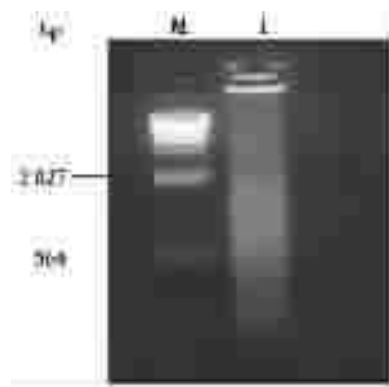


图 1 食管癌组织 mRNA
Figure 1 mRNA of esophageal cancer tissue
Lane M: marker digested by λ /Hind III; lane 1: pure esophageal cancer mRNA.

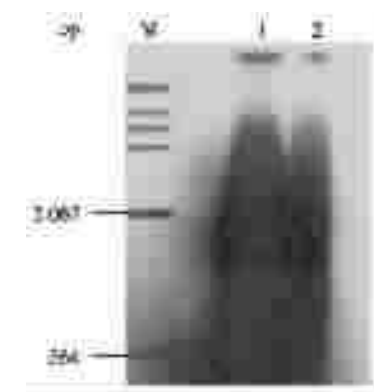


图 2 食管癌组织 cDNA 第一链和第二链电泳放射自显影 X 光片图
Figure 2 X-ray autoradiograph of first-strand and second-strand cDNA of esophageal carcinoma tissue
Lane M: marker digested by λ /Hind III; lane 1: first-strand cDNA; lane 2: second-strand cDNA.

Sephacose CL-2B 凝胶柱中按照分子大小分离并分部收集。收集的各管 cDNA 片段经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及放射自显影,结果显示第 5~11 管的片段长度大于 500 bp (图 3)。合并第 5~11 管,沉淀后溶于 5 μ L 去离子水中。EB 琼脂平板定量其浓度为 100 ng/ μ L。

取 100 ng 与 ZAP Express 载体连接后,用 GigapackIII Gold Cloning kit 提供的包装蛋白进行包装。获得库容为 1×10^6 pfu 的人食管癌组织 cDNA 表达原始文库。文库不经扩增直接用于抗原筛选。

2.2 从食管癌组织 cDNA 表达文库中筛选与患者血清反应的克隆结果

2.2.1 反应血清的吸收,排除与细菌和噬菌体反应的抗体 本研究采用的自体 and 异体血清均采用偶联有感染 λ -ZAP 空载噬菌体的 XL1-Blue-MRF' 宿主菌蛋白的 CNBr-Sepharose 4B 柱料对血清进行预吸收。图 4 为一张吸收与未吸收的患者自体血清与文库反应后效果的代表性图示。可见经吸收后,背景噬菌斑显色强度明显降低,阳性克隆噬菌斑清晰可辨。

2.2.2 血清免疫学筛选获取阳性反应克隆 利用吸收后的食管癌患者自体血清筛选了总共 1×10^6 的克隆。初筛共获得了 184 个阳性克隆。图 5A 是一张经初筛得到的阳性克隆在硝酸纤维素膜上的显色情况。经分析排除了假阳性克隆后共得到 75 个阳性克隆。将得到的 75 个克隆混合培养后重新转印到新的膜上进行第二轮筛选,并排除自身 IgG 反应的克隆,即排除那些能直接与抗人 IgG 的二抗反应的克隆。图 5B 是经过第二轮筛选后阳性克隆在膜上显色的一张代表图。经过第二轮筛选共得到 21 个阳性克隆。

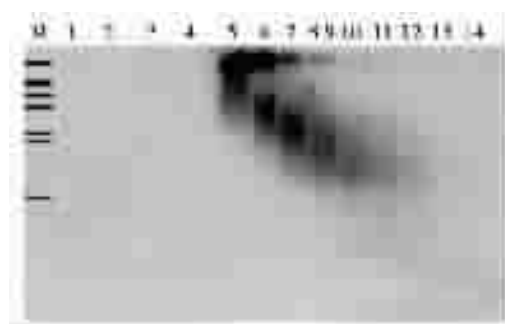


图 3 采用凝胶柱层析分离的 cDNA 片段经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后的放射自显影图

Figure 3 X-ray autoradiograph of cDNA fragments fractionated by Sepharose CL-2B gel filtration medium
Lane M: marker digested by λ Hind III; lanes 1-14: cDNA fragments fractionated by Sepharose CL-2B gel filtration medium and collected after centrifugation.

