

# 人黑色素瘤抗原 A3 在宫颈癌组织和细胞中的表达研究

石若冰<sup>1</sup>, 王 琰<sup>1</sup>, 何海鹏<sup>1</sup>, 李 青<sup>1</sup>, 马 英<sup>1</sup>, 梁义娟<sup>1</sup>, 刘 金<sup>1</sup>, 齐 冀<sup>1</sup>, 高新萍<sup>2</sup>

**摘要** 目的 深入研究人黑色素瘤相关抗原 A3 (MAGE-A3) 在宫颈癌 (CC) 组织和 CC 细胞系中的表达情况, 探讨其在 CC 治疗中的意义。方法 应用免疫组织化学 SP 法检测 MAGE-A3 在 40 例 CC 组织和 20 例正常宫颈组织中的表达。采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测 MAGE-A3 mRNA 在 3 种不同 CC 细胞株及正常宫颈细胞株中的表达情况。应用 Western blot 检测 MAGE-A3 蛋白在 3 种不同 CC 细胞株 (HeLa、SiHa 和 C-33A) 及正常宫颈细胞株 (End1/E6E7) 中的表达水平。结果 MAGE-A3 在正常宫颈组织中不表达, 在 CC 组织中有表达, 阳性表达率分别为 0% 和 70%。MAGE-A3 mRNA 和蛋白在 3 种 CC 细胞株中的表达明显高于正常宫颈细胞株 ( $P < 0.05$ )。结论 MAGE-A3 在 CC 组织和 CC 细胞中高表达, 提示在 CC 的发生发展中 MAGE-A3 可能具有重要作用。

**关键词** MAGE-A3; 宫颈肿瘤; 基因表达

**中图分类号** R 737.33

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2019)11-1726-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.11.013

宫颈癌 (cervical cancer, CC) 是最常见的妇科恶性肿瘤之一, 在世界范围内, 宫颈癌 CC 的发病率居女性恶性肿瘤的第三位<sup>[1-2]</sup>。黑色素瘤抗原 (melanoma antigen gene, MAGE) 属于癌胚抗原 (cancer testis gene, CTA), 在正常组织中 CTA 仅表达于睾丸和胎盘中, 而在各种肿瘤组织中呈高表达<sup>[3-5]</sup>, 其中 MAGE-A3 为 MAGE-A 家族重要成员, 是目前已知的免疫原性最强、能被免疫细胞识别的肽表位最多的抗原。因此 MAGE-A3 在 CC 的发生、发展中所起的作用日益受到学者的关注。该研究应用免疫组织化学 SP 法、Western blot 和 RT-qPCR 法分别检测了 MAGE-A3 在宫颈组织和 CC 细胞株中

的表达情况, 初步探讨了 MAGE-A3 在 CC 中的表达及意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究材料

**1.1.1 细胞培养** CC 细胞株 HeLa、SiHa 和 C-33A 购自北京市中国医学科学院, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在含 5% CO<sub>2</sub>、37 °C、饱和湿度的培养箱中培养。作为正常对照的细胞株 End1/E6E7 (购自美国模式菌种收集中心), 用含 0.05 mg/ml 牛垂体提取物 (bovine pituitary extract, BPE) 和 0.1 ng/ml 人重组表皮生长因子 (human recombinant epidermal growth factor, EGF) 的角化细胞无血清培养基 (keratinocyte-serum free medium, K-SFM) 培养, 其他培养条件同前。

**1.1.2 组织标本** 60 例组织标本取自河北大学附属医院妇产科 2015 年 1 月 ~ 2017 年 1 月间首诊并行妇科手术患者的宫颈组织。收集存档蜡块标本, 其中正常宫颈组织 20 例 (标本均来源于本院因子子宫肌瘤等良性病变行子宫全切术后的宫颈切片标本), CC 组织 40 例 (所有患者术前均未进行肿瘤的放疗及化疗)。所有病例均需经病理诊断证实, 所有患者均排除患其他恶性肿瘤疾病或急慢性疾病。实验方案经医院伦理委员会批准。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 免疫组化法** 将石蜡切片常规脱蜡和水化后, 0.01% 枸橼酸盐缓冲液进行抗原修复, 滴加适量 3% 双氧水, 以消除内源性过氧化物酶活性, 滴 1 滴正常山羊血清封闭液 (试剂 A), 室温下孵育 15 min, 每张切片加适当稀释后的 MAGE-A3 一抗工作液约 50  $\mu$ l; 空白对照组加 PBS 液约 50  $\mu$ l, 置于 4 °C 冰箱过夜孵育。滴加稀释后的二抗 50  $\mu$ l (试剂 B), 滴加过氧化物酶标记链霉卵白素 (试剂 C), 最后滴加 DAB 溶液显色, 光镜下观察切片。以胎盘组织做阳性对照。显微镜下观察, 于细胞中见棕黄色颗粒的为 MAGE-A3 阳性细胞。

