

# 世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

**Shijie Huaren Xiaohua Zazhi**

**2005 年 7 月 28 日 第 13 卷 第 14 期 (Volume 13 Number 14)**



**14/2005**

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,  
2003年百种中国杰出学术期刊,

《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学  
类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊.

世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,  
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,  
俄罗斯《文摘杂志》收录.

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2005 年 7 月 28 日 第 13 卷 第 14 期 (总第142期)

述 评	1645 进一步加强慢性肝炎、肝纤维化治疗研究 姚希贤, 崔东来 1650 胃肠道生理功能的再认识与肠衰竭 丁连安, 黎介寿
胃 癌	1652 AGS细胞系中12-LOX的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响 黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众
肝 癌	1658 Maxizyme对肝癌突变抑癌基因p53的抑制作用 李岩, 林菊生, 孔心涓 1663 肝癌组织中TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 1R II和NF- $\kappa$ B的表达 缪林, 张锁林, 季国忠, 范志宁, 刘政, 张平, 杨春 1667 肝细胞癌组织和外周血中肿瘤/睾丸抗原SSX-2和SSX-5的表达 吴力群, 王新建, 张斌, 卢云, 杨金镛 1673 肝细胞肝癌患者肿瘤/睾丸抗原SSX-1及NY-ESO-1mRNA的表达意义 吴力群, 王新建, 卢云, 张斌, 杨金镛 1679 重组人内皮抑素真核表达载体pCD-sEndo的构建和表达 邵俊伟, 刘然义, 易继林, 卢绮萍, 黄文林 1684 蛋白质芯片飞行质谱技术检测体外培养的肝癌细胞株与转染HBV的肝癌细胞株蛋白质的差异表达 丁守怡, 钱冬萌, 闫志勇, 宋旭霞, 牟文凤, 王斌
病毒性肝炎	1688 酵母双杂交技术筛选白细胞cDNA文库中新基因NS2TP蛋白结合蛋白基因 张黎颖, 成军, 邓红, 郭江, 郭风劲, 王巧侠 1692 抗HBV多聚酶TP区VH抗体体外可抑制HBV复制 于俊岩, 兰林, 王宇明, 丁世涛 1696 黑龙江地区乙型肝炎病毒耐药变异与基因型 李迪, 张淑云, 谷鸿喜, 程险峰, 王晓燕 1700 丙型肝炎病毒非结构蛋白2反式调节基因NS2TP的克隆化 张黎颖, 成军, 邓红, 刘妍, 王琳
基础研究	1705 苷脱氨酶基因对小鼠大剂量化疗的保护作用 路平, 王永来, 金锋, 陈波, 姚凡, 王舒宝, 陈峻青, 徐惠绵, 赵实诚 1713 三氧化二砷注射液对胰腺癌细胞系PC-3的体外作用 刘静冰, 秦叔逵, 李进 1717 消炎痛和阿斯匹林对C57BL/6和Balb/c小鼠胃酸分泌的效应 王昌成 1721 $^{103}\text{Pd}$ 诱导犬胆管增殖平滑肌细胞凋亡及对相关基因的影响 何贵金, 吴荣, 高沁怡, 许书河, 高红, 姜维国, 蒋涛, 戴显伟, 马凯
文献综述	1725 热休克蛋白家族与肝癌的关系 吴顺华, 成军, 郑玉建 1731 HCV的基因型及其变异与肝细胞癌的关系 韩苏夏, 刘正稳, 马瑾璐 1734 移植肝细胞基因调控研究 林勇, 曾欣 1737 三氧化二砷治疗肝癌的分子机制 吴顺华, 成军, 郑玉建 1744 丁酸钠抗肿瘤作用的新进展 崔路佳, 高善玲, 裴风华 1747 聚乙二醇 $\alpha$ -干扰素治疗慢性乙型肝炎的研究进展 周平, 谢仁江 1750 人类免疫缺陷病毒与黏膜免疫 杨贵波, 邵一鸣
研究快报	1760 胰腺外分泌功能研究大鼠模型的建立 陈小燕, 李兆申, 屠振兴, 曹晓鹏 1762 乳杆菌细胞壁表面黏附相关蛋白的提取和鉴定 王斌, 魏泓 1766 幽门螺杆菌和促胃液素在胃癌前病变中的作用 郑宗茂, 吴灵飞, 冯家琳, 李国平, 王炳周 1768 表皮生长因子及其受体mRNA在胃溃疡发生与愈合过程中的表达 谭永港, 舒晴, 邱猛进, 张永锋 1770 巢式PCR-RFLP法对湖南省乙型肝炎病毒Bj和Ba基因亚型的初步鉴定 温志立, 谭德明, 杨铁一, 徐铿 1773 阿霉素对胃癌细胞内游离 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的影响 邢承忠, 路平, 郭晓临, 刘瑾, 徐惠绵, 袁媛 1776 BALB/C小鼠炎症性肠病动物模型建立方法探讨 刘敬军, 郑长青, 潘丽丽, 闻英, 胡刚正

