

· 临床研究 ·

抗 SPAG9 自身抗体在肿瘤患者外周血中表达分析*

任碧琼, 李 勇, 邹国英, 徐国锋, 徐 飞
(湖南省第二人民医院检验科, 长沙 410007)

摘要:目的 通过对各种肿瘤患者血清中精子相关抗原 9(SPAG9)自身抗体的检测初步了解肿瘤患者外周血中抗 SPAG9 自身抗体的表达情况。方法 采用重组 SPAG9 建立 ELISA 检测肝癌、肺癌以及其他肿瘤患者血清中的抗 SPAG9 自身抗体水平,以了解 SPAG9 引起的肿瘤患者体液免疫反应。以健康对照组血清中抗 SPAG9 自身抗体 OD 值的均值加 2 倍 SD 作为阳性判断标准。结果 86 例肿瘤患者血清中抗 SPAG9 自身抗体总体阳性率为 32.6%,肝癌组阳性率为 48.1%,肺癌组为 16.2%,其他肿瘤组为 40.8%。结论 SPAG9 自身抗体在各种肿瘤患者外周血中均有不同程度的表达,值得进一步研究。

关键词:精子相关抗原-9;肿瘤;自身抗体

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.30.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)30-3141-02

Research on expression of anti-SPAG9 autoantibody in peripheral blood of cancer patients*

Ren Biqiong, Li Yong, Zou Guoying, Xu Guofeng, Xu Fei

(Department of Clinical Laboratory, Hunan No. 2 People's Hospital, Changsha, Hunan 410007, China)

Abstract:Objective To discuss the expression of anti-SPAG9 autoantibody in peripheral blood of cancer patients by testing the anti-SPAG9 autoantibody in serum of cancer patients. **Methods** ELISA built by SPAG9 recombinant protein for the detection the levels of serum SPAG9 antibodies in liver cancer, lung cancer and other cancers patients to monitor the immune response against SPAG9 in cancer patients. The positive criterion was titers above the mean \pm 2 SD of the healthy sera. **Results** The total positive rate of 86 cancer patients was 32.6%; liver cancer group was about 48.1%; lung group was just 16.2% and others was 40.8%. **Conclusion** Anti-SPAG9 autoantibody expression in peripheral blood of various cancer patients with different degree which worthiness further study.

Key words: SPAG-9; neoplasms; autoantibodies

众所周知,癌症死亡占疾病死亡首位,成功治疗的关键在于早期诊断,肿瘤标志物的研究一直是热点。人们试图开发抗肿瘤抗原的自身抗体,而不再是瞄准血清抗原作为生物标志^[1],而肿瘤相关抗原多是自身蛋白质往往没有太多的免疫原性^[2-4],如抗 CT 抗原 NY-ESO-1 自身抗体在原发性乳腺癌患者中检出率仅占 4%^[5],抗 CT 抗原 SCP-1 及 SSX-2 自身抗体分别为 6% 和 1%^[6],所以,需进一步努力鉴别免疫原性肿瘤抗原。近年,国外学者发现精子相关抗原-9(sperm-associated antigen 9, SPAG9)不仅在肿瘤组织表达的阳性率超过 80%(蛋白水平和 RNA 水平),而且该抗原免疫原性强,能引起肿瘤患者较强的体液免疫反应,产生相应抗体。有报道^[12]抗 SPAG9 抗体在卵巢上皮癌患者血清中的阳性检出率为 67%,并在活体内各种组织类型的早期阶段(I~II 期)表现出高的抗 SPAG9 免疫活性,而健康人血清中完全没有。另外,有一个较高的 SPAG9 免疫反应积分的独特模式,与乳腺癌复发显著相关^[13]。这些研究为进一步大规模证明肿瘤早期诊断和治疗打下基础。本研究采用 SPAG 重组蛋白建立 ELISA 对 86 例肿瘤患者血清中的 SPAG9 自身抗体进行检测,结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 以 2009 年 7 月至 2010 年 9 月湖南省第二人民医院肿瘤科的 86 例肿瘤患者为研究对象,其中,男 61 例,女 25 例,年龄(54 \pm 11)岁。肺癌 37 例,肝癌 27 例,其他癌 22 例,见表 1。健康对照组 22 例,其中,男 14 例,女 8 例,来自湖南省第二人民医院健康体检中心,实验室检查未见任何异常。所有肿瘤均结合病理切片、超声、CT、磁共振、肿瘤标志物等检查确诊。

