

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.12.010

· 临床研究 ·

MAGE-A9、MAGE-A11 和 Ki67 在喉鳞状细胞癌组织中的表达及其临床意义

刘胜辉^{ab}, 赵岩^a, 徐玉茹^a, 桑梅香^{bc}, 赵瑞力^a, 谷丽娜^b, 单保恩^{bc} (河北医科大学第四医院 a. 耳鼻喉科; b. 科研中心; c. 肿瘤研究所, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 探讨黑色素瘤相关抗原 A9(MAGE-A9)、MAGE-A11 和 Ki67 在喉鳞状细胞癌组织中的表达, 并分析其与喉鳞状细胞癌患者临床病理学特征及预后的关系。 **方法:** 选取河北医科大学第四医院 2012-2014 年住院手术切除的喉鳞状细胞癌组织及相应癌旁组织标本各 73 例, 同时选取该院 3 例前列腺癌住院患者去势治疗术后的睾丸组织作为阳性对照, 应用免疫组织化学法检测喉鳞状细胞癌组织及相应癌旁组织中 MAGE-A9、MAGE-A11 和 Ki67 蛋白的表达水平。 **结果:** 喉鳞状细胞癌组织中 MAGE-A9、MAGE-A11 蛋白和 Ki67 的表达率 [47.94%(35/73)]、[49.32%(36/73)] 和 [46.58%(34/73)] 均显著高于相应的癌旁组织 [0(0/75)] ($P < 0.01$), MAGE-A9 和 MAGE-A11 蛋白的表达与喉鳞状细胞癌患者的临床分期和淋巴转移有关 ($P < 0.05$), Ki67 表达与喉鳞状细胞癌患者的肿瘤大小、临床分期和淋巴转移有关 ($P < 0.05$)。相关性分析显示, MAGE-A9 和 MAGE-A11 蛋白表达均与 Ki67 指数呈正相关 ($r = 0.258, P = 0.027$; $r = 0.672, P = 0.001$)。Kaplan-Meier 生存曲线分析显示, MAGE-A9、MAGE-A11 和 Ki67 蛋白高表达阳性患者的生存率均显著低于低表达的患者, 而且 MAGE-A9 和 Ki67 均高表达或 MAGE-A11 和 Ki67 均高表达患者的生存期均显著低于其单一高表达或均低表达的患者 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。单因素和多因素 Cox 回归模型分析进一步提示, MAGE-A9 蛋白和 MAGE-A11 蛋白是喉鳞状细胞癌患者总体生存的独立预后因素 ($P < 0.05$)。 **结论:** MAGE-A9、MAGE-A11 和 Ki67 是喉鳞状细胞癌的肿瘤相关抗原, 其可作为预测喉鳞状细胞癌患者的预后指标。

[关键词] 喉鳞状细胞癌; 黑色素瘤相关抗原-A9; 黑色素瘤相关抗原-A11; Ki67 抗原; 预后

[中图分类号] R739.65; R730.45 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)12-1356-07

Expressions and clinical significances of MAGE-A9, MAGE-A11 and Ki67 in laryngeal squamous cell carcinoma

LIU Shenghui^{ab}, ZHAO Yan^a, XU Yuru^a, SANG Meixiang^{bc}, ZHAO Ruili^a, GU Lina^b, SHAN Baoen^{bc} (a. Department of Otolaryngology; b. Department of Research Center; c. Tumor Research Institute, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expressions of melanoma antigen (MAGE) -A9, -A11 and Ki67 in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) tissues, and to analyze their correlation with clinicopathological features and the prognosis of LSCC patients. **Methods:** A total of 73 pairs of LSCC tissues and corresponding para-cancerous tissues resected from LSCC patients, who were treated at the Fourth Hospital of Hebei Medical University from 2012 to 2014, were collected for this study. At the same time, testicular tissues from 3 patients with prostate cancer after castration were selected as positive control. The protein expressions of MAGE-A9, MAGE-A11 and Ki67 in LSCC tissues and its para-cancerous tissues were detected by immunohistochemistry. **Results:** The expression rates of MAGE-A9, MAGE-A11 protein and Ki67 in LSCC tissues were 47.94% (35/73), 49.32% (36/73) and 46.58% (34/73) respectively, which were significantly higher than those in para-cancerous tissues. The protein expressions of MAGE-A9 and MAGE-A11 were correlated with clinical stage and lymphatic metastasis of LSCC ($P < 0.05$). The expression of Ki67 was correlated with tumor size, clinical stage and lymphatic metastasis of LSCC ($P < 0.05$). The correlation analysis showed that the expressions of MAGE-A9 and MAGE-A11 were positively correlated with Ki67 ($r = 0.258, P = 0.027$; $r = 0.672, P = 0.001$). Kaplan-Meier survival curve analysis showed that the survival rates of patients with high expression of MAGE-A9 protein ($P = 0.009$), MAGE-A11 protein ($P = 0.031$) and Ki67 ($P = 0.040$) were signifi-

