

MAGEA9 基因在肝癌中的表达及 RNAi 沉默后对肝癌细胞生长和克隆形成的影响

焦龙先^{1,2}, 邓庆², 梅铭惠³, 韩泽广^{1,2}, 黄健^{2,4}

Expression of MAGEA9 in Hepatocellular Carcinoma and Its Effects on Hepatocarcinoma Cell Growth and Colony Formation by RNA Interference

JIAO Long-xian^{1,2}, DENG Qing², MEI Ming-hui³, HAN Ze-guang^{1,2}, HUANG Jian^{2,4}

1. Department of Biochemistry Institute, College of Bioengineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Shanghai-Ministry Key Laboratory of Disease and Health Genomics, Chinese National Human Genome Center at Shanghai; 3. National Engineering Center for Biotech at Shanghai; 4. Department of Hepatobiliary Pancreatic Surgery, Affiliated Hospital of Guilin Medical College

Corresponding Author: HUANG Jian, E-mail: huangj@chgc.sh.cn

Abstract: Objective To study the expression of MAGEA9 gene in hepatocellular carcinoma (HCC) and the effect of silencing of MAGEA9 gene on the cell growth of Focus and PLC/PRF/5 this derived from liver cancer. **Methods** Semi-quantitative RT-PCR was performed to detect the expression of MAGEA9 in 48 pairs of HCCs compared with adjacent non-cancerous livers (non-HCC). We also evaluated the expression of MAGEA9 gene in 14 normal human tissues and 17 HCC-derived cell lines by RT-PCR. The cell growth curve was observed after silencing of MAGEA9 by siRNAs using CCK-8 reagent. Finally, we constructed the shRNA expression vector pSUPER-shRNA-M9 for colony formation assay. **Results** MAGEA9 was significantly up-regulated in 29% (14/48) HCC specimens at mRNA level compared with non-HCCs. MAGEA9 gene was specifically expressed in testis, heart, spleen and kidney. Interestingly, silencing of MAGEA9 gene in Focus and PLC/PRF/5 cells markedly inhibited cell growth with siRNA-M9 as compared with the control cells transfected by siRNA-NC. In addition, the colony formation efficiency was depressed by shRNA-M9. **Conclusion** The expression of MAGEA9 gene may be important for the malignant growth of hepatocarcinoma cells. Moreover, it may play an important role in the hepatocarcinogenesis. In further study, it may be used as a new marker or a potential therapeutic target for HCC.

Key words: Hepatocellular carcinoma; RNA interference; CT gene; MAGEA9

摘要:目的 研究基因 MAGEA9 在肝癌中的表达,以及被沉默后对肝癌细胞株 Focus 和 PLC/PRF/5 生长的影响。**方法** 采用半定量 RT-PCR 方法检测 MAGEA9 基因在 48 例肝癌样本的癌和癌旁组织, 14 种人正常组织和 17 株人肝癌细胞株中的表达差异;同时观察沉默 MAGEA9 表达后肝癌细胞生长曲线和克隆形成能力的变化。**结果** 与癌旁样本相比, MAGEA9 基因在肝癌组织 mRNA 表达水平上调的比例为 29%(14/48);在正常人体组织中局限于睾丸、心脏、脾脏、肾脏组织中表达;利用 RNA 干扰技术下调 MAGEA9 基因的表达后, Focus 和 PLC/PRF/5 细胞生长受到明显的抑制;同时, PLC/PRF/5 细

胞克隆形成能力明显减弱。**结论** MAGEA9 基因在维持肝癌细胞的恶性表型中可能起到重要的作用,因此它可能与肝癌发生发展有密切的关系,深入研究 MAGEA9 在肝癌中的功能,有可能为肝癌诊断发现新的指标或为肝癌治疗提供潜在的药物靶点。**关键词:** 肝细胞癌; RNA 干扰; CT 基因; MAGEA9

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A
文章编号: 1000-8578(2010)06-0647-05

收稿日期: 2009-02-12; **修回日期:** 2009-04-28

基金项目: 国家 973 计划资助项目(2006CB910402); 上海市科委资助项目(08JC1416400)

作者单位: 1. 200237 上海, 华东理工大学生物工程学院生物化学系; 2. 上海市疾病与健康基因组学实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 国家人类基因组南方研究中心; 3. 桂林医学院附属医院肝胆胰外科; 4. 生物芯片上海国家工程研究中心

