

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2010. 04. 010

肿瘤抗原 MAGE-A4 在乳腺癌组织和细胞系中的表达及其作用

桑梅香¹,单保恩¹,耿翠芝²,杨瑞玲²,王 玲¹

Expression and Function of Tumor Antigen MAGE-A4 in Breast Cancer Tissues and Cell Lines

SANG Mei-xiang¹, SHAN Bao-en¹, GENG Cui-zhi², YANG Rui-ling², WANG Ling¹

1. Research Center, The Fourth Clinical Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, 0500112, China, 2. The First Surgery Department

Corresponding Author: SHAN Bao-en, E-mail: baoenshan@yahoo. com. cn

Abstract: Objective To examine the expression of MAGE-A4 (melanoma antigen-A4) mRNA in normal and breast cancer tissues and investigate the relationship between MAGE-A4 expression and the clinical and biological parameters and the effect of MAGE-A4 on the proliferation of breast cancer cells. **Methods** Expression of MAGE-A4 mRNA in 77 cases of normal breast tissues and breast cancer tissues were examined by RT-PCR. The relationship between MAGE-A4 expression and the clinical and biological parameters was analyzed by χ^2 test. Colony formation assay was used to examine the effect of MAGE-A4 on the proliferation of breast cancer cells. **Results** There were no MAGE-A4 mRNA expressions in the 77 normal breast tissues. Thirty-three of 77 cases of breast cancer tissues expressed MAGE-A4 mRNA, with an expression rate of was 42. 9%. There was no relationship between MAGE-A4 and tumor size, clinical stage, the type of pathology, histological stage, tumor embolus, ER/PR as well as HER-2 state ($P>0. 05$). However, MAGE-A4 mRNA expression rate was higher in the breast cancer patients more than 60 years old than in the patients less than 60 years old ($P<0. 05$). MAGE-A4 mRNA was highly expressed in MDA-MB-436 cells, whereas there were no expressions of MAGE-A4 in MCF-7 and MDA-MB-231 cells at mRNA level. MAGE-A4 suppressed the colony formation in MCF-7 and MDA-MB-231 cells ($P<0. 05$). **Conclusion** As a tumor specific antigen, MAGE-A4 was expressed in breast cancer tissues, but not in normal breast tissues. MAGE-A4 expression was correlated to patient's age. However, it was not correlated to other clinical and biological parameters. MAGE-A4 transfection into MCF-7 and MDA-MB-231 cells that did not express MAGE-A4 suppressed the colony formation of these cells.

Key words: MAGE-A4; Tumor specific antigen; Breast cancer; RT-PCR

摘 要:目的 检测正常乳腺组织及乳腺癌组织中 MAGE-A4 (melanoma antigen-A4) mRNA 的表达,探讨其与乳腺癌临床参数、生物学行为的关系以及对乳腺癌细胞增殖的影响。**方法** 用 RT-PCR 方法检测 77 例正常乳腺组织及乳腺癌组织中 MAGE-A4 mRNA 的表达状况,用 χ^2 检验分析其表达与乳腺癌临床参数及生物学行为的关系;用集落形成实验研究 MAGE-A4 对乳腺癌细胞增殖的影响。**结果** 77 例正常乳腺组织中没有检测到 MAGE-A4 mRNA 的表达;77 例乳腺癌组织有 33 例 MAGE-A4 mRNA 阳性表达,阳性率为 42. 9%。60(含 60 岁)岁以上乳腺癌患者 MAGE-A4 mRNA 阳性表达率明显高于 60 岁以下患者($P<0. 05$);但 MAGE-A4 mRNA 表达与乳腺肿瘤的大小、临床分期、病理类型、组织学分级、淋巴结转移、有无瘤栓、ER/PR 及 HER-2 状态之间无明显相关性 ($P>0. 05$)。乳腺癌细胞系 MCF-7 和 MDA-MB-231 均不表达 MAGE-A4 mRNA,而乳腺癌细胞系 MDA-MB-436 中 MAGE-A4 mRNA 呈高表达。转染 MAGE-A4 基因可以抑制 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞克隆的形成($P<0. 05$)。**结论** MAGE-A4 在正常乳腺组织不表达,在乳腺癌组织中表达率为 42. 9%,提示 MAGE-A4 是一种肿瘤特异性抗原。该基因的表达与乳腺癌患者的年龄有关,与其他临床参数及生物学行为无明显相关性。在 MAGE-A4 阴性表达的乳腺癌细胞系