[基金项目] 河北省财政支撑项目资助(No. [2016]361006)。Project supported by the Financial Support Programme of Hebei Province (No. [2016]361006)

[作者简介] 刘胜辉(1982-),男,博士,主治医师,主要从事头颈部肿瘤治疗的研究, E-mail: liushenghuiemail@163.com

[通信作者] 单保恩(SHAN Baoen, corresponding author), 博士,教授,博士生导师,主要从事肿瘤免疫治疗的研究, E-mail: baoshan@hotmail.com

cantly lower than those with low expressions. And the survival time of patients with both high expressions of MAGE-A9 and Ki67LI ($P=0.001$) or both high expressions of MAGE-A11 and Ki67 ($P=0.001$) was significantly shorter than that of patients with low expression (both or single). Univariate and multivariate Cox regression analysis further indicated that MAGE-A9 protein ($P=0.028$) and MAGE-A11 protein ($P=0.042$) were independent prognostic factors for overall survival of LSCC patients. **Conclusion:** MAGE-A9, MAGE-A11 and Ki67 are tumor-associated antigens of LSCC, which can be used as prognostic indicators for LSCC.

[Key words] laryngeal squamous cell carcinoma; melanoma antigen-A9(MAGE-A9); melanoma antigen-A11(MAGE-A11); Ki67; prognosis

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(12): 1356-1362. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.12.010]

喉癌是耳鼻咽喉头颈外科常见的恶性肿瘤,男性多于女性,好发年龄为40~60岁,其中90%的病理类型是鳞状细胞癌^[1]。目前治疗方法有手术、放疗、化疗等方法,但其预后仍堪忧。因此,需要寻求特异性的肿瘤抗原以评估治疗方案和预测预后,以及为肿瘤免疫治疗提供靶点。肿瘤免疫治疗可通过调整自身的抗肿瘤能力,针对特异性抗原,精确控制甚至杀伤肿瘤细胞。而癌/睾丸抗原(cancer/testis antigens, CTA)作为一类肿瘤相关抗原,睾丸组织及多肿瘤组织中均有表达,偶尔在生殖细胞也有表达,其余正常组织则呈沉默状态^[2]。黑色素瘤相关抗原(melanoma-associated antigens, MAGE)是CTA中的研究较多的成员之一。第一个黑色素瘤相关抗原基因是在1991年由BRUGGEN等^[3]分离克隆的,命名为MAGE-1(后更名为MAGE-A1)。其中,MAGE-A、MAGE-B和MAGE-C也被称作MAGE-1类基因^[4]。MAGE-A亚家族研究的相对较成熟,已发现有MAGE-A1~MAGE-A15等成员,均位于染色体Xq28上^[5]。Ki67是一种细胞核增殖抗原,它只在增殖细胞核中表达,Ki67单克隆抗体可以标记出除G0期和G1早期以外的细胞核增殖期的G1后期、S期、G2期、M期。HAROON等研究^[6]发现,可应用Ki67来识别正在增殖的细胞,从而评估肿瘤细胞增殖能力。目前为止,MAGE-A基因异常表达除在黑色素瘤中,其他癌组织中也有发现,本课题组一直致力于MAGE-A家族在食管癌^[7-8]、乳腺癌^[9]和肺癌^[10]的研究。在喉癌中曾有MAGE-A3阳性表达的报告,并证实该基因对喉癌的发生、发展及转移有一定的预测作用^[11]。而其他家族成员在喉癌中的表达情况鲜有报道。本研究利用免疫组织化学法从蛋白水平检测喉癌患者MAGE-A9、MAGE-A11和Ki67的表达情况,并分析其与临床参数及预后的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集河北医科大学第四医院耳鼻咽喉头颈外科2012~2014年接受手术治疗的住院喉癌患者的标本,其中喉癌组织及其对应的癌旁正常黏膜各73例,同时选取该院3例前列腺癌住院患者去势治疗术后的

睾丸组织作为阳性对照。所有肿瘤组织标本经病理科证实均为喉鳞状细胞癌,喉癌旁组织为喉腔正常黏膜或炎性病变。喉癌患者均为首次发病,且术前均未接受手术治疗、放疗及化疗。其中男性56例,女性17例;年龄43~78岁,≥60岁34例,<60岁39例;吸烟量≥400支/年为吸烟阳性病例、共56例,吸烟量<400支/年为吸烟阴性病例、共17例;病理分级:G1(高分化)组9例,G2(中分化)组42例,G3(低分化)组22例;临床分期(国际抗癌协会UICC TNM分类及分期标准(2002)):I+II期共35例,III+IV期共38例;有淋巴结转移的(N+)27例,无淋巴结转移的(N0)46例;临床分型:声门上型29例,声门型32例,声门下型12例;肿瘤大小(以术中探查肿瘤的浸润范围的长径来计算):<2 cm 25例,≥2 cm 48例。