表 1 86 例肿瘤患者一般情况

| 分类 | n | 年龄($\bar{x} \pm s$, 岁) | 性别(男/女) |
|---------|----|--------------------------|---------|
| 肺癌 | 37 | 53.58 \pm 10.484 | 20/17 |
| 肝癌 | 27 | 51.42 \pm 10.93 | 16/11 |
| 其他癌 | | | |
| 子宫、卵巢癌 | 4 | 55.75 \pm 8.57 | 0/4 |
| 乳腺癌、乳腺癌 | 3 | 58.00 \pm 23.40 | 0/3 |
| 结肠、直肠癌 | 2 | 38/72 | 1/1 |
| 胰头、胆管癌 | 2 | 47/54 | 2/0 |
| 鼻咽癌 | 2 | 43/44 | 2/0 |
| 肾癌 | 4 | 48.00 \pm 10.48 | 1/3 |
| 食管癌 | 2 | 51/61 | 1/1 |
| 淋巴瘤 | 1 | 61 | 1/0 |
| 脑膜瘤 | 1 | 37 | 1/0 |
| 胶质瘤 | 1 | 55 | 1/0 |

1.2 方法

1.2.1 标本收集 采集肿瘤患者空腹血 3~5 mL,放置 20 min,3 000 r/min 离心 10 min 分离血清,-80 °C 冰箱低温保存。健康对照组同样条件采集与保存。

1.2.2 SPAG9 检测 采用台湾 Abnova 公司提供的 SPAG9 重组蛋白作为抗原建立 ELISA。包被 96 孔板,每孔 100 ng 抗原,体积 60 μ L,放置 4 °C 冰箱过夜;然后取出用洗板机洗板 5 次,每次 1 min;加封闭液每孔 200 μ L,37 °C 放置 2 h;加入稀释后的样本每孔 100 μ L,37 °C 放置 1 h 然后再洗板 5 次,每次 1

* 基金项目:湖南省科技计划基金资助项目(2009SK3092);湖南省卫生厅计划基金资助项目(B2011-099)。

min。加稀释后的酶标二抗,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 放置 1 h;再洗板 5 次,每次 1 min;分别加 A、B 显色液每孔 50 μ L,37 $^{\circ}$ C 放置 45 min 后加终止液 50 μ L 然后在酶标仪上 450 nm 和 620 nm 波长比色。参照文献[7],共检测 86 例肿瘤患者及 22 例健康人血清抗 SPAG9 抗体滴度,本次研究的最佳条件为:SPAG9 重组蛋白包被量为每孔 100 ng,血清 1:10 稀释,酶标仪比色波长 450 nm 和 620 nm。以健康人吸光值均数加 2 倍标准差作为阳性判断标准。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.5 软件进行 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各肿瘤患者组及对照组检测情况 86 例肿瘤患者血清中 SPAG9 免疫反应总体阳性率为 32.6%,肝癌组阳性率为 48.1%,肺癌组为 16.2%,其他肿瘤组为 40.8%,健康对照组为 4.54%。肝癌组及其他肿瘤组与对照组比较差异有统计学意义,见表 2、图 1。

表 2 各肿瘤患者组及对照组检测情况

| 组别 | SPAG9 免疫反应性(%) | OD | P |
|-----|----------------|-------|-------|
| 肺癌组 | 6/37(16.2) | 0.157 | 0.240 |
| 肝癌组 | 13/27(48.1) | 0.340 | 0.001 |
| 其他组 | 9/22(40.8) | 0.300 | 0.033 |
| 对照组 | 1/22(4.54) | 0.172 | — |

