

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.01.001

• 基础研究 •

A549 肺癌细胞株中癌睾丸抗原的表达及生物学意义研究*

岳芳桦^{1#} 初明^{1#} 史萃¹ 肖鹏¹ 冯嘉辉¹ 初正云² 陈雪¹ 王若琚¹ 刘晓妍¹
岑羽捷¹ 谢少华¹ 徐兰¹ 朱蕴兰¹ 裴军¹ 张明波² 翟艳君² 王月丹^{1△}

(1 北京大学医学部基础医学院 北京 100191; 2 辽宁中医药大学药学院 辽宁 沈阳 110032)

摘要 目的:癌睾丸抗原(cancer-testis antigen, CTA)是一类主要表达于睾丸组织和癌组织,并具有较强诱导体液和细胞免疫应答能力的抗原,可以作为抗肿瘤的理想靶分子。本研究探讨了 A549 肺癌细胞系中 CTA 的表达情况及其生物学意义。**方法:**本研究中选取了 A549 肺癌细胞株,运用 RT-PCR 的方法检测了其中九种常见 CTA 的表达情况,进一步通过 AV-PI 双染法观察了表柔比星,紫杉醇,卡铂,伊立替康,依托泊苷五种化疗药物对 A549 细胞的凋亡作用及其调控 CTA 表达的情况。另外用转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 处理 A549 细胞,验证了 TGF- $\beta 1$ 促进细胞生长的作用,进一步检测此时 CTA 的表达调控。**结果:**结果显示 MAGEA1, MAGEA3, MAGEC1, HCA661 在 A549 细胞系中稳定表达,表柔比星能够强烈诱导细胞发生凋亡,其诱导作用随浓度增高而增强。表柔比星下调了 MAGEA1, MAGEA3, MAGEC1 的表达,对 HCA661 的表达无影响。TGF- $\beta 1$ 增强了肿瘤细胞增殖能力,与此同时下调 HCA661 的表达,对 MAGEA1, MAGEA3, MAGEC1 的表达无影响。**结论:**MAGEA1, MAGEA3, MAGEC1, HCA661 在肺癌细胞系 A549 中稳定表达。TGF- $\beta 1$ 作用 48 小时,使 HCA661 的表达下调, MAGEA1, MAGEA3, MAGEC1 的表达无变化。表柔比星作用 48 小时,使 MAGEA1, MAGEA3, MAGEC1 的表达下调, HCA661 表达无影响,卡铂,紫杉醇,伊立替康,依托泊苷对 CTA 的表达无调控,为进一步明确 CTA 的表达调控机制奠定了研究基础,同时为将 HCA661 作为临床中诊断与治疗的新靶点提供了可行性。

关键词: 肺癌; 癌睾丸抗原; TGF- $\beta 1$; 表柔比星; 细胞凋亡**中图分类号:** R734.2, R392.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)01-1-06Cancer Testis Antigen Expression and Regulation of A549
and Biological Meaning*YUE Fang-hua^{1#}, CHU Ming^{1#}, SHI Cui¹, XIAO Peng¹, FENG Jia-hui¹, CHU Zheng-yun², CHEN Xue¹, WANG Ruo-jun¹,
LIU Xiao-yan¹, CEN Yu-jie¹, XIE Shao-hua¹, XU Lan¹, ZHU Yun-lan¹, PEI Jun¹, ZHANG Ming-bo², ZHAI Yan-jun², WANG Yue-dan^{1△}
(1 Department of Immunology, School of Basic Medicine, Peking University, Beijing, 100191, China;

2 Pharmacy department Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning, 110032, China)

ABSTRACT Objective: Cancer-testis antigens (CTA) are a series of antigens which mostly expressed in testis and cancer cells, and have strong capacity of inducing humoral and cellular immunity. They are promising as vaccine to tumor. In this investigation, we detect the expression and regulation of CT antigens in A549 cell line. **Methods:** Nine kinds of CT antigens are detected of their expression in A549 cell line using the method of RT-PCR. Also the role of TGF- $\beta 1$ and five kinds of chemotherapy medicine playing in the regulation of CT antigens is investigated. **Results:** The results show that MAGEA1, MAGEA3, MAGEC1, HCA661 express in A549 cell line. TGF- $\beta 1$ down-regulates the expression of HCA661, but has no effect on MAGEA1, MAGEA3 and MAGEC1. Epirubicin down-regulates the expression of MAGEA1, MAGEA3 and MAGEC1, but have no effect on HCA661. **Conclusion:** MAGEA1, MAGEA3, MAGEC1, HCA661 stably express in A549 lung cancer cell line. For 48 hours, TGF- $\beta 1$ down-regulate the expression of HCA661, MAGEA1, MAGEA3, MAGEC1, unchanged. Epirubicin down-regulate the expression of MAGEA1, MAGEA3 and MAGEC1, but it does not affect HCA661. Carboplatin, paclitaxel, irinotecan, etoposide have no CT antigen expression regulation. Our study laid the basis for further clarification of the mechanism of CTA expression regulation and provided feasibility of HCA661 as a new target for clinical diagnosis and treatment.