所有标本经4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,制成厚4 μm的病理切片用于免疫组织化学检测。73例喉癌患者中有70例获得完整随访资料,3例喉癌患者失访,均采用电话回访方式。上述标本的获取均取得受试者及家属的知情同意并签署知情同意书,并上报医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂

SP免疫组化染色试剂盒及浓缩型DAB试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,兔抗人MAGE-A9、MAGE-A11多克隆抗体均购自英国Abcam公司,鼠抗人Ki67单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司,高PH抗原修复液购自基因科技上海有限公司。

1.3 免疫组织化学法检测喉鳞状细胞癌组织、癌旁组织及正常睾丸组织中MAGE-A9、MAGE-A11和Ki67蛋白的表达

将石蜡病理切片按照SP免疫组织化学试剂盒说明书方法检测MAGE-A9、MAGE-A11和Ki67蛋白的表达情况。兔抗人MAGE-A9和MAGE-A11多克隆抗体以及鼠抗人Ki67单克隆抗体分别以1:25、1:500和1:200稀释,生物素化山羊抗兔二抗和辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素(三抗)为试剂盒中的原液,加DAB试剂显色后,用苏木精对比染色,中性树脂胶封片。以人正常睾丸组织作为MAGE-A9和MAGE-

A11 的阳性对照,以癌旁组织作为 MAGE-A9、MAGE-A11 和 Ki-67 的阴性对照。免疫组化染色以细胞质或内出现棕黄色颗粒为阳性,双盲法观察组织切片全部视野,采用半定量积分法判断结果,确定阳性定位,然后按照下述标准进行评分^[12]。(1)阳性细胞数:无阳性细胞为0分,<10%为1分,10%~50%为2分,>50%为3分;(2)染色阳性强度,无色或与背景颜色相似为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。将(1)和(2)两者积分相乘,积分<4分为低表达,≥4分为高表达。(3)Ki67 指数(labeling index, LI)。随机选取每张切片的10个视野,在低倍镜下(×200)计数 Ki67 阳性细胞并计算百分数,求取其平均数,为 Ki67LI。如同一切片中存在多个评分不同的视野,则选取最大者和最小者的平均值进行免疫组化的评分。细胞核强着色为阳性,核弱着色或细胞质着色为阴性。其中,如果阳性细胞数≥10%,称为高 Ki67LI,阳性细胞数<10%,则称为低 Ki67LI^[13]。

1.4 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件,计数数据以百分率表示,采用卡方检验或 Fisher 确切概率法统计 MAGE-A9、MAGE-A11 和 Ki67 的表达与喉癌的临床病理学指标间的关系,采用 Spearman 相关分析检测 MAGE-A9 和 MAGE-A11 的表达与 Ki67LI 的关系。采用 Kaplan-Meier 法对喉癌患者是否表达 MAGE-A9、MAGE-A11 蛋白和 Ki67LI 进行生存分析,利用 Cox 回归模型针对 MAGE-A9、MAGE-A11 蛋白和 Ki67LI 及相关临床病例资料进行单因素和多因素分析,以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MAGE-A9 和 MAGE-A11 在正常睾丸组织中的表达

选取正常睾丸组织作为 MAGE-A9 和 MAGE-A11 蛋白的阳性对照。免疫组织化学法检测结果(图1)显示,在正常睾丸组织中,MAGE-A9、MAGE-A11 主要在初级精母细胞和精原细胞的细胞浆和细胞核着色。

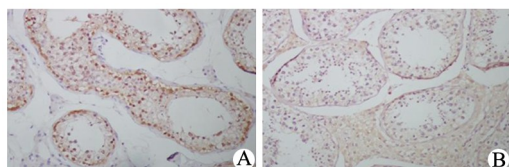


图1 免疫组织化学法检测 MAGE-A9(A)和 MAGE-A11(B)蛋白在正常睾丸组织中的表达(×200)

Fig.1 Protein expressions of MAGE-A9(A) and MAGE-A11 (B) in normal testicular tissues detected by immunohistochemistry(×200)

