

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.09.010

· 基础研究 ·

基因芯片技术筛查并鉴定乳腺癌细胞中 MAGE-A11 的相关基因

谷丽娜^a, 桑梅香^{ab}, 李娟^a, 刘飞^a, 王芃堉^a, 尹丹静^a, 吴云艳^a, 单保恩^{ab}(河北医科大学 第四医院 a. 科研中心; b. 肿瘤研究所免疫室, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:**应用高通量基因芯片技术筛查乳腺癌细胞中黑色素瘤相关抗原(melanoma antigen, MAGE)-A11 的相关基因, 并从数量和功能两方面加以验证。**方法:**采用基因芯片技术筛选乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 和 BT-549 中 MAGE-A11 下游靶基因的 mRNA 的差异表达, 对有代表性的基因进行了聚类分析, 并利用 qRT-PCR 进行验证。以 CCK-8 法、细胞划痕实验和 Transwell 实验检测 MAGE-A11 对乳腺癌细胞中增殖、迁移和侵袭功能的影响。**结果:**3 种乳腺癌细胞过表达 MAGE-A11 导致 1 608 个下游基因差异表达, 主要涉及蛋白泛素化、细胞增殖和凋亡、肿瘤侵袭和转移。基因芯片中典型高表达的 *ZNF-451*、*CENPTJ*、*CDK13*、*API5* 和 *LMO7* 在 qRT-PCR 在验证结果中也显著高于对照组 ($P < 0.01$), 低表达的 *SHPRH*、*PML*、*MARK2*、*LIM1* 和 *ANGPTL4* 也显著低于对照组 ($P < 0.01$)。转染 MAGE-A11 组的乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 和 BT-549 72 h 的增殖能力较对照组明显增强(均 $P < 0.01$), 培养 48 h 后与对照组相比, 转染 MAGE-A11 的 3 种细胞划痕出现明显愈合 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 穿膜数较对照组明显增多(均 $P < 0.01$)。**结论:**在 MCF-7、MDA-MB-231 和 BT-549 三种乳腺癌细胞中筛查到涉及蛋白泛素化、细胞增殖和凋亡、肿瘤侵袭和迁移等生物功能众多的表达差异基因, 对其中 10 种典型差异基因从数量和功能两方面进行验证, 并得到初步确认。

[关键词] 乳腺癌; 黑色素瘤相关抗原-A11; 基因芯片

[中图分类号] R730.1; R737.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)09-0904-09

Screening and identification of MAGE-A11 related genes based on DNA microarray

GU Lina^a, SANG Meixiang^{ab}, LI Juan^a, LIU Fei^b, WANG Pengyu^a, YIN Danjing^a, WU Yunyan^a, SHAN Baoen^{ab}(a. Department of Research Center; b. Department of Immunology, Tumor Research Institute, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To screen related genes of melanoma-associated antigen-A11 (MAGE-A11) in breast cancer cells based on high-throughput DNA microarray technology, and to validate from the aspects of quantity and function. **Methods:** DNA microarray was used to screen the differently-expressed downstream mRNAs of MAGE-A11 in breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-231 and BT-549). Cluster analysis was applied on representative genes and quantitative RT-PCR was used to validate. CCK-8, scratch wound healing assay and Transwell assay were used to detect the effect of MAGE-A11 on the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells. **Results:** Over-expression of MAGE-A11 caused the differential expression of 1608 downstream genes in 3 breast cancer cell lines, which was associated with various cell functions such as protein ubiquitination, cell proliferation and apoptosis, tumor invasion and metastasis. qRT-PCR validated that the expression of *ZNF-451*, *CENPTJ*, *CDK13*, *API5* and *LMO7*, which were highly expressed in microarray, were also significantly higher than those in control group ($P < 0.01$); in addition, *SHPRH*, *PML*, *MARK2*, *LIM1* and *ANGPTL4*, which were low-expressed in microarray, were also significantly lower than those in control group ($P < 0.01$). MAGE-A11 transfection directly increased the proliferation of breast cancer MCF-7, MDA-MB-231 and BT-549 cells at 72 h (all $P < 0.01$); compared with control group after transfection exhibited obvious wound healing at 48 h ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and significantly increased trans-membrane cell numbers (all $P < 0.01$). **Conclusion:** Many differentially expressed genes related to ubiquitination, cell proliferation and apoptosis, tumor

[基金项目] 河北省科技计划资助项目(No.152777184);河北省杰出青年基金资助项目(No.H2016206410);河北省财政厅资助项目(No.[2016]361006)。Project supported by the Science and Technology Program of Hebei Province (No.152777184), the Foundation for Distinguished Young-Scholars of Hebei Province(No. H2016206410), and the Supporting Program from Financial Department of Hebei Province(No. [2016] 361006)

[作者简介] 谷丽娜(1989-),女,硕士,实习研究员,主要从事肿瘤免疫的基础研究,E-mail: gln081225@163.com

[通信作者] 单保恩(SHAN Baoen, corresponding author),博士,教授,博士生导师,主要从事肿瘤分子生物学和肿瘤免疫学研究,E-mail:baoen-shan1962@hotmail.com

invasion and migration were screened in MCF-7, MDA-MB-231 and BT-549 breast cancer cells. Among them, 10 typical differentially expressed genes were identified in terms of quantity and function.

[Key words] breast cancer; melanoma antigen-A11 (MAGE-A11); DNA microarray

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(9): 904-912. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.09.010]

黑色素瘤相关抗原(melanoma antigen, MAGE)-A 家族作为癌睾丸抗原, 表达于多种肿瘤组织, 并与预后不良相关^[1-4]。MAGE-A11 首次在人睾丸组织中被鉴定为与雄激素受体(androgen receptor, AR)相互作用的蛋白^[5]。目前, 对于 MAGE-A11 的研究主要集中在 MAGE-A11 通过 AR 受体途径促进前列腺癌细胞的增殖。近期有研究^[6]表明, 人类 SUV39 H2(suppressor of variegation 3-9 homolog 2) 与 MAGE-A11 协同作用可增加雄激素依赖的 AR 转录活性。MAGE-A11 与 Skp2 和 Cyclin A 直接相互作用, 调控 Skp2 介导的蛋白质降解的底物特异性^[7]。而 MAGE-A11 在乳腺癌中的研究相对较少, 本课题组^[8]前期研究表明, MAGE-A11 在乳腺癌组织高表达, 其中 mRNA 和蛋白阳性表达率分别为 66.7% (40/60) 和 63.3% (38/60), 其高表达与患者的预后不良呈正相关且可作为监测患者预后的指标, DNA 甲基化和组蛋白乙酰化可能是正常组织中 MAGE-A11 基因沉默的重要机制。为了进一步阐明 MAGE-A11 在乳腺癌细胞中的作用机制, 本研究利用高通量基因芯片技术研究乳腺癌细胞转染 MAGE-A11 质粒后, 部分下游靶基因的 mRNA 发生变化, 进一步利用 qRT-PCR 进行验证, 以筛选乳腺癌中与 MAGE-A11 相关的基因, 阐明其在乳腺癌中的可能机制。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