临床经验	1779 社会因素对老年人群幽门螺杆菌感染的影响 张玫, 汤哲, 汤欣, 蔡玲, 牛小羽, 孙书春 1781 口服药物致食管溃疡22例 王孟春, 张丽瑶, 钟琳琳 1782 经内镜乳头括约肌预切开术在困难ERCP中的应用 王庆, 秦明放, 勾承月, 李宁, 王震宇, 邹富胜 1785 肠镜检查肠道准备无效率的影响因素 蔡文智, 智发朝, 李凤伶, 陈秀云, 姜泊 1787 中国人与非洲黑人 <i>H. pylori</i> 相关胃十二指肠疾病发生情况比较及分析 廖常奎, Geojanna GA 1790 大肠癌术后时辰化疗联合中医时间医学治疗的临床研究 张思奋, 罗湛滨, 吴文江, 何晶, 范小华 1792 幽默疗法辅助治疗慢性萎缩性胃炎53例 阮鹏, 阮浩然 1794 肝炎肝硬化患者血清IL-10、IL-18水平及意义 谭永港, 刘俊, 丁世华, 刘新民 1797 暴发性胰腺炎时腹腔室隔综合征的联合治疗40例 孙早喜, 孙诚谊
致 谢	1800 致谢世界华人消化杂志编委
封面故事	1652 AGS细胞系中12-LOX的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响 黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众 世界华人消化杂志 2005;13(14):1652-1657 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v13/i14/1652.htm">http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v13/i14/1652.htm</a>
国际会议	13th United European Gastroenterology Week, UEGW October 15-20, 2005  American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting October 28-November 2, 2005  ISGCON 2005 November 11-15, 2005 <a href="mailto:isgcon2005@yahoo.co.in">isgcon2005@yahoo.co.in</a> <a href="http://www.isgcon2005.com">isgcon2005.com</a>  Advanced Capsule Endoscopy Users Course November 18-19, 2005 <a href="http://www.asge.org/education">www.asge.org/education</a>  II Latvian Gastroenterology Congress November 29, 2005 <a href="mailto:gec@stradini.lv">gec@stradini.lv</a> <a href="http://www.gastroenterologs.lv">www.gastroenterologs.lv</a>  2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases December 1-3, 2005 <a href="mailto:c.chase@imedex.com">c.chase@imedex.com</a> <a href="http://www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm">www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm</a>  10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 <a href="mailto:isde@sapmea.asn.au">isde@sapmea.asn.au</a> <a href="http://www.isde.net">www.isde.net</a>

<div>世界华人消化杂志</div> <div>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</div> <div>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (半月刊)  创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2005-07-28 原刊名 新消化病学杂志</div> <div>名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生 编辑部主任 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁 英文编辑 张海宁 排版校对 张敏 张勇 李琪</div>	<div>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 出版 世界胃肠病学杂志社 100023, 北京市2345信箱 E-mail: <a href="mailto:wcjd@wjgnet.com">wcjd@wjgnet.com</a> <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a> 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893 印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局 邮购 世界胃肠病学杂志社发行部 (100023, 北京市2345信箱) 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893</div>	<div>世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.</div> <div>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</div> <div>2005年版权归世界胃肠病学杂志社所有</div>
--	---	---

ISSN 1009-3079	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
CN 14-1260/R	82-262	M 4481	每期24.00元 全年576.00元	1401004000050

[www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com)

# 肝细胞癌组织和外周血中肿瘤 / 辜丸抗原 SSX-2 和 SSX-5 的表达

吴力群, 王新建, 张 斌, 卢 云, 杨金镛

吴力群, 王新建, 张斌, 卢云, 杨金镛, 青岛大学医学院附属医院肝胆外科 山东省青岛市 266003

吴力群, 男, 1958-10-31 生, 江苏省丹阳市人, 汉族, 1982 年青岛医学院本科毕业, 主任医师, 主要从事肝胆外科专业。

通讯作者: 吴力群, 266003, 山东省青岛市, 青岛大学医学院附属医院肝胆外科。 jiaogin@mail.qdcatv.com.cn

电话: 0532-82911369 传真: 0532-2911999

收稿日期: 2005-03-31 接受日期: 2005-04-09

## Expression of cancer-testis antigen SSX-2 and SSX-5 in tissues and peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma

Li-Qun Wu, Xin-Jian Wang, Bin Zhang, Yun Lu, Jin-Yong Yang

Li-Qun Wu, Xin-Jian Wang, Bin Zhang, Yun Lu, Jin-Yong Yang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China  
Correspondence to: Li-Qun Wu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China. jiaogin@mail.qdcatv.com.cn  
Received: 2005-03-31 Accepted: 2005-04-09

### Abstract

**AIM:** To investigate the expression of SSX-2 and SSX-5 mRNA in the tissues and peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and their relations with kinds of clinical indexes, and to evaluate the possibility of using them as the targets for specific immunotherapy of HCC as well as the markers to in adjuvant diagnosis and prognosis and recurrence detection of HCC.

**METHODS:** One-step reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of SSX-2 and SSX-5 mRNA in the cancer tissues, corresponding cancer-adjacent tissues and peripheral blood of 26 patients with HCC, as well as in 12 cirrhotic tissues and 10 normal tissues. One sample, selected from each gene with positive PCR outcomes, was sequenced to testify the reliability. The relation between SSX-2, SSX-5 expression and kinds of clinical indexes, such as  $\alpha$ -fetoprotein (AFP), HBsAg, diameter of the tumor, TNM staging, was analysed.

**RESULTS:** The positive rates of SSX-2 and SSX-5 mRNA expression were 34.6%(9/26) and 46.2%(12/26) in HCC tissues respectively, while none of the two genes was

detected in the corresponding cancer-adjacent tissues. At least one gene was expressed in 65.4%(17/26) of HCC tissues and the co-expression was found in 15.4%(4/26). In the peripheral blood of the 26 HCC patients, the positive-expression rates of SSX-2 and SSX-5 mRNA were 19.2%(5/26) and 23.1%(6/26) respectively. The positive rates of single expression and co-expression were 34.6%(9/26) and 7.7%(2/26) respectively. In the 12 patients with hepatic cirrhosis and 10 normal controls, none of SSX-2 and SSX-5 mRNA was detectable in liver tissues and peripheral blood. After sequencing, the RT-PCR products were confirmed to be the target cDNA. No relationship was found between the expression of the two genes and the clinical indicators such as age, sex, tumor size, serum AFP level and infection of hepatitis B virus ( $P>0.05$ ). However, in some patients with normal serum AFP ( $<20$  ng/L), specific expression of SSX-2 and/or SSX-5 genes were/was observed in the peripheral blood.

**CONCLUSION:** SSX-2 and SSX-5 mRNA are expressed with a high frequency and specificity in HCC, and they can be also co-expressed. They can be used as the targets for specific immunotherapy of HCC. No relationship exists between the expression of SSX-2 and SSX-5 and clinical indicators, and the expression of the two genes may be used as the markers in diagnosis and prognosis prediction of HCC.