2.2 MAGE-A9、MAGE-A11 和 Ki67 蛋白在喉鳞状细胞癌组织及癌旁组织的表达

免疫组织化学法检测结果显示,MAGE-A9、MAGE-A11 阳性染色主要定位于细胞质,部分定位于细胞核中,呈棕黄或棕褐色染色;Ki67 在喉鳞状细胞癌组织中阳性产物主要定位于细胞核。73 例喉鳞状细胞癌组织中 MAGE-A9 的阳性表达率[47.94% (35/73)]明显高于正常黏膜组织的阳性表达率[0(0/75)]($P<0.01$;表1,图2A-C)。73 例喉鳞状细胞癌组织中 MAGE-A11 的阳性表达率[49.32%(36/73)]明显高于正常黏膜组织的阳性表达率[0(0/75)]($P<0.01$,表1,图2E-D)。73 例喉鳞状细胞癌组织中高 Ki67LI 的表达率[46.58%(34/73)]明显高于正常黏膜组织的表达率[0.05%(4/75)]($P<0.01$;表1,图2H-G)。以上结果提示,MAGE-A9 和 MAGE-A11 蛋白是喉鳞状细胞癌的肿瘤相关抗原。

2.3 MAGE-A9、MAGE-A11 和 Ki67 蛋白表达与喉鳞状细胞癌临床病理特征的关系

卡方检验或 Fisher 确切概率法分析结果(表2)显示,MAGE-A9、MAGE-A11 蛋白表达与喉鳞状细胞癌患者的性别、年龄、吸烟史、肿瘤大小、组织学分级、临床分型均无相关性(均 $P>0.05$),但与临床分期、淋巴转移存在相关性(均 $P<0.05$)。Ki67LI 表达与喉鳞状细胞癌患者的性别、年龄、吸烟史、组织学分级、临床分型均无相关性($P>0.05$),但与临床分期、淋巴转移和肿瘤大小存在相关性(均 $P<0.05$)。

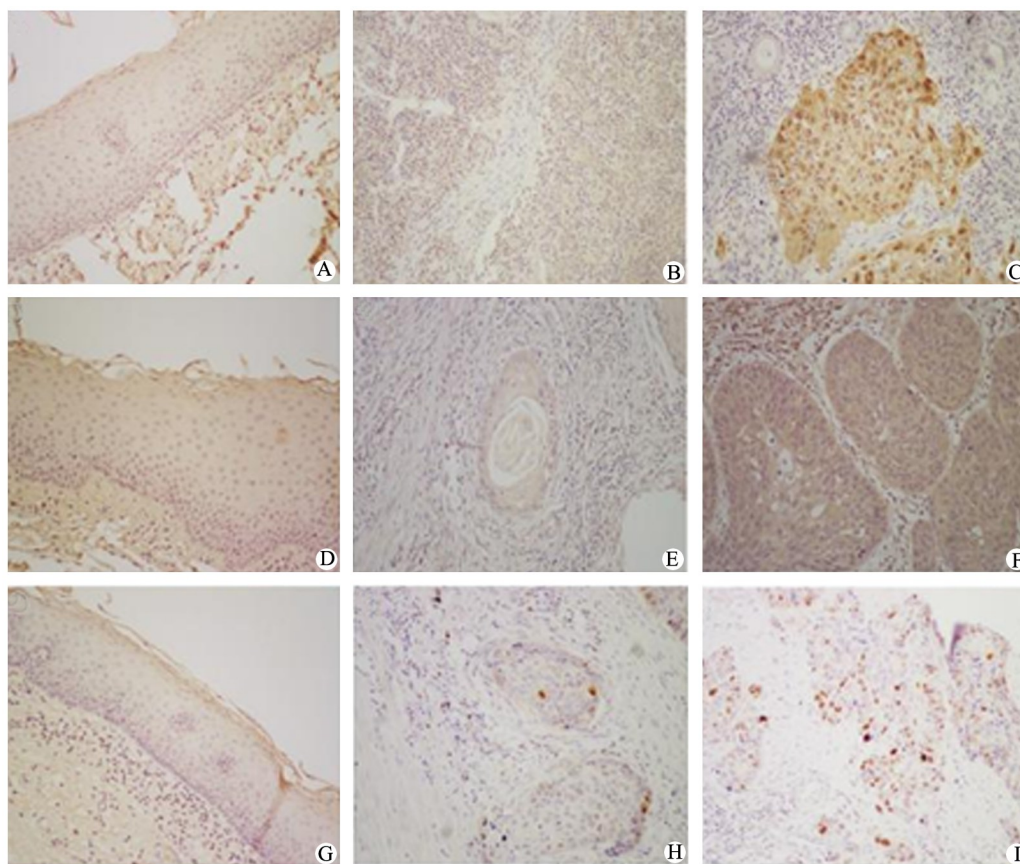
2.4 MAGE-A9、MAGE-A11 与 Ki67LI 表达水平呈正相关

MAGE-A9 高水平表达的 35 例喉鳞状细胞癌组织中,高 Ki67LI 的表达率为 60.00%(21/35)。Spearman 相关分析结果(表3)显示,MAGE-A9 与 Ki67LI 正相关($r=0.258, P=0.027$);MAGE-A11 高水平表达的 36 例喉鳞状细胞癌组织中,高 Ki67LI 的表达率为 80.56%(29/36),MAGE-A11 与 Ki67LI 正相关($r=0.672, P<0.01$)。