人乳腺癌细胞株 MCF-7、BT-549 和 MDA-MB-231 均来自于河北医科大学第四医院科研中心。RPMI1640 培养基、DMEM 培养基、L-15 培养基和胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司, 胎牛血清购自上海依科赛生物制品有限公司, TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司, Platinum SYBR SuperMix 试剂、逆转录试剂盒和 FuGENE HD 转染试剂均购自美国 Promega 公司, PCR 引物购自锐博公司, Transwell 小室(孔径 3.0) 购自美国 Corning 公司, 姬姆萨染液购自珠海贝索生物技术有限公司。全基因组表达谱芯片 Arraystar Human mRNA Array (60 K) 购自上海康成生物工程有限公司。

1.2 细胞培养、质粒转染和 RNA 提取

将乳腺癌 MCF-7 细胞接种于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养; BT-549 细胞接种于含 10% FBS 的

DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养; MDA-MB-231 细胞接种于含 10% FBS 的 L-15 培养基, 于 37 °C、无 CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。取对数生长期细胞进行实验。按照 FuGENE HD 转染说明书操作, 以无血清培养基做溶媒配置转染试剂及质粒工作液, 分别向 MCF-7、BT-549、MDA-MB-231 细胞中转染 MAGE-A11 质粒及阴性对照质粒。转染 48 h 后按照 TRIzol 说明书操作分别提取各组细胞总 RNA, 以用于下一步实验。

1.3 芯片杂交和数据分析

经过杂交和漂洗后, 利用 Agilent 微阵列芯片扫描仪进行扫描, 并将数据导入至 Agilent GeneSpring GX 软件(v.7.3) 进行进一步分析。将原始数据进行归一化处理, 采用表达差异倍数(Fold-change) 和 Student's-*t* 检验方法对差异表达基因进行筛选。挑选条件如下: (1) Fold-change(linear) ≤ 0.05 或 Fold-change(linear) ≥ 2.0; (2) *t* 检验后 *P* < 0.05。将表达基因或者差异基因数据做聚类分析。对样本和基因分别进行分级聚类之后, 通过聚类热图(heat map) 直观地展现基因在不同样本中的表达情况, 对差异表达最显著的 31 个基因进行聚类分析。

1.4 qRT-PCR 验证基因芯片结果

收集转染 48 h 后的 MCF-7、BT-549 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞, 用 TRIzol 试剂提取各组细胞的总 RNA, 按照反转录试剂盒和 qRT-PCR 试剂盒说明书提供的方法进行反转录, 并利用 qRT-PCR 法检测 *ZNF-451*、*CENPTJ*、*CDK13*、*API5*、*MARK2*、*LMO7*、*SHPRH*、*PML*、*LIM1* 和 *ANGPTL4* (以 *GAPDH* 为内参照) 的表达量。这些基因的引物序列见表 1。检测 PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 15 s、60 °C 1 min, 共 40 个循环; 72 °C 5 min。以 2^{-ΔΔCt} 法计算各组细胞上述 10 个基因 mRNA 的相对表达水平。实验重复 3 次。

1.5 CCK-8 法检测 MAGE-A11 对乳腺癌细胞增殖的影响

分别收集转染了 MAGE-A11 的乳腺癌细胞 MCF-7、BT-549 和 MDA-MB-231, 以 2 × 10³ 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板, 常规培养, 分别于 0、24、48 和 72 h 在各孔中加入 CCK-8 试剂 10 μl, 继续培养细胞 1 h。然后用酶标仪测定波长为 450 nm 处各孔的光密度(*D*) 值, 各个时间点设置 3 个复孔, 计算平均值,

实验重复3次,并绘制细胞增殖曲线。

表1 qRT-PCR引物序列
Tab.1 Sequence of qRT-PCR primers

Gene	Primer sequences(5'-3')
GAPDH	F CGCTGAGTACGTCGTGGAGTC
	R GTGATGATCTTGAGGCTGTTGTC
ZNF-451	F AGCCATGAAGGTGTTGCTTG
	R ACCTTTCCACAGACCACACA
CENPJ	F TCCGGCAGATCCCATTAGTC
	R GTGCGACTTCACACTCACTC
CDK13	F CTTGGAGCTAACGCCAGAAC
	R CTTCTCAGTGAAGGCTGGT
API5	F CTGAACAGGCCGACCTAGAA
	R AGTGCAGTGTAAAGGCCTGT
MARK2	F AACGAGATGATGCGGGAGAT
	R TGCACAGCAGCATGTACTTC
LMO7	F ACGTGAGCAGGAGAACTGA
	R GACTTGGACCCTTCACTCCA
SHPRH	F TCCTGCATTGATCCCTGTGT
	R GTGCAGGGCACTTTCAGTAG
PML	F CCTACGCTGACCAGCATCTA
	R AAGGCACTATCCTGCTCCTG
LIMA1	F GTTCAACAGCCTGTCCATCC
	R CTTGCAGGTGCCTGAACTT
ANGPTL4	F CCTATAGCCTGCAGCTCACT
	R GTGGAGAAGGGTACGGAGAG

1.6 细胞划痕实验检测MAGE-A11对乳腺癌细胞迁移的影响

将转染后的乳腺癌细胞接种于6孔板,待细胞生长至汇合度90%时,用高压灭菌过的200 μl枪头在6孔板划痕,无菌PBS洗涤6孔板3次,加入2 ml完全培养基继续培养。在0、24、48 h倒置显微镜下(×200)观察细胞迁移情况,进行拍照分析。实验重复3次。