**Key Words:** Hepatocellular carcinoma; SSX-2; SSX-5; Reverse transcription polymerase chain reaction

Wu LQ, Wang XJ, Zhang B, Lu Y, Yang JY. Expression of cancer-testis antigen SSX-2 and SSX-5 in tissues and peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(14):1667-1672

### 摘要

**目的:** 检测 SSX 家族中 SSX-2 和 SSX-5 mRNA 在肝细胞癌(HCC)组织和外周血中的表达情况及其与临床指标之间的关系, 评价其作为肝癌免疫治疗特异性靶位的可能性, 及作为肝癌辅助诊断和监测预后、复发指标的可能性。

**方法:** 用一步法逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法对 HCC 患者 26 例的癌组织、相应癌旁组织和外周血及对照(肝硬化和正常肝组织)中 SSX-2, SSX-5 mRNA

的表达进行了检测,为验证结果的可靠性,随机选取每一种抗原 RT-PCR 呈阳性的产物 1 例进行 DNA 序列测定,并对检测结果与 AFP, HBSAg, 肿瘤直径, TNM 分期等临床指标之间的相关性进行分析。

**结果:** 26 例 HCC 肝癌组织 SSX-2 和 SSX-5 基因表达阳性率分别为 34.6% 和 46.2%, 两种基因同时表达的有 4 例 (15.4%), 至少有一种基因表达的有 17 例 (65.4%), 癌旁组织表达的阳性率皆为 0%; 在 26 例 HCC 患者外周血中, SSX-2 mRNA 的表达率为 19.2%, 在组织呈阳性的患者外周血中的表达率为 55.6%; SSX-5 mRNA 的表达率为 23.1%, 在组织呈阳性的患者外周血中的表达率为 50%; 两种基因同时表达者为 7.7%, 至少有一种表达者为 34.6%。对照组中 12 例肝硬化和 10 例非肿瘤肝组织及外周血均未检测到 SSX-2 和 SSX-5 的表达。二者均取 1 例 DNA 测序, 结果表明 RT-PCR 产物为 SSX-2 和 SSX-5 cDNA。SSX-2 和 SSX-5 的表达与年龄、性别、肿瘤大小、分化程度、AFP 水平、HBV 感染等无显著相关性 ( $P > 0.05$ )。部分 AFP 正常 ( $< 20 \text{ ng/L}$ ) HCC 患者外周血中存在 SSX-2 或 / 和 SSX-5 基因的表达。

**结论:** SSX-2 和 SSX-5 基因在 HCC 中呈高频率、高特异表达, 二者可同时在 HCC 中表达, 可以作为肝癌免疫治疗特异性靶位。二者的表达与年龄、性别、肿瘤大小、TNM 分期、血清 AFP 水平、肝炎病毒感染无显著相关性; SSX-2, SSX-5 基因的表达可用于 HCC 的辅助诊断和作为监测复发和预后的指标。

**关键词:** 肝细胞癌; SSX-2; SSX-5; 逆转录聚合酶链反应

吴力群, 王新建, 张斌, 卢云, 杨金镛. 肝细胞癌组织和外周血中肿瘤/睾丸抗原 SSX-2 和 SSX-5 的表达. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1667-1672  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1667.asp>

## 0 引言

原发性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界范围内常见的恶性肿瘤之一, 居我国恶性肿瘤致死类型的第 2 位。在 HCC 的治疗方面, 主要是以手术为主, 辅之以化疗、放疗、酒精注射及射频消融等, 在一定程度上改善了患者的预后, 并提高了生活质量, 但是依然有近一半 HCC 的患者死亡。目前治愈性肝切除术后 5 a 生存率估计在 17-33%, 但治愈性切除术后 5 a 复发率高达 61.5%, 小肝癌的复发率也高达 43.5%。在 HCC 中, SSX 家族基因研究较少, 我们对 SSX 基因家族中的 SSX-2 和 SSX-5 在肝癌组织和外周血中的表达情况进行研究, 以期能找到适合 HCC 免疫治疗的新靶位, 并探讨是否能将其作为一种新的 HCC 的诊断指标, 或监测预后和复发的指标。

## 1 材料和方法

1.1 材料 手术前取外周抗凝血约 100 mL (加入肝素

200 kU/L), 留待分离外周血单核细胞。手术切下标本后立刻先取癌旁组织 (距病变边界 2-5 cm 外), 分别切成约  $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$  的小块, 置于冻存管中, 立即放入液氮中速冻; 然后再取癌组织, 切成约  $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$  的小块, 置于冻存管后也经液氮速冻。然后将这些标本保存于  $-70^\circ\text{C}$  低温冰箱中, 用于检测 CTA 基因的 mRNA 表达。用同样的方法取 12 例肝硬化组织和 10 例非肿瘤肝组织作为研究对照。另取正常人的睾丸组织作为阳性对照。将所取外周血用 PBS 稀释, PBS 和血液的稀释比是 1:1。取 50 mL 离心管数个, 每管加入 10-15 mL 淋巴细胞分离液, 加入上述已稀释的抗凝血, 血液和分离液的比例为 2:1, 向分离液加入血液时, 应使血液沿管壁缓慢流下叠于分离液上。上述各管置于离心机,  $2\ 500 \text{ r/min}$  离心 20 min, 用移液管吸出 PBMC 层。PBMC 置于新离心管中, 加入 5 倍体积的 PBS, 离心  $1\ 500 \text{ r/min}$ , 10 min, 如此漂洗 PBMC 2 次。用 PBS 重悬漂洗后的 PBMC, 取细胞悬液 10-20  $\mu\text{L}$ , 加入等量 4 g/L 台盼蓝, 混匀后上细胞计数板进行计数, 细胞总数 = 四个大方格总数  $/ 2 \times 10^4 \times$  细胞悬液总量。一般情况下, 100 mL 血可获得  $8-10 \times 10^7$  个 PBMC。将细胞悬液离心  $1\ 500 \text{ r/min}$  10 min, 其上清, 加入冻存液重悬细胞, 分装于冻存管中, 每管装  $1 \times 10^7$  个细胞。将冻存管先置于  $4^\circ\text{C}$  冰箱, 约 1 h 后移入  $-80^\circ\text{C}$  冰箱, 24 h 后移入液氮中保存。