2.5 MAGE-A9、MAGE-A11 蛋白和 Ki67LI 与患者的生存关系

对 MAGE-A9、MAGE-A11 和 Ki67LI 蛋白高表达及低表达的患者生存曲线分别进行 Log-Rank 检验,结果显示,MAGE-A9 蛋白高表达患者的生存期显著低于 MAGE-A9 蛋白低表达的患者($P=0.009$,图3A);MAGE-A11 蛋白高表达患者的生存期显著低于 MAGE-A11 蛋白低表达的患者($P=0.031$,图3B);高 Ki67LI 患者的生存期显著低于低 Ki67LI 的患者($P=0.040$,图3C);MAGE-A9 和 Ki67LI 均高表达患者的生存期显著低于其单一高表达或均低表达的患

者 ($P=0.001$, 图 3D); MAGE-A11 和 Ki67LI 均高表达患者的生存期显著低于其单一高表达或均低表达的患者 ($P=0.001$, 图 3E)。



A-C: MAGE-A9; D-F: MAGE-A11; G-I: Ki67; A, D and G: Para-cancerous tissues; B, E, H: Strongly positive expression; C, F and I: Weakly positive expression

图2 免疫组织化学检测 MAGE-A9、MAGE-A11 和 Ki67 在喉鳞状细胞癌组织及癌旁组织中的表达($\times 200$)

Fig.2 Protein expressions of MAGE-A9, MAGE-A11 and Ki67 in laryngeal squamous cell carcinoma and para-cancerous tissues detected by immunohistochemistry($\times 200$)

表1 免疫组化染色检测 MAGE-A9 和 MAGE-A11 在喉鳞状细胞癌组织中的表达 [$n(\%)$]

Tab.1 Expressions of MAGE-A9 and MAGE-A11 in laryngeal squamous cell carcinoma tissues detected by immunohistochemistry [$n(\%)$]

Group	N	MAGE-A9	MAGE-A11	Ki67
Laryngeal squamous cell carcinoma	73	35(47.94)	36(49.32)	34(46.58)
Para-carcinoma tissue	73	0	0	4(0.05)
χ^2		46.036	47.782	32.018
P		0.000	0.000	0.000

应用 Cox 回归模型进行单因素和多因素分析结果(表 4)显示, MAGE-A9 蛋白表达和 MAGE-A11 蛋白表达可作为喉鳞状细胞癌患者生存的独立预后因素均 ($P<0.05$)。

3 讨论

肿瘤免疫治疗就是应用免疫反应对肿瘤细胞实行特异性杀伤。对 MAGE-A 亚家族而言, T 细胞免疫

是其主要的免疫反应方式, 其次还有自然杀伤细胞反应、巨噬细胞及树突细胞反应等^[14]。在 MAGE 阳性表达的肿瘤细胞中, 胞质中的 MAGE 蛋白被裂解成肽段, 由相应的抗原加工相关转运物转送至内质网上, 与 MHC I 类分子结合形成复合物, 经过高尔基体转运至细胞表面, 被 CD8⁺ 的 T 淋巴细胞识别, 并特异性结合, 引起免疫杀伤效应, 这为将 MAGE-A9 和 MAGE-A11 设计成免疫治疗喉癌的靶位提供了理论

支持。本课题组^[22]早期构建 MAGE-A11 候选肽, 并通过候选肽诱导细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL), 发现 CTLs 可以特异性杀伤 MAGE-A11 高表达的乳腺癌细胞, 但不能杀伤 MAGE-A11 低表达的乳腺癌细胞。为了进一步提高抗肿瘤的免

疫反应, 用 DNA 甲基转移酶抑制剂诱导 MAGE-A11 表达, 上调 CTLs 特异性杀伤乳腺癌细胞的效果。基于以上研究结果, 可以考虑构建 Ki67、MAGE-A9 和 MAGE-A11 复合抗原疫苗, 进一步提高肿瘤杀伤效果, 为喉癌免疫治疗提供新策略。

表2 喉鳞状细胞癌组织 MAGE-A9 和 MAGE-A11 表达与患者临床病理特征的关系(n)

Tab.2 Correlations between expressions of MAGE-A9 and MAGE-A11 in laryngeal squamous cell carcinoma tissues and clinicopathological features (n)

