

# 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:wjgd@wjgnet.com">wjgd@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)

# 肝细胞肝癌患者肿瘤/睾丸抗原 SSX-1 及 NY-ESO-1 mRNA 的表达意义

吴力群, 王新建, 卢云, 张斌, 杨金镛

吴力群, 王新建, 卢云, 张斌, 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: 0532-82911999 传真: 0532-82911999  
收稿日期: 2005-03-31 接受日期: 2005-04-09

## Expression of cancer-testis antigens SSX-1 and NY-ESO-1 mRNA in hepatocellular carcinoma and its clinical significance

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

Li-Qun Wu, Xin-Jian Wang, Yun Lu, Bin Zhang, 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-1 and NY-ESO-1 mRNA in hepatocellular carcinoma (HCC) and their clinical significances.

**METHODS:** The expression of SSX-1 and NY-ESO-1 mRNA were detected in the cancer tissues, the corresponding cancer-adjacent tissues and the peripheral blood of 26 patients with HCC as well as of 20 controls by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). A randomized sample of the RT-PCR products was selected for DNA sequencing to examine the reliability of results.

**RESULTS:** The positive rates of SSX-1 and NY-ESO-1 mRNA expression were 61.5%(16/26) and 11.5% (3/26), respectively, in cancer tissues, and they were 46.2%(12/26) and 3.8%(1/26) in the peripheral blood. HCC patients, whose peripheral blood expressed SSX-1 or NY-ESO-1 mRNA, also expressed the same gene in their cancer tissues. SSX-1 and NY-ESO-1 mRNA were not expressed in cancer-adjacent tissues, and tissues and peripheral blood of the controls. DNA sequencing confirmed that the RT-PCR products were the target cDNA. No significant

relationship was found between the expression of SSX-1 and NY-ESO-1 and the clinical indicators such as age, gender, tumor size, extent of differentiation, serum  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) level and infection of hepatitis B virus ( $P>0.05$ ). However, in 37.5% patients with normal serum AFP ( $<20$  ng/L), specific expression of SSX-1 mRNA was observed. The short-term recurrent rate was 50%(4/8) in patients whose peripheral blood expressed SSX-1 mRNA, while the rate in patients with no SSX-1 mRNA expression was 25%(3/12).

**CONCLUSION:** SSX-1 and NY-ESO-1 are expressed with a high specificity in HCC, and they can be used as the targets for specific immunotherapy of HCC. The combination of SSX-1 mRNA and AFP detection can help to improve the accuracy of diagnosis for HCC. The expression of SSX-1 mRNA may be used as an indicator for recurrence, metastasis and prognosis of HCC.

**Key Words:** Hepatocellular carcinoma; SSX-1; NY-ESO-1; Reverse transcription polymerase chain reaction

Wu LQ, Wang XJ, Lu Y, Zhang B, Yang JY. Expression of cancer-testis antigens SSX-1 and NY-ESO-1 mRNA in hepatocellular carcinoma and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(14):1673-1678

### 摘要

**目的:** 检测 SSX-1 及 NY-ESO-1 mRNA 在肝细胞性肝癌(HCC)患者的外周血及肝癌组织中的表达情况及其临床意义。

**方法:** 用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法对26例 HCC 患者的外周血、癌组织、相应的癌旁组织及20例对照研究标本进行 SSX-1 和 NY-ESO-1 mRNA 检测。为验证结果的可靠性,对 SSX-1 和 NY-ESO-1 的 RT-PCR 产物进行了 DNA 测序。

**结果:** SSX-1 及 NY-ESO-1 mRNA 在 26 例 HCC 组织中的表达率分别为 61.5% 和 11.5%, 在相应的外周血中的表达率分别为 46.2% 和 3.8%。外周血中表达 SSX-1 或 NY-ESO-1 mRNA 的 HCC 患者,其组织标本中也表达上述基因。所有的癌旁组织,作为对照的肝硬化和正常肝组织以及非肿瘤患者的外周血中均未发现这两种

基因的表达。测序结果表明所得到的 cDNA 确为要扩增的目的基因。SSX-1 和 NY-ESO-1 基因的表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小、分化程度、血清 AFP 水平、肝炎病毒感染等临床指标无显著相关性 ( $P>0.05$ )。37.5% 的 AFP 正常 ( $<20\text{ ng/L}$ ) 的 HCC 患者外周血中有 SSX-1 基因表达。外周血中表达 SSX-1 mRNA 的患者的短期 (6 mo) 复发率为 50% (4/8), 不表达者的复发率为 25% (3/12)。