通信作者: 黄健, E-mail: huangj@chgc.sh.cn

作者简介: 焦龙先(1982-), 男, 硕士, 主要从事分子生物学研究

0 引言

肝癌是一种发病率高、恶性程度高、预后差的疾病,严重地威胁着人类的健康。我国为肝癌高发区,每年有约 11 万人死于肝癌,约占全世界肝癌死亡人数的 45% 左右^[1]。近半个世纪以来,虽然在流行病、病因、基础、诊断与治疗等方面,肝癌的研究均有一定的进步,但肝癌的预后仍然较差,所以深入研究肝癌发生的分子机制,有可能对肝癌的诊断、治疗和预防产生突破性的进展。

我们前期通过对 HBV 引起的肝癌组织细胞的基因芯片表达谱分析,发现 MAGEA9 在肝癌组织中明显上调。MAGEA9 属于黑色素瘤相关抗原基因(MAGE)家族成员,是一类 Cancer/Testis(CT)抗原基因。正常情况下,由于 CT 基因只在睾丸组织中表达,而在其他组织中不表达或者极低的表达,所以,当其在肿瘤组织中高表达时,可以很好地诱导体液免疫或细胞免疫,从而被认为是肿瘤疫苗研究中最有价值的一类抗原^[2]。因此,为了深入研究 MAGEA9 与人类肝癌的关系,我们利用 RT-PCR 技术检测 MAGEA9 在肝癌组织中的异常表达情况,同时,利用 RNA 干扰技术探讨它对肝癌细胞株生长的影响,这些研究为进一步了解 MAGEA 家族在肝癌发生发展中的作用奠定了良好的基础。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 组织、细胞株及质粒来源 本研究所用肝癌及癌旁组织来源于临床肝癌手术病人,由桂林医学院附属医院肝胆胰外科提供。14 种人体正常组织:脑、心、肺、脾、肾、胃、食管、小肠、卵巢、前列腺、胰腺、胎肝、肝、睾丸等购自 Clontech 公司。细胞株 YY-8103、Bel-7404、QGY7701、Bel-7402、Focus、SK-hep-1、PLC/PRF/5、Huh7、Hep3B、MHCC-L、MHCC-H、SMMC-7721、SNU398、LM3、LM6、Bel-7405、L-02、HepG2 等由本室保存。质粒 pcDNA3.

1B(-)购自 Invitrogen 公司,pSUPER 载体由本室保存。

1.1.2 主要试剂 逆转录酶 M-MLV Reverse Transcriptase 购自 Promega 公司;PCR 试剂、DNase I 等购自 TaKaRa 公司;TRIzol 试剂、Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;Cell Counting Kit-8 试剂盒购自 DOJINDO 研究所。DMEM、MEM 培养液等购自 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和半定量 RT-PCR 总 RNA 的提取采用 TRIzol 试剂,按说明书一步抽提法获得总 RNA。DNase I 处理 RNA 以去除基因组 DNA 污染。取总 RNA 2 μg,逆转录合成 cDNA。以 1 μl cDNA 为模板,PCR 扩增 MAGEA9 基因,同时以 β-actin 作为内参。PCR 条件为:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30s,57℃ 退火 30s,72℃ 延伸 30s,共 35 循环(β-actin 为 25 循环),72℃ 延伸 5 min。用 2% 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 产物。

β-actin 上游引物 5'-CATCCTGCGTCTG-GACCT-3',下游引物 5'-GTACTTGCCTCAG-GAGGAG-3',产物大小为 490 bp;MAGEA9 上游引物 5'-CCCATCTGCTACCCATCCCTTTA-3',下游引物 5'-CACCCACTGCCACTGAGAACACT-3',产物大小为 195 bp。

1.2.2 RNA 干扰片段设计 根据 siRNA 相关设计原则,利用在线设计软件(<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/>)设计针对 MAGEA9 的 siRNA 序列,见表 1,siRNA 干扰片段由上海吉玛公司合成。

1.2.3 细胞培养和转染 肝癌细胞株 Hep3B、HepG2 用 MEM 完全培养液(含青霉素、链霉素、非必需氨基酸和 10% FBS)培养,其余细胞株均用 DMEM 完全培养液(含青霉素、链霉素和 10% FBS),37℃、5% CO₂ 培养。PLC/PRF/5、Focus 分别以 30% 的密度接种于 35mm 培养皿中;培养 24h