Feature	N	MAGE-A9		χ^2	P	MAGE-A11		χ^2	P	Ki67LI		χ^2	P
		Low	High			Low	High			Low	High		
Gender				0.007	0.933			0.802	0.371			0.361	0.548
Male	56	29	27			30	26			31	25		
Female	17	9	8			7	10			8	9		
Age(t/a)				0.636	0.425			0.688	0.407			0.154	0.694
<60	34	16	18			19	15			19	15		
≥60	39	22	17			18	21			20	19		
Smoking history				0.007	0.933			0.802	0.371			0.361	0.548
<400	17	9	8			7	10			8	9		
≥400	56	29	27			30	26			31	25		
Pathological degree				0.078	0.780			2.584	0.108			1.982	0.159
G1/G2	51	26	25			29	22			30	21		
G3	22	12	10			8	14			9	13		
Clinical classification				1.022	0.600			1.755	0.416			3.442	0.179
Supraglottic	29	13	16			13	16			13	16		
Glottic	32	18	14			19	13			21	11		
Subglottic	12	7	5			5	7			5	7		
Clinical stage				5.027	0.025			3.986	0.046			6.199	0.013
I/II	35	23	12			22	13			24	11		
III/IV	38	15	23			15	23			15	23		
Tumor size (l/cm ³)				0.250	0.617			1.320	0.251			5.272	0.022
<2	25	12	13			15	10			18	7		
≥2	48	26	22			22	26			21	27		
Metastatic state of				3.872	0.049			5.161	0.023			4.624	0.032
Lymph node													
N0	46	28	18			28	18			29	17		
N+	27	10	17			9	18			10	17		

表3 MAGE-A9、MAGE-A11 与 Ki67LI 在喉鳞状细胞癌组织中表达的相关性

Tab.3 The correlation of MAGE-A9, MAGE-A11 and Ki67 in laryngeal squamous cell carcinoma

Feature		MAGE-A9		r	P	MAGE-A11		r	P
		Low	High			Low	High		
Ki67LI	Low	25	14	0.258	0.027	32	7	0.672	0.001
	High	13	21			5	29		

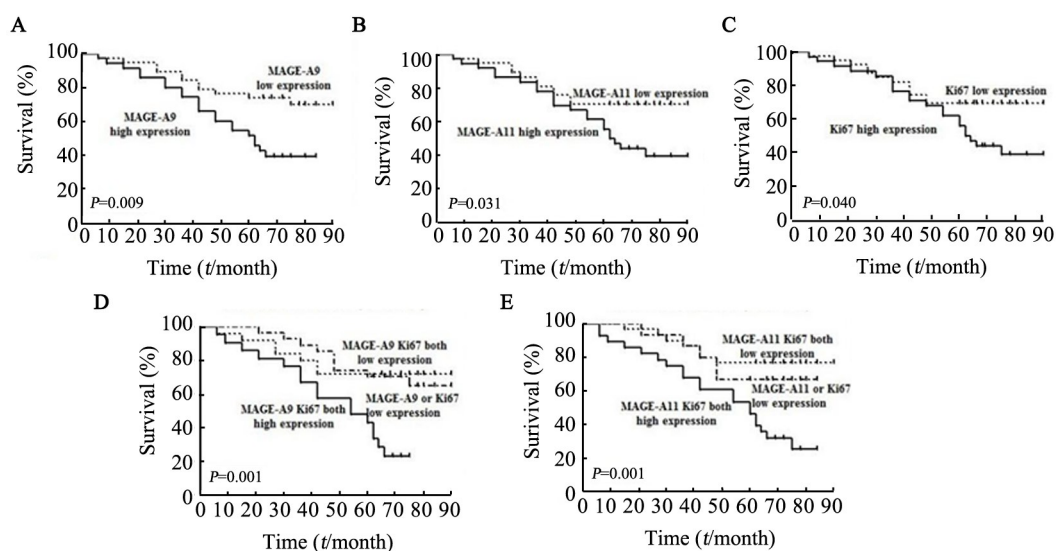
近年来, 本课题组致力于研究肿瘤组织中 MAGE-A9 和 MAGE-A11 蛋白表达, 谷丽娜等^[7]报道 MAGE-A9 和 MAGE-A11 蛋白在食管癌组织中的阳性表达率为 45.00% 和 66.67%; LIU 等^[8]研究发现, 在食管癌组织芯片中 MAGE-A11 的阳性表达率为 56.6%; 连易水等^[14]研究发现, 在乳腺癌组织中 MAGE-A11 的阳性表达率为 52%。而喉癌组织中 MAGE-A9 和 MAGE-A11 蛋白的表达研究较少, 本研究通过免疫组化方法, 观察两者蛋白水平在喉癌的表达情况, 并分析及探讨了两者与各临床参数及预

后的关系。

Ki67 是预测几种癌症患者临床结局的一个成熟标志物^[17-18]。有研究^[19]表明, 肿瘤表达较高的 Ki67 患者预后较差。除了常规参数外, Ki67 还被认为是影响肿瘤治疗疗效的关键因素^[20]。本研究分析了 Ki67LI 与临床参数及预后的关系以及 MAGE-A9 和 MAGE-A11 蛋白表达与 Ki67LI 的相关性, 结果显示, MAGE-A9 蛋白表达与喉癌的临床分期、淋巴转移密切相关, 提示 MAGE-A9 与喉癌的肿瘤进展和转移密切相关, 可能 MAGE-A9 可以预测喉癌患者的预后;