**结论:** 在 HCC 患者及癌组织中 SSX-1 和 NY-ESO-1 基因高特异性表达, 在检查 AFP 的同时检测外周血 SSX-1 mRNA 的表达, 有助于提高 HCC 的检出率。表达 SSX-1 mRNA 的 HCC 患者的短期复发率明显增高, 可作为监测 HCC 复发、转移和预后的指标。

**关键词:** 肝细胞癌; SSX-1; NY-ESO-1; 逆转录聚合酶链反应

吴力群, 王新建, 卢云, 张斌, 杨金镛. 肝细胞肝癌患者肿瘤/睾丸抗原 SSX-1 及 NY-ESO-1 mRNA 的表达意义. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1673-1678  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1673.asp>

## 0 引言

原发性肝细胞性肝癌 (HCC) 常见, 恶性程度高, 预后差。我国每年约 23 万人死于肝癌, 占全世界肝癌死亡数的 53%<sup>[1]</sup>。即使小肝癌术后 5 a 的复发率也超过 50%, 大肝癌的复发率则更高<sup>[2]</sup>, 复发与转移成为制约肝癌预后的瓶颈。据估计直径小于 1 cm 的 HCC 约有 20% 发生血管侵犯, 大于 5 cm 的约有 90% 发生血管侵犯, 对血管的浸润直接造成了肝癌细胞的血源性播散<sup>[3]</sup>。当前, 手术切除仍是治疗肝癌复发灶的最有效的方法<sup>[4]</sup>。RT-PCR 技术检测循环血液中的肿瘤播散细胞 (DTC) 的灵敏度可达  $1/(10^6-10^8)$ <sup>[5]</sup>。以 ALB mRNA 及 AFP mRNA 作为检测指标, 缺乏特异性<sup>[6-7]</sup>。近年来肿瘤-睾丸抗原 (cancer-testis antigens, CTA), 包括 MAGE<sup>[8]</sup>, SSX<sup>[9]</sup>, GAGE<sup>[10]</sup>, BAGE, SCP-1 和 NY-ESO-1 等家族, 有望成为检测肿瘤细胞的特异性指标。MAGE-1 和 MAGE-3 在 HCC 组织中呈高表达<sup>[11-12]</sup>, 其抗原肽在体外能诱导产生 CTL 反应<sup>[13-14]</sup>, 可用于肿瘤复发的监测<sup>[15]</sup>。我们以 SSX-1 和 NY-ESO-1 mRNA 为标记检测 HCC 外周血中肿瘤细胞, 对于 HCC 辅助诊断, 复发与预后的预测可能具有重要的意义, 目前国内外尚无此类研究报道。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 术前自深静脉通道或外周静脉采血 30-40 mL 立即加入肝素 100 U 抗凝, 在 1 h 内采用梯度离心法分离淋巴细胞, 在显微镜下计数并计算所得淋巴细胞的总量, 根据细胞数加入适量冻存液, 使其密度为  $1 \times 10^{10}/\text{L}$ , 按每管 1 mL 装入冻存管内, 先在 4℃ 冰箱内过渡 30 min, 然后放入 -70℃ 冰箱过夜, 次日将其转入液氮中长期保存备用。肝癌标本离体后立

即将其剖开, 更换刀片后, 先切取距肿瘤边缘 2-5 cm 的癌旁组织, 然后沿肿瘤边缘切取生长活跃的瘤组织, 将所取组织切成 3-5 mm 的小碎块装入冻存管内, 并立即放入液氮中, 随后将其转入 -70℃ 冰箱内保存。采用同样的方法, 切取和保存作为对照的肝硬化及正常肝组织。对照标本均取自非肿瘤患者, 另取正常人的睾丸组织作为阳性对照。