1.2 方法 从液氮中取出细胞标本在  $37^\circ\text{C}$  水浴箱内快速解冻, 以  $4^\circ\text{C}$ ,  $2\ 000 \text{ r/min}$  离心 10 min, 弃去冻存液加入 Trizol (美国 Gibco 公司) 1 mL, 反复吹打使细胞充分裂解。从  $-70^\circ\text{C}$  冰箱中取出组织标本约 50-100 mg 置入研钵内, 在有液氮存在的情况下研成碎末, 待液氮干燥后, 立即加 Trizol 1 mL 不断研磨直到完全成为液体后, 移入 1.5 mL 离心管中。在上述裂解液中加入三氯甲烷 200  $\mu\text{L}$ , 用力摇晃 15 s, 室温放置 2-3 min。  $12\ 500 \text{ g}$ ,  $4^\circ\text{C}$  离心 15 min, 小心吸取上清液将其移入另一 1.5 mL 离心管中, 加入异丙醇 0.5 mL, 于室温放置 10 min 进行 RNA 沉淀。  $12\ 500 \text{ g}$ ,  $4^\circ\text{C}$  离心 10 min, 小心弃去上清液, 加入 DEPC 处理水配制的 750 mol/L 乙醇 1 mL, 将白色 RNA 沉淀整块吹起进行漂洗。  $7\ 500 \text{ g}$ ,  $4^\circ\text{C}$  离心 5 min 后, 弃去上清液, 再加入 750 mol/L 乙醇 1 mL 重复洗涤一次,  $7\ 500 \text{ g}$ ,  $4^\circ\text{C}$  离心 5 min 后, 小心弃去上清液, 吸尽管壁残留的液体。冰上放置 5-10 min, 待残留的乙醇干燥后, 根据肉眼观察的 RNA 量的多少, 将所得 RNA 溶于 30-80  $\mu\text{L}$  DEPC 处理过的纯净水中。取 RNA 样品 4  $\mu\text{L}$ , 加无 RNA 酶的水 196  $\mu\text{L}$  稀释 50 倍, 用紫外分光光度计对 RNA 在 260 nm 下的吸光度进行定量。RNA 浓度 (g/L) =  $A_{260} \times$  核酸稀释倍数  $\times 40 / 1\ 000$ 。

用紫外分光光度计对 RNA 在 260 nm 和 280 nm 下的吸光度  $A_{260}$  和  $A_{280}$  进行定量, 计算  $A_{260}/A_{280}$ , 所有标本的比值要求在 1.75-1.95 之间. 低于此值者表明其含有蛋白质杂质, 用三氯甲烷重新提纯. 琼脂糖 1 g, 加入  $0.5 \times$  TBE 到总体积为 50  $\mu$ L, 配成 20 g/L 的凝胶, 经微波炉加热 100 s, 冷却到微烫手时加入 EB ( $0.5 \text{ g/L}$ ) 2.5  $\mu$ L 充分混匀后灌胶. 取 RNA 溶液 3  $\mu$ L, 加  $0.5 \times$  TBE 2  $\mu$ L,  $6 \times$  loading Buffer 1  $\mu$ L, 混匀后上样. 在  $0.5 \times$  TBE 的电泳液中, 以 5 V/cm 的电压电泳 20 min, 在紫外灯下观察 RNA 的电泳带, 比较核糖体 RNA (rRNA) 28 S 和 18 S 两条带, 如果在 EB 作用下显色强度为 2:1, 说明本实验提取的 RNA 比较完整.

1.2.1 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR) 所用的引物和内参照  $\beta_2$  微球蛋白( $\beta_2$ -MG)引物均委托上海生工公司合成, 引物序列、扩增片段大小及其在基因结构图上的位置详见表 1, 图 1, 2. 所用引物序列参照了以前研究者的设计<sup>[11]</sup>. SSX-2 含有 6 个外显子(exon), 我们所采用的引物位于第 1 和第 5, 6 外显子(跨越一个内含子)上, 扩增片段长度为 435 bp, 若为基因组 DNA 污染的产物, 因包含 4 个内含子, 片段远较目的产物长, 在电泳图上容易区分. SSX-5 含有 6 个外显子(exon), 所采用的引物位于第 1 和第 5 外显子上, 扩增片段长度为 314 bp, 若为基因组 DNA 污染的产物, 因包含 4 个内含子, 片段远较目的产物长, 在电泳图上容易区分. 一步法 RT-PCR 按照 50  $\mu$ L 反应体系, 依次向薄壁 PCR 管中加入无 RNA 酶水 26  $\mu$ L; 5 倍缓冲液 10  $\mu$ L; 10 mmol/L dNTPs 2  $\mu$ L; 15 mmol/L 上游引物 2  $\mu$ L; 15 mmol/L 下游引物 2  $\mu$ L; 10  $\mu$ mol/L  $\beta_2$ -M P1 2  $\mu$ L; 10  $\mu$ mol/L  $\beta_2$ -M P2 2  $\mu$ L; RT-PCR 酶 2  $\mu$ L; 所提取的 RNA 2  $\mu$ L; 总体积 50  $\mu$ L. 反应条件: 先 50 $^{\circ}$ C 30 min, 进行逆转录产生 cDNA, 然后进行 PCR 扩增. 按照试剂盒的要求所有 PCR 扩增程序的第一步均为 94 $^{\circ}$ C, 15 min 以激活 DNA 聚合酶, 此后步骤: SSX-2: 变性 94 $^{\circ}$ C 45 s, 退火 54 $^{\circ}$ C 45 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 60 s; SSX-5: 变性 94 $^{\circ}$ C 45 s, 退火 52 $^{\circ}$ C 45 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 45 s; 于 PCR 仪内扩增 35 个循环, 延伸 72 $^{\circ}$ C 12 min.