Key words: Lung cancer; Cancer-testis antigen; TGF- $\beta 1$; Epirubicin; Apoptosis

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81172884), 国家基础科学人才培养基金(J1030831/J0108);

北京大学创新人才培养计划, 北京大学医学部新教师启动基金项目(BMU0239)

作者简介: 岳芳桦(1987-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 肿瘤免疫

初明(1984-), 男, 讲师, 主要研究方向: 肿瘤免疫, 抗感染免疫

共同第一作者

△ 通讯作者: 王月丹, E-mail: wangyuedan@bjmu.edu.cn

(收稿日期: 2013-06-26 接受日期: 2013-07-13)

Chinese Library Classification(CLC): R734.2, R392.12 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2014)01-1-06

前言

近 50 年来,世界各国特别是工业发达国家,肺癌发病率和病死率迅速上升。目前,肺癌是全世界癌症死因的第一名。肺癌起源于支气管粘膜上皮,可向支气管腔内或邻近的肺组织生长,并可通过淋巴血行或经支气管转移扩散。肺癌分为两种基本类型:小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC)^[1],其中约 20 % 的肺癌患者属于 SCLC,该肿瘤进展快,常伴有内分泌异常或类癌综合征。根据临床表现,肺癌又分为:鳞形细胞癌,未分化癌,腺癌,肺泡细胞癌。近年来,尽管手术、化疗、放疗三大经典治疗手段在不断发展进步,肺癌的生存率并未得到明显提高^[2]。随着肿瘤免疫学和分子生物学的发展,寻找和鉴定肿瘤抗原并把它们作为肿瘤疫苗的理想靶点,这一直是肿瘤免疫治疗的重要方向。由于肿瘤抗原表达的局限性以及在肿瘤疫苗和肿瘤免疫治疗中的重要意义,肿瘤-睾丸抗原已经成为肿瘤研究的热点。

上世纪九十年代以来,随着免疫学和分子生物学检测技术的飞速发展,人们相继发现了一系列肿瘤抗原,其中最大的肿瘤抗原家族是肿瘤-睾丸抗原(cancer-testis antigens,CTA)。CTA 是一类可在多种肿瘤组织中表达,而在睾丸以外的其他正常组织中几乎不表达的抗原。由于生殖细胞缺乏 MHC 分子,因此其表达的 CTA 不会引起免疫反应,而表达于肿瘤细胞的 CTA 则能够被机体识别,从而引起特异性的免疫应答,这一特点使 CTA 成为肿瘤免疫治疗研究领域的一大热点^[3]。目前,人们已经发现了 44 种 CTA 家族,包含约 200 多种 CTA 基因。根据 CTA 是否定位在 X 染色体上,可将 CTA 基因分为两大类:X-CTA,定位于 X 染色体上,此类基因基本都是多基因家族,包括黑色素瘤抗原(melanoma antigen,MAGE)、G 抗原(G antigen,GAGE)、纽约食管鳞状细胞癌 1(New York esophageal squamous cell carcinoma 1,NY-ESO-1)等约 30 种基因或基因家族;Non X-CTA,定位在不同的常染色体上,如肌钙结合蛋白 1(troponin 1)等。

CT-X 抗原的表达在不同肿瘤里有很大区别。对肺癌中 CTA 的表达研究,目前主要集中在 MAGE-A、GAGE、BAGE、NY-ESO-1 和 SSX 家族。不同 CTA 在肺癌中的表达频率相差很大。研究发现,肺癌患者中 MAGE-3、SSX-4 的阳性率较高^[4]。Groeper 等^[5]发现 CTA 表达与肺癌的分期、病理类型、转移复发等密切相关,并可能与肿瘤的演进和恶化有关^[6]。Atanackovic 等^[7]率先报道通过接种 MAGE-A3 重组蛋白能够成功诱导细胞免疫应答。目前,CTA 的表达调控机制尚未明确,本课题组前期研究发现 DNA 甲基化可能在 CTA 的表达过程中起重要作用^[8-9]。同时发现,肿瘤细胞在增殖或凋亡的过程中,CTA 的表达频率会发生明显的改变。因此,在本研究中,我们应用 TGF- β 刺激肺癌细胞株 A549 增殖,观察在不同浓度 TGF- β 作用下细胞增殖情况,同时检测 CTA 在此过程中的表达变化情况。另外,我们选用 5 种临床中常用的化疗药物,通过不同的机制诱导 A549 细胞凋亡,观察 CTA 的表达情况,从而探讨 CTA 可能