收稿日期:2008-12-05;修回日期:2009-04-24
作者单位:1. 050011 石家庄,河北医科大学第四医院科研中心,2. 外一科
通信作者:单保恩, E-mail: baoenshan@yahoo. com. cn
作者简介:桑梅香(1979-),女,博士,助理研究员,主要从事肿瘤免疫学研究

MCF-7 和 MDA-MB-231 中转染 MAGE-A4 基因可抑制该细胞的克隆形成。

关键词:MAGE-A4;肿瘤特异性抗原;乳腺癌;RT-PCR

中图分类号:R737.9 文献标识码:A

文章编号:1000-8578(2010)04-0407-04

0 引言

人类黑色素瘤抗原-A (Melanoma Antigen-A, MAGE-A) 家族包括 12 个成员,它们在正常人体,除了睾丸和胎盘组织中表达外,其他组织中均不表达^[1],而在不同类型的肿瘤组织中却存在高表达现象,因此,被认为是一种肿瘤特异性抗原。MAGE 基因编码肿瘤特异性抗原多肽,通过 MHC I 类分子被提呈给 CD8⁺ T 细胞^[2],所以被作为肿瘤免疫治疗的重要靶分子受到极大重视。有研究报道,在 MAGE-A 家族中,MAGE-A4 表现出与其他成员不同的生物学特性。MAGE-A4 在乳腺癌组织中的表达及其作用国内尚未见报道。本研究检测了乳腺癌组织中 MAGE-A4 mRNA 表达状况,分析了该基因表达与乳腺癌临床参数和生物学行为的关系,研究其对乳腺癌细胞增殖的影响,旨在了解 MAGE-A4 在乳腺癌发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Trizol、SuperScript™ II 及 Lipofectamine2000 均购自 Invitogen 公司;r-Taq 购自 TaKaRa 公司;鼠抗人 FLAG 单抗及兔抗人的 actin 单抗购自 Sigma 公司;HRP 标记的抗鼠/兔的二抗购自 Cell signaling 公司;ECL 显色液购自 Amersham Biosciences 公司。

1.2 组织标本及细胞培养

77 例正常乳腺组织及乳腺癌组织标本均来源于河北医科大学第四医院外一科 2006 年 3 月~2007 年 3 月的乳腺癌手术切除标本,正常组织为距癌组织 5cm 以远的乳腺组织。人类乳腺癌细胞系 MCF-7、MDA-MB-231 和 MDA-MB-436 用含 10%胎牛血清及青链霉素的 DMEM 培养液,于 37℃、5% CO₂ 环境下培养,用 0.05%胰蛋白酶消化传代。

1.3 组织及细胞 RNA 提取和 RT-PCR

取新鲜组织标本及细胞,用 Trizol 提取总 RNA。取 1μg 总 RNA,用 SuperScript™ II 催化反转录,用 r-Taq 催化 PCR 扩增。MAGA-4 和 GAPDH 扩增产物分别于 1%和 2%的琼脂糖凝胶电泳观察拍照。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 The primers of RT-PCR

Genes	Primer Sequences	Annealing temperature	Cycle numbers
MAGE-A4	Forward: 5'-GAGCAGACAGGCCAACCG-3'	60℃	38
	Reverse: 5'-ATAGACTGAGGCATAAGGCGG -3'		
GAPDH	Forward: 5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3'	58℃	22
	Reverse: 5'-TCCACCACCCTGTGTGCTGTA-3'		