表1 PCR 所用的引物序列和扩增片段

引物名称	序列	扩增片段(bp)
SSX-2A(5')P1	5' -GTG CTC AAA TAC CAG AGA AGA TC-3'	435
SSX-2B(3')P2	5' -TTT TGG GTC CAG ATC TCT CGT G-3'	
SSX-5A(5')P1	5' -GTT CTC AAA TAC CAC AGA AGA TG-3'	314
SSX-5B(3')P2	5' -CTC TGC TGG CTT CTC GGG CG-3'	
B <sub>2</sub> -M A(5')P1	5' -CTC GCG CTA CTC TCT CTT TCT GG-3'	168
B <sub>2</sub> -M B(3')P2	5' -GCT TAC ATG TCT CGA TCC CAC TTA A-3'	



图1 SSX-2 基因结构示意图.

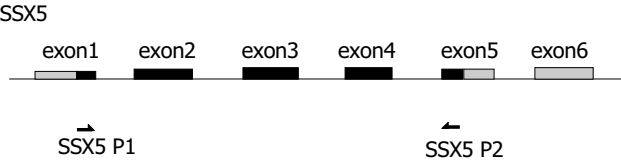


图2 SSX-5 基因结构示意图.

1.2.2 CTA 基因 PCR 产物的纯化和测序 取 PCR 产物 100  $\mu$ L, 在 5 V/cm 的电压下行 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳, 电泳 30 min, 在紫外灯下快速切下含目的片段的琼脂糖凝胶(切胶时应尽可能多的去掉不含 DNA 的琼脂糖). 按每 100 mg 琼脂糖加入  $S_1$  液 300  $\mu$ L, 置于 50 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 是琼脂糖完全熔化, 每分钟颠倒混匀一次. 加入 1/3  $S_1$  液体积的异丙醇, 混匀, 置于 50 $^{\circ}$ C 水浴 1 min, 混匀. 将熔化后的 Agarose 液已入吸附柱, 离心 30 s, 倒掉收集管中的液体, 在将吸附柱放入同一收集管中. 在吸附柱中加入  $W_1$  液 500  $\mu$ L, 离心 15 s, 倒掉收集管中的液体, 将吸附柱放入同一收集管中. 在吸附柱中加入 500  $\mu$ L  $W_1$  液, 静置 1 min, 离心 15 s, 倒掉收集管中的液体, 将吸附柱放入同一收集管, 离心 1 min. 将吸附柱放入一个干净的 1.5 mL 离心管中, 在吸附膜中央加入  $T_1$  液 50  $\mu$ L, 静置 1 min, 离心 1 min. 将回收产物进行 20 g/L 的琼脂糖凝胶电泳, 如果电泳带很清晰并且无杂带, 说明回收和纯化成功. 所回收和纯化的样品及相应的 PCR 上游引物送请上海生工公司进行 DNA 序列测定.

统计学处理 采用 SSPS 统计软件(10.0 版本)进行, 所用的统计学方法为  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  认为有统计学意义.

2 结果

2.1 SSX-2 和 SSX-5 基因在 HCC 组织中的表达 在 26 例 HCC 组织中, SSX-2, SSX-5 基因 mRNA 阳性率分别是 34.6% 和 46.2%, 两种基因同时表达的有 4 例 (15.4%), 至少有一种基因表达的有 17 例 (65.4%), 癌旁组织表达的阳性率皆为 0%; 对照组中 12 例肝硬化和 10 例非肿瘤患者正常肝组织均未检测到 SSX-2 和 SSX-5 的表达. 电泳显示 PCR 产物与阳性对照大小一致(图 3-6). RT-PCR 产物与从 GeneBank 检索的 SSX-2 (NM\_003147), SSX-5 (NM\_021015) 扩增范围序列基本一致, 证实所得到的 cDNA 确为要扩增的目的基因, 所得结果未发

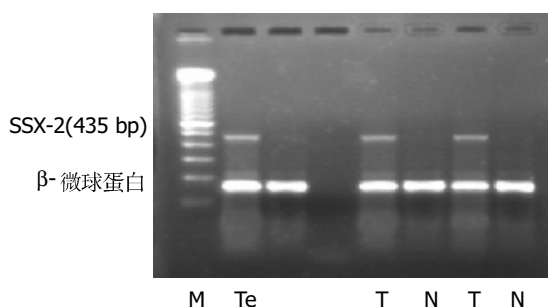


图3 SSX-2 基因在肝癌组织中表达电泳图.

现有固定的碱基改变. 在不同的HCC标本中SSX-2和SSX-5基因的RT-PCR产物电泳带的亮度存在较大差异, 而在同一标本中二者的表达也存在有强弱不等的现象, 说明二者的表达存在差异

2.2 SSX-2, SSX-5 基因的表达与临床指标的关系表 2 在 26 例 HCC 患者中, 男 21 例, 女 5 例, 年龄 17-79 (平均年龄  $53 \pm 14.8$ ) 岁; 有完整随访资料的病例有 20 例, 随访时间 6-15 (平均  $9.6 \pm 2.6$ ) mo, 共有 7 例复发, HBsAg 阳性 23 例, HCV 阳性 3 例, AFP 阳性 18 例, AFP 阴性 8 例; 术后病理显示中分化 15 例, 低分化 11 例; TNM 分期 III 期和 IV 期各 13 例. 通过统计学分析发现 SSX-2 及 SSX-5 基因在 HCC 组织中的表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小、TNM 分期、血清 AFP 水平、肝炎病毒感染无显著相关性 ( $P > 0.05$ ). 但是, 在 8 例 AFP 阴性的 ( $< 20$  ng/L) HCC 患者中有 2 例 SSX-2 基因表达阳性, 有 3 例 SSX-5 基因表达阳性. 随访的 20 例病例中, 术后 6 mo 期间有 7 例出现复发, 其中 SSX-2 基因表达阳性者 2 例, 占随访病例中 SSX-2 表达阳性者的 22.2%; SSX-5 基因表达阳性者 2 例, 占

