

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.07.002

# Viili 多糖对人肺癌 A549 细胞中 MAGEA10 表达的影响

张金禄<sup>1</sup>, 张晓红<sup>1</sup>, 王玉荣<sup>1</sup>, 何超<sup>2</sup>, 吴季辉<sup>2</sup>, 罗成<sup>1</sup>

## MAGEA10 Expression in Human Lung Cancer A549 Cells Influenced by Viili Polysaccharides

ZHANG Jinlu<sup>1</sup>, ZHANG Xiaohong<sup>1</sup>, WANG Yurong<sup>1</sup>, HE Chao<sup>2</sup>, WU Jihui<sup>2</sup>, LUO Cheng<sup>1</sup>

1. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science &amp; Technology, Tianjin 300457, China; 2. School of Life Sciences, University of Science and Technology of China

Corresponding Author: LUO Cheng, E-mail: Luo58@yahoo.com

**Abstract: Objective** To discuss the effects and mechanism of MAGEA10 expression in human lung cancer A549 cells influenced by Viili polysaccharides. **Methods** MTT was used to study the survival impact of non small cell lung cancer (NSCLC) A549 with viili polysaccharides in different concentration at 24 h, 48 h and 72 h. qRT-PCR was used to detect the relative expression changes of MAGEA10 mRNA with Viili polysaccharides in different concentration of 10 mg/L, 25 mg/L and 50 mg/L compared with those of the normal A549 cells. And Western blot was adopted to detect the antigen expression of MAGEA10 after stimulation of A549 with Viili polysaccharides in different concentration of 10 mg/L, 25 mg/L and 50 mg/L. Through the expression of MAGEA10 mRNA and antigen, we discussed the effects and possible mechanism of MAGEA10 expression made by Viili polysaccharides. **Results** (1) Viili polysaccharides inhibited cell proliferation of A549 and its concentration was negatively related to cell survival within 0 mg/L-50 mg/L and the result was most remarkable at 48 h. (2) Compared with the blank group, the relative expression of MAGEA10 mRNA elevated at the concentration of 50 mg/L. (3) Compared with the blank group, the protein expression of MAGEA10 elevated, at the concentration of 50 mg/L. **Conclusion** Viili inhibited NSCLC A549 cell proliferation, but the increase of the gene transcription and translation levels of MAGEA10 in A549 cell needs further exploration for those two parts might be inter-dependent. This study aims to indicate that viili is possible to promote non specific immunity, and increase possibility of cancer cell recognition by CTLs, and possibly initiate apoptotic process of cancer cells if same epitope of MAGEA10 and corresponding TCR encounters.

**Key words:** MAGEA10; Viili Polysaccharides; A549; melanoma antigen-encoding genes(MAGEs)

**摘要:目的** 探讨 Viili 多糖对肿瘤特异性抗原基因 MAGEA10 表达量的影响及其机制。**方法** 利用 MTT 技术检测不同浓度 Viili 多糖刺激 A549 细胞 24 h、48 h、72 h 后对其存活率的影响, qRT-PCR 法检测 Viili 多糖浓度为 10 mg/L、25 mg/L、50 mg/L 时与正常生长 A549 细胞相比较 MAGEA10 mRNA 相对表达量的变化,并用 Western blot 检测 Viili 多糖 10 mg/L、25 mg/L、50 mg/L 刺激 A549 细胞后 MAGEA10 表达抗原肽的情况。通过 MAGEA10 mRNA 表达量与抗原肽表达量分析探讨 Viili 多糖对 MAGEA10 表达的影响及其表达过程中的可能机制。**结果** (1) Viili 多糖作用 A549 细胞后,存活率下降,在 0 mg/L~50 mg/L 范围内其浓度与细胞存活率呈负相关,且作用 48 h 效果最显著。(2) 与未用 Viili 多糖刺激的空白组相比,Viili 多糖浓度为 50 mg/L 时 MAGEA10 mRNA 相对表达量上升。(3) 与空白组相比,Viili 多糖浓度为 50 mg/L 时 MAGEA10 蛋白表达量上升。**结论** Viili 多糖对 A549 细胞的生长具有一定的抑制作用,上调 A549 细胞中 MAGEA10 的转录和翻译水平,两者机制尚需进一步研究,但可能是相互独立的。本研究通过提高癌症的非特异性免疫来提高特异性免疫概率,为癌症辅助治疗提供更多的科学依据。