1.7 Transwell实验检测MAGE-A11对乳腺癌细胞侵袭及迁移的影响

将4 °C过夜溶解的Matrigel胶用无血清的培养基按1:7的比例稀释,操作在冰上进行,避免Matrigel胶在常温下出现不可逆性凝固。将带有8 μl微孔聚碳酸酯膜的Transwell小室置于无菌24孔板中,由此形成上下两个小室,向上室中加入25 μl Matrigel胶,快速晃动24孔板,使其均匀铺满小室底面,避免产生气泡,37 °C无菌保持过夜,确保Matrigel胶。Transwell迁移实验为上室中不铺Matrigel胶。收集MCF-7-Ctr、BT-549-Ctr、MDA-MB-231-Ctr、MCF-7-MAGE-A11、BT-549-MAGE-A11和MDA-MB-231-MAGE-A11 6组细胞,培养24 h后用胰蛋白酶消化细胞,制成单细胞悬液并计数。将各组细胞分别加入Transwell小室的上室(1.5×10⁵个/小室),下室中加入600 μl含10%胎牛血清或含20%胎牛血清的培养液,常规培养48 h,用棉签擦净上室细胞,用PBS清洗后姬姆萨染色,于倒置相差显微镜下(×200)观察并拍照,随机观察5个视野,计数穿膜细胞数。实验重复3次。

1.8 统计学处理

采用SPSS20.0统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验,组内比较采用方差分析。以P<0.05或P<0.01表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 提取的细胞样本总RNA纯度较高

所有细胞样本总RNA经过电泳质检后,可观察到18S和28S两条清晰的电泳条带,表明提取的样本总RNA完整性较好、未发生降解。此外,测定各样本总RNA的D₂₆₀/D₂₈₀比值接近2.0(1.8~2.1为适宜),D₂₆₀/D₂₃₀比值均高于1.8(表2)。说明各样本总RNA的纯度较高,无明显的蛋白质污染,可用于芯片实验和qRT-PCR验证。

表2 乳腺癌细胞RNA质检结果

Tab.2 The quality test results of RNA of breast cancer cells

Group	Sample	Conc[ρ _B (ng·μl ⁻¹)]	D ₂₆₀ /D ₂₈₀	D ₂₆₀ /D ₂₃₀	RIN	28S/18S
Control	1	983.5	2.02	2.33	7.9	1.5
Control	2	819.9	2.04	2.30	8.0	1.6
Control	3	882.5	2.03	2.28	8.1	1.7
MAGE-A11	4	999.0	2.06	2.30	8.2	1.7
MAGE-A11	5	934.7	2.06	2.29	8.0	1.5
MAGE-A11	6	906.5	2.04	2.29	8.4	1.5

2.2 乳腺癌细胞中筛选的mRNA的差异表达情况

采用Arraystar Human mRNA Array(60K)检测转染后过表达MAGE-A11的乳腺癌细胞中差异表达的

基因,利用该芯片共检测了20 655个基因,其中差异表达的mRNA共有1 608个,860个表达上调,748个表达下调。表3和表4分别列出了具有代表性的19

个表达上调的基因和12个表达下调的基因。针对有代表性的基因进行了聚类分析(图1), 差异表达的基因主要涉及蛋白泛素化 (*ZNF-451*、*TRIM28* 和 *RNF111* 等), 细胞增殖和凋亡 (*CENPJ*、*CDK13*、*API5* 和 *KIF2A* 等)、肿瘤侵袭和转移 (*LIMA1*、*MARK2*、*ANGPTL4* 和 *LMO7* 等)。

2.3 qRT-PCR 验证基因芯片结果的准确性

根据基因芯片检测结果, 选择典型的5个上调基因为 *ZNF-451*、*CENPTJ*、*CDK13*、*API5*、*LOM7* 和 5个下调基因为 *SHPRH*、*PML*、*MARK2*、*LIMA1*、*ANGPTL4*。应用 qRT-PCR 检测过表达 MAGE-A11 质粒前后 3 株乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 和 BT-549 中上述 10 个基因的表达情况, 结果(图2)显示, qRT-PCR 检测的各个 mRNA 的表达情况与基因芯片的结果具有一致性, 基因芯片中高表达的 *ZNF-451*、*CENPTJ*、*CDK13*、*API5* 和 *LMO7* mRNA 在验证结果中显著高于对照组 ($P < 0.01$), 低表达的 *SHPRH*、*PML*、*MARK2*、*LIMA1* 和 *ANGPTL4* mRNA 在验证结

果中显著低于对照组 ($P < 0.01$)。

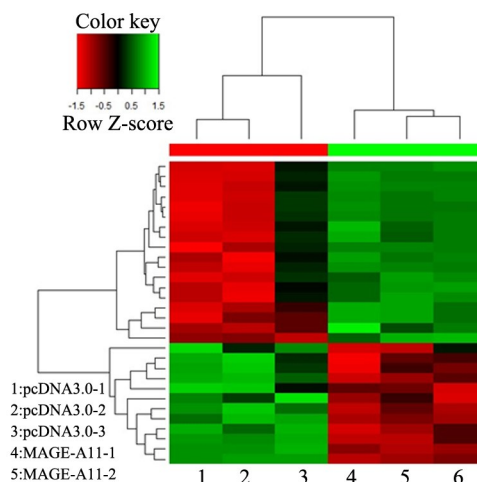


图1 乳腺癌细胞中31个代表性差异表达基因mRNA的聚类热图

Fig. 1 Heat-map of the top 31 differentially expressed mRNAs in breast cancer cells