### 1.2 方法

**1.2.1 RNA 的提取和测定** 将提取 RNA 用的研钵刷洗干净, 经强酸浸泡过夜, 用自来水洗净残余酸, 用双蒸水清洗 3 遍, 200℃ 干烤 6 h 备用。从液氮中取出细胞标本, 在 37℃ 水浴箱内快速解冻。以 4℃, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃去冻存液, 每  $10^7$  个细胞中加入 Trizol (美国 Gibco 公司) 1 mL, 反复吹打使细胞充分裂解。从 -70℃ 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氯仿 200  $\mu\text{L}$ , 用力摇晃 15 s, 室温放置 2-3 min。12 500 g, 4℃ 离心 15 min, 小心吸取上清液将其移入另一 1.5 mL 的离心管中, 加入异丙醇 0.5 mL, 于室温放置 10 min 进行 RNA 沉淀。12 500 g, 4℃ 离心 10 min, 小心弃去上清液, 加入 DEPC 处理水配制的 750 mL/L 乙醇 1 mL, 将白色 RNA 沉淀整块吹起进行漂洗。7 500 g, 4℃ 离心 5 min 后, 弃去上清液, 再加入 750 mL/L 乙醇 1 mL 重复洗涤 1 次, 7 500 g, 4℃ 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, 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) =  $A_{260} \times \text{核酸稀释倍数} \times 40/1\ 000$ 。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, 用氯仿重新提纯。称琼脂糖 1 g, 加入  $0.5 \times \text{TBE}$  到总体积为 50 mL, 配成 2% 的凝胶, 经微波炉加热 100 s, 冷却到微烫手时加入 2.5  $\mu\text{L}$  EB (0.5 g/L) 充分混匀后灌胶。取 RNA 溶液 3  $\mu\text{L}$ , 加 2  $\mu\text{L}$   $0.5 \times \text{TBE}$ , 1  $\mu\text{L}$   $6 \times \text{Loading Buffer}$ , 混匀后上样。在  $0.5 \times \text{TBE}$  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。

**1.2.2 逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)** 所用的目的引物和内参照  $\beta_2$  微球蛋白 ( $\beta_2\text{-MG}$ ) 引物均委托上海生

工公司合成(表1). 所用引物序列参照了以前研究者的设计<sup>[16]</sup>. 将引物按照 Qiagen QneStep RT-PCR 试剂盒的要求溶解为 15  $\mu\text{mol/L}$ , 保存在 4℃ 冰箱内备用. 目的基因及  $\beta_2$  微球蛋白的 RT-PCR 扩增: 反应体积为 50  $\mu\text{L}$ , 依次向薄壁 PCR 管中加入 5  $\times$  Buffer 10  $\mu\text{L}$ , 10 mmol/L dNTP 2  $\mu\text{L}$ , 15 mol/L SSX-1/NY-ESO-1 上游引物 2  $\mu\text{L}$ , 15 mol/L SSX-1/NY-ESO-1 下游引物 2  $\mu\text{L}$ , 15 mol/L  $\beta_2$  微球蛋白的上游引物 2  $\mu\text{L}$ , 15 mol/L  $\beta_2$  微球蛋白的下游引物 2  $\mu\text{L}$ , 混合酶 2  $\mu\text{L}$ , RNA 溶液可变(每个反应体系所需的 RNA 模板量为 0.5  $\mu\text{g}$ –1  $\mu\text{g}$ , RNA 溶液的加样量根据所测浓度而定), Q-solution 10  $\mu\text{L}$ , 无 RNA 酶水至 50  $\mu\text{L}$ . 整个加样过程中各种试剂及 PCR 管均应放在冰上, 在加样结束前数分钟打开 PCR 仪, 设定逆转录程序, 待 PCR 仪的温度升至 50℃ 后迅速放入 PCR 管. 先 50℃ 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℃, 15 min 以激活 DNA 聚合酶, 此后步骤分别如下: SSX-1: 变性 94℃ 45 s, 退火 52℃ 45 s, 延伸 72℃ 60 s; NY-ESO-1: 变性 94℃ 45 s, 退火 52℃ 45 s, 延伸 72℃ 45 s; 于 PCR 仪内扩增 35 个循环, 延伸 72℃ 12 min. 称取琼脂糖 2.0 g, 加入 0.5  $\times$  TBE 到总体积为 100 mL, 配成 15 g/L 的凝胶, 经微波炉加热 90 s, 冷却到微烫手后 加入 5  $\mu\text{L}$  EB (0.5 g/L) 充分混匀后灌胶. 取 PCR 产物 5  $\mu\text{L}$ , 加 1  $\mu\text{L}$  6  $\times$  Loading Buffer 混匀后上样. 在 0.5  $\times$  TBE 电泳液中, 用 5 V/cm 的电压电泳 45 min, 在紫外线灯下观察 DNA 的电泳带, 并用 Korda 成像系统对产物进行分析. PCR 扩增后未出现  $\beta_2$  微球蛋白目的带的样本, 表明 cDNA, 不完整, 为排除加样错误重做 1 次, 必要时重新提取该样本的 RNA, 对于出现  $\beta_2$  微球蛋白目的带的样本进行相关指标的阳性统计. 取 RT-PCR 产物 100  $\mu\text{L}$ , 在 5 V/cm 的电压下行 20 g/L 的琼脂糖凝胶电泳, 电泳 45 min, 在紫外灯下快速切下含目的片段的琼脂糖凝胶, 将其放入 1.5 mL 离心管内. 将回收的胶称重. 按照每 100 mg 胶 300 mL S1 液的比例加入 S1 液, 置 50℃ 水浴 10 min,