**关键词:** MAGEA10; Viili 多糖; A549; MAGEs

**中图分类号:** R734.2 **文献标识码:** A

**收稿日期:** 2012-07-25; **修回日期:** 2012-11-22

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(31101357); 天津市 2010 年千人计划启动基金资助项目(中组发[2008]28 号)

**作者单位:** 1. 300457 天津,天津科技大学食品工程与生物技术学院; 2. 中国科学技术大学生命科学学院

**通信作者:** 罗成, E-mail: Luo58@yahoo.com

**作者简介:** 张金禄(1987-),女,硕士在读,主要从事食品营养与免疫的基础研究工作

## 0 引言

Viili 是原产于芬兰的一种原始发酵型奶制品,发酵温度 25℃~30℃,其发酵液黏稠度极高,带有特

异香味,在芬兰是人们日常食用的健康食品。Viili 发酵过程中产生大量的多糖(Viili 多糖,简称 vPS),vPS 的平均分子量范围在  $10^3 \sim 10^6$  之间,属大分子杂多糖,其中存在的大量重复单元结构为: $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-Galf-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galf-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Galf-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galf-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galf-(1 $\rightarrow$ )[<sup>1</sup>]

随着人们对多糖研究的不断深入,部分多糖被发现和证实在细胞中充当了细胞生物学信号分子的角色,如银耳多糖、黄芪多糖、乳酸菌多糖等,它们具有抗肿瘤、免疫促进等作用[<sup>2-3</sup>]。伴随癌症免疫治疗研究的不断深入,越来越多的与癌症相关的免疫信号分子被发现,MAGE(melanoma antigen-encoding genes)家族属于 CTAs(cancer/testis antigens),人的 MAGEA 基因簇位于 X 染色体 q28 区域[<sup>4</sup>],由 van der Bruggen 等[<sup>5</sup>]在黑色素瘤细胞系中发现。他们发现了一小段能够被 HLA-I(human leukocyte antigen -I)类分子呈递的多肽 MZ2-E,MZ2-E 多肽可与 HLA-I 结合并呈递于细胞表面后被 CTLs(cytolytic T lymphocytes)表面抗原受体识别。MAGE 家族 MAGE-I 类基因在细胞内所表达的多肽是肿瘤/睾丸特异性的,正常组织细胞中处于沉默状态,或者不被特异的 HLA 等位基因呈递。而在癌细胞中表达有可能被自身免疫系统识别的 MAGE 抗原肽[<sup>6</sup>],MAGEA10 是近年发现的 MAGE 家族中 MAGE-I 类的新成员[<sup>7</sup>]。

本研究对 Viili 乳制品中多糖成分的抗肿瘤活性进行了研究,并从目前重要的治疗癌症的靶目标 MAGE 基因家族中的 MAGEA10 着手,探讨 Viili 多糖对 MAGEA10 转录及表达的影响。利用典型的非小细胞肺癌中 A549 细胞系作为探究 Viili 多糖刺激 MAGEA10 表达的模型。对 Viili 多糖进行提取和纯化,应用 MTT 法检测 Viili 多糖对 A549 细胞增殖的抑制;qRT-PCR 检测 A549 细胞中 MAGEA10 mRNA 的正常表达量和 Viili 多糖刺激后的 MAGEA10 转录水平,并用 Western blot 观察其蛋白的表达变化,作进一步分析和验证。通过整个 MAGEA10 基因表达过程中的 mRNA 及其蛋白量的变化,讨论 Viili 多糖抑制癌细胞增殖的可能原因。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞株及主要试剂