的表达调控机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和样本

胎牛血清,DMEM 无血清培养基购自美国 Gibco 公司, Pen Strep, Trypsin-EDTA 购自美国 Life Technology 公司, TGF- β 1 购自美国 Peprotech 公司, Trizol 购自美国 invitrogen 公司, PCR Master Mix 购自北京天根生物科技有限公司, 逆转录试剂盒购自美国 Thermo 公司, 所有引物合成由北京诺赛基因公司完成, Annexin V / PI 双染法流式细胞分析试剂盒购自美国 Pharmingen 公司, 逆转录试剂盒购自美国 Fermentas 公司, CCK8 试剂盒购自庄盟生物。

1.2 细胞培养

A549 肺癌细胞系购置美国 ATCC 公司, A549 细胞的培养条件是 37 °C, 5 % CO₂, 并用含 10 % FBS 的 DMEM 培养液培养。待细胞汇合度达 90 % 时, 用 0.25 % EDTA 胰酶进行消化, 根据细胞的生长快慢按照一定比例传代培养。取生长对数期的细胞进行后续实验。

1.3 TGF- β 1 刺激 A549 细胞增殖

取对数生长期的 A549 细胞, 调整密度为 5×10^4 / mL, 移入 96 孔板中, 100 μ L / 孔。使用 CCK8 方法检测其生长情况, 按说明书操作, 在进行实验前 4 小时每孔加入 10 μ L CCK8 试剂, 测定 OD450 nm 吸光度值。根据数据绘制 A549 细胞及 TGF- β 1 刺激后的 A549 细胞生长曲线。取对数生长期的 A549 细胞移入 6 孔板培养, 细胞密度调整为 1×10^6 / mL。在各孔中加入不同剂量的 TGF- β 1, 使得培养液中 TGF- β 1 的终浓度分别为 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 15 ng/mL 和 20 ng/mL, 处理细胞 48 小时后收集细胞, 提取 mRNA, 通过 RT-PCR 的方法检测 CTA 的转录情况。

1.4 RT-PCR 检测 CTA 基因的转录情况

将细胞加入 1 mL 的 Trizol 试剂中提取 RNA, 按照 Fermentas kit 的说明书反转录制备 cDNA。引物序列参见表 1。引物工作液浓度为 10 μ mol / L, 在 12.5 μ L 反应体系(表 2)中进行 PCR。反应参数: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 20 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 共 28 个循环, 最后一个循环结束后, 72 °C 延伸 10 min。收集 PCR 产物, 在 1.0 % 琼脂糖凝胶中电泳, EB 显色, 凝胶成像仪记录结果, 并用软件进行条带分析。

1.5 化疗药物诱导 A549 细胞凋亡

取对数生长期的 A549 细胞移入 6 孔板培养, 细胞密度调整为 1×10^6 / mL。在各孔中加入不同剂量的化疗药物, 包括表柔比星, 紫杉醇, 卡铂, 伊立替康和依托泊苷, 使得培养液中化疗药物的终浓度为 1 μ g / mL, 处理细胞 24 小时后收集细胞, 提取 mRNA, 通过 RT-PCR 的方法检测 CTA 的表达情况。

1.6 流式细胞术检测凋亡

使用五种化疗药物处理细胞 24 小时后, 取单细胞悬液, 用 $1 \times$ Binding Buffer 将细胞调整至 1×10^6 / mL, 取 100 μ L 转至 5 mL 流式管中, 分别加入 5 μ L 的 AV-FITC 和 10 μ L PI 溶