**1.2.2 RT-qPCR** 收获对数生长期的细胞, 用 TRIzol 试剂盒提取 RNA, 经紫外分光光度计进行 RNA

2019-04-28 接收

基金项目: 河北省政府资助临床医学优秀人才培养和基础课题研究项目 (编号: 361007); 2016 年河北省医学科学研究重点课题计划项目 (编号: 20160381)

作者单位: <sup>1</sup> 河北大学附属医院妇科, 保定 071000

<sup>2</sup> 深圳市萨米医疗中心妇产科, 深圳 518000

作者简介: 石若冰, 女, 硕士研究生;

高新萍, 女, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 1944055884@qq.com

浓度和纯度的测定,逆转录合成 cDNA,RT-qPCR 反应条件为 45 ℃、50 min。利用 Pubmed 查找基因的序列号,上海生科公司利用基因序列号合成相关基因的实时定量 PCR 引物,MAGE-A3 上游引物序列: 5'-GGGACGGACATCTTCACTGG-3'; MAGE-A3 下游引物序列: 5'-CCACCAATTCTTGTGGCACC-3'; 内参 GAPDH 上游引物序列: 5'-GCACCGTCAAGGCT-3'; 内参 GAPDH 下游引物序列: 5'-AGGTCCACCACTA-CACGTTT-3'。将反应体系置于 PCR 扩增仪上 94 ℃ 预变性 3 min,然后开始 PCR 循环: 94 ℃、15 s,65 ℃、30 s,72 ℃、30 s,共 40 个循环,最后 1 个循环 72 ℃ 延长 10 min。所取数据根据  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式计算 mRNA 相对表达量。

**1.2.3 Western blot** 收获对数生长期的细胞后,裂解细胞提取总蛋白并进行蛋白定量(采用 BCA 法蛋白定量),配制 10% SDS-PAGE 凝胶,每孔上样量 30  $\mu$ l,经电泳、转膜、封闭,与 MAGE-A3 抗体(稀释度 1:2 000)4 ℃ 摇床慢慢摇晃过夜孵育,洗膜后,与抗鼠二抗(稀释度 1:3 000)37 ℃ 培养箱慢慢摇晃孵育 2 h,洗膜后将显影液加于 PVDF 膜上。用凝胶成像系统进行扫描并分析。以目标蛋白与内参蛋白条带灰度比值计算各组蛋白的相对表达量。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 进行统计分析。计数资料比较采用  $\chi^2$  检验。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,各组数据均呈正态分布,因此多组间的比较采用单因素方差分析,方差齐的组间两两比较用 LSD 法;方差不齐的组间两两比较用 Dunnett's T3 法, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 免疫组织化学 SP 法检测宫颈组织中 MAGE-A3 的表达** MAGE-A3 主要表达于细胞质中,呈浅黄色至棕褐色。其在正常宫颈组织和 CC 组织中阳性表达率分别为 0% (0/20) 和 70% (28/40)。在 20 例正常宫颈组织中 MAGE-A3 均呈阴性表达,在 40 例 CC 组织中 28 例呈阳性表达,12 例呈阴性表达。CC 组表达高于正常宫颈组,差异有统计学意义( $\chi^2 = 26.25, P < 0.05$ )。见图 1。

**2.2 RT-PCR 检测宫颈细胞中 MAGE-A3 mRNA 的表达** 检测基因 MAGE-A3 的 mRNA 水平结果显示,CC 细胞组与正常宫颈细胞组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而 3 种 CC 细胞之间差异无统计学意义。见图 2。