—:表示此项无数据。

2.2 各肿瘤组 OD 值的分布情况 在肝癌组及其他癌症组患者中 OD 值比较分散,有较强免疫反应患者;肺癌组患者 OD 值相对集中,未见强免疫反应患者,见图 2。

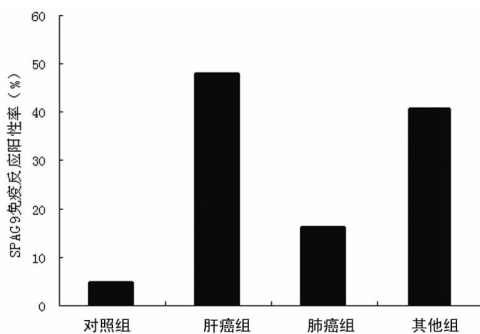


图 1 各组 SPAG9 免疫反应阳性率

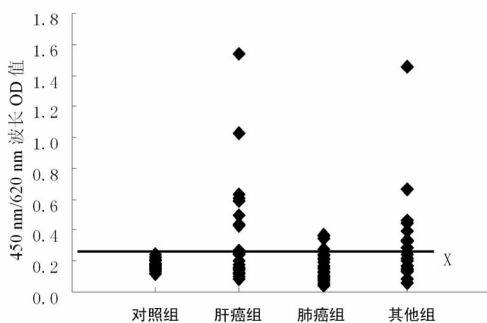


图 2 各组 OD 值分布

3 讨论

SPAG9 是 2004 年发现的癌-睾丸抗原家族的新成员,作为一种支架蛋白与 JNK(c-Jun-NH2-kinase)结合,参与 JNK 信号通路,在细胞的生存、增殖、凋亡和肿瘤的发生等生理过程中

扮演重要调节角色[8-9]。SPAG9 是一个单拷贝基因定位于人类染色体 17q21[9],这个区域是各种癌症中的一个与癌基因的扩增与表达有关的区域。肿瘤抗原的血清学分析揭示抗原编码在 17q21,提示基因编码在 17 号染色体这一区域增强表达是肿瘤的一个关键事件[10],所以,SPAG9 在活体内的表达特征能作为肿瘤进犯和临床结果的分子标志。

国外一系列研究报道 SPAG9 在活体内有着很强的体液免疫反应,在卵巢上皮癌中占 67%[11],乳腺癌中占 80%[12],肾癌中 77%[13],子宫癌中 80%[14],甲状腺癌中 78%[15],而慢性粒细胞白血病中高达 88%[16],由此可以推导,SPAG9 是免疫原性肿瘤抗原,其自身抗体有望成为很好的肿瘤早期诊断指标。

作者的初步研究显示,在 86 份肿瘤患者血液标本中有 28 例表现出 SPAG9 体液免疫反应性,总敏感度为 32.6%,其中肺癌的敏感度为 16.2%,肝癌为 48.1%,其他癌为 40.9%;22 例对照组中只有 1 例阳性;特异性为 95.5%。虽然本研究的 SPAG9 自身抗体的阳性率(即敏感度)低于文献报道,但已能初步了解到肿瘤患者外周血中抗 SPAG9 自身抗体的表达远远高于健康人,并且肝癌患者的体液免疫反应较强,至今尚未发现国内外文献报道。肠道、女性相关的肿瘤也表现出较强的免疫反应,相比之下肺癌的免疫反应较弱,这可能与肺部组织的结构特点有关,也可能是入组患者经过各种治疗效果良好、疾病得到有效控制的缘故。同时作者所采用的 ELISA 方法的特异性达到 95.5%,出现假阳性概率仅为 4.5%,说明实验方法特异性较好。但是,若要得到更加理想的实验结果有必要重新收集初诊、未经任何治疗的患者标本进一步研究。总的来说,本研究抗 SPAG9 自身抗体的阳性率低于国外文献报道的原因可能有如下几方面:(1)因为研究对象大多数为已经过放疗、化疗或者陀螺刀治疗的患者而不是肿瘤初诊患者,诸多的治疗因素干扰研究结果,这也提示 SPAG9 与肿瘤细胞存活的关系很值得研究;(2)ELISA 的条件有待优化,抗原包被量以及标本稀释比例有待进一步摸索。另外,需扩大肿瘤患者病例样本数,严格的分期分级,并同时扩大健康对照样本数进行检测。本研究初步证实 SPAG9 的免疫原性,发现抗 SPAG9 自身抗体在各种肿瘤患者外周血中有不同程度的表达,尤其在肝脏肿瘤患者的血清中检出较高的阳性率,值得进一步研究。