表 1 PCR 引物序列及产物长度
Table 1 Sequence and size of product

Gene	Sequence	Size of product (bp)
MAGEC1/CT7	F: GACGAGGATCGTCTCAGGTCAGC R: ACATCCTCACCTCAGGAGGG	631
MAGEC2	F: CGGATCGAAGGCATTTGTGAG R: GTGAACTCACGGGCTCTCTTGAG	883
MAGEA3	F: GAAGCCGGCCCAGGCTCG R: GGAGTCCTCATAGGATTGGCT	422
SSX2	F: GTGCTCAAATACCAGAGAAGATC R: TTTTGGGTCCAGATCTCTCGTG	434
NY-ESO-1	F: CGCCTGCTTGAGTTCTACCT R: GTCAGTCGGATAGTCAGTATGTTG	158
SLLP-1	F: CCAGTGAGGCCAAGCTCTAC R: TGGGTTATCTTCATGGCACA	305
SSX-1	F: GTTTCAAAGTCACCCTCCC R: TGCTTCTGACACTCCCTTC	203
MAGEA1	F: CGGCCGAAGGAACCTGACCCAG R: GCTGGAACCCTCACTGGGTTGCC	421
HCA661	F: ATGGACGAGAACCAGACCAG R: CCCAGACCTTCATGGAAGA	307
GADPH	F: TGGGTGTGAACACGAGAA R: TGGGTGTGAACACGAGAA	452
E-cadherin	F: GGGTGACTACAAAATCAATC R: GGGGGCAGTAAGGGCTCTTT	135
β -actin	F: CTCCATCCTGGCCTCGCTGT R: CTCCATCCTGGCCTCGCTGT	452

表 2 PCR 反应体系
Table 2 PCR reaction system

cDNA	0.5 μ L
Forward Primer	0.25 μ L
Reverse Primer	0.25 μ L
Mix-Tag	6.25 μ L
ddH ₂ O	5.25 μ L
Total	12.5 μ L

液。混匀细胞,避光孵育 30min 后,加入 400 μ L 的 1 $\times$ Binding Buffer。30 分钟内用流式细胞仪检测。

2 结果

2.1 CTA 在 A549 细胞系中的表达

我们使用 PCR 方法检测 9 种主要的癌睾丸抗原在 A549 细胞系中表达情况,分别为 SSX1、SSX2、MAGEC2、NY-ESO-1、SLLP-1、HCA661、MAGEA1、MAGEC1、MAGEA3。表达情况如图 1,其中 HCA661、MAGEA1、MAGEC1、MAGEA3 在 A549 细胞系中有稳定表达。

2.2 TGF- β 1 对 A549 细胞株生长状况及 CTA 基因表达的调节

TGF- β 1 抑制正常上皮细胞生长,而促进多种实体瘤生长,本实验中我们使用浓度为 20 ng/mL 的 TGF- β 1 处理 A549 细

胞株检测其生长情况,接着分别使用 1 ng/mL,5 ng/mL,10 ng/mL,15 ng/mL,20 ng/mL 的 TGF- β 1 处理细胞 48 小时检测 A549 细胞系 CTA 表达情况(图 2),可以看到 TGF- β 1 对 A549 细胞有明显的促增殖作用,而在不同浓度 TGF- β 1 作用下 MAGEA1、MAGEC1、MAGEA3 的表达并无影响,但对 HCA661 的表达存在下调作用,并随着 TGF- β 1 浓度的升高,下调作用加强。

2.3 化疗药物对 A549 细胞 CTAs 表达的影响

表柔比星,卡铂,紫杉醇,伊立替康,依托泊苷是临床常用五种化疗药物,作用机制不尽相同,但都通过诱导细胞凋亡发挥作用。经表柔比星,卡铂,紫杉醇,伊立替康,依托泊苷处理 48 小时后,细胞凋亡情况如图 3(A),只有表柔比星处理的细胞出现大量凋亡,说明表柔比星有强烈诱导细胞凋亡的作用。

随着表柔比星浓度的升高,细胞出现大量早期和中晚期凋亡,如图3(B)。表柔比星,卡铂,紫杉醇,伊立替康,依托泊苷五种化疗药物处理 A549 细胞系 48 小时后 CTA 表达情况如图 3(A),表柔比星对 MAGEA1, MAGEC1, MAGEA3 的表达都存在比较明显下调,但对 HCA661 的表达不起作用,其他化疗药物对 CTA 的表达无影响。而使用不同浓度表柔比星处理 A549 细胞后观察 HCA661 表达情况如图 3(B),发现其对 HCA661 表达调控不起作用,不具有浓度依赖性。