使琼脂糖块完全溶化, 每 2–3 min 颠倒混匀一次. 因为目的片段小于 500 bp, 所以还需向水浴后的胶样中加 1/3 S1 液体积的异丙醇, 混匀. 继续 50℃ 水浴 1 min. 将溶化后的胶样移入吸附柱, 12 000 g, 离心 30 s, 倒掉收集管中的液体, 再将吸附放入同一收集管. 在吸附柱中加入 500  $\mu\text{L}$  W1 液, 离心 15 s. 倒掉收集管中的液体, 再将吸附放入同一收集管. 离心 1 min. 将吸附柱放入一个干净的 1.5 mL 的离心管中, 在吸附膜中央加入 30  $\mu\text{L}$  T1 液, 静置 1 min 后, 离心 1 min. 取 3  $\mu\text{L}$  加入 2  $\mu\text{L}$  0.5  $\times$  TBE 和 1  $\mu\text{L}$  6  $\times$  Loading Buffer, 进行 20 g/L 的琼脂糖凝胶电泳, 对回收产物进行鉴定, 如果电泳带很清晰并且无杂带, 说明回收和纯化成功. 测序: 将回收和纯化的样品交给上海生工生物工程技术有限公司. 测序结果如下: 将测序结果与从 GeneBank 检索的 SSX-1 (NM\_005635)、NY-ESO-1 (U87459) 基因序列相对照, 基本一致, 证实所得到的 cDNA 确为要扩增的目的基因.

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-1A(5')	5'-CTA AAG CAT CAG AGA AGA GAA GC-3'	
SSX-1B(3')	5'-AGA TCT CTT ATT AAT CTT CTC AGA AA-3'	422
NY-ESO-1(5')	5'-ATG GAT GCT GCA GAT GCG G-3'	
NY-ESO-1(3')	5'-GGC TTA GCG CCT CTG CCC TG-3'	329
$\beta_2$ -M A(5')	5'-CTC GCG CTA CTC TCT CTT TCT GG-3'	
$\beta_2$ -M B(3')	5'-GCT TAC ATG TCT CGA TCC CAC TTA A-3'	168

**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-1 及 NY-ESO-1 基因在 HCC 组织中的表达** 在 HCC 组织中, SSX-1 及 NY-ESO-1 基因 mRNA 阳性率分别是 61.5% 和 11.5%, PCR 产物与阳性对照大小一致 (图 1A–B); 相应的癌旁组织及作为对照的肝硬化和正

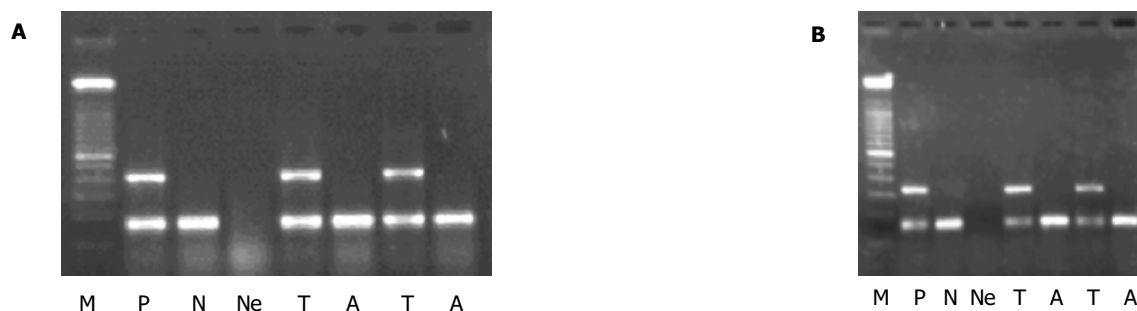


图1 SSX-1 及 NY-ESO-1 基因在肝癌组织中表达电泳图. A: SSX-1; B: NY-ESO-1. T: 肿瘤组织; A: 癌旁组织; N: 对照肝组织; Ne: 空白对照; P: 阳性对照; M: 100 bp DNA marker.