参考文献:

- [1] Suri A. Cancer testis antigens-their importance in immunotherapy and in the early detection of cancer[J]. Expert Opin Biol Ther, 2006, 6(3): 379-389.
- [2] Fernandez-Madrid F. Autoantibodies in breast cancer sera: candidate biomarkers and reporters of tumorigenesis[J]. Cancer Lett, 2005, 230(2): 187-198.
- [3] Lechpammer M, Lukac J, Lechpammer S, et al. Humoral immune response to p53 correlates with clinical course in colorectal cancer patients during adjuvant chemotherapy[J]. Int J Colorectal Dis, 2004, 19(1): 114-120.
- [4] Casiano CA, Varela MM, Tan EM. Tumor-associated antigen arrays for the serological diagnosis of cancer[J]. Mol Cell Proteomics, 2006, 5(14): 1745-1759.
- [5] Stockert E, Jager E, Chen YT, et al. A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens[J]. J Exp Med, 1998, 187(10): 1349-1354.

血栓形成,子宫处于缺血缺氧休眠状态,大约在阻断 6~24 h 后,子宫与膀胱、直肠、两侧盆壁动脉交通支重新构建血管网络,正常的平滑肌组织具有较强的溶解血栓的能力,溶解血管内的血栓,使子宫恢复血流,发生再灌注,子宫恢复活性,而肌瘤组织不能溶解血栓,导致永久性梗死^[12-14]。术后病理检查均提示宫体部肌瘤,无 1 例恶性肿瘤,肿瘤直径小于 15 cm。朱宇等^[15]分析出现此种现象的原因可能与纤溶酶原激活因子及纤溶酶原激活物抑制因子在正常子宫组织及肌瘤组织中的差异表达有关。

参考文献:

- [1] Stewart EA. Uterine fibroids[J]. *Lancet*, 2011, 357(2): 293-298.
- [2] Walker CL, Stewart EA. Uterine fibroids: the elephant in the room[J]. *Science*, 2009, 308(12): 1589-1592.
- [3] Lumsden MA. Embolization versus myomectomy versus hysterectomy: which is best, when? [J]. *Hum Reprod*, 2009, 17(2): 253-259.
- [4] Falcone T, Bedaiwy MA. Minimally invasive management of uterine fibroids[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2002, 14(4): 401-407.
- [5] Liu WM. Laparoscopic bipolar coagulation of uterine vessels to treat symptomatic leiomyoma[J]. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*, 2000, 7(1): 125-129.
- [6] Liu WM, Heung MD, Tai NG, et al. Laparoscopic bipolar coagulation of uterine vessel: a new method for treating symptomatic fibroids[J]. *Fertil Steril*, 2011, 75(3): 417-422.
- [7] Liu WM, Tzeng CR, Yi JC, et al. Laparoscopic bipolar coagulation of uterine vessels: a new method for treating

symptomatic fibroids[J]. *Ferti Steril*, 2001, 75(2): 417-422.