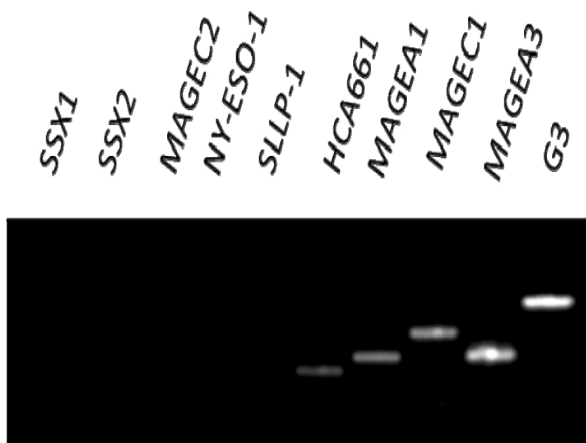


图 1 检测 9 种 CTA 在 A549 细胞系中的表达情况

Fig.1 Expression file of 9 CTA genes in A549 cells

3 讨论

近年来肺癌发病人数和病死率不断增加,虽然各种治疗手段不断改进但肺癌病人生存率并未见改善。免疫治疗为癌症的治疗带来了曙光,CTA 作为近年来发现的肿瘤特异性抗原在多种组织来源的肿瘤细胞中表达,但在正常组织中的表达仅限于睾丸的生殖细胞或胎盘细胞中。由于生殖细胞不表达人白细胞抗原(HLA)分子以及血-睾丸屏障的存在,所以 CTA 在产生肿瘤免疫时不会对正常组织及生殖细胞产生损伤作用^[10]。利用 CTA 免疫治疗手段能够特异地识别肿瘤细胞,是一种理想的抗肿瘤治疗措施。然而 CTA 表达的差异性限制了其免疫治疗的效果。

转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 是属于一组新近发现的调节细胞生长和分化的 TGF- β 超家族。TGF- β 能使正常的成纤维细胞的表型发生转化,在表皮生长因子(EGF)同时存在的条件下,改变成纤维细胞中增殖生长特性而获得在琼脂中生长的能力,并失去生长中密度依赖的抑制作用。TGF- β 是由两个结构相同或相近的、分子量的 12.5 kDa 亚单位借二硫键连接的双体。TGF- β 1、 β 2 和 β 3 功能相似,一般来说,TGF- β 对间充质起源的细胞超刺激作用,而对上皮或神经外胚层来源的细胞起抑制作用。机体多种细胞均可分泌非活性状态的 TGF- β ,活化后 T 细胞或 B 细胞产生 TGF- β 水平比静止细胞明显为高,而几乎所有肿瘤细胞内可检测到 TGF- β mRNA。近年来发现 TGF- β 对细胞的生长、分化和免疫功能都有重要的调节作用^[11]。

临床常用化疗药物表柔比星,卡铂,紫杉醇,伊立替康,依

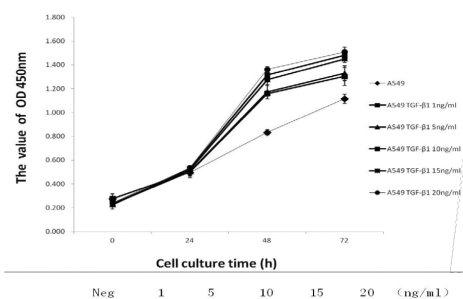


图 2 TGF- β 1 对 A549 细胞株 CTA 基因表达的调节

TGF- β 1 处理 A549 后 CTA 表达情况,从左至右各组如下:未处理的 A549 细胞;1 ng/mL 组;5 ng/mL 组;10 ng/mL 组;15 ng/mL 组;20 ng/mL 组
Fig.2 Effect of TGF- β 1 on the expression of CTA genes in A549 cell line detected by RT-PCR

Effect of TGF- β 1 on the expression of CTAs in A549 cells, groups: left to right Untreated A549 cells; Treated with TGF- β 1 ng/ml; Treated with TGF- β 5 ng/mL; Treated with TGF- β 10 ng/ml; Treated with TGF- β 15 ng/mL; Treated with TGF- β 20 ng/mL.