人非小细胞肺癌细胞株 A549 由天津市肺癌研究所惠赠;Viili 多糖,由笔者按文献[<sup>8</sup>]的方法提取所得;总 RNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司(德国);RevertAid<sup>TM</sup> 反转录试剂盒购自 Thermo 公司;SYBR<sup>®</sup> Promix TaqTMI(Thi RNaseH Plus)荧光定量试剂盒购自 TAKARA 公司;MAGEA10 一抗和  $\beta$ -actin 一抗分别购自 PTG 公司(美国)和 Bio-

world technology 公司(美国),羊抗兔 IgG 及 SuperSignal<sup>®</sup> WB 检测试剂盒(Pierce);胎牛血清及培养液均购自 Gibco 公司(美国),PCR 引物由上海生工有限公司合成。

### 1.2 vPS 的制备

采用产于芬兰的 Viili 接种于新鲜牛乳,28 °C 发酵 10 h 得到高度黏稠并带特殊香味的 Viili 发酵液。采用文献[<sup>8</sup>]方法提取 Viili 多糖。提取过程如下:发酵液经蛋白酶消化和反复脱蛋白后得 Viili 粗多糖。粗多糖经 DEAE-52 纤维素阴离子交换柱和 Sephadex-200 葡聚糖凝胶柱串联纯化后,冷冻干燥得 vPS,-20 °C 保存。

### 1.3 A549 细胞培养

人非小细胞肺癌 A549 细胞株及实验组均用含 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI1640 培养液常规培养于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱内。vPS 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液溶解,并过滤除菌,即用即配。

### 1.4 MTT 法检测 vPS 对细胞生长的影响

利用 MTT 法检测 vPS 浓度为 0 mg/L ~ 50 mg/L,不同作用时间内对 A549 细胞生长的影响。对数生长期细胞  $4 \times 10^3$  个/孔,接于 96 孔培养板,每种浓度设 6 个复孔。分别在 24 h、48 h 和 72 h 后每孔加入 20  $\mu$ l MTT 溶液(5 mg/ml 于 0.01 MPBS 中),37 °C、5% CO<sub>2</sub> 继续孵育 4 h,吸弃培养液,每孔加入 100  $\mu$ l 二甲亚砜(dimethyl sulfoxide,DM-SO),振荡 10 min,590 nm 波长下测量吸光度值(optical density,OD),按存活率(%) =  $(OD_{vPS组} / OD_{空白组}) \times 100\%$  计算。

### 1.5 qRT-PCR 法检测 MAGEA10 mRNA 的相对表达量

细胞培养至指数生长期,计数并同步培养 10 h 后,vPS 按浓度 0 mg/L、10 mg/L、25 mg/L、50 mg/L 作用 48 h,每个样品浓度设置三个平行反应管。采用 RNeasy Mini Kit(QIAGEN)提取细胞总 RNA,纯化后定量备用。1  $\mu$ g 总 RNA 应用于反转录实验,反应条件 42 °C 60 min,70 °C 5 min 制备 cDNA。Primer 5.0 设计 MAGEA10(NM\_021028.4)引物,上游:5'-GGGATGGAGCACCTCATTTA-3',下游:5'-TTGGCCAAAATTTTCAGGAG-3',扩增片段长度 179 bp。采用 GAPDH(NM\_002046.4)为内参基因,上游:5'-GAAGGTGAAG-GTCGGAGT-3',下游:5'-GAAGATGGTGATGG-GATTTC-3',扩增片段长度 226 bp。以合成的 1  $\mu$ l cDNA 为模版,采用 SYBR<sup>®</sup> Promix TaqTMI(Thi RNaseH Plus)试剂盒在 Agilent Technologies Mx3000p Stratagenen 荧光定量 PCR 仪中进行 PCR 扩增,每个模板设 4 个重复,反应条件为 94 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 45 s,循环 42 次后得各模板 Ct

值,以各模板的 Ct 值减去内参 GAPDH 的 Ct 值得出 $\Delta$ Ct 值,按照  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[9]</sup> 计算 MAGEA10 相对表达量。