表2 HCC 组织中SSX-2、5 表达与临床指标的关系( $n = 26$ )

临床指标	SSX-2	SSX-5
年龄 $<40$ 岁	1/4(25%)	2/4(50%)
$\geq 40$ 岁	8/22(36.4%)	10/22(45.5%)
男性	8/21(38.1%)	10/21(47.7%)
女性	1/5(20%)	2/5(40%)
肿瘤大小		
$\leq 5$ cm	5/16(31.2%)	7/16(43.8%)
$> 5$ cm	4/10(40%)	5/10(50%)
TNM 分期		
I, II, III 期	4/13(30.8%)	5/13(38.5%)
IV 期	5/13(38.5%)	7/13(53.8%)
HBV(+)	8/23(%)	11/23(%)
HBV(-)	1/3(%)	1/3(%)
AFP $\leq 20$ ug/L	2/8(25%)	3/8(37.5%)
AFP $> 20$ ug/L	7/18(38.9%)	9/18(50%)

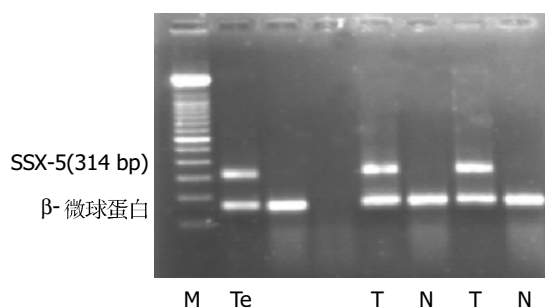


图4 SSX-5 基因在肝癌组织中表达电泳图.

随访病例中 SSX-5 表达阳性者的 18.2% (有 1 例 SSX-5 表达阳性者失去随访), 复发与阳性表达之间无显著的相关性 ( $P > 0.05$ ).

2.3 SSX-2 及 SSX-5 mRNA 在 HCC 患者外周血中的表达 在 26 例 HCC 患者外周血中, SSX-2 mRNA 的表达率为 19.2%, 在组织呈阳性的患者外周血中的表达率为 55.6%; SSX-5 mRNA 的表达率为 23.1%, 在组织呈阳性的患者外周血中的表达率为 50%. 两种基因同时表达者为 7.7%, 至少有一种表达者为 34.6%. 在外周血中表达为阳性者, 其在组织中的表达都为阳性; 组织中表达为阴性者, 其在外周血中表达也为阴性. 对照组中 12 例肝硬化和 10 例非肿瘤患者外周血中均未检测到 SSX-2 和 SSX-5 的表达. 在实验中严格设立阳性对照、空白对照和内参照, 所有的内参照均为阳性, 说明逆转录产物 cDNA 的质量良好; 所有的阳性对照电泳带显示良好, 而空白对照均为阴性, 说明无假阳性或假阴性情况出现, 所有目的带与阳性对照带的大小相同, 结果可靠.

2.4 SSX-2 及 SSX-5 基因在 HCC 患者外周血中的表达与临床指标的关系表 3 患者的各项临床指标同前, 统计学分析显示 SSX-2 及 SSX-5 基因在 HCC 患者外周血中的表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小、TNM 分期、血清 AFP 水平、肝炎病毒感染无显著相关性 ( $P > 0.05$ ). 在 8 例 AFP 为阴性的 ( $< 20$  ng/L) HCC 患者外周血中有 2 例 SSX-2 基因表达阳性, 有 2 例 SSX-5 基因表达阳性. 随访的 20 例病例中, 术后 6 mo 期间有 7 例出现复发, 其中有 1 例外周血 SSX-2 的表达为阳性, 占随

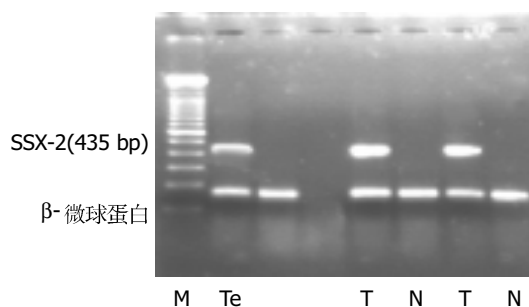


图5 SSX-2 基因在 HCC 外周血中的表达电泳图.



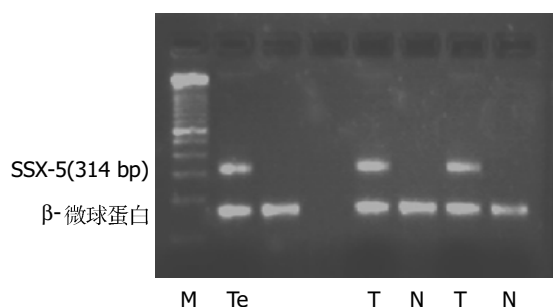


图6 SSX-5 基因在 HCC 外周血中的表达电泳图.

访病例中 SSX-2 表达阳性者的 20%, ; 有 2 例外周血 SSX-5 的表达为阳性, 占随访病例中 SSX-5 表达阳性者的 40%(有 1 例 SSX-5 表达阳性者失去随访); SSX-2 或 SSX-5 表达阳性者, 随访 6mo 内的复发率为 37.5% (3/8). 复发与外周血中基因的表达之间无显著相关性.