表 1 RNA 干扰的特异性序列目录

Table 1 List of RNAi sequences

siRNA/shRNA	Sequence
siRNA-NC	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT-3' 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT-3'
siRNA-M9	5'-AAUUGAAGGUGGCUGAGUUGGdTdT-3' 5'-AACCAACUCAGCCACCUCAAdTdT-3'
shRNA-NC	5'-GATCCCC TTCTCCGAACGTGTCACGTTT ttcaagaga AAACGTGACACGTTCCGAGAA TTTTTGGAAA-3' 5'-AGCTTTTCCAAAAA TTCTCCGAACGTGTCACGTTT tctcttgaa AAACGTGACACGTTCCGAGAA GGG-3'
shRNA-M9	5'-GATCCCC AATTGAAGGTGGCTGAGTTGGTT ttcaagaga AACCAACTCAGCCACCTTCAATT TTTTTGGAAA-3' 5'-AGCTTTTCCAAAAA AATTGAAGGTGGCTGAGTTGGTT tctcttgaa AACCAACTCAGCCACCTTCAATT GGG-3'

后换为无血清培养液按 Lipofectamine 2000 脂质体说明书进行转染。4~6 h 后换为 DMEM 完全培养液培养,24~72 h 后收集细胞分析。

1.2.4 MAGEA9 特异的 shRNA 表达载体 pSUPER-shRNA-M9 的构建 以 siRNA-M9 对应的 cDNA 为靶序列(表 1 划线部分),设计合成 64 个核苷酸序列的寡聚核酸链。将寡聚核酸链经退火后用 T4 PNK 酶磷酸化,然后与线性化 pSUPER 质粒于 16℃ 连接,转化 DH5 α 感受态细菌,挑取阳性克隆,培养过夜;抽提质粒双酶切鉴定;阳性质粒再测序确认插入片段的正确性。

1.2.5 实时荧光定量 PCR(Quantitative Real-time RT-PCR,qRT-PCR) 按照 SYBR Premix Ex Taq 试剂说明进行扩增反应,引物与 RT-PCR 所用引物一致。对照组和实验组基因的表达水平按以下方法进行计算: $MAGEA9_{\Delta Ct} = \text{平均 } MAGEA9_{Ct} - \text{平均 } \beta\text{-actin}_{Ct}$, $MAGEA9_{\Delta\Delta Ct} = MAGEA9_{\Delta Ct_{\text{实验组}}} - MAGEA9_{\Delta Ct_{\text{对照组}}}$,对照组和实验组中的待测基因的倍数关系用 $2^{-MAGEA9_{\Delta\Delta Ct}}$ 来计算^[3]。

1.2.6 CCK-8 法测定细胞生长曲线 细胞转染 24 h 后,将各细胞以 4×10^3 个细胞/孔、3 复孔/天接种至 96 孔培养板。测定时将 100 μ l 无血清培养液和 10 μ l CCK-8(按 10:1)加入待测孔中,继续培养 1 h;测定 450 nm 处的吸光度。以 24 h 为一个检测单位,培养 6~7 d,绘制生长曲线,所有实验均独立重复 3 次。

1.2.7 克隆形成实验 将 pSUPER 质粒与 pcDNA3.1B 以 5:1 的比例共转染,以获得 G418 抗性;35 mm 培养皿培养 24 h 后消化至 100 mm 培养皿,继续培养 24 h 后,加 G418 至终浓度 800 mg/ml,期间每隔 3 天换液,培养 2~3 星期直至有肉眼可见的克隆形成。考马斯亮蓝 R-250 染色液染色、脱色后;按相同标准计细胞克隆数。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 统计软件进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MAGEA9 在肝癌组织中表达上调