### 1.6 Western blot 法检测 MAGEA10 蛋白表达

细胞培养至指数生长期,计数  $1 \times 10^6$  并同步培养 10 h 后,vPS 按浓度 0 mg/L、10 mg/L、25 mg/L、50 mg/L 作用 48 h。100  $\mu$ l RIPA 液(Solarbio)裂解细胞,5 $\times$ SDS 上样液混匀后,10% SDS-PAGE 电泳 1.5 h 转至 NC 膜,与适当比例稀释的抗体孵育并清洗。SuperSignal<sup>®</sup> (Thermo) IgG 检测试剂盒检测蛋白结果,由 Image Quant LAS4000 mini (GE Healthcare)曝光并成像。

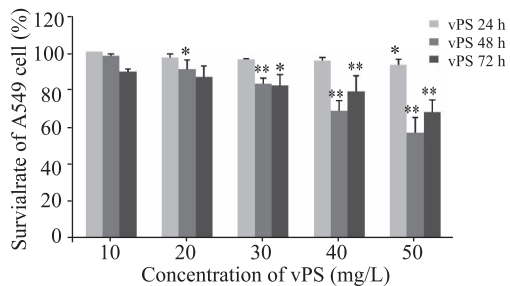
### 1.7 统计学方法

实验结果由软件 SPSS 16.0 统计分析得出,数据分析均采用独立样本 *t* 检验。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 vPS 对 A549 细胞生长的影响

与未加 vPS 组相比较,vPS 浓度为 40 mg/L、50 mg/L 作用 48 h 和 72 h 后其细胞存活率比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。且 vPS 浓度 0 mg/L~50 mg/L 范围内,随 vPS 浓度的增加细胞存活率下降,见图 1。



\* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ , compared with 10 mg/L vPS group

图 1 vPS 对人肺癌 A549 细胞存活率的影响

Figure 1 Effects in human lung cancer A549 of vPS on cell viability

### 2.2 vPS 对 MAGEA10 转录水平的影响

不同 vPS 作用下,MAGEA10 mRNA 的扩增曲线见图 2 A,内参基因为 GAPDH;溶解曲线见图 2 B。由扩增曲线得出,与内参基因 GAPDH 相比 MAGEA10 的 Ct 值高,说明样品中 MAGEA10 mRNA 的原始拷贝数低于 GAPDH mRNA 的原始拷贝,且 vPS 浓度为 50 mg/L 时,MAGEA10 mRNA 较其他浓度相对表达量均高( $P < 0.01$ ),见图 3。

### 2.3 vPS 对 MAGEA10 蛋白表达量的影响

vPS 浓度 0 mg/L、10 mg/L、25 mg/L、50 mg/L 作用 48 h 后,与 0 mg/L 相比,50 mg/L 作用的

A549 细胞内 MAGEA10 蛋白表达量增加,其差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),RT-PCR 结果见图 4,各浓度 vPS 作用后表达水平,见图 5。

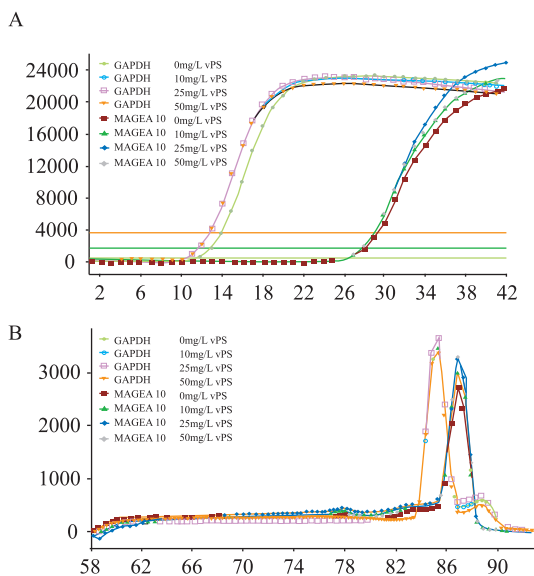


图 2 各浓度 vPS 作用下 MAGEA10 mRNA 的扩增曲线及溶解曲线

Figure 2 The Amplification curve (A) and dissociation curve (B) of MAGEA10 mRNA with different vPS concentration