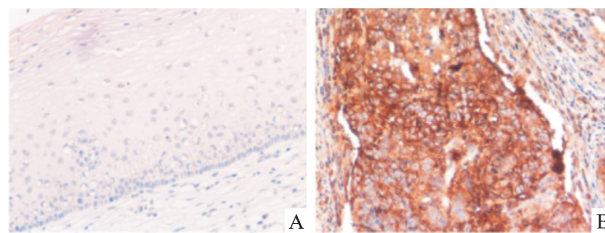


图 1 正常宫颈组织和宫颈癌组织中 MAGE-A3 的表达 SP  $\times 200$   
A: 正常宫颈组织; B: 宫颈癌组织

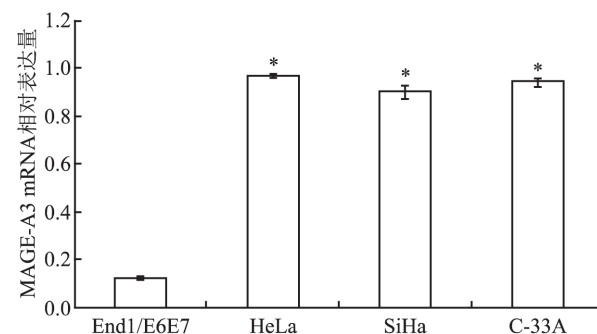


图 2 4 种宫颈细胞中 MAGE-A3 mRNA 的表达比较  
与正常宫颈细胞(End1/E6E7)组比较: \*  $P < 0.05$

**2.3 Western blot 检测宫颈细胞中 MAGE-A3 蛋白的表达** MAGE-A3 蛋白在 3 株 CC 细胞和正常宫颈细胞中的表达与 mRNA 相似,CC 细胞组与正常宫颈细胞组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而 3 种 CC 细胞之间差异无统计学意义。见图 3。

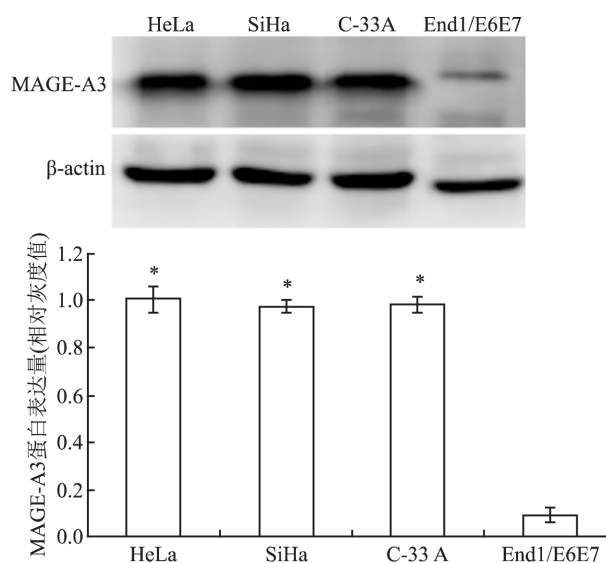


图 3 4 种宫颈细胞中 MAGE-A3 蛋白的表达比较  
与正常宫颈细胞(End1/E6E7)组比较: \*  $P < 0.05$

## 3 讨论

MAGE-A3 表达于多种恶性肿瘤,而在正常组织中不表达(除睾丸和胎盘外),具有肿瘤特异性,是肿瘤特异性免疫治疗的理想靶点<sup>[3]</sup>。研究<sup>[6-8]</sup>显示,MAGE-A3 基因在黑色素瘤、肺癌、肝癌、乳腺癌、喉癌<sup>[9]</sup>等多种肿瘤中有不同程度的表达。Hatiboglu et al<sup>[10]</sup> 通过研究得出 MAGE-A 与非转移性肾癌的预后不良有关。Han et al<sup>[11]</sup> 通过对喉鳞状细胞癌的组织研究表明,MAGE-A 表达是喉鳞癌患者预后的生物标志物,MAGE-A 高表达提示喉癌患者预后不良。Gu et al<sup>[8]</sup> 通过对肝细胞癌的分析数据表明 MAGE-A 高表达是肝癌患者不利预后的生物标志物。Duan et al<sup>[12]</sup> 研究表明 MAGE-A3 抗原在肿瘤的边缘有表达,炎症组织、良性肿瘤及癌旁组织中则不表达,这一特点为 MAGE-A3 用于肿瘤分子学诊断和免疫治疗创造了条件。

本研究中,使用免疫组化法评估了 CC 组织中的 MAGE-A3 蛋白表达,结果显示 MAGE-A3 在细胞质中高表达。这与 Yin et al<sup>[13]</sup> 在膀胱移行细胞癌的研究结果一致。提示 CC 组织中 MAGE-A3 相对表达量明显高于正常宫颈组织。

本研究显示,MAGE-A3 基因在 CC 细胞株 HeLa、SiHa、C-33A 中呈高表达,在正常宫颈细胞株 End1/E6E7 细胞中表达量极低。这就说明 MAGE-A3 可能参与了 CC 的发生和发展,并在此过程中可能发挥着一定的作用。因此下一步工作将探讨 MAGE-A3 是否在 CC 侵袭、转移以及增殖中发挥作用,并深入研究其作用机制,从而为 MAGE-A3 是否为 CC 的促癌基因提供实验依据。