常肝组织中无阳性表达. 表达NY-ESO-1的3例标本同时表达SSX-1, 二者间未呈现互补关系. 阳性对照均为阳性, 而空白对照均为阴性, 说明结果可靠. 实验中发现不同的HCC标本中SSX-1基因的RT-PCR产物电泳带的亮度存在较大差异, 说明SSX-1基因的表达存在差异. 随机选取SSX-1, NY-ESO-1表达阳性的PCR产物各1例测序, 测序结果表明所得的RT-PCR产物与从GeneBank检索的SSX-1(NM\_005635), NY-ESO-1(U87459)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.

**2.2 SSX-1及NY-ESO-1表达与临床指标的关系** HCC患者26例, 男21例, 女5例, 年龄17-79(平均 $53 \pm 14.8$ )岁; 随访20例, 随访时间最短6-15(平均 $9.6 \pm 2.6$ )mo, 术后6 mo内有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16例, 低分化10例; TNM分期III期和IV期各13例. 通过统计学分析发现SSX-1及NY-ESO-1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、分化程度、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5例SSX-1基因表达阳性, 随访期间复发的7例患者中, 组织标本SSX-1基因阳性的5例, 阴性的2例, 组织SSX-1阳性者的复发率为41.7%(5/12), 阴性的复发率为25%(2/8); 组织NY-ESO-1阳性的复发率为0(0/3), 阴性的复发率为41.2%(7/17).

**2.3 SSX-1及NY-ESO-1mRNA在HCC患者外周血中的表达** SSX-1mRNA的表达率为38.5%, 在组织表达SSX-1mRNA的患者外周血中的表达率为62.5%(10/16)(图2A); NY-ESO-1的表达率为3.8%, 在组织呈阳性的标本中的表达率为33.3%(1/3)(图2B). 表达NY-ESO-1的血样不表达SSX-1, 二者有互补关系. 所有外周血中表达SSX-1或NY-ESO-1mRNA的患者, 其肿瘤组织中亦呈表达相应基因. 肝癌组织中不表达SSX-1或NY-ESO-1mRNA的患者, 其外周血中亦不表达该基因. 同法检测20例非肿瘤患者的外周血, 未发现这

两种基因的表达. 统计学分析显示SSX-1及NY-ESO-1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、分化程度、血清AFP水平、肝炎病毒感染无显著相关性( $P>0.05$ ). 在8例AFP阴性的( $<20$  ng/L)HCC患者中有3例其外周血中SSX-1基因表达阳性. 随访期间复发的7例患者中有4例外周血SSX-1的表达为阳性, 外周血不表达SSX-1基因的3例患者中, 有2例其组织标本也不表达SSX-1. 外周血SSX-1阳性者的复发率为50%(4/8), 阴性的复发率为25%(3/12); 提示外周血SSX-1阳性的患者似乎更易复发, 因此以SSX-1基因mRNA为肿瘤标志物, 也许可以用于HCC的辅助诊断和作为监测复发、转移和预后的指标.

### 3 讨论

**3.1 SSX-1和NY-ESO-1在HCC中的表达** SSX-1基因位于X<sub>p</sub>11.23-p11.22. 该基因DNA片段的长度为8 720 bp, 含6个外显子, 剪辑后的mRNA长度为766 bp, 编码188个氨基酸残基的蛋白<sup>[17]</sup>. 研究SSX1基因在HCC组织及外周血中的表达, 揭示其与HCC的转移, 复发及预后间的关系, 对于指导临床治疗, 探讨其能否作为HCC免疫治疗的靶点, 以及监测肿瘤的转移等可能具有重要的意义. NY-ESO-1的上述表达方式及基因位点(位于X染色体)与先前发现的CT基因相同, 因此属于CT家族. 研究NY-ESO-1mRNA在肝癌组织中的表达情况, 及表达NY-ESO-1mRNA的肿瘤播散细胞在循环血液中的存在情况, 对于肝癌的免疫治疗可能具有重要意义. 我们发现虽然SSX-1基因在HCC组织中的表达与患者的性别, 年龄, 肿瘤大小及AFP等临床指标间无显著相关性, 但是在20例随访患者中, 组织SSX-1阳性患者的短期(6 mo)复发率为41.7%(5/12), 阴性患者的复发率为25%(2/8), 外周血中SSX-1阳性患者的短期复发率为50%(4/8), 阴性患者的复发率为25%(2/8), 阳性者明显增高, 提示SSX-1阳性的患者可能更易复发, 预后差. NY-ESO-1mRNA只在HCC组织中表达, 在其相应的癌旁组织及对照的肝