表3 基因芯片筛选出的部分上调基因

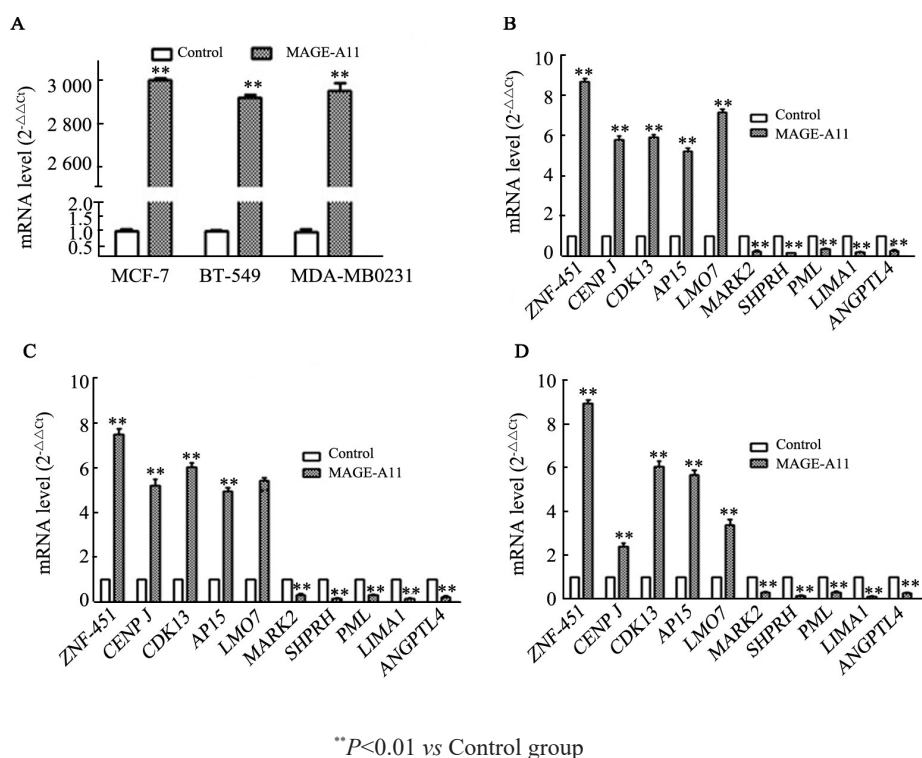
Tab.3 Up-regulated genes screened by gene chip

Gene	Absolute fold change	Chrom	Function
<i>TRIM28</i>	4.76	chr19	Post-transcriptional control
<i>ZC3H11A</i>	11.21	chr1	Unkown
<i>ZNF-451</i>	8.65	chr1	Proliferation
<i>PJA2</i>	7.35	chr5	Unkown
<i>SKP1</i>	2.77	chr5	Transcriptional control
<i>LMO7</i>	6.33	chr13	Proliferation,migration
<i>CENPJ</i>	5.71	chr13	Proliferation and induce apoptosis
<i>CDK13</i>	5.62	chr7	Proliferation and induce apoptosis
<i>API5</i>	5.22	chr11	Proliferation
<i>KIF2A</i>	2.20	chr5	Mitosis
<i>ZNF224</i>	5.05	chr19	Transcription factor
<i>ZFR</i>	4.42	chr5	Proliferation
<i>NUP88</i>	4.25	chr17	Cell cycle progression
<i>MKI67</i>	3.55	chr10	Proliferation
<i>RNF111</i>	3.31	chr15	Proliferation and metastasis
<i>MMP26</i>	2.67	chr11	Tumor invasion
<i>EGFR</i>	3.07	chr7	Proliferation
<i>USP28</i>	2.70	chr11	Proliferation and induce apoptosis
<i>MAGE-A3</i>	3.77	chrX	Unkown

表4 基因芯片筛选出的部分下调基因

Tab.4 Down-regulated genes screened by gene chip

Gene	Absolute fold change	Chrom	Function
<i>LARP4</i>	4.93	chr12	Inhibit migration and invasion
<i>LIMA1</i>	4.93	chr12	Inhibit migration
<i>SHPRH</i>	6.02	chr6	Tumor suppressor gene
<i>MTUS1</i>	5.70	chr8	Inhibit invasion and metastasis
<i>BRCA1</i>	4.16	chr17	Tumor supressor gene
<i>ANGPTL4</i>	3.34	chr19	Inhibit invasion
<i>PML</i>	2.78	chr15	Cell cycle
<i>CCNF</i>	2.92	chr16	Ubiquitination
<i>BCL2L12</i>	2.68	chr19	Anti-apoptotic cytokine
<i>MARK2</i>	3.91	chr11	Inhibit invasion
<i>DMTF1</i>	3.96	chr7	Cell cycle
<i>MAGE-A9B</i>	4.02	chrX	Unkown



A: qRT-PCR shows the transfection efficiency of MAGE-A11 expression plasmid in MCF-7, BT-549 and MBA-MB-231 cells; B-D: qRT-PCR shows the relative expression of *ZNF-451*, *CENP J*, *CDK13*, *API5*, *MARK2*, *LMO7*, *SHPRH*, *PML*, *LIM1* and *ANGPTL4* in MCF-7, BT-549 and MBA-MB-231 cells

图2 qRT-PCR验证乳腺癌细胞基因的差异性表达

Fig. 2 Differentially expressed genes in breast cancer cells validated by qRT-PCR

2.4 转染 MAGE-A11 提高乳腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力

CCK-8法检测结果(图3)显示,转染 MAGE-A11 组的乳腺癌细胞 MCF-7(图3A)、MDA-MB-231(图3B)和 BT-549(图3C)72 h 的增殖能力较对照组明显增强(均 $P < 0.01$),提示 MAGE-A11 对乳腺癌细胞增殖具有一定的促进作用。细胞划痕实验结果(图4)显示,培养 48 h 后与对照组相比,MCF-7、MDA-MB-231、BT-549 细胞转染 MAGE-A11 组的划痕出现明显

愈合($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明该组细胞迁移能力较强。Transwell 迁移实验结果(图5)显示,转染 MAGE-A11 组的乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 和 BT-549 穿膜细胞数比对照组增多(均 $P < 0.01$)。Transwell 侵袭实验结果(图6)显示,转染 MAGE-A11 组的乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 和 BT-549 穿膜数比对照组明显增多(均 $P < 0.01$)。上述结果表明转染 MAGE-A11 增加了乳腺癌细胞的侵袭和迁移能力。