Russo et al<sup>[14]</sup> 利用能表达 MAGE-A3 的转基因的淋巴细胞 MAGE-A3-GML 治疗黑色素瘤患者,10 例患者中 3 例表现出外周循环血中抗 MAGE-A3 T 细胞增加,并且促进皮肤关于 MAGE-A3 迟发型过敏反应的发生。但其中有 2 例患者抗 MAGE-A3 的 T 细胞不仅在血液中被检出,在肿瘤组织中也能被检出,表明 MAGE-A3-GML 的注射能诱导抗肿瘤 T 细胞,这些 T 细胞能浸润到肿瘤组织内部。王谦等<sup>[15]</sup> 通过 MAGE-A3 蛋白刺激获得能够呈递其抗原的成熟树突状细胞,再用该细胞刺激 T 淋巴细胞而获得能够识别 MAGE-A3 蛋白的 CD8<sup>+</sup> 细胞毒 T 淋巴细胞,表明 MAGE-A3-DC-CD8<sup>+</sup> CTL 具有特异性的肿瘤杀伤能力。由此可见,MAGE-A3 是肿瘤免疫治疗的理想靶点。

## 参考文献

- [1] Schiffman M, Solomon D. Clinical practice. Cervical-cancer screening with human papillomavirus and cytologic cotesting [J]. N Engl J Med, 2013, 369( 24): 2324 - 31.
- [2] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. Int J Cancer, 2015, 136( 5): E359 - 86.
- [3] Agarwal S, Saini S, Parashar D, et al. The novel cancer-testis antigen A-kinase anchor protein 4 ( AKAP4 ) is a potential target for immunotherapy of ovarian serous carcinoma [J]. Oncoimmunology, 2013, 2( 5): e24270.
- [4] Lucas S, Desmet C, Arden K C, et al. Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis [J]. Cancer Res, 1998, 58( 4): 743 - 52.
- [5] Thongprasert S, Yang P C, Lee J S, et al. The prevalence of expression of MAGE-A3 and PRAME tumor antigens in East and South East Asian non-small cell lung cancer patients [J]. Lung Cancer, 2016, 101: 137 - 44.
- [6] Yin B, Liu G, Wang X S, et al. Expression profile of cancer-testis genes in transitional cell carcinoma of the bladder [J]. Urol Oncol, 2012, 30( 6): 886 - 92.
- [7] Saiaj P, Gutzmer R, Ascierto P A, et al. Prospective assessment of a gene signature potentially predictive of clinical benefit in metastatic melanoma patients following MAGE-A3 immunotherapeutic ( PREDICT1 ) [J]. Ann Oncol, 2016, 27( 10): 1947 - 53.
- [8] Xie C, Subhash V V, Datta A, et al. Melanoma associated antigen ( MAGE ) -A3 promotes cell proliferation and chemotherapeutic drug resistance in gastric cancer [J]. Cell Oncol( Dordr ), 2016, 39( 2): 175 - 86.
- [9] Gu X, Fu M, Ge Z, et al. High expression of MAGE-A9 correlates with unfavorable survival in hepatocellular carcinoma [J]. Sci Rep, 2014, 4: 6625.
- [10] Hatiboglu G, Pritsch M, Macher-Goeppinger S, et al. Prognostic value of melanoma-associated antigen A9 in renal cell carcinoma [J]. Scand J Urol, 2013, 47( 4): 311 - 22.
- [11] Han L, Jiang B, Wu H, et al. Expression and prognostic value of MAGE-A9 in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Int J Clin Pathol, 2014, 7( 10): 6734 - 42.
- [12] Duan Z, Duan Y, Lamendola D E, et al. Overexpression of MAGE/GAGE genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant human cancer cell lines [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9( 7): 2778 - 85.
- [13] Yin B, Liu G, Wang X S, et al. Expression profile of cancer-testis genes in transitional cell carcinoma of the bladder [J]. Urol Oncol, 2012, 30( 6): 886 - 92.
- [14] Russo V, Lunghi F, Fontana R, et al. A clinical study of a cell-based MAGE-A3 active immunotherapy in advanced melanoma patients [J]. J Cancer, 2011, 2: 329 - 30.
- [15] 王谦, 黄长山, 余伟, 等. 黑色素瘤相关抗原-A3 蛋白激活树突状细胞诱导 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 淋巴细胞免疫治疗肝癌 [J]. 中华实验外科杂志, 2017, 34( 4): 587 - 90.