托泊苷通过不同途径产生细胞毒作用,引起凋亡。

在本研究中,我们利用肺癌细胞系 A549 进行研究,A549 细胞最早由 D.J. Giard 等从一 58 岁的肺癌患者组织中建系得到的^[12]。我们首先对肺癌细胞系 A549 中 CTA 的表达情况进行初步检测,结果显示在 A549 细胞系中 MAGEA1, MAGEA3, MAGEC1 和 HCA661 稳定表达,特别是 HCA661,其作为 DP 家族的新成员,基因定位于 X 染色体,特异性表达于 A549 细胞系,具有与转录因子 E2F 结合作用^[13],抑制 E2F 蛋白的转录活性进而影响肿瘤增殖的生物学功能,这些特点使得 HCA661 在肺癌的免疫治疗方面具有重要意义。

我们通过 TGF- β 1 刺激 A549 细胞 48 小时后发现 MAGEA1, MAGEA3 和 MAGEC1 的表达无明显变化,但 HCA661 的表达有所下调,提示 TGF- β 1 在促进肿瘤细胞增殖的过程中抑制了 HCA661 的表达。HCA661 又称为 TFDP3,是 DP 家族的重要成员,其能通过与 TFDP1 和 TFDP2 竞争性的结合 E2F,抑制 E2F 的转录活性,影响细胞周期的进程,进而抑制细胞的增殖^[14-16]。这也为研究 TGF- β 1 在肿瘤发生发展中的作用提供了新的研究思路。众所周知,TGF- β 1 首先与 TGF β R2 结合,形成复合物后诱导 TGF β R2 磷酸化,随后 Smads 亦被磷酸化并诱导其复合物转至细胞核内^[17,18]。当其功能发生异常时,将会影响 TGF- β 信号的传导,从而导致肿瘤的发生。但 TGF- β 1 在肿瘤发生的早期阶段也可以诱导肿瘤细胞发生凋亡,所以 TGF- β 与肿瘤的确切关系有待进一步的研究。从本实验结果来看,TGF- β 1 抑制 HCA661 的表达进而上调 E2F 蛋白的转录活性,可能是促进肿瘤增殖的一条重要途径。