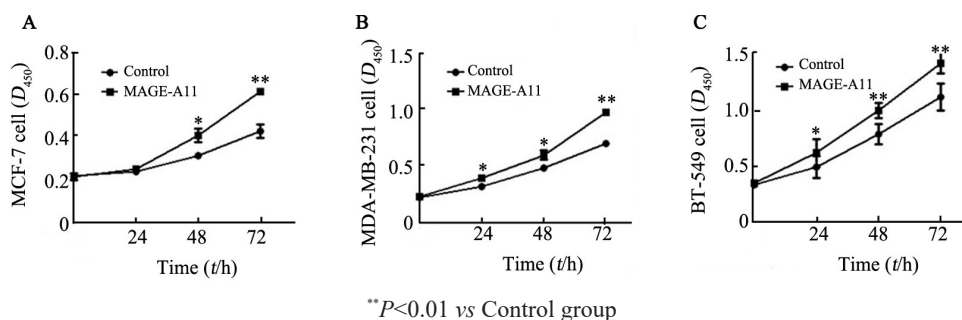


图3 过表达 MAGE-A11 对 MCF-7(A)、MDA-MB-231(B)和 BT-549(C)细胞增殖的影响

Fig.3 Effects of MAGE-A11 over-expression on proliferation of MCF-7(A), MDA-MB -231(B)and BT-549 (C)cells

3 讨论

MAGE-A11 在多种肿瘤组织中表达,包括前列腺癌,乳腺癌和脑胶质瘤等^[9-11]。本实验组前期实验

结果表明, MAGE-A11在乳腺癌组织中高表达, 其基因 mRNA 阳性表达率为 66.67%(40/60)并且与乳腺癌患者的预后呈正相关, 而具体的机制尚未阐明。

在本研究中, 通过对转染 MAGE-A11 质粒的乳腺癌细胞进行基因芯片筛选, 以期筛选出乳腺癌细胞中与 MAGE-A11 相关的下游靶基因。

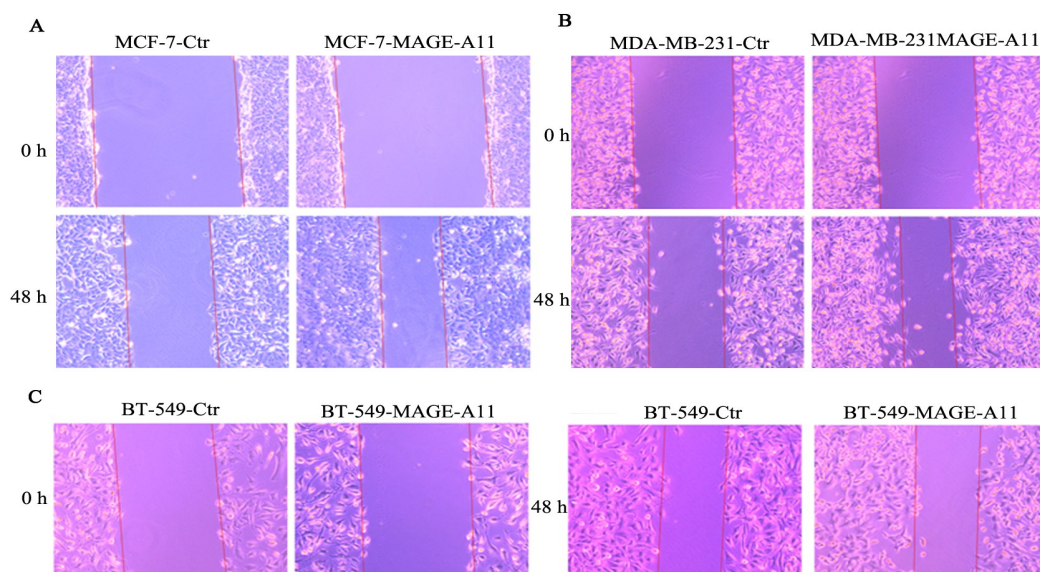
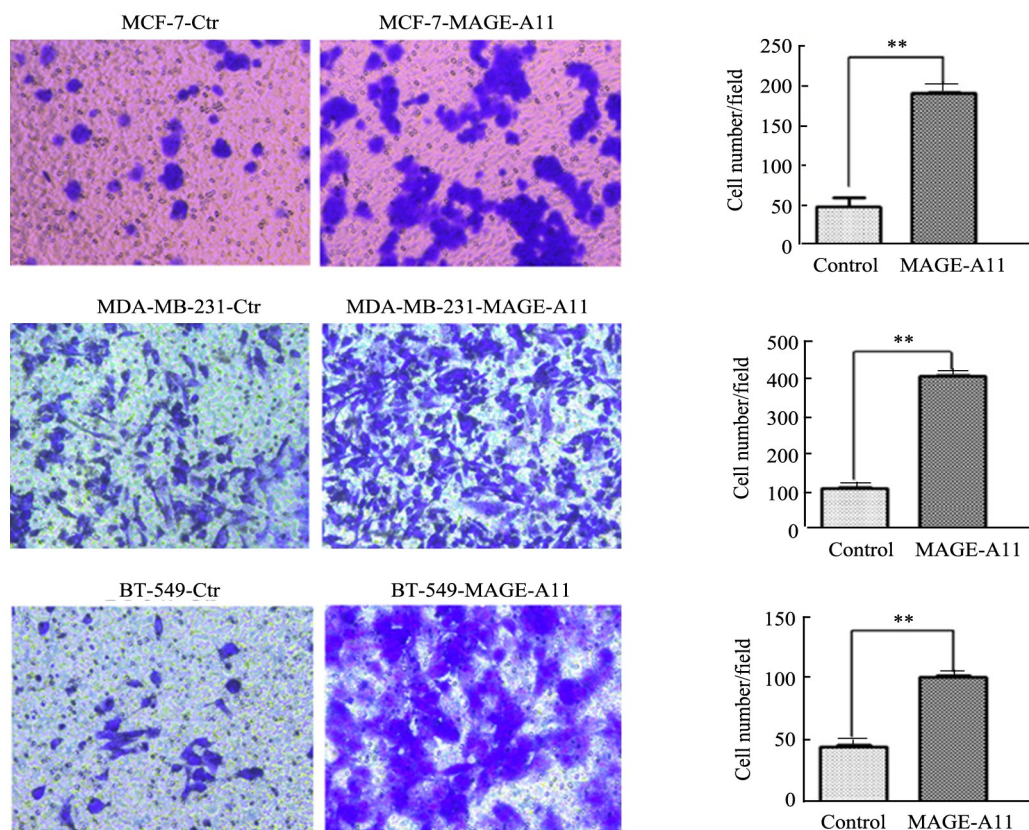


图4 细胞划痕实验检测过表达 MAGE-A11 对乳腺癌 MCF-7(A), MDA-MB-231(B)和 BT-549(C)细胞迁移的影响(姬姆萨染色, ×200)