1.4 基因转染

MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞生长至 60%以上时,用 Lipofectamine2000 转染试剂将 1 μg 人类 FLAG-pcDNA3-MAGE-A4 表达载体(本室构建)转染以上两种细胞,同时设立空载体对照组。转染 48 h 后进行下一步实验。

1.5 Western blot

收集细胞,PBS 洗涤两次,加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液 A (25 mmol/L Tris-HCl,137 mmol/L NaCl,2.7 mmol/L KCl 和 1% Triton X-100, pH7.5) 充分裂解细胞,离心收集上清。12.5% SDA-PAGE 垂直电泳分离,转移蛋白质到 PVDF 膜,5%脱脂奶粉 4℃封闭过夜,一抗、二抗分别室温孵育 1 h,ECL 显影。

1.6 集落形成实验

取方法 1.4 中制备的细胞,3 000 个/皿接种于直径 10 cm 的培养皿,贴壁过夜,加入终浓度为 600 μg/ml 的 G418 进行筛选,每周换液 1 次,2 周后姬姆萨染色,拍照并计数克隆数。

1.7 统计学方法

实验重复 3 次,用 SPSS11.5 统计学软件进行统计处理,χ² 检验计算 MAGE-A4 mRNA 表达与乳腺癌临床参数及生物学行为的关系,两样本 t 检验比较每组克隆数差异。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常乳腺组织及乳腺癌组织中 MAGE-A4 mRNA 表达率

RT-PCR 结果显示,77 例正常乳腺组织中均未发现 MAGE-A4 mRNA 表达;77 例乳腺癌组织中 33 例 MAGE-A4 mRNA 阳性表达,阳性率为 42.9%,见图 1。

2.2 MAGE-A4 mRNA 表达与乳腺癌患者临床参数及生物学行为的关系

MAGE-A4 mRNA 表达与乳腺癌患者的肿瘤大小、临床分期、病理类型、组织学分级、淋巴结转移、有无瘤栓、ER/PR 及 HER-2 状态无明显相关性 (P>0.05),但 60(含 60 岁)岁以上乳腺癌患者肿瘤

组织 MAGE-A4 mRNA 阳性表达率明显高于 60 岁以下患者 ($P<0.05$),见表 2。

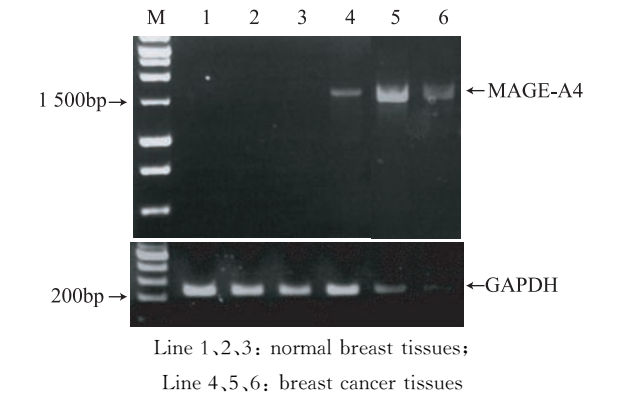


图 1 RT-PCR 检测不同乳腺组织中 MAGE-A4 mRNA 的表达

Figure 1 Expressions of MAGE-A4 mRNA in different breast tissues

表 2 MAGE-A4 mRNA 表达与乳腺癌患者临床参数及生物学行为的关系

Table 2 The relationship between MAGE-A4 mRNA expression and the clinical and biological parameters of breast cancer patients

Clinical and biological parameters	MAGE-A4 expression		χ^2	P
	-	+		
Age (y)				
<60	34	18	4.442	0.035
≥60	10	15		
Clinical stage				
I ~ II	36	25	0.421	0.517
III	8	8		
Tumor size (cm)				
≤2	4	3	2.301	0.316
>2 and ≤5	36	23		
>5	4	7		
Pathological type				
Infiltrating ductal carcinoma	24	23	1.820	0.402
Infiltrating lobular carcinoma	14	7		
Other types	6	3		
Histological grade				
I	7	4	0.229	0.892
II	29	23		
III	8	6		
Axillary lymph node				
0	22	18	5.707	0.058
1~3	16	5		
≥4	6	10		
Tumor embolus				
Yes	16	12	0.000	1.000
No	28	21		
ER/PR status				
ER+ PR+	30	23	0.040	0.980
ER+ PR-/ER-PR+	6	4		
ER-PR-	8	6		
HER-2 status				
+++	12	8	0.090	0.764
~++	32	25		