此外,我们还选用了临床中常用的 5 种化疗药物诱导

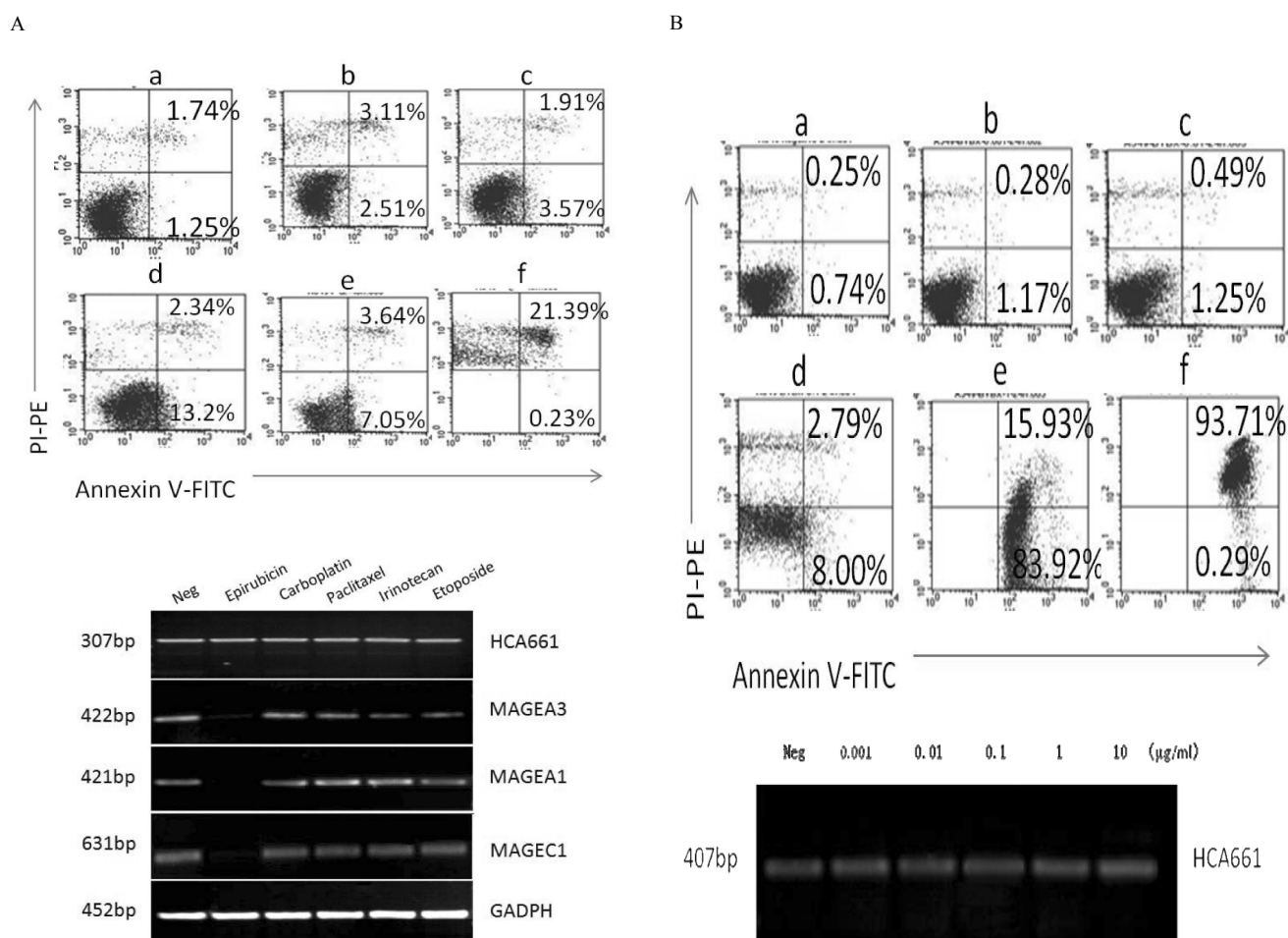


图3 化疗药物对 A549 细胞株 CTAs 表达的调节

A. 五种化疗药物处理 A549 细胞 48 小时后细胞凋亡情况, a 阴性对照 b 伊立替康 c 依托泊苷 d 卡铂 e 紫杉醇 f 表柔比星, 化疗药物处理 A549 后 CTA 表达情况, 从左至右各组如下: 对照, 表柔比星, 卡铂, 紫杉醇, 伊立替康, 依托泊苷; B. 不同浓度表柔比星分别处理 A549 细胞后凋亡情况, a 阴性对照, b 0.001 μg/mL, c 0.01 μg/mL, d 0.1 μg/mL, e 1 μg/mL, f 10 μg/mL, 不同浓度表柔比星处理后 HCA661 表达情况。

Fig.3 Effect of chemotherapy drugs on the expression of CTAs in A549 cell line

A. Apoptosis of A549 cells after treated with five chemotherapy drugs in 48 hours, a. negative control, b. Irinotecan, c. Etoposide, d. Carboplatin, e. Taxol, f. Epirubicin, effect of five chemotherapy drugs on the expression of CTAs in A549 cells, from left-to-right groups as follows: control, Epirubicin, Carboplatin, Paclitaxel, Irinotecan and Etoposide; B. A549 cells apoptosis after treated with different concentrations of epirubicin, a. negative control, b. 0.001 μL/mL, c. 0.01 μL/mL, d. 0.1 μL/mL, e. 1 μL/mL, f. 10 μL/mL, effect of Epirubicin on the expression of HCA661 in A549 cells.

A549 细胞凋亡, 探讨在细胞凋亡过程中 CTA 的表达变化情况。研究发现, A549 细胞仅对表柔比星敏感, 而对其他四种化疗药物呈现耐药的状态。表柔比星是一种临床上应用较广泛的化疗药物, 目前研究主要认为表柔比星可通过嵌入 DNA 双螺旋的大沟内, 并与 DNA 碱基及磷酸骨架形成多对氢键, 促使细胞 DNA 的转录和复制过程出现紊乱, 进而诱导肿瘤细胞凋亡^[19]。我们采用不同剂量的表柔比星刺激 A549 细胞 24 小时后发现 MAGEA1, MAGEC1, MAGEA3 的表达有明显的下调, 而 HCA661 的表达没有出现明显的变化, 这是由于 HCA661 基因序列中没有表柔比星可以插入的位点, 因此其转录不会被抑制^[20]。另外, HCA661 的稳定表达, 使其能够结合 E2F, 抑制 E2F 通过 AKT 信号通路调控细胞凋亡的能力, 从而辅助表柔比星诱导细胞凋亡。

本实验通过对肺癌细胞系 A549 细胞中 CTA 表达调控的研究, 发现肺癌中稳定表达 4 种 CTA, 包括 MAGEA1, MAGEA3, MAGEC1 和 HCA661, 其中 HCA661 在细胞增殖及细胞凋亡

的过程中均发挥重要的作用。该研究为进一步明确 CTA 的表达调控机制奠定了研究基础, 同时为将 HCA661 作为临床中诊断与治疗的新靶点提供了可行性。

参考文献(References)