MAGEA9 基因在 14 例(29%)肝癌中明显上调(图 1 显示 30 例实验结果)。

2.2 MAGEA9 在正常人体组织中的表达

MAGEA9 在睾丸组织、心、脾、肾中都有较高的表达,见图 2。这一结果符合 CT 基因分类中的第二类组织限制性表达基因的标准。

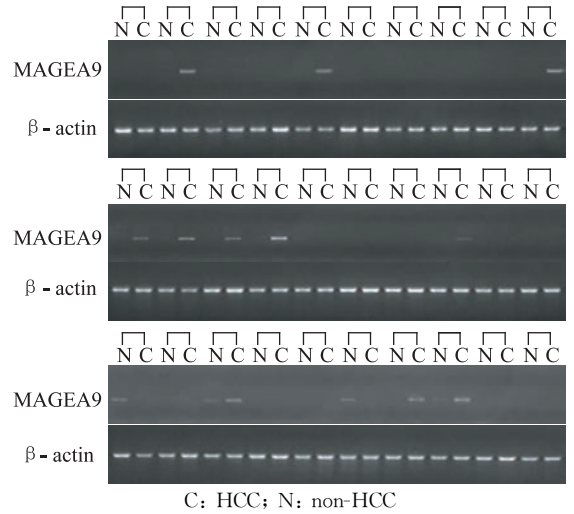


图 1 MAGEA9 基因在肝癌及癌旁组织中的表达
Figure 1 Analysis of MAGEA9 in hepatocellular carcinoma (HCC) and adjacent non-cancerous liver (non-HCC) tissues by RT-PCR

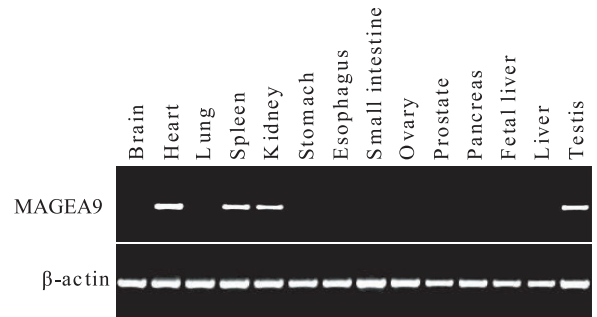


图 2 MAGEA9 基因在人正常组织中的表达
Figure 2 Analysis of MAGEA9 in human normal tissues by RT-PCR

2.3 MAGEA9 在肝癌细胞株中的表达

MAGEA9 基因在 Focus 和 PLC/PRF/5 中高表达,见图 3。因此,我们选择这两株细胞株用于后续的 RNA 干扰实验。

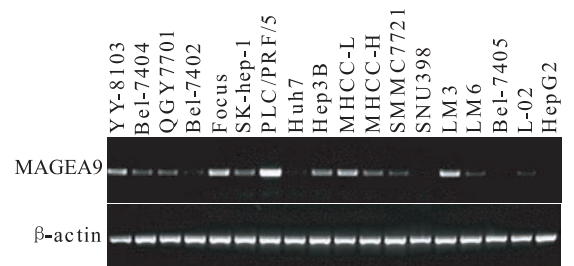


图 3 MAGEA9 基因在肝癌细胞株中的表达
Figure 3 Analysis of MAGEA9 in HCC cell lines by RT-PCR

2.4 siRNA 沉默 MAGEA9 后 Focus 和 PLC/PRF/5 细胞生长均受到明显抑制

与对照组(siRNA-NC)相比。转染 siRNA-M9 的 Focus 和 PLC/PRF/5 细胞中 MAGEA9 基因被明显下调,见图 4A、B。

与对照组 (siRNA-NC) 相比较, 转染 siRNA-M9 后 Focus 和 PLC/PRF/5 细胞的生长均受到明显抑制 ($P < 0.05$), 见图 4C、D。结果提示沉默 MAGEA9 基因的表达可抑制肝癌细胞的生长增殖水平。