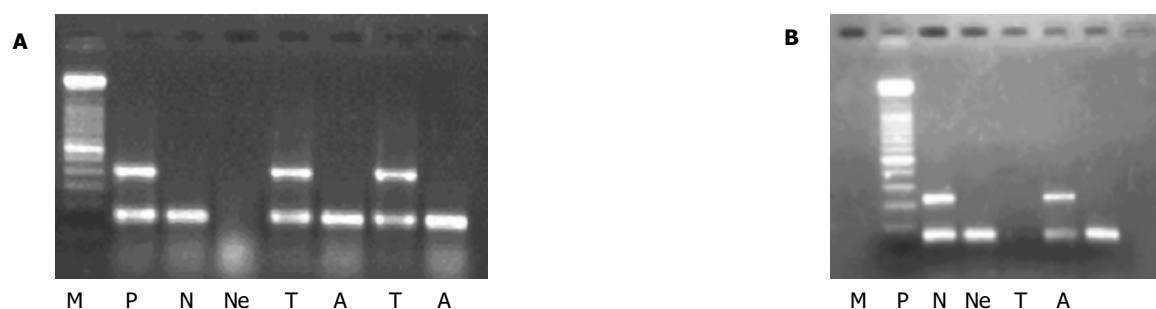


图2 SSX-1及NY-ESO-1基因在肝癌患者外周血中表达电泳图. A: SSX-1; B: NY-ESO-1. T: 肿瘤组织; A: 癌旁组织; N: 对照肝组织; Ne: 空白对照; P: 阳性对照; M: 100 bp DNA marker.



硬化及正常肝组织中均无表达, 具有高度特异性, 但是表达率偏低, 仅为 11.5%(3/26), 而且与另一研究指标 SSX-1 的表达间无互补关系, 与各项临床指标间亦无显著相关性. 关于 NY-ESO-1 mRNA 在 HCC 组织中表达的研究不多, Boyer *et al*<sup>[16]</sup> 报道的检测结果为 0 (0/22), Chen *et al*<sup>[18]</sup> 报道的为 36.7%, 我们的研究结果介于二者之间, 显示 NY-ESO-1 基因在 HCC 组织中呈低表达. 虽然 NY-ESO-1 在 HCC 中呈低表达, 但是有研究表明, 50% 的 NY-ESO-1 阳性的黑色素瘤患者体内可检测到 NY-ESO-1 抗体, 这一比例是已发现的 CT 抗原中最高的, 而且已经发现了 NY-ESO-1 抗原肽的 CTL 表位 (HLA-A2), 并证实 NY-ESO-1 抗原能在患者体内同时引发抗肿瘤的体液和细胞免疫, 因此, 如能证实 NY-ESO-1 抗原在其阳性的 HCC 患者中也能引发如此高比例的细胞和 / 或体液免疫, 那么 NY-ESO-1 抗原有可能成为 NY-ESO-1 阳性 HCC 患者最有效的免疫治疗靶点, 但这有待于进一步研究证实.

**3.2 以 SSX-1 及 NY-ESO-1 mRNA 为标记检测外周血中的肿瘤播散细胞** 对于血液中的肿瘤播散细胞 (DTC) 的检测, 已经开展了约半个世纪, 多数研究集中于 DTC 在骨髓中的检测. 因为外周血中的 DTC 的含量较骨髓中的更少, 因而对检测方法的灵敏度要求更高, 常规的方法, 包括用于检测骨髓中 DTC 的免疫细胞 / 组织化学技术 (ICC/IHC) 也不能满足其要求, 所以对于外周血中 DTC 的检测主要开展于更灵敏的 RT-PCR 技术诞生后的近 10 a 间, 尤其是近 5-6 a. 将 RT-PCR 技术用于检测外周血中的 DTC 具有两大优势: (1) 他是目前用于检测 DTC 灵敏度最高的方法, 依据不同的条件, 其灵敏度可达  $1/(10^6-10^8)$ , 体外试验中可以从 1 mL 全血中检测出一个肿瘤细胞<sup>[5]</sup>; (2) 因为 mRNA 分子极不稳定, 而组织及血液中的 RNA 酶又无处不在, 所以体内游离以及凋亡细胞中的 mRNA 会立即被 RNA 酶降解. 因此如能从外周血中扩增出靶 mRNA 序列, 即表明其中含有存活的靶细胞. 如果所用 mRNA 具有肿瘤特异性, 那么阳性结果将表明, 外周血中存在活的肿瘤细胞. 尽管对于外周血中的肿瘤细胞的临床意义, 仅仅是代表从原发瘤脱落的无转移能力的肿瘤细胞, 还是代表着转移播散? 一直存在争议, 但是有一个不容忽视的事实, 即脱离原发灶的肿瘤细胞, 如果不通过血液循环就不可能到达远隔器官形成转移灶, 例如, 肝癌的肺转移及脑转移. 从这个角度来看, 外周血中的肿瘤细胞与肿瘤的转移与复发间应该存在某种联系, 近 10 a 来, 已有相当一部分研究结果肯定了外周血中肿瘤细胞的临床意义. 因此, 选择肿瘤特异性 mRNA 为标记, 检测肿瘤患者外周血中的肿瘤细胞, 对于监测肿瘤的转移, 复发及指导临床治疗可能具有重要意义.