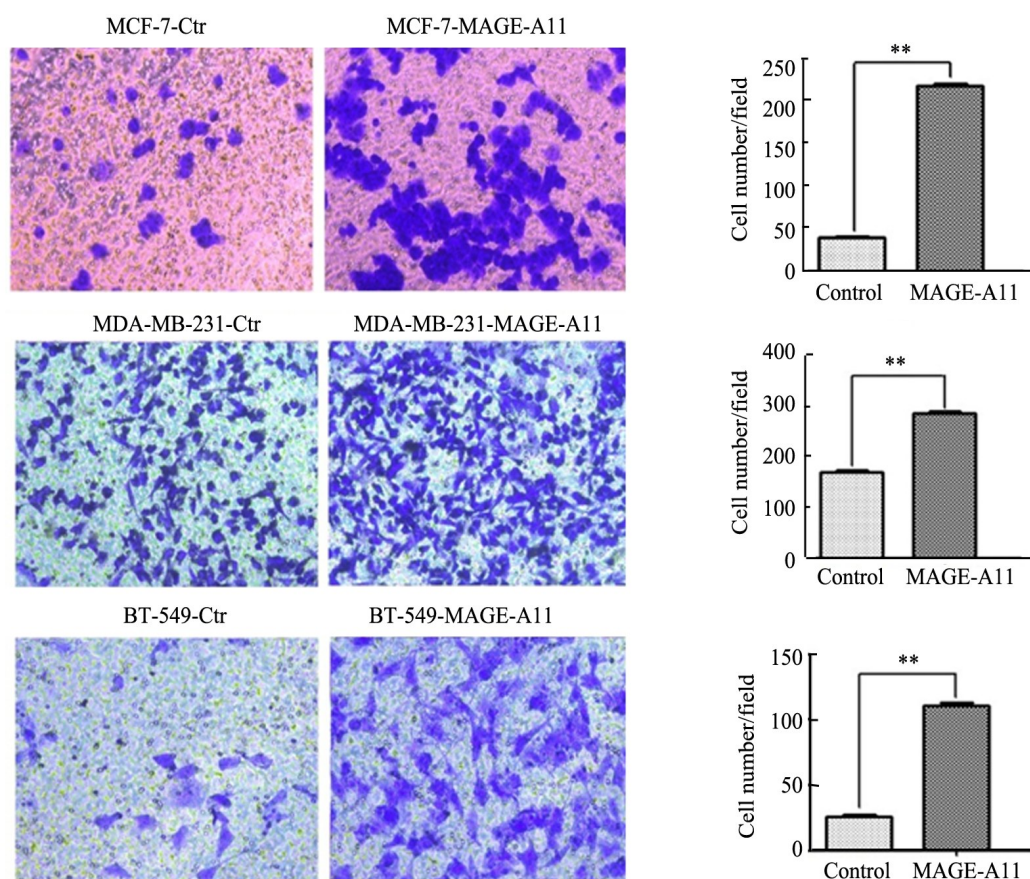
Fig.4 Effects of MAGE-A11 over-expression on migration of MCF-7(A), MDA-MB -231(B) and BT-549(C) cells by scratch wound healing assay (Giemsa staining, ×200)



**P<0.01 vs Control group

图5 Transwell 实验检测过表达 MAGE-A11 对乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 和 BT-549 细胞迁移的影响(姬姆萨染色, ×200)

Fig.5 Effects of MAGE-A11 over-expression on migration of MCF-7, MDA-MB -231 and BT-549 cells by Transwell assay (Giemsa staining, ×200)



** $P < 0.01$ vs Control group

图6 Transwell实验检测过表达MAGE-A11对乳腺癌MCF-7、MDA-MB-231和BT-549细胞侵袭的影响(姬姆萨染色, $\times 200$)

Fig.6 Effects of MAGE-A11 over-expression on invasion of MCF-7, MDA-MB-231 and BT-549 cells by Transwell assay.

(Giemsa staining, $\times 200$)

本研究首次通过基因芯片检测乳腺癌细胞中过表达MAGE-A11质粒前后差异表达的基因, 研究发现一共有1594个差异性表达的基因, 包括850个上调基因和744个下调基因。差异表达的基因主要涉及蛋白泛素化、细胞增殖和凋亡以及肿瘤侵袭和转移。代表性基因的功能在表3、4中展示。最近的研究^[12]表明, MAGEs与E3 RING泛素连接酶组合形成MAGE-RING连接酶(MRLs), 作为泛素化调节因子调控连接酶活性、底物特性和亚细胞定位。860个表达上调的基因中, 有部分基因与蛋白泛素化相关。ZNF451是一种SUMO E3泛素连接酶, ZNF451以SUMO修饰形式定位于早幼粒细胞白血病中, SENP1介导的去磷酸化可破坏其核定位^[13]。有研究^[14]报道, ZNF451作为SMAD3/4的转录辅阻遏物, 负向调控TGF- β 信号转导, 而TGF- β 抗增殖反应的失活可能与肿瘤的早期发生有关。本研究中ZNF451平均上调8.65倍。RNF111是含有RING结构域的E3泛素连接酶, CHEN等^[15]报道RNF111在非小细胞肺癌中高表达, 下调RNF111可以抑制TGF- β /Smad信号通路活

性以及抑制肿瘤细胞的侵袭。本研究中RNF111平均上调3.31倍。已有研究^[16]表明, 在体外和细胞中MAGEs可刺激TRIM28自身泛素化和其底物肿瘤抑制剂P53和ZNF382的泛素化, 以蛋白酶体依赖的方式降低p53和ZNF382的蛋白水平。MAGE-A3和其高度相似的蛋白MAGE-A6也可与TRIM28形成MAGE-A3/6-TRIM28复合物^[17]。MAGE-A3/6可直接与AMPK α 1相互作用, 并增强了AMPK α 1的泛素化和随后的蛋白酶体降解, 抑制自噬, 激活mTOR信号通路, 从而增强肿瘤的发生^[17]。本研究中TRIM28平均上调4.76倍。