表3 HCC 外周血中 SSX-2、5 表达与临床指标的关系( $n = 26$ )

临床指标	SSX-2	SSX-5
年龄<40 岁	1/4(25%)	0/4(0%)
≥ 40 岁	4/22(18.2%)	6/22(27.3%)
男性	5/21(23.8%)	5/21(23.8%)
女性	0/5(0%)	1/5(20%)
肿瘤大小		
≤ 5 cm	3/16(18.8%)	4/16(25%)
>5 cm	2/10(20%)	2/10(20%)
TNM 分期		
I, II, III 期	1/13(7.7%)	2/13(15.4%)
IV 期	4/13(30.8%)	4/13(30.8%)
HBV(+)	5/23(21.7%)	6/23(26.1%)
HBV(-)	0/3(0%)	0/3(0%)
AFP ≤ 20 ug/L	2/8(25%)	1/8(12.5%)
>20 ug/L	3/18(16.7%)	5/18(27.8%)

### 3 讨论

关于 SSX-2 和 SSX-5 基因在 HCC 中的表达情况的研究较少, Chen *et al*<sup>[1]</sup>应用巢式 PCR 的方法检测了 SSX 基因亚家族在肝癌中的表达情况, 结果发现 SSX-2 和 SSX-5 基因 mRNA 在肝癌中的阳性率分别为 46.7% 和 33.3%, 在相应的癌旁组织中为 0% 和 10%. 我们采用一步法 RT-PCR 的方法研究了 SSX-2 和 SSX-5 基因在肝癌组织中的表达情况. 在所检测的 26 例 HCC 组织中, SSX-2 和 SSX-5 基因 mRNA 阳性率分别是 34.6% (9/26) 和 46.2%, 表达频率较高; 两种基因同时表达的有 4 例 (15.4%), 至少有一种基因表达的有 17 例 (65.4%); 发现 SSX-2 和 SSX-5 基因在癌旁组织及对照组的肝硬化和正常肝组织中均没有表达. 此结果与 Chen *et al*<sup>[1]</sup>

的结果大致相同(两种基因表达阳性率分别为 34.6% 和 46.2%), 但我们的研究结果中, 两种基因在癌旁和正常肝组织中均无表达, 至于为什么 SSX-5 会在癌旁组织中出现, 原因仍不清楚, Chen *et al*<sup>[1]</sup>认为可能是由于在癌旁存在微型转移灶, 或者是因为在肝硬化时期肝组织已经有 SSX-5 的表达. 根据我们的研究结果, 我们认为前一种可能性较大, 因为巢式 PCR (两轮 PCR) 是一种高度敏感的方法, 可达到检测一个肿瘤细胞的水平, 而现有的形态学检查尚不能达到此水平, 因此不能完全排除 SSX-5 基因呈阳性的癌旁组织存在微小转移的可能性. 同时也不能排除采集标本时标本受到污染的可能. 我们的研究结果提示 SSX-2 和 SSX-5 基因在肝癌中呈高频率、高特异表达, 这可能为肝癌的免疫治疗提供了新的潜在的靶位. 另外, 这两个基因在肝癌中可同时表达为采用多价瘤苗进行肝癌的免疫治疗提供了实验依据. 但是, 由于 SSX 基因的表达存在个体差异性, 即异质性问题(我们的研究也显示 SSX-2 和 SSX-5 基因在不同的标本中的表达有差异), 而且目前我们只是进行定性检测, 以这种定性结果指导选择病例进行免疫治疗, 其合理性值得商榷. 如能从蛋白质水平和定量检测其表达, 可能对选择合适的病例进行免疫治疗更具指导价值. 我们发现 SSX-2 和 SSX-5 基因的表达与年龄、性别、肿瘤大小、TNM 分期、血清 AFP 水平、肝炎病毒感染无显著相关性 ( $P > 0.05$ ).

目前对 HCC 的诊断仍 AFP 的检测和影像学检查为主, 但都可造成一定的假阳性和假阴性, 所以, 临床上仍希望能找到一种特异性更高的诊断方法. 另外, 肝癌细胞具有容易侵犯血管的特性, 极易造成肝癌细胞的血行播散, 可能造成手术切除后的高复发率和高转移率, 目前临床仍以检测 AFP 作为检测 HCC 复发的指标, 但其特异性仍不能令人满意, 这就要求我们寻找一种特异性更高的检测 HCC 复发的指标. 近年来兴起的运用 RT-PCR 方法检测循环肿瘤细胞 (这种方法敏感度极高, 可以从  $10^{7-8}$  个单个核细胞中检测出 1 个癌细胞<sup>[2-3]</sup>), 为在这方面的研究提供了广阔的前景. RT-PCR 技术已经成功地应用到多种实体肿瘤中, 以检测进入循环中微量的肿瘤细胞, 如黑色素瘤<sup>[4-5]</sup>、神经母细胞瘤<sup>[6]</sup>、前列腺癌<sup>[7-9]</sup>、乳腺癌<sup>[9-10]</sup>、胃癌<sup>[11-12]</sup>和结直肠癌<sup>[11-13]</sup>等, 当然这种技术也可以被用于检测 HCC 患者的循环肿瘤细胞. 最近的资料证实可以应用 RT-PCR 方法检测循环中的肝癌细胞, 但是所用的标志物都是组织特异性标记物. 换言之, 现在尚未找到肝脏肿瘤特异的标志物, 即在 100% 的肝脏肿瘤细胞中表达而在正常肝组织中完全不表达的标志物. 所以, 关键是找到一种肝脏肿瘤特异性的标志