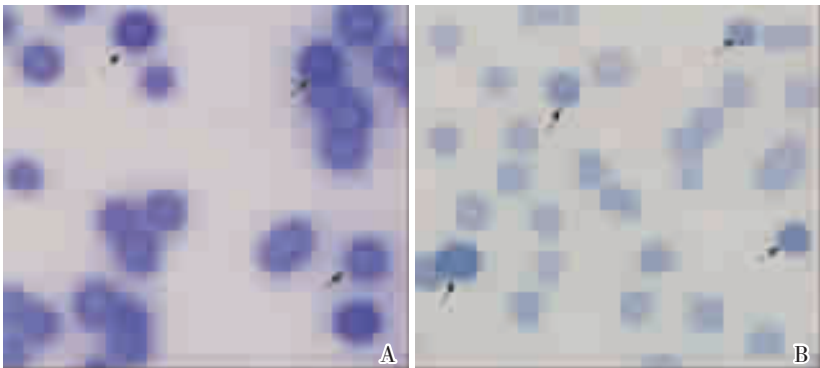


图 4 患者自体血清与文库反应的结果

Figure 4 Immunoreaction of library clones with autologous serum

A: Immunoreaction of autologous serum without absorption by proteins of Bacterial Host Strain and wild-type lambda phage.
B: Immunoreaction of autologous serum absorbed by proteins of Bacterial Host Strain and wild-type lambda phage.
The arrows point to positive clones.

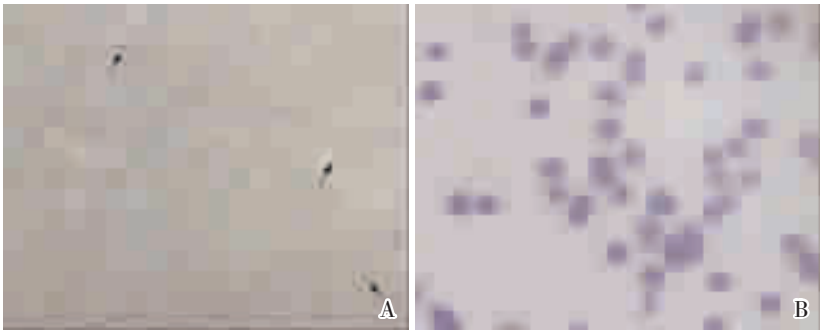


图 5 文库血清学筛选得到的阳性克隆

Figure 5 Positive clones of the library screened by autoantibodies in autologous serum
A: primary screening; B: second round screening.
The arrows point to positive clones during the primary screening.



图 6 部分阳性克隆双酶切后 1% 琼脂糖电泳图

Figure 6 Seven positive clones digested with *EcoR* I and *Xho* I
Lane M: marker; lanes 1-7: positive clones.

2.3 阳性克隆代表基因同源性分析结果
2.3.1 阳性克隆双酶切 对获得的 21 个阳性克隆首先进行内部剪切。用

EcoR I 和 *Xho* I 双酶切鉴定外源插入片段的大小。图 6 显示的是部分阳性克隆双酶切后经 1% 琼脂糖凝胶电泳的结果。经鉴定, 21 个阳性克隆均含有外源插入片段, 片段大小在 0.5~2.0 kb 之间。
2.3.2 阳性克隆代表的肿瘤抗原基因序列的鉴定及同源性分析 将这些克隆进行核苷酸序列测定。核苷酸序列显示 21 个克隆代表不同的抗原分子。进入 GenBank 进行 EST

同源性比较发现, 有 17 个克隆与 GenBank 已有的 EST 具有较高的同源性, 如表 1 所示。其中 5 个克隆的 cDNA 分别含有 5 个基因的全长 cDNA 序列, 它们是: ESO-8 为人活化的 RAN 聚合酶 II 共转录因子 4, ESO-10 为人核糖体蛋白质 S4, ESO-12 为人肝细胞色素 C 氧化酶亚单位 VIIa 多肽 2, ESO-13 为人微粒体的谷胱甘肽 S 转移酶 2 以及 ESO-15(白介素 7 受体)。其中 ESO-15 为我们首先发现的完整的新基因 cDNA 序列, 在 GenBank 中的登录号为 AF373204, 后来鉴定为白介素 7 受体。余下 4 个克隆的序列与 GenBank 已报道的 EST 或基因的外显子序列无明显同源。
2.4 阳性克隆与正常人血清反应性低于食管癌患者