表达上调的基因中, 有部分基因与细胞增殖和凋亡相关。CDK13编码的蛋白是细胞周期依赖的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员, 调控细胞周期。有研究^[18]显示, CDK13与肿瘤细胞的增殖有关, 而其基因的扩增可能是肿瘤发生的关键机制; 本研究中CDK13平均上调5.62倍。API5编码的蛋白最初被鉴定为凋亡抑制蛋白, 其表达可以抑制生长因子剥夺后的细胞凋亡^[19]。涉及API5的抗凋亡机制研究的很

少,但有研究^[20]表明,API5的过表达可促进宫颈癌细胞株CUC-6的细胞增殖;本研究中API5平均上调5.22倍。KIF2A编码的蛋白属于驱动蛋白13的微管解聚酶,研究^[21]报道,KIF2A在肺腺癌组织中过表达,同时沉默KIF2A的表达可以显著抑制肺腺癌细胞的增殖和抑制诱导细胞的凋亡;本研究中KIF2A平均上调2.20倍。

在表达上调的基因中,有部分基因与侵袭和转移相关。LIMA1(EPLIN)是一种细胞骨架蛋白,在肿瘤组织和细胞中表达均降低,其表达降低被认为与侵袭表型相关。而在体外实验中,LIMA1的表达下调促进了卵巢癌细胞的侵袭、黏附和转移^[22];本研究中LIMA1平均下调4.93倍。LMO7编码的蛋白包含一个LIM结构域的哺乳动物蛋白,在乳腺癌细胞MDA-MB-231中LMO7表达水平增高,在乳腺癌细胞的迁移和转移中发挥重要作用^[23];本研究中LMO7平均上调6.33倍。MARK2编码的蛋白属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的Par-1家族成员,XU等^[24]研究表明,过表达MARK2可以抑制Hela细胞的侵袭和迁移;本研究中MARK2平均下调3.91倍。

为了进一步证实MAGE-A11参与了肿瘤进展,本研究比较了三株乳腺癌细胞过表达MAGE-A11前后乳腺癌细胞增殖、侵袭和迁移的变化,结果表明,过表达MAGE-A11后促进了乳腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移。

本研究利用基因芯片技术筛选乳腺癌细胞中与MAGE-A11相关的基因,并进行了初步验证。通过阅读相关文献也证实了本研究中基因芯片检测结果的可信性,后续研究将在肿瘤组织中进行进一步验证,并对差异表达的基因进行功能试验,进一步阐明乳腺癌中MAGE-A11的分子机制,为乳腺癌的诊断和治疗提供试验数据和理论依据。

【参 考 文 献】

- [1] LIU S H, SANG M X, XU Y R, et al. Expression of MAGE-A1, -A9, -A11 in laryngeal squamous cell carcinoma and their prognostic significance: a retrospective clinical study[J]. *Acta Otolaryngol*, 2016, 136(5): 506-513. DOI: 10.3109/00016489.2015.1126856.
- [2] 谷丽娜, 桑梅香, 刘飞, 等. 黑素瘤相关抗原-A9和-A11在食管鳞状细胞癌组织中的表达及其临床意义[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2015, 22(5): 630-636. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2015,05,014.
- [3] WANG H Q, SANG M X, GENG C Z, et al. MAGE-A is frequently expressed in triple negative breast cancer and associated with epithelial-mesenchymal transition[J]. *Neoplasma*, 2016, 63(1): 44-56. DOI: 10.4149/neo_2016_006.
- [4] 谷丽娜, 桑梅香, 尹丹静, 等. 非小细胞肺癌组织中黑色素瘤相关抗原A家族部分成员的表达及其意义[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(6): 632-639. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.010.
- [5] BAI S, HE B, WILSON E M. Melanoma antigen gene protein MAGE-11 regulates androgen receptor function by modulating the interdomain interaction[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(4): 1238-1257. DOI:10.1128/MCB.25.4.1238-1257.2005.
- [6] EMILY B A, SUXIA B, AMANDA B P, et al. Androgen receptor regulation by histone methyltransferase suppressor of variegation 3-9 homolog 2 and melanoma antigen-A11[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 443(1): 42-51. DOI:10.1016/j.mce.2016.12.028.
- [7] SU S, CHEN X, GENG J, et al. Melanoma antigen-A11 regulates substrate-specificity of Skp2-mediated protein degradation[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 439(1): 1-9. DOI: 10.1016/j.mce.2016.10.006.
- [8] HOU S Y, SANG M X, GENG C Z, et al. Expressions of MAGE-A9 and MAGE-A11 in breast cancer and their expression mechanism [J]. *Arch Med Res*, 2014, 45(1): 44-51. DOI: 10.1016/j.arcmed.2013.10.005.
- [9] SU S, JOHN T M, GAIL G, et al. Proto-oncogene activity of melanoma antigen-A11 (MAGE-A11) regulates retinoblastoma-related p107 and E2F1 proteins[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(34): 24809-24824. DOI: 10.1074/jbc.M113.468579.
- [10] BAI S, WILSON E M. Epidermal growth factor-dependent phosphorylation and ubiquitinylation of MAGE-11 regulates its interaction with the androgen receptor[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(6): 1947-1963. DOI:10.1128/MCB.01672-07.
- [11] ASKEW E B, BAI S, HNAT A T, et al. Melanoma antigen gene protein-A11(MAGE-11) F-box links the androgen receptor NH2-terminal transactivation domain to p160 coactivators[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(50): 34793-34808. DOI:10.1074/jbc.M109.065979.
- [12] ANNA K L, PATRICK R P. A comprehensive guide to the MAGE family of ubiquitin ligases[J]. *J Mol Biol*, 2017, 429(8): 1114-1142. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.03.005.
- [13] KARVONEN U, JÄÄSKELAINEN T, RYTINKI M, et al. ZNF451 is a novel PML body- and SUMO-associated transcriptional coregulator[J]. *J Mol Biol*, 2008, 382(3): 585-600. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.07.016.
- [14] FENG Y, WU H, XU Y, et al. Zinc finger protein 451 is a novel Smad corepressor in transforming growth factor- β signaling[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(4): 2072-2083. DOI: 10.1074/jbc.M113.526905.
- [15] CHEN H, YANG T, LEI Z, et al. RNF111/Arkadia is regulated by DNA methylation and affects TGF- β /Smad signaling associated invasion in NSCLC cells[J]. *Lung Cancer*, 2015, 90(1): 32-40. DOI: 10.1016/j.lungcan.2015.07.010.
- [16] XIAO T Z, SUH Y, LONGLEY B J. MAGE proteins regulate KRAB zinc finger transcription factors and KAP1 E3 ligase activity [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 563(SI): 136-144. DOI:10.1016/j.abb.2014.07.026.
- [17] PINEDA C T, RAMANATHAN S, FON T K, et al. Degradation of AMPK by a cancer-specific ubiquitin ligase[J]. *Cell*, 2015, 160(4): 715-728. DOI: 10.1016/j.cell.2015.01.034.
- [18] KIM H, KIM D, LEE K J, et al. Frequent amplification of CENPF, GMNN and CDK13 genes in hepatocellular carcinomas[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43223[2018-06-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3418236/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0043223.