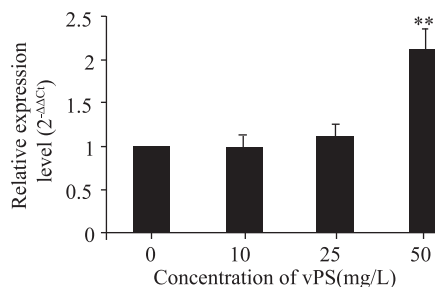
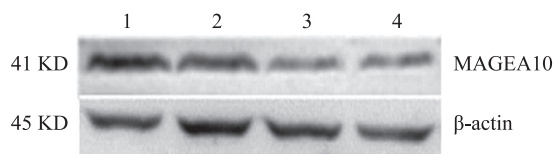


图 3 vPS 作用下 MAGEA10 mRNA 的相对表达量 (\*\* :  $P < 0.01$ )

Figure 3 Relative expression level of MAGEA10 mRNA influenced by vPS (\*\* :  $P < 0.01$ )



1: 50 mg/L; 2: 25 mg/L; 3: 10 mg/L; 4: 0 mg/L

图 4 vPS 对 MAGEA10 蛋白表达量的影响

Figure 4 Protein expression of MAGEA10 influenced by vPS

## 3 讨论

根据表达模式不同,MAGE 家族基因被分为 MAGE-I 类和 MAGE-II 类。MAGE-I 类分子必须有 MHC-I 或 II 类分子的呈递才能到达细胞表面引起免疫反应,与癌细胞不同的是睾丸生殖细胞不表达 MHC-I / II 类分子,因此是免疫免除的,即不引起免疫系统对自身组织的伤害<sup>[10]</sup>。目前 MAGE-A 族成员是具有吸引力的癌症免疫治疗的靶标之

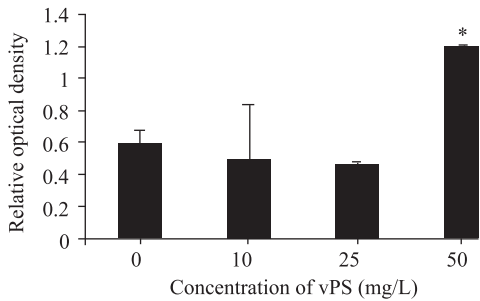


图5 vPS 三种浓度作用下 A549 细胞中 MAGEA10 蛋白表达水平 (\* : $P < 0.05$ )

Figure 5 The levels of protein expression of MAGEA10 in the A549 cells with and without vPS (\* : $P < 0.05$ )

—<sup>[11-12]</sup>。Bricard 等<sup>[13]</sup>研究发现, MAGE-A10 特异性 CTL(cytotoxicity T lymphocyte) 在肿瘤损伤部位密集, 而正常肝组织中不存在, 而且 MAGEA10 特异性 CTL 在体外具有强大地杀伤肿瘤细胞的能力, 由此可见 MAGEA10 抗原表达量的提高为 CTL 的杀伤性增强提供了更多的可能。乳酸菌类多糖的抗肿瘤活性早在多年前就引起了很多学者的广泛关注<sup>[14]</sup>, 其作用途径有很多种, 目前尚需更深入的研究。本研究中 Viili 多糖的基本重复结构中还带有大量自由的磷酸基团<sup>[15]</sup>, 改变细胞膜上离子负荷, 并且多糖中存在与膜上脂多糖类似的衔接位点, 这些均可能导致营养物质不能自由进出细胞, 阻碍细胞的繁殖及增长。本 MTT 检测结果显示, 随着多糖浓度上升, 抑制细胞生长的效果增强, 提示 vPS 所产生的抑制作用与其浓度之间存在着剂量依赖关系, vPS 浓度 0 mg/L~50 mg/L 范围内只是单纯的对细胞起到了增殖抑制作用, 并没有真正意义上地杀死细胞, 可鉴定其对正常细胞无明显毒性损伤。MAGEA10 转录水平的上调, vPS 浓度为 50 mg/L 时较其他浓度明显, 但是对于细胞中管家基因如 GAPDH 而言相对表达量依然较低, 提示 vPS 上调 A549 细胞 MAGEA10 转录水平在一定范围内, 且低于 GAPDH 等非特异性表达的基因。MTT 实验中, 在 vPS 浓度高出 50 mg/L 的范围后, 其抑制作用依然明显, 因此, vPS 对 A549 细胞增殖的抑制可能是多因子的生物学抑制, 并未刺激细胞内部信号释放导致细胞不能正常增殖。Western blot 检测结果表明 vPS 不同浓度刺激后, MAGEA10 蛋白表达量发生变化, 且表现出与 MAGEA10 的 mRNA 表达水平相似的规律, 提示 vPS 一定浓度范围内能够使 A549 细胞中 MAGEA10 的表达量上升, 且转录和翻译水平一致。vPS 作为一种主要由乳酸菌产生的杂多糖, 可能成为可开发性的肿瘤免疫治疗靶向药物, 或辅助化疗药物。