2.5 pSUPER-shRNA-M9 沉默 MAGEA9 后 PLC/PRF/5 细胞的克隆形成能力下降

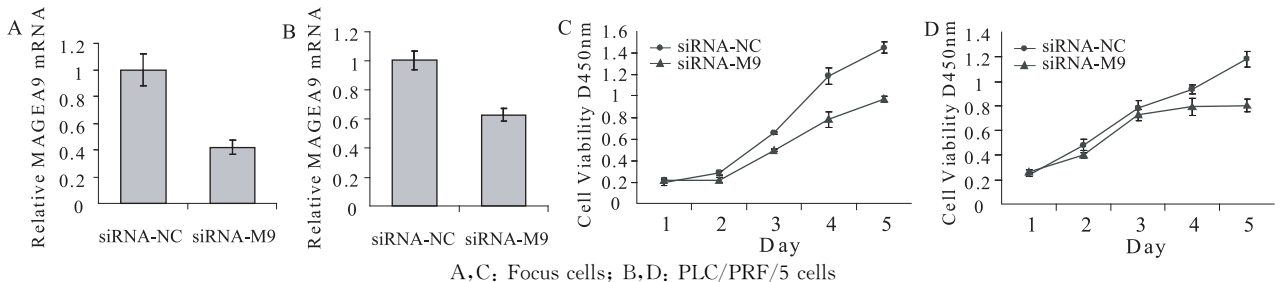
与转染对照质粒 pSUPER-shRNA-NC 的细胞相比, 转染 pSUPER-shRNA-M9 质粒的 PLC/PRF/5 细胞 MAGEA9 的 mRNA 表达量明显下调, 见图 5A。克隆形成实验表明, 与对照组相比, 转染 pSUPER-shRNA-M9 的 PLC/PRF/5 细胞克隆形成数明显减少 ($P < 0.05$), 见图 5B、C, 提示沉默 MAGEA9 后细胞的克隆形成能力明显下降。

3 讨论

CT 抗原在肿瘤病人中具有高免疫原性和组织局限性表达的特点, 识别和深入研究 CT 抗原基因在肿瘤免疫治疗的研究和应用领域具有重要的意义。根据 Scanlan 等^[4]标准, 我们可以将 CT 基因分为 4 类: 第 1 类为睾丸特异性表达基因; 第 2 类是组织限制性表达基因; 第 3 类属组织差异性表达基因, 除睾丸、卵巢和胎盘外, 在其他 3~6 种组织中有共同表达; 第 4 类为组织普遍性表达基因, 在所有组织中共同表达。发现新的肿瘤相关 CT 基因, 可为抗原特异性肿瘤疫苗的研发提供可靠的理论支撑。到

目前为止, 人们已经鉴定到了 47 个 CT 基因家族其中包括黑色素瘤 (MAGE) 家族, 并且已在多种肿瘤中研究它们的表达情况。例如, 膀胱癌、非小细胞肺癌和黑色素瘤中都有不同程度的 CT 基因表达。

MAGEA 亚家族属于 CT 基因 MAGE 家族, 近年来, MAGEA 家族成员的功能被逐步揭示, 例如 MAGEA1 能作为转录抑制因子参与肿瘤生长或者精子发生相关基因的调控^[5]。MAGEA9 在 38% 肾细胞癌中表达^[6], 在 122 个子宫癌患者中有 24 个呈现高表达^[7], 也在 46 个膀胱癌患者中以 54% 高表达^[8], 说明它在多种肿瘤中都存在异常表达, 提示着可能它在肿瘤中的表达有着共同调控的机制。本研究发现 CT 基因 MAGEA 家族成员 MAGEA9 在肝癌中 mRNA 表达水平明显上调。有关 MAGEA9 基因功能的研究报道比较少, 为了进一步研究 MAGEA9 与肝癌的关系, 我们利用 RNA 干扰技术分别沉默 MAGEA9 基因在 Focus 和 PLC/PRF/5 细胞中的表达。发现沉默 MAGEA9 基因的表达后, 细胞的生长受到明显的抑制; 同时, 利用构建的 MAGEA9 shRNA 表达载体质粒 pSUPER-shRNA-M9 转染 PLC/PRF/5 细胞后, 发现 PLC/PRF/5 细胞的克隆形成能力明显下降。提示着 MAGEA9 基因的表达对维持肝癌细胞的恶性生长有重要作用, 也可能影响细胞的生长增殖能力, 详细的分子机制有待于进一步的研究。



A, C: Focus cells; B, D: PLC/PRF/5 cells
The expression of endogenous MAGEA9 gene by qRT-PCR (A, B);
The growth curve of Focus or PLC/PRF/5 cells with silencing MAGEA9 (C, D)