用 SADA 法检测 4 个具有全长 cDNA 序列的克隆与 10 例食管癌患者血清和 10 例正常人血清的反应情况。图 7 是其中两例食管癌和两例正常人血清的反应情况。患者 1 的血清与克隆 ESO-8 反应, 患者 2 的血清与克隆 ESO-12、ESO-13 反应; 而 2 例正常人的血清均不与这 4 个克隆反应。
4 个克隆与 20 例异体血清的反应情况见表 2。从表中可见 4 个克隆与肿瘤患者的血清反应的阳性率均高于与正常人血清的反应。其中 8、10 和 12 号克隆与肿瘤患者的血清反应阳性率高出正常人血清反应的 3 倍以上。

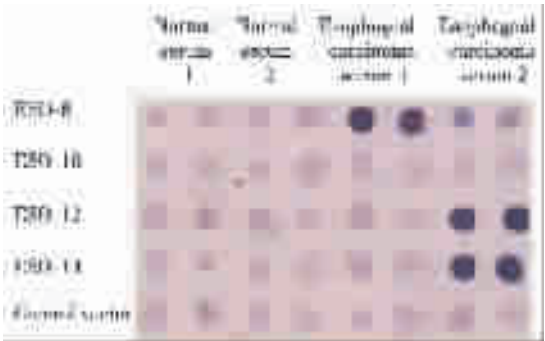


图 7 SADA 法检测 4 例阳性克隆与异体血清的反应情况

Figure 7 The immunoreactions of 4 positive clones with heterologous sera detected by SADA
Each serologic reaction was parallel detected with two same clones. Blue-black dots represent positive immunoreactions. Vector without insert was used as a negative control.

表 1 食管癌 cDNA 表达文库阳性克隆的同源性分析
Table 1 BLAST outcome of inserts from positive clones

Clone	Gene	Length of identified nucleotide sequence (bp)	EST homology analysis in GenBank (%)	Function
ESO-1	Homo sapiens desmin (DES)	635	96	Cell structure
ESO-2	Homo sapiens CDP-diacylglycerol—inositol 3-phosphatidyltransferase (phosphatidylinositol synthase) (CDIPT)	595	99	Metabolism
ESO-3	Homo sapiens ferritin heavy chain subunit	573	98	Metabolism
ESO-4	Homo sapiens glutathione S-transferaes pi (GSTP1)	336	100	Metabolism
ESO-7	Homo sapiens cathepsin B (CTSB)	651	99	Metabolism
ESO-8	RNApolymerase II transcription cofactor 4	381	99	RNA synthesis
ESO-10	Ribosomal protein S4	802	100	Ribosome protein
ESO-11	Homo sapiens RAN, member RAS oncogene family	703	98	Signal transduction
ESO-12	Homo sapiens similar to cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 (liver) (H. sapiens)	408	100	Metabolism
ESO-13	Homo sapiens microsomal glutathione S-transferase 2 (MGST2)	541	100	Metabolism
ESO-14	Homo sapiens singed (Drosophila)-like (sea urchin fascin homolog like) (SNL)	482	99	Cell mobility
ESO-15	Interleukin 7 receptor (IL-7R)	701	100	Signal transduction
ESO-16	Human calmodulin- I (CALM1)	656	97	Signal transduction
ESO-18	Homo sapiens transgelin (TAGLN)	544	100	Cell structure
ESO-19	Homo sapiens fibronectin (FN precursor).	684	98	Cell adhesion
ESO-20	Homo sapiens collagen, type I , alpha 1 (COL1A1)	663	94	Cell adhesion
ESO-21	Homo sapiens Humanin (HN)	605	99	Signal transduction

表 2 4 个克隆与前面 20 例血清的
反应情况

Table 2 Reactions of 4 positive
clones with 10 samples of esophageal
cancer serum and 10 samples of
normal control serum (cases)

Clone	Esophageal cancer sera	Normal control sera
ESO-8	4	0
ESO-10	6	1
ESO-12	7	2
ESO-13	3	2