2.3 MAGE-A4 mRNA 在不同乳腺癌细胞系中的表达

乳腺癌细胞系 MCF-7 和 MDA-MB-231 不表达 MAGE-A4 mRNA, 而 MDA-MB-436 细胞系中 MAGE-A4 mRNA 呈高表达,见图 2。

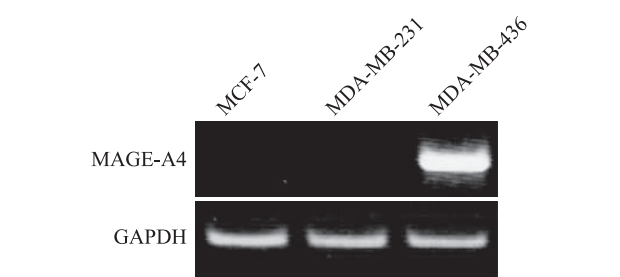


图 2 RT-PCR 检测 MAGE-A4mRNA 在乳腺癌细胞系中的表达

Figure 2 Expressions of MAGE-A4 mRNA in breast cancer cell lines detected by RT-PCR

2.4 转染 MAGE-A4 基因对 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞克隆形成的影响

转染 MAGE-A4 基因后,MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞可高表达 MAGE-A4 蛋白,见图 3。经 G418 筛选,转染 MAGE-A4 基因的 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞克隆形成数均明显低于对照组 ($P<0.05$,图略)。

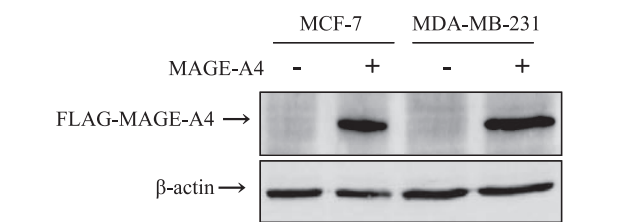


图 3 Western blot 检测 MCF-7 和 MDA-MB-231 中 MAGE-A4 蛋白的表达

Figure 3 MAGE-A4 protein expressions in MCF-7 and MDA-MB-231 cells detected by Western blot

3 讨论

MAGE-A4 除在黑色素瘤中表达外,在肺癌^[3]、膀胱癌^[4]、卵巢癌^[5]及结直肠癌^[6]等不同组织来源的肿瘤组织中均有表达。MAGE-A 的表达特异性依赖于其启动子区 CpG 岛的甲基化/去甲基化机制调控。

MAGE-A 家族成员虽然在结构上具有高度保守性,但不同成员之间在功能上却存在着差异,尤其是 MAGE-A4,与该家族的其他成员功能差异很大。

Otte 等^[7]对 67 例欧洲原发性乳腺癌患者组织检测结果显示,MAGE-A4 阳性表达率为 13%。本结果显示,MAGE-A4 mRNA 在乳腺癌中的表达率为 42.9%,明显高于 Otte 的研究结果,该现象可能

与两者使用的引物不同有关,也可能与东西方人种差异有关。Otte 报道,MAGE-A 家族成员在乳腺导管癌中的表达率高于其他组织类型乳腺癌。本结果显示,MAGE-A4 在乳腺导管癌中的表达率为 48.94%,在乳腺小叶癌中的表达率为 33.33%,无统计学差异。然而,MAGE-A4 mRNA 表达与患者年龄之间存在相关性,可能与患者年龄增长,机体面临的促基因不稳定性因素增加,导致基因去甲基化的结果有关^[8]。MAGE-A 家族呈高度保守性,目前市场上虽然有同时识别该家族几个成员的抗体销售,但针对 MAGE-A4 蛋白的特异性抗体很难买到,因此本文尚未在蛋白水平上检测 MAGE-A4 的表达。