- [8] Yen YK, Liu WM, Lai CR, et al. Rapid enlargement of uterine myomas after laparoscopic bipolar coagulation of uterine vessels[J]. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*, 2002, 9(1): 93-97.
- [9] 温菁, 孙文娣, 王学慧, 等. 子宫动脉上行支的解剖学研究及其临床意义[J]. *应用解剖*, 2005, 23(1): 72-75.
- [10] 詹松华, 王国良, 李翊, 等. 子宫动脉栓塞治疗子宫肌瘤 72 例分析[J]. *中国医学影像技术*, 2011, 17(10): 1207-1209.
- [11] Liu WM, Tzeng CR, Yi JC, et al. Combining the uterine depletion procedure and myomectomy may be useful for treating symptomatic fibroids[J]. *Fertil Steril*, 2004, 82(1): 205-210.
- [12] Burbank F, Hutchins FL. Uterine artery occlusion by embolization or surgery for the treatment of fibroids: A unifying hypothesis—transient uterine ischemia[J]. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*, 2010, 7(1): 1-49.
- [13] Burbank F. Childbirth and myoma treatment by uterine artery occlusion: do they share a common biology? [J]. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*, 2004, 11(2): 138-152.
- [14] 邓辉, 韩文玲, 刘金华, 等. 改良经腹子宫肌瘤剔除术(附 30 例临床分析)[J]. *赣南医学院学报*, 2007, 27(1): 71-72.
- [15] 朱宇, 谢彦, 杨伟红, 等. 子宫肌瘤及子宫平滑肌 PA/PAI 差异表达与腹腔镜子宫动脉阻断术治疗子宫肌瘤相关性的研究[J]. *现代妇产科进展*, 2010, 19(8): 596-600.

(收稿日期: 2012-04-22 修回日期: 2012-05-21)

(上接第 3142 页)

- [6] Mischo A, Kubuschok B, Ertan K, et al. Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer[J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(5): 696-703.
- [7] Jagadish N, Rana R, Mishra D, et al. Characterization of immune response in mice to plasmid DNA encoding human sperm associated antigen 9 (SPAG9) [J]. *Vaccine*, 2006, 24(25): 3695-3703.
- [8] Shankar S, Mohapatra B, Suri A. Cloning of a novel human testis mRNA specifically expressed in testicular haploid germ cells, having unique palindromic sequences and encoding a leucine zipper dimerization motif[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 243(4): 561-563.
- [9] Jagadish N, Rana R, Selvi R, et al. Characterization of a novel human sperm-associated antigen 9 (SPAG9) having structural homology with c-Jun N-terminal kinase-interacting protein[J]. *Biochem J*, 2005, 389(1): 73-82.
- [10] Stone B, Schummer M, Paley PJ, et al. Serologic analysis of ovarian tumor antigens reveals a bias toward antigens encoded on 17q[J]. *Int J Cancer*, 2003, 104(1): 73-84.
- [11] Garg M, Chaurasiya D, Rana R, et al. Sperm associated

antigen 9 (SPAG9), a novel cancer testis antigen is potential target for immunotherapy in epithelial ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(11): 1421-1428.

- [12] Kanojia D, Garg M, Gupta S, et al. Sperm associated antigen 9 (SPAG9), a novel biomarker for early detection of breast cancer [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18(4): 630-639.
- [13] Garg M, Kanojia D, Khosla A, et al. Sperm associated antigen 9 is associated with tumor growth, migration and invasion in renal cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(47): 8240-8243.
- [14] Garg M, Kanojia D, Salhan S, et al. Sperm-associated antigen 9 (SPAG9) is a biomarker for early cervical carcinoma [J]. *Cancer*, 2009, 115(17): 2671-2683.
- [15] Garg M, Kanojia D, Suri S, et al. Sperm-associated antigen 9: a novel diagnostic marker for thyroid cancer [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(30): 4613-4618.
- [16] Kanojia D, Garga M, Saini S, et al. Sperm associated antigen 9 expression and humoral response in chronic myeloid leukemia [J]. *Leukemia Research*, 2010, 34(6): 858-863.

(收稿日期: 2012-04-09 修回日期: 2012-05-23)