MAGE-A11 蛋白表达与喉癌的临床分期、淋巴转移密切相关, 同样提示 MAGE-A11 与喉癌的肿瘤进展和转移密切相关, 并可以预测喉癌患者的预后。Ki67LI 高表达与喉癌的肿瘤大小, 临床分期、淋巴转移密切相关, 提示 Ki67LI 与喉癌的肿瘤进展和转移

密切相关, 并可能可以预测喉癌患者的预后。进一步分析 MAGE-A9 和 MAGE-A11 蛋白表达与 Ki67LI 的相关性, 结果显示, MAGE-A9 和 MAGE-A11 蛋白表达均与 Ki67LI 呈正相关, 提示 MAGE-A9 和 MAGE-A11 蛋白表达可能与喉癌细胞的增殖有关。



A: Survival curve of patients with high expression of MAGE-A9 protein; B: Survival curve of patients with MAGE-A11 protein positive expression; C: Survival curve of patients with high expression of Ki67LI; D: Survival curve of patients with high expression of MAGE-A9 and Ki67LI; E: Survival curve of patients with high expression of MAGE-A11 and Ki67LI

图3 应用 Kaplan-Meier 方法对喉鳞状细胞癌患者进行生存分析

Fig.3 Survival analysis of patients with laryngeal squamous cell carcinoma by Kaplan-Meier method

表4 影响喉鳞状细胞癌患者总体生存预后单因素和多因素分析

Tab.4 Univariate and multivariate analysis of prognostic factors for overall survival in LSCC patients

Variable	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	P	95% CI	HR	P	95% CI
Expression of MAGE-A9	2.554	0.012	1.225-5.323	2.435	0.028	1.299-5.151
High vs Low						
Expression of MAGE-A11	2.170	0.038	1.045-4.505	2.535	0.042	1.069-4.867
High vs Low						
Ki67LI	2.016	0.048	1.006-4.219	1.899	0.056	1.121-4.325
High vs Low						
Gender	0.649	0.340	0.267-1.577			
Male vs Female						
Age (t/a)	0.887	0.735	0.443-1.774			
<60 vs ≥60						
Smoking history	1.541	0.340	0.634-3.746			
<400 vs ≥400						
Pathological degree	0.952	0.897	0.451-2.011			
G1/G2 vs G3						
Clinical classification	0.832	0.461	0.511-1.355			
Supraglottic vs Glottic vs Subglottic						
Tumor size (l/cm ²)	2.157	0.072	0.932-4.990			
<2 vs ≥2						
Clinical stage	3.017	0.005	1.389-6.554			
I and II vs III and IV						
Metastatic state of lymph node	2.053	0.042	1.025-4.110	2.125	0.061	1.152-4.216
Yes vs No						

研究^[8,21-22]显示,MAGE-A9蛋白是食管鳞状细胞癌和肺腺癌的独立预后因素。本研究Kaplan-Meier生存曲线分析结果显示,MAGE-A9、MAGE-A11和Ki67LI蛋白高表达阳性患者的生存率均显著低于其低表达的患者,而且MAGE-A9和Ki67均高表达或MAGE-A11和Ki67均高表达的患者生存期均显著低于其单一表达或均低表达的患者。单因素和多因素Cox回归模型分析进一步提示,MAGE-A9蛋白和MAGE-A11蛋白是喉癌患者总体生存的独立预后因素。

综上所述,MAGE-A9、MAGE-A11和Ki67是喉鳞状细胞癌的肿瘤相关抗原,其可作为预测喉鳞状细胞癌患者的预后指标,本课题组将进一步确定MAGE-A和Ki67抗原肽对喉癌细胞的杀伤作用,为其成为喉癌免疫治疗的靶点提供实验基础。

[参 考 文 献]