Bandic 等^[9]对 81 例乳腺癌组织 MAGE-A4 表达的研究显示,MAGE-A4 表达与乳腺肿瘤的大小、组织学分级、淋巴结转移数目和雌激素及孕激素受体状态没有相关性,但与患者的生存时间存在相关性。MAGE-A4 阳性表达的患者生存时间明显大于 MAGE-A4 阴性表达的患者。然而,由于本研究所使用的标本来源于 2006 年 3 月~2007 年 3 月期间,尚未对这些病例生存期进行随访分析。

有研究提示肿瘤细胞的原位培养可能导致 MAGE-A 基因的活化^[10],本文检测的 3 种乳腺癌细胞中,MCF-7 和 MDA-MB-231 均不表达 MAGE-A4 mRNA,MDA-MB-436 呈 MAGE-A4 mRNA 高表达。我们在 MCF-7 和 MDA-MB-231 中转入外源性 MAGE-A4 基因,经 G418 筛选后细胞的克隆形成数减少,提示 MAGE-A4 的表达可以抑制细胞增殖。

本文以及一些国外的研究结果均显示,MAGE-A 和本家族中的其他成员不同,虽然在肿瘤组织中高表达,但却不是扮演癌基因的角色,这可能是由于未表达 MAGE-A4 基因的肿瘤细胞能够逃避宿主的免疫监视而优先增殖的结果。因此该基因的表达有可能是乳腺癌发生后的一个自身防御机制,在肿瘤发生中起到保护作用^[11-12],而具体分子机制还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Ohman Forslund K, Nordqvist K. The melanoma antigen genes—any clues to their functions in normal tissues? [J]. Exp Cell Res, 2001, 265(2): 185-194.

[2] Barker PA, Salehi A. The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease [J]. J Neurosci Res, 2002, 67(6): 705-712.

[3] Peikert T, Specks U, Farver C, et al. Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis [J]. Cancer Res, 2006, 66(9): 4693-4700.

[4] Picard V, Bergeron A, Larue H, et al. MAGE-A9 mRNA and protein expression in bladder cancer [J]. Int J Cancer, 2007, 120(10): 2170-2177.

[5] Yakirevich E, Sabo E, Lavie O, et al. Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(17): 6453-6460.

[6] Kufer P, zippelius A, Lutterbuse R, et al. Heterogeneous expression of MAGE-A genes in occult disseminated tumor cells: a novel multimarker reverse transcription-polymerase chain reaction for diagnosis of micrometastatic disease [J]. Cancer Res, 2002, 62(1): 251-261.

[7] Otte M, Zafrakas M, Riethdorf L, et al. MAGE-A gene expression pattern in primary breast cancer [J]. Cancer Res, 2001, 61(18): 6682-6687.

[8] Wischnewski F, Frises O, Pantel K, et al. Methyl-CpG binding domain proteins and their involvement in the regulation of the MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, and MAGE-A12 gene promoters [J]. Mol Cancer Res, 2007, 5(7): 749-759.

[9] Bandic D, Juretic A, Sarcevic B, et al. Expression and possible prognostic role of MAGE-A4, NY-ESO-1, and HER-2 antigens in women with relapsing invasive ductal breast cancer: retrospective immunohistochemical study [J]. Croat Med J, 2006, 47(1): 32-41.

[10] Gillespie AM, Coleman RE. The potential of melanoma antigen expression in cancer therapy [J]. Cancer Treat Rev, 1999, 25(4): 219-227.

[11] Nagao T, Higashitsuji H, Nonoguchi K, et al. MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity [J]. J Bio Chem, 2003, 278(12): 10668-10674.

[12] Sakurai T, Itoh K, Higashitsuji H, et al. A cleaved form of MAGE-A4 binds to Miz-1 and induces apoptosis in human cells [J]. J Bio Chem, 2004, 279(15): 15505-15514.

[编辑校对: 贺 文]