网络出版时间: 2019-9-19 10:04 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190917.1059.014.html>

## 乳腺癌细胞 HMGA1 稳定株构建及对细胞增殖的影响

胡芳琳<sup>1</sup>, 钟小林<sup>1</sup>, 陈亚军<sup>1,2,3</sup>, 钟 警<sup>1</sup>

**摘要** 目的 构建高迁移率族蛋白 A1 (HMGA1) 表达载体及乳腺癌 MCF7 和 T47D 细胞 HMGA1 高表达稳定株, 并检测 HMGA1 高表达对 MCF7 和 T47D 细胞增殖的影响。方法 通过 PCR 扩增 HMGA1 基因编码框, 将 HMGA1 编码框连接于 GV219 [pcDNA3.1(-)] 载体, 经测序确认后, 将 pcDNA3.1(-)/HMGA1 分别转染至 MCF7 和 T47D 细胞中, 再经遗传霉素 (G418) 筛选单克隆株并扩大培养。通过 Western blot 检测各稳定细胞株 HMGA1 的表达, 从而筛选出 HMGA1 稳定高表达的细胞株。实验进一步采用 MTT 比色法和细胞克隆形成实验检测 HMGA1 高表达对细胞增殖能力的

影响。结果 成功构建 pcDNA3.1(-)/HMGA1 载体; 成功建立稳定高表达 HMGA1 的 MCF7 和 T47D 细胞株; MTT 实验结果表明 MCF7 和 T47D 细胞 HMGA1 高表达稳定株增殖能力比对照组明显增强 ( $P < 0.001$ ); 克隆形成实验结果显示 HMGA1 高表达稳定株克隆形成率明显高于对照组 ( $P < 0.001$ )。结论 HMGA1 稳定高表达可明显促进乳腺癌 MCF7 和 T47D 细胞的增殖。

**关键词** 乳腺癌; HMGA1; 细胞增殖; 质粒转染

**中图分类号** R 737.9

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2019)11-1729-06

**doi:** 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.11.014

2019-06-17 接收

**基金项目:** 国家自然科学基金(编号: 81773294); 湖南省自然科学基金(编号: 2019JJ20014); 湖南省研究生科研创新项目(编号: CX2018B637)

**作者单位:** <sup>1</sup> 南华大学附属第一医院临床医学研究所, 衡阳 421001

<sup>2</sup> 南华大学附属第二医院内分泌科, 衡阳 421001

<sup>3</sup> 南华大学病理生理学教研室, 衡阳 421001

**作者简介:** 胡芳琳, 女, 硕士研究生;

钟 警, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:

zhongjing2002@hotmail.com

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 近年来乳腺癌的发病率和死亡率迅速上升, 并有年轻化趋势, 已成为威胁女性健康的重要原因<sup>[1-2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>表明, 乳腺癌的发生发展与多种因素有关, 但其致病机制尚不清楚。高迁移率族蛋白 (high mobility group protein, HMG) 与乳腺癌的发生发展相关。HMG 分为 3 大类: HMGB、HMGN 及 HMGA, 各大类

## Expression of the melanoma-associated antigen-A3 (MAGE-A3) in cervical cancer tissues and cervical cancer cells

Shi Ruobing, Wang Yan, He Haipeng, et al

(Dept of Gynecology, The Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000)

**Abstract Objective** To further elucidate the expression of melanoma-associated antigen-A3 (MAGE-A3) in cervical cancer tissues and cervical cancer cell lines, and to explore its significance in the treatment of cervical cancer. **Methods** Immunohistochemical SP method was used to detect the expression of MAGE-A3 in 40 samples of cervical cancer tissue and 20 samples of normal cervical tissue. The expression of MAGE-A3 mRNA in three different cervical cancer cell lines and normal cervical cell line was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). The expression levels of MAGE-A3 protein in three different cervical cancer cell lines-HeLa, SiHa and C-33A and normal cervical cell line were detected by Western blot. **Results** MAGE-A3 was not expressed in normal cervical tissues and was expressed in cervical cancer tissues. The positive expression rates were 0% and 70%, respectively. The expressions of MAGE-A3 mRNA and protein in three cervical cancer cell lines were significantly higher than those in normal cervical cancer cell lines. **Conclusion** MAGE-A3 is highly expressed in cervical cancer tissues and cervical cancer cells. It suggests that MAGE-A3 plays an important role in the development of cervical cancer.

**Key words** MAGE-A3; cervical carcinoma; gene expression