图 4 MAGEA9 基因沉默对肝癌细胞生长的影响

Figure 4 Effects of silencing MAGEA9 on cell growth of HCC cell lines

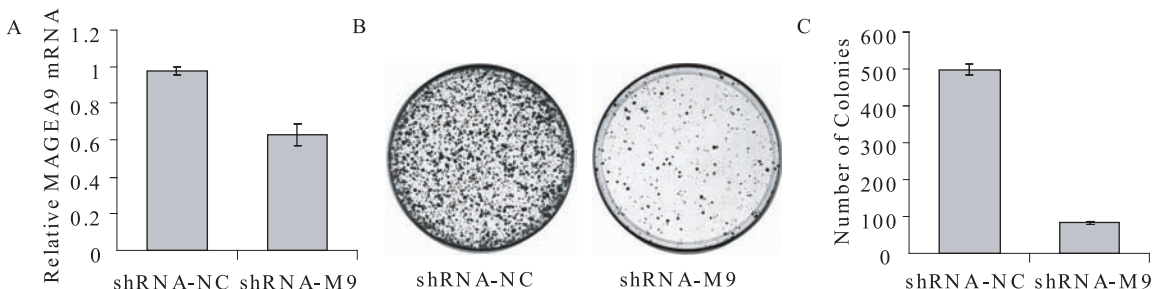


图 5 pSUPER-shRNA-M9 瞬间转染 PLC/PRF/5 细胞的克隆形成实验

Figure 5 Colony formation assay of PLC/PRF/5 after transfected by pSUPER-shRNA-M9

当前研究结果表明人工下调 *MAGEA9* 基因的表达能够在一定程度上抑制肝癌细胞的生长,提示 *MAGEA9* 基因可能是一个新的肝癌促进基因,也可能在维持肝癌的恶性表型等方面起到重要的作用。因此,下一步我们将克隆这个基因,探讨它在细胞恶性增殖中的直接作用,并深入分析 *MAGEA9* 基因的异常表达与肝癌临床病理特征的关联性。我们相信深入研究 *MAGEA9* 在肝癌中的功能,有可能为肝癌诊断发现新的指标或为肝癌治疗提供潜在的药物靶点。

参考文献:

- [1] 宗伟英,邓庆,梅铭惠,等. 肝癌组织 CT 抗原基因 CSAG1 表达对肝癌细胞生长的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志,2009,16(2): 109-113.
- [2] YT Chen, Scanlan MJ. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous screening[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94 (5):1914-1918.
- [3] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expres-

- sion data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C (T)) method [J]. Methods, 2001, 25 (4): 402-408.
- [4] Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ, et al. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary[J]. Cancer Immun, 2004, 4(1): 1-8.
- [5] Laduron S, Deplus R, Zhou S, et al. MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(14): 4340-4350.
- [6] Oehlich N, Devitt G, Linnebacher M, et al. Generation of RAGE-1 and MAGE-9 peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte lines for transfer in patients with renal cell carcinoma[J]. Int J Cancer, 2005, 117(2): 256-264.
- [7] Risinger JI, Chandramouli GV, Maxwell GL, et al. Global expression analysis of cancer/testis genes in uterine cancers reveals a high incidence of BORIS expression [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(6):1713-1719.
- [8] 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.

[编辑:周永红;校对:杨 卉]

• 简讯 •

《肿瘤防治研究》杂志征订征稿启事

《肿瘤防治研究》杂志创刊于 1973 年,是我国第一本独立的全国性肿瘤专业高级学术刊物。中华人民共和国卫生部主管,湖北省卫生厅、中国抗癌协会、湖北省肿瘤医院主办。杂志是中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊、湖北省优秀医学期刊、中国抗癌协会系列刊物。被美国 CA、CSA、Ulrich PD、波兰 IC、英国 CABI、Global Health、日本 JST 等大型数据库收录。本刊以报道国内外肿瘤防治研究领域最新之研究成果及新进展为主。读者对象为肿瘤防治研究工作者及相关专业的医药科技人员。

主要栏目有:专题论坛、基础研究、临床研究、临床诊断、临床应用、流行病学、研究简报、技术交流、论著摘要、综述、短篇个案、简讯等。

邮发代号:38-70; 国外代号:MO6482; 定价:8.00 元/册; 出版周期:月刊

中国标准连续出版物号:ISSN 1000-8578 CN 42-1241/R

投稿网站:<http://www.zlfzyj.com> E-mail:zlfzyj@263.net.cn

电话/传真:0086-27-87670126

通信地址:武汉市武昌卓刀泉南路 116 号《肿瘤防治研究》编辑部 邮政编码:430079