3 讨 论

肿瘤免疫识别研究多注意 T 细胞免疫,特别是 CTL 的作用。由于细胞免疫和体液免疫在抗肿瘤免疫应答中协同发挥作用,所以肿瘤抗原在体内不仅能诱导细胞免疫应答,而且还能诱导产生特异性抗体。已经证明采用 SEREX 技术筛选出的肿瘤抗原,如 MAGE,既能诱导细胞免疫应答,又能刺激机体产生抗体。我们应用该技术研究食管癌肿瘤抗原,筛选获得 21 个

抗原分子,其中 17 个编码基因与已知基因有较高的同源性,这些抗原分子在食管癌患者体内能不同程度地刺激免疫系统产生特异性抗体。同时筛选获得 4 个与已知的 EST 或基因外显子无同源性的序列,有报道这些序列表达的肽段可能是模拟了某些抗原分子的表位而被肿瘤自身抗体所识别^[7]。

生物信息学分析表明在我们鉴定的已知抗原中主要有以下一些类型:

(1)参与致癌物代谢的食管癌相关抗原。在食管癌发生过程中,绝大多数化学致癌物为前致癌物,需要被细胞色素氧化酶代谢后才具有致癌性。其中我们筛选到一个克隆是细胞色素 C 氧化酶亚单位 VIIa 多肽 2,它可能与激活致癌物有关。我们筛选到的与 GST- π 高度同源的食管癌抗原,它可能对体内活化的致癌物具有解毒的作用。GST- π 是食管组织恶变前的一个早期标志物,是食管粘膜接触致癌物增多的标志^[8]。

(2)信号传导途径相关抗原。采用 SEREX 技术,我们筛选到一个克隆 ESO-11,该克隆为 ras 癌基因家族成员

ran,该 cDNA 的预测氨基酸序列具有 GTP 结合结构域。ran 首先是从事胎瘤 cDNA 文库中筛选出来^[9],参与多种肿瘤内信号转导,当 ran 分子与 GTPase 活化蛋白 (GAPs) 结合时,ran 的 GTPase 活性就被诱导,从而结合 GTP,使该条信号通路处于活性状态,如果 ran 永久处于 ran-GTP 结合状态,细胞就会发生异常有丝分裂,与肿瘤形成有关。所以,从食管癌转移灶 cDNA 表达文库中筛选到 ran 高度同源蛋白,提示了食管癌的发生可能有上述相似的机制^[10]。另外,ESO-16 号克隆为人钙调蛋白 I,该蛋白又称磷酸化酶激酶 delta 亚单位 (PHKD),参与了细胞的生长,细胞周期的调节^[11]。

(3)细胞黏附分子相关抗原。良性肿瘤与恶性肿瘤的关键区别就是恶性肿瘤具侵袭和转移能力。目前的研究表明肿瘤细胞表面的黏附分子直接参与了肿瘤细胞的侵袭、转移。在我们的研究中发现了两个克隆为细胞黏附分子:人纤连蛋白和人 I 型胶原 1。有关纤连蛋白参与肿瘤发生发展的报道很多,在食管癌的研究中发现纤连蛋白

在食管癌中高表达,并且参与了癌细胞 Erk 通路的活化,加速了食管癌的演进^[12]。胶原分子直接参与了肿瘤细胞之间、肿瘤细胞与基质的黏附,一个日本的研究小组报道 I 型胶原在食管癌患者血清中升高,并且可以作为食管癌诊断的血清标志物^[13]。因此 I 型胶原作为肿瘤相关抗原同时还能够激发体液免疫,升高肿瘤患者血清中相应自身抗体的水平。

(4)人核糖体蛋白相关抗原。我们从食管癌转移灶 cDNA 文库中筛选到一个阳性克隆 ESO-10,GenBank 分析表明其与人 rPS4 mRNA 有 100%的同源性。有报道显示人核糖体蛋白(rPS)与肿瘤的发生、发展密切相关,如 rPS2 在人肝癌中表达上调^[14],rPS3 参与细胞凋亡的调控^[15]。所以,有理由推测,rPS4 在食管癌的发生过程中可能也起重要作用。