以往的文献表明, SSX-1 和 NY-ESO-1 mRNA 具有肿瘤特异性<sup>[14, 19]</sup>. 本实验也证实二者在 HCC 组织中高特异性表达, 适合于作为检测外周血中肿瘤细胞的标志, 尤其是 SSX-1, 不但高度特异, 而且还具有较高的表达率. 本研究发现. (1) SSX-1 mRNA 在非肿瘤患者的外周血中的表达率为 0, 而在 HCC 患者外周血中的表达率为 10/26, 提示其具有辅助诊断的价值; (2) 37.5%(3/8) 的 AFP 正常患者的外周血中 SSX-1 mRNA 阳性, 提示二者联合应用可能有助于提高 HCC 的检出率. (3) 外周血 SSX-1 mRNA 阳性患者的短期复发率为 50%(4/8), 阴性患者的复发率为 25%(3/12), 虽然因例数较少不具有统计学意义, 但提示外周血中 SSX-1 mRNA 阳性的患者似乎更易复发. (4) 虽然外周血中的 NY-ESO-1 mRNA 阳性率很低, 仅为 3.8%(1/26), 但是与 SSX-1 mRNA 在外周血中的表达有互补关系, 因而仍有应用价值.

总之, 本实验得到了以下发现: (1) SSX-1 和 NY-ESO-1 基因在肝癌组织中高特异性表达, 有望成为 HCC 的特异性免疫治疗新的潜在靶位; (2) SSX-1 及 NY-ESO-1 mRNA 在 HCC 外周血中高特异性表达, 以他们为标记检测患者外周血中的肝癌细胞, 对于 HCC 具有定性诊断价值; (3) 部分 AFP 正常 (<20 ng/L) HCC 患者的外周血中有 SSX-1 mRNA 的表达, 提示二者联合应用有助于提高 HCC 的检出率. (4) 表达 SSX-1 mRNA 的 HCC 患者的短期复发率明显增高, 提示可将 SSX-1 mRNA 作为监测 HCC 患者复发、转移和预后的指标.

#### 4 参考文献

- 1 Tang ZY, Yu YQ, Zhou XD, Ma ZC, Wu ZQ. Progress and prospects in hepatocellular carcinoma surgery. *Ann Chir* 1998; 52:558-563
- 2 Ghossein RA, Osman I, Bhattacharya S, Ferrara J, Fazzari M, Cordon-Cardo C, Scher HI. Detection of prostatic specific membrane antigen messenger RNA using immunobead reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1999;8:59-65
- 3 Müller C, Petermann D, Pfeffel F, Oesterreicher C, Fugger R. Lack of specificity of albumin-mRNA-positive cells as a marker of circulating hepatoma cells. *Hepatology* 1997;29:879-879
- 4 Lemoine A, LeBricon T, Salvucci M, Azoulay D, Pham P, Raccuia J, Bismuth H, Debuire B. Prospective evaluation of circulating hepatocytes by alpha-fetoprotein mRNA in humans during liver surgery. *Ann Surg* 1997;226:43-50
- 5 Matsuzaki A, Suminoe A, Hattori H, Hoshina T, Hara T. Immunotherapy with autologous dendritic cells and tumor-specific synthetic peptides for synovial sarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002;24:220-223
- 6 Tureci O, Sahin U, Zwick C, Koslowski M, Seitz G, Pfreundschuh M. Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5211-5216
- 7 Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci*