- [1] 汪吉宝,孔维佳,黄选兆.实用耳鼻咽喉头颈外科学[M].北京:人民卫生出版社,2016:163-166.
- [2] ZENDMAN A J W, RUITER D J, VAN MUIJEN G N P. Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function[J]. *J Cell Physiol*, 2003, 194(3): 272-288. DOI:10.1002/jcp.10215.
- [3] 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. DOI: 10.1126/science.1840703.
- [4] BARKER P A, SALEHI A. The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease[J]. *J Neurosci Res*, 2002, 67(6): 705-712. DOI:10.1002/jnr.10160.
- [5] VATOLIN S, ABDULLAEV Z, PACK S D, et al. Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(17): 7751-7762. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-05-0858.
- [6] HAROON S, HASHMI A A, KHURSHID A, et al. Ki67 index in breast cancer: correlation with other prognostic markers and potential in Pakistani patients[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(7): 4353-4358. DOI:10.7314/apjcp.2013.14.7.4353.
- [7] 谷丽娜,桑梅香,刘飞,等.黑色素瘤相关抗原-A9和-A11在食管鳞状细胞癌组织中的表达及其临床意义[J].*中国肿瘤生物治疗杂志*, 2015, 22(5): 630-636. DOI: CNKI:SUN:ZLSW.0.2015-05-023.
- [8] LIU S N, LIU F, HUANG W N, et al. MAGE-A11 is activated through TFCEP2/ZEB1 binding sites de-methylation as well as histone modification and facilitates ESCC tumor growth[J/OL]. *Oncotarget*, 2018, 9(3): 3365-3378[2019-07-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5790469/>. DOI:10.18632/oncotarget.22973.
- [9] WANG H, SANG M, GENG C, et al. MAGE-A is frequently expressed in triple negative breast cancer and associated with epithelial-mesenchymal transition[J]. *Neoplasma*, 2016, 63(1): 44-56. DOI: 10.4149/neo_2016_006.
- [10] GU L N, SANG M X, YIN D J, et al. MAGE-A gene expression in peripheral blood serves as a poor prognostic marker for patients with lung cancer[J/OL]. *Thorac Cancer*, 2018, 9(4): 431-438[2019-07-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5879056/>. DOI:10.1111/1759-7714.12571.
- [11] 吉晓滨,苏娟,陈敬贤,等.黑色素瘤抗原在喉癌中的表达及临床评价[J].*中华临床医师杂志(电子版)*, 2011, 5(24): 7271-7276. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.24.019.
- [12] MATOS L L, STABENOW E, TAVARES M R, et al. Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semiquantitative analysis[J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2006, 61(5): 417-424. DOI:10.1590/s1807-59322006000500008.
- [13] WILD P J, KUNZ-SCHUGHART L A, STOEHR R, et al. High-throughput tissue microarray analysis of COX2 expression in urinary bladder cancer[J]. *Int J Oncol*, 2005, 27(2): 385-391.
- [14] BAI S X, WILSON E M. Epidermal-growth-factor-dependent phosphorylation and ubiquitinylation of MAGE-11 regulates its interaction with the androgen receptor[J/OL]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(6): 1947-1963[2019-07-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2268407/>. DOI:10.1128/MCB.01672-07.
- [15] ZHANG J D, SANG M X, GU L N, et al. Zebularine treatment induces MAGE-A11 expression and improves CTL cytotoxicity using a novel identified HLA-A2-restricted MAGE-A11 peptide[J]. *J Immunother*, 2017, 40(6): 211-220. DOI:10.1097/CJI.0000000000000170.
- [16] 连易水,桑梅香,周欣亮,等.乳腺癌组织中黑色素瘤抗原-A11的表达及其促进乳腺癌细胞的增殖[J].*肿瘤*, 2011, 31(9): 830-834. DOI:10.3781/j.issn.1000-7431.2011.09.010.
- [15] CHEN Y, KLINGEN T A, WIK E, et al. Breast cancer stromal elastosis is associated with mammography screening detection, low Ki67 expression and favourable prognosis in a population-based study[J/OL]. *Diagn Pathol*, 2014, 9: 230[2019-07-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4300053/>. DOI:10.1186/s13000-014-0230-8.
- [16] MA X H, WU Y T, ZHANG T, et al. Ki67 proliferation index as a histopathological predictive and prognostic parameter of oral mucosal melanoma in patients without distant metastases[J/OL]. *J Cancer*, 2017, 8(18): 3828-3837[2019-07-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5688936/>. DOI:10.7150/jca.20935.
- [17] TOKUDA E, HORIMOTO Y, ARAKAWA A, et al. Differences in Ki67 expressions between pre- and post-neoadjuvant chemotherapy specimens might predict early recurrence of breast cancer[J]. *Hum Pathol*, 2017, 63: 40-45. DOI:10.1016/j.humpath.2017.02.005.
- [18] COATES A S, WINER E P, GOLDBIRSCHE A, et al. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: st Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2015[J/OL]. *Ann Oncol*, 2015, 26(8): 1533-1546[2019-07-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4511219/>. DOI:10.1093/annonc/mdv221.
- [19] QI Y, CAO K X, XING F C, et al. High expression of MAGE-A9 is associated with unfavorable survival in esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3): 3415-3420[2019-07-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5588010/>. DOI: 10.3892/ol.2017.6614.
- [20] ZHAI X L, XU L Q, ZHANG S Y, et al. High expression levels of MAGE-A9 are correlated with unfavorable survival in lung adenocarcinoma[J/OL]. *Oncotarget*, 2016, 7(4): 4871-4881[2019-07-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4826249/>. DOI: 10.18632/oncotarget.6741.

[收稿日期] 2019-08-25

[修回日期] 2019-11-29

[本文编辑] 王映红