#### 参考文献:

- [1] Higashimura M, Mulder-Bosman BW, Reich R, *et al.* Solution properties of Viilian, the exopolysaccharide from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495 [J]. *Biopolymers*, 2000, 54 (2): 143-58.
- [2] Ottaviani S, Zhang Y, Boon T, *et al.* A MAGE-1 antigenic peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 tumor cells [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2005, 54 (12): 1214-20.
- [3] Kanmani P, Satish kumar R, Yuvaraj N, *et al.* Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(7): 4827-33.
- [4] Rogner UC, Wilke K, Steck E, *et al.* The melanoma antigen gene (MAGE) family is clustered in the chromosomal band Xq28 [J]. *Genomics*, 1999, 29(3): 725-31.
- [5] 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): 1643-7.
- [6] Zhang T. Advances of molecular targeted drugs used in maintenance therapy of non-small cell lung cancer [J]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2010, 13(11): 1070-3. [张涛. 分子靶向药物应用于非小细胞肺癌维持治疗的研究进展 [J]. *中国肺癌杂志*, 2010, 13(11): 1070-3.]
- [7] Lin J, Lin L, Thomas DG, *et al.* Melanoma-associated antigens in esophageal adenocarcinoma identification of novel MAGE-A10 splice variants [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10 (17): 5708.
- [8] Wang CL, Han XM, Chen MH, *et al.* Isolation, purification of extracellular polysaccharide from Viili and its effect on the lifespan of *Caenorhabditis elegans* [J]. *An Ji Suan He Sheng Wu Zi Yuan*, 2011, 33(2): 64-7. [王昌禄, 韩晓梅, 陈勉华, 等. Viili 中胞外多糖的分离纯化及对秀丽线虫寿命的影响 [J]. *氨基酸和生物资源*, 2011, 33(2): 64-7.]
- [9] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C</sup> (T) method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402-8.
- [10] Barker PA, Salehi A. The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease [J]. *J Neurosci Res*, 2002, 67(6): 705-12.
- [11] Sang M, Lian Y, Zhou X, *et al.* MAGE-A family: attractive targets for cancer immunotherapy [J]. *Vaccine*, 2011, 29 (47): 8496-500.
- [12] Lian Y, Sang M, Ding C, *et al.* Expressions of MAGE-A10 and MAGE-A11 in breast cancers and their prognostic significance: a retrospective clinical study [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(3): 519-27.
- [13] Bricard G, Bouzourene H, Martinet O, *et al.* Naturally acquired MAGE-A10 and SSX-2-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *J Immunol*, 2005, 174 (3): 1709-16.
- [14] Nagaoka M, Hashimoto S, Watanabe T, *et al.* Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides [J]. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(8): 1012-7.
- [15] Svensson MV, Zhang X, Huttunen E, *et al.* Structure studies of the capsular polysaccharide produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* PIA2 [J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12 (7): 2469-501.

[编辑: 安 凤; 校对: 邱颖慧]