物. Mori *et al*<sup>[13]</sup>应用 MAGE 基因 mRNA 作为标记物检测胃肠道肿瘤患者的循环肿瘤细胞, 结果显示敏感性为 1 个食管癌细胞系细胞 /  $10^6$  个 PBMC, 特异性也比较高 (正常人血液标本均不表达 MAGE 基因). 同理, 也可以用 CTA 基因作为肿瘤标志物检测 HCC 的循环肿瘤细胞. 这对于 HCC 的诊断、指导治疗及判断治疗效果和预后都有重要的临床意义. 我们应用 RT-PCR 技术对 26 例 HCC 患者外周血中 SSX-2 和 SSX-5 基因的表达进行了检测. 二者表达的阳性率分别为 19.2% 和 23.1%, 二者同时表达为 7.7%, 至少有一种表达为 34.6%, 在 HCC 组织中未能检测到 SSX-2 和 / 或 SSX-5 基因的患者, 在外周血标本中也不能检测到该基因, 对照组患者 (12 例肝硬化和 10 例其他非肿瘤患者) 的外周血中没有表达. 这说明这两种基因在 HCC 的外周血中的表达呈特异性, 所以对外周血中的 SSX-2 和 SSX-5 基因进行检测可作为 HCC 的一种诊断措施, 但由于其表达频率不高, 可造成一定的假阴性, 应用可能受到一定的限制. 而目前临床普遍采用的 AFP 检测法, 由于其在慢性活动性肝炎、肝硬化患者中也有表达, 存在一定的假阳性; 同时, 并非所有 HCC 患者都有 AFP 的表达, 有一定的假阴性, 而我们的研究结果显示, 有 4 例 AFP 正常 ( $<20 \mu\text{g/L}$ ) 的患者, 其外周血可检测到 SSX-2 和 / 或 SSX-5 基因, 这提示当怀疑有 HCC 但 AFP 又为阴性时, 可检测外周血中的 SSX-2 和 / 或 SSX-5 基因, 以作为 HCC 的辅助诊断指标. HCC 外周血中 SSX-2 和 SSX-5 基因的表达与临床指标的关系: 我们发现 HCC 外周血中 SSX-2 和 SSX-5 基因的表达与年龄、性别、肿瘤大小、TNM 分期、血清 AFP 水平、肝炎病毒感染无显著相关性 ( $P>0.05$ ). 我们的研究结果显示, 外周血 SSX-2 和 / 或 SSX-5 基因表达阳性的患者, 6 mo 内的复发率较高 (37.5%), 但没有统计学意义, 考虑可能与标本量较少有关, 应进行大标本量的研究, 可望将 SSX-2 和 SSX-5 作为监测 HCC 术后复发的指标.

总之, 本实验得到了以下发现: SSX-2 和 SSX-5 基因在肝癌组织中呈高特异、高频率表达, 在非肿瘤肝组织中不表达, 这就为 HCC 的特异性免疫治疗提供了新的潜在的靶位; SSX-2 和 SSX-5 基因在部分 HCC 中同时表达, 为采用多价疫苗进行 HCC 的特异性免疫治疗提供了实验依据; 相当一部分 AFP 正常 ( $<20 \mu\text{g/L}$ ) HCC 患者存在 SSX-2 和 SSX-5 基因的表达, 提示也许可能将 SSX-2 和 SSX-5 基因 mRNA 作为肿瘤标志物肿瘤标志

物来检测循环肝癌细胞, 用于 HCC 的辅助诊断和作为监测复发、转移和预后的指标.

#### 4 参考文献

- 1 Chen CH, Chen GJ, Lee HS, Huang GT, Yang PM, Tsai LJ, Chen DS, Sheu JC. Expressions of cancer-testis antigens in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Lett* 2001;164:189-195
- 2 Mori M, Mimori K, Tanaka F, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T. Molecular diagnosis of circulating cancer cells using MAGE gene assays. *JAMA* 1997;278:476-477
- 3 Ghossein RA, Scher HI, Gerald WL, Kelly WK, Curley T, Amsterdam A, Zhang ZF, Rosai J. Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic prostatic carcinoma: clinical implications. *J Clin Oncol* 1995;13:1195-1200
- 4 Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagener C, Neumaier M. Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994;12:725-729
- 5 Brossart P, Schmier JW, Kruger S, Willhauck M, Scheibenbogen C, Mohler T, Keilholz U. A polymerase chain reaction-based semiquantitative assessment of malignant melanoma cells in peripheral blood. *Cancer Res* 1995;55:4065-4068
- 6 Foss AJ, Guille MJ, Occlleston NL, Hykin PG, Hungerford JL, Lightman S. The detection of melanoma cells in peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1995;72:155-159
- 7 Naito H, Kuzumaki N, Uchino J, Kobayashi R, Shikano T, Ishikawa Y, Matsumoto S. Detection of tyrosine hydroxylase mRNA and minimal neuroblastoma cells by the reverse transcription-polymerase chain reaction. *Eur J Cancer* 1991;27:762-765
- 8 Gunther G, Haglund M, Lindquist L, Forsgren M, Skoldenberg B. Tick-borne encephalitis in Sweden in relation to aseptic meningo-encephalitis of other etiology: a prospective study of clinical course and outcome. *J Neurol* 1997;244:230-238
- 9 Israeli RS, Miller WH Jr, Su SL, Samadi DS, Powell CT, Heston WD, Wise GJ, Fair WR. Sensitive detection of prostate hematogenous tumor cell dissemination using prostate specific antigen and prostate specific membrane-derived primers in the polymerase chain reaction. *J Urol* 1995;153(3 Pt 1):573-577
- 10 Israeli RS, Miller WH Jr, Su SL, Powell CT, Fair WR, Samadi DS, Huryk RF, DeBlasio A, Edwards ET, Wise GJ. Sensitive nested reverse transcription polymerase chain reaction detection of circulating prostatic tumor cells: comparison of prostate-specific membrane antigen and prostate-specific antigen-based assays. *Cancer Res* 1994;54:6306-6310
- 11 Kruger WH, Stockschrader M, Hennings S, Aschenbrenner M, Gruber M, Gutensohn K, Loliger C, Gieseck F, Jonat W, Zander AR. Detection of cancer cells in peripheral blood stem cells of women with breast cancer by RT-PCR and cell culture. *Bone Marrow Transplant* 1996;18(Suppl 1):S18-20
- 12 Mori M, Mimori K, Inoue H, Barnard GF, Tsuji K, Nanbara S, Ueo H, Akiyoshi T. Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1995;55:3417-3420
- 13 Mori M, Mimori K, Ueo H, Karimine N, Barnard GF, Sugimachi K, Akiyoshi T. Molecular detection of circulating solid carcinoma cells in the peripheral blood: the concept of early systemic disease. *Int J Cancer* 1996;68:739-743