- [19] TEWARI M, YU M, ROSS B, et al. AAC-11, a novel cDNA that inhibits apoptosis after growth factor withdrawal[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(18): 4063-4069.
- [20] CHO H, CHUNG JY, SONG K H, et al. Apoptosis inhibitor-5 overexpression is associated with tumor progression and poor prognosis in patients with cervical cancer[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(6): 545-551. DOI: 10.1186/1471-2407-14-545.
- [21] XIE T, LI X, YE F, et al. High KIF2A expression promotes proliferation, migration and predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497(1): 65-72. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.02.020.
- [22] LIU R, MARTIN T A, JORDAN N J, et al. Epithelial protein lost in neoplasm- α (EPLIN- α) is a potential prognostic marker for the progression of epithelial ovarian cancer[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(6): 2488-2496. DOI: 10.3892/ijo.2016.3462.
- [23] HU Q, GUO C, LI Y, et al. LMO7 mediates cell-specific activation of the rho-myocardin-related transcription factor-serum response factor pathway and plays an important role in breast cancer cell migration[J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(16): 3223-3240. DOI: 10.1128/MCB.01365-10.
- [24] XU G, GE Y, TAO X, et al. MARK2 inhibits the growth of HeLa cells through AMPK and reverses epithelial-mesenchymal transition [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(1): 237-244. DOI: 10.3892/or.2017.5686.
- [收稿日期] 2018-05-10 [修回日期] 2018-07-21
[本文编辑] 王映红



·编委花絮·

庆祝本刊资深编委陈诗书教授九十华诞暨学术交流会圆满举行

2018年9月15日,在上海交通大学医学院成功举办了本刊资深编委陈诗书教授九十华诞暨学术交流活动。出席活动的有德高望重的学术前辈,医学院和基础医学院领导,生物化学与分子生物学会理事会领导,《生命的化学》、《中国肿瘤生物治疗杂志》、《生物化学与生物物理学报(ABBS)》、《生物化学与分子生物学报》和中国科学出版社的代表,以及陈教授国内外的弟子、好友等。陈教授在上海第二医科大学(现上海交通大学医学院)从事生物化学和分子生物学教学与科研工作长达四十多年,创建了我国医学领域第一个分子生物学博士点,是我国医学分子生物学领域学术研究的先驱者,于1992年率先在国内成立了第一家“人类基因治疗研究中心”,任上海生物化学和分子生物学会理事长。曾主持国家“863”生物医药重点项目相关课题研究,发表论文200余篇,并获得各类科技进步及成果奖近20项。作为教授、博士生导师,培养了50多名研究生,现分布于世界各地,并多有建树。

会议期间还开展了以“肿瘤研究最新进展”为主题的学术交流活动,邀请陈教授的97级博士生现任康奈尔大学 James Jamison 讲席教授钱书兵、88级博士生现为复旦大学分子免疫学教授朱乃硕、98级博士生现为上海交通大学医学院研究员糜军和99级博士生现为复旦大学附属肿瘤医院教授王建化等学者,分别作“From translation to translational study”、“肿瘤分子免疫治疗”、“微环境对肿瘤免疫的调控”和“微环境中肿瘤标志物检测的意义”等精彩的学术报告。

陈诗书教授1929年11月出生于福建,1949年就读圣约翰大学,1955年毕业于上海第二医学院,1955-1959年为北京医学院生物化学专业研究生,之后在上海第二医科大学(现上海交通大学医学院)从事生物化学和分子生物学教学与研究工作长达四十多年,创建了我国医学领域第一个分子生物学博士点,是卓越的生物化学和分子生物学家、优秀的学科领导人和前沿学科发展的倡导者。他作为《中国肿瘤生物治疗杂志》第一、二届编辑委员会委员,积极参加本刊的创刊工作,热心期刊建设,为本刊的建设发展作出了巨大的贡献。他于1978年荣获上海市先进科技工作者,1989年荣获全国优秀教师,1990年荣获上海市劳动模范,1991年享受国务院政府特殊津贴。

陈教授曾于20世纪80年代留学美国,在美国 Memorial Sloan Kettering 癌症中心、Rockefeller 大学及 Mount Sinai 医学中心进修学习,回国后即投入大学分子生物学学科和实验室建设,并担任分子生物学实验室和人类基因治疗研究中心主任,是上海市重点学科分子生物学的学术带头人,上海市免疫学研究所免疫生化研究室主任,于1992年率先在国内成立了第一家“人类基因治疗研究中心”。陈教授在分子免疫学、肿瘤分子生物学、基因诊断、基因治疗等方面取得了一系列出色的研究成果,是我国医学分子生物学领域科学研究的先驱者。

陈教授曾任上海生物化学和分子生物学会理事长,担任《生物化学与生物物理学报》、《中华微生物学与免疫学杂志》、《中国肿瘤生物治疗杂志》、《中国生物化学与分子生物学报》、《生命的化学》、《胃肠病学》等刊物编委,《肝脏》杂志特约编委;主编了《肿瘤与免疫》、《医学细胞与分子生物学》及《医学生物化学》等专著和教材。他也是一位优秀的教育家,为人低调,他倡导实事求是的科学精神和求真务实的学术作风,是学生们成长过程中学习的榜样和楷模。鹤发银丝映日月、丹心热血育新花,作为教授、博士生导师,他培养了50多名研究生现分布于世界各地,并多有建树。陈教授精湛的学术造诣、严谨的治学作风和高尚的为人风范是众多学生们终生学习的榜样,当载史册!

上海交通大学医学院基础医学院生物化学与分子细胞生物学系 糜军