- USA 1997;94:1914-1918
- 8 Chen YT, Gure AO, Tsang S, Stockert E, Jager E, Knuth A, Old LJ. Identification of multiple cancer/testis antigens by allogenic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6919-6923
- 9 Yamashita N, Ishibashi H, Hayashida K, Kudo J, Takenaka K, Itoh K, Niho Y. High frequency of the MAGE-1 gene expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996;24:1437-1440
- 10 Tahara K, Mori M, Sadanaga N, Sakamoto Y, Kitano S, Makuuchi M. Expression of the MAGE gene family in human hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1999;85:1234-1240
- 11 Jager D, Stockert E, Karbach J, Herrlinger K, Atmaca A, Arand M, Chen YT, Gnjatich S, Old LJ, Knuth A, Jager E. Urine antibody against human cancer antigen NY-ESO-1. *Cancer Immunity* 2002;2:10
- 12 Clark J, Rocques PJ, Crew AJ, Gill S, Shipley J, Chan AM, Gusterson BA, Cooper CS. Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the t (X;18)(p11. 2;q11. 2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nat Genet* 1994;7:502-508
- 13 Crew AJ, Clark J, Fisher C, Gill S, Grimer R, Chand A, Shipley J, Gusterson BA, Cooper CS. Fusion of SYT to two genes, SSX1 and SSX2, encoding proteins with homology to the Kruppel-associated box in human synovial sarcoma. *EMBO J* 1995;14:2333-2340
- 14 Dos Santos NR, Torensma R, de Vries TJ, Schreurs MW, de Bruijn DR, Kater-Baats E, Ruiter DJ, Adema GJ, van Muijen GN, van Kessel AG. Heterogeneous expression of the SSX cancer/testis antigens in human melanoma lesions and cell lines. *Cancer Res* 2000;60:1654-1662
- 15 Tureci O, Chen YT, Sahin U, Gure AO, Zwick C, Villena C, Tsang S, Seitz G, Old LJ, Pfreundschuh M. Expression of SSX genes in human tumors. *Int J Cancer* 1998;77:19-23
- 16 Chen YT, Boyer AD, Viars CS, Tsang S, Old LJ, Arden KC. Genomic cloning and localization of CTAG, a gene encoding an autoimmunogenic cancer-testis antigen NY-ESO-1, to human chromosome Xq28. *Cytogenet Cell Genet* 1997;79:237-240
- 17 Lee SY, Obata Y, Yoshida M, Stockert E, Williamson B, Jungbluth AA, Chen YT, Old LJ, Scanlan MJ. Immunomic analysis of human sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2651-2656
- 18 Chen CH, Chen GJ, Lee HS. Expressions of cancer-testis antigens in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Lett* 2001;164:189-195
- 19 Mori M, Mimori K, Ueo H, Tsuji K, Shiraishi T, Barnard GF, Sugimachi K, Akiyoshi T. Clinical significance of molecular detection of carcinoma cells in lymph nodes and peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction in patients with gastrointestinal or breast carcinomas. *J Clin Oncol* 1998;16:128-132

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 欢迎征订《英语科技论文撰写与投稿》

本书是英语科技论文写作与投稿的指南读物，可作为理工科研究生的教学用书或自学教材，也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览。

书中全方位地分析和展示了科技写作的技巧与诀窍，介绍了当前国际主流科技期刊对稿件的基本要求。从论文选题、投稿期刊的选择及作者署名与分工等方面阐述了科技论文写作前的准备工作，通过大量实例分析介绍了英文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则 - 准确(Accuracy)、简洁(Brevity)和清楚(Clarity)，分别从写作技巧、时态和语态的使用等方面介绍了科技论文正文各部分(引言、材料与方法、研究结果、讨论、结论)的撰写，举例说明了致谢的写作要点及图表制作的注意事项，总结了各主要参考文献体例的特点、格式及相关著录规范。

本书还较为全面地介绍了国际单位制(SI)及其使用中应注意的问题，结合实例举证，从选词、重要语法和文体等方面系统阐述了科技英语写作的文法与表达，较为详尽地总结了英文标点符号的使用，从稿件排版、投稿信写作、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系，综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互动。

本书论述缜密、案例丰富。为方便读者进一步追溯和研读相关资料，书中按章节形式标引了参考文献约 220 篇(次)。

编著: 任胜利, 理学博士,《自然科学进展》责任编辑, 1998 年以来先后在 Science, Nature, Scientometrics, Learned Publishing,《科学通报》、《编辑学报》、《中国科技期刊研究》等期刊上发表文献计量学、科技编辑与写作方面的论文 30 余篇。出版: 科学出版社。定价: 28 元 + 2 元(邮费)。邮购地址: 100085, 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社办公室, 北京市海淀区双清路 83 号。联系人: 刘俐, 程宇。联系电话: 010-62327204; 传真: 010-62326921。开户银行: 中国工商银行北京北太平庄支行 开户名: 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社, 帐号: 0200010009200062483。(国家自然科学基金委员会科学基金杂志社 2004-05-20)