通过 SADA 法,我们进一步验证了这些通过患者自体血清筛选出来的克隆在其他食管癌患者和正常人体内参与的自体肿瘤抗原反应的情况。4 个克隆在 10 例食管癌患者的异体血清中均有一定的反应阳性率,ESO-12 更是达到了 70%,表明该抗原较普遍地参与了食管癌的病理演进过程。其中除了 ESO-13 以外,其它 3 个克隆在食管癌患者血清中的阳性率明显高于正常人血清。这一结果表明这些抗原有可能作为食管癌诊断的血清学分子标志物。2005 年,Wang 等^[7]报道他们通过类似方法得到的 22 个前列腺癌抗原对于前列腺癌诊断的敏感性达到了 81.6%,特异性达到了 88.2%,明显高于 PSA 诊断的结果。他们的这一研究被新英格兰医学杂志评为近年来分子诊断标志物最重要的进展^[16]。下一步,我们将对这 21 个克隆进行系统的研究,扩大血清样本,探讨这些抗原作为临床食管癌血清学诊断标志物的可

能。

总之,我们的研究分离得到了食管癌相关肿瘤抗原。由于这些食管癌相关肿瘤抗原能诱导机体产生免疫反应,因此可作为食管癌免疫治疗的分子靶点,同时也可能成为食管癌诊断的血清学分子标志物。

[参 考 文 献]

- [1] He Y T, Hou J, Qiao C Y, et al. An analysis of esophageal cancer incidence in Cixian county from 1974 to 1996 [J]. *World J Gastroenterol*, 2003,9(2):209-213.
- [2] Houghton A N, Guevara-Patino J A. Immune recognition of self in immunity against cancer [J]. *J Clin Invest*, 2004,114(4):551-559.
- [3] Fernandez-Madrid F, Tang N, Alansari H, et al. Autoantibodies to Annexin XI-A and other autoantigens in the diagnosis of breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2004,64(15):5089-5096.
- [4] Swissa M, Amital-Teplizki H, Haim N, et al. Autoantibodies in neoplasia. An unresolved enigma [J]. *Cancer*, 1990,65(11):2554-2558.
- [5] Imai H, Nakano Y, Kiyosawa K, et al. Increasing titers and changing specificities of antinuclear antibodies in patients with chronic liver disease who develop hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer*, 1993,71(1):26-35.
- [6] Rohayem J, Diestelkoetter P, Weigle B, et al. Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein survivin in cancer patients [J]. *Cancer Res*, 2000,60(7):1815-1817.
- [7] Wang X, Yu J, Sreekumar A, et al. Autoantibody signatures in prostate cancer [J]. *N Engl J Med*, 2005,353(12):1224-1235.
- [8] 李之山,张汝刚,罗贤懋,等.谷胱

甘肽硫转移酶- π 在人食管鳞癌中的表达 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2001,23(1):39-42.

- [9] Drivas G T, Shih A, Coutavas E, et al. Characterization of four novel ras-like genes expressed in a human teratocarcinoma cell line [J]. *Mol Cell Biol*, 1990,10(4):1793-1798.
- [10] Wennerberg K, Rossman K L, Der C J. The Ras superfamily at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2005,118(Pt 5):843-846.
- [11] Kahl C R, Means A R. Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways [J]. *Endocr Rev*, 2003,24(6):719-736.
- [12] Zhang J, Zhi H, Zhou C, et al. Up-regulation of fibronectin in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with activation of the Erk pathway [J]. *J Pathol*, 2005,207(4):402-409.
- [13] Nabeya Y, Shimada H, Okazumi S, et al. Serum cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) as a prognostic tumor marker in patients with esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer*, 2002,15,94(4):940-949.
- [14] Kowalczyk P, Woszczynski M, Ostrowski J. Increased expression of ribosomal protein S2 in liver tumors, posthepatomized livers, and proliferating hepatocytes *in vitro* [J]. *Acta Biochim Pol*, 2002,49(3):615-624.
- [15] Jang C Y, Lee J Y, Kim J. RpS3, a DNA repair endonuclease and ribosomal protein, is involved in apoptosis [J]. *FEBS Lett*, 2004,560(1-3):81-85.
- [16] Finn O J. Immune response as a biomarker for cancer detection and a lot more [J]. *N Engl J Med*, 2005,353(12):1288-1290.

[编辑及校对:庄爱华]