- [1] Travis WD, Rekhtman N. Pathological diagnosis and classification of lung cancer in small biopsies and cytology: strategic management of tissue for molecular testing[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2011, 32(1): 22-31
- [2] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-300
- [3] Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy[J]. Cancer Sci, 2009, 100(11): 2014-2021
- [4] Kim YD, Park HR, Song MH, et al. Pattern of cancer/testis antigen expression in lung cancer patients [J]. Int. J. Mol. Med., 2012, 29(4): 656-662
- [5] Shigematsu Y, Hanagiri T, Shiota H, et al. Clinical significance of can-

- cer/testis antigens expression in patients with non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer-j. Iaslc., 2010, 68(1): 105-110
- [6] Gure AO, Chua R, Williamson B, et al. Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer[J]. Clin. Cancer Res., 2005, 11(22): 8055-8062
- [7] Atanackovic D, Altorki NK, Cao Y, et al. Booster vaccination of cancer patients with MAGE-A3 protein reveals long-term immunological memory or tolerance depending on priming[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(5): 1650-1655
- [8] Adair SJ, Hogan KT. Treatment of ovarian cancer cell lines with 5-aza-2'-deoxycytidine upregulates the expression of cancer-testis antigens and class I major histocompatibility complex-encoded molecules[J]. Cancer Immunol Immunother, 2009, 58(4): 589-601
- [9] Karpf AR. A potential role for epigenetic modulatory drugs in the enhancement of cancer/germ-line antigen vaccine efficacy[J]. Epigenetics, 2006, 1(3): 116-120
- [10] Fijak M, Meinhardt A. The testis in immune privilege [J]. Immunol. Rev., 2006, 213: 66-81
- [11] Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression [J]. Trends Immunol., 2010, 31(6): 220-227
- [12] Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors[J]. J Natl Cancer Inst, 1973, 51(5): 1417-1423
- [13] Sun HX, Xu Y, Yang XR, et al. Hypoxia inducible factor 2 alpha inhibits hepatocellular carcinoma growth through the transcription factor dimerization partner 3/E2F transcription factor 1-dependent apoptotic pathway[J]. Hepatology, 2013, 57(3): 1088-1097
- [14] Qiao H, Di Stefano L, Tian C, et al. Human TFDP3, a novel DP protein, inhibits DNA binding and transactivation by E2F[J]. J. Biol. Chem., 2007, 282(1): 454-466
- [15] Milton A, Luoto K, Ingram L, et al. A functionally distinct member of the DP family of E2F subunits[J]. Oncogene, 2006, 25(22):3212-3218
- [16] Tian C, Lv D, Qiao H, et al. TFDP3 inhibits E2F1-induced, p53-mediated apoptosis [J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2007, 361(1): 20-25
- [17] Massague J. TGF-beta signal transduction [J]. Annu. Rev. Biochem., 1998, 67: 753-791
- [18] Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins [J]. Nature, 1997, 390(6659): 465-471
- [19] Forrest RA, Swift LP, Rephaeli A, et al. Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation[J]. Biochem. Pharmacol., 2012, 83(12): 1602-1612
- [20] Chaires JB, Fox KR, Herrera JE, et al. Site and sequence specificity of the daunomycin-DNA interaction [J]. Biochemistry-us, 1987, 26(25): 8227-8236

(上接第 122 页)

- [2] Osswald BR, Tochtermann U, Schweiger P, et al. Does the completeness of revascularization contribute to an improved early survival in patients up to 70 years of age[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2001, 49(6): 373-377
- [3] Guo Yong-he, Zhou Yu-jie, Zhao Ying-xin, et al. Effect of incomplete revascularization strategy by percutaneous coronary intervention on the outcome and prognosis in aged patients with multivessel coronary artery disease[J]. Chinese Journal of Interventional Cardiology, 2012, 20(1): 9-11(In Chinese)
- [4] Han Ya-lin. Complete or incomplete revascularization evaluation of clinical efficacy[J]. Chinese Circulation Journal, 2010, 25(6): 403-404(In Chinese)
- [5] Gao Chang-qing, Li Bo-jun, Xiao Cang-song, et al. Comparative study on off-pump versus on-pump coronary artery bypass grafting in elderly patients[J]. Chin J Thorac Cardiovasc Surg, 2002, 18(3): 150-152(In Chinese)
- [6] Gao Chang-qing, Zhang Tao, Li Bo-jun, et al. Relationship between stenosis of left anterior descending artery and left internal mammary artery[J]. Chin J Surg, 2003, 41(11): 820-822(In Chinese)
- [7] Kozower BD, Moon MR, Barner HB, et al. Impact of complete revascularization on long-term survival after coronary artery bypass grafting in octogenarians[J]. Ann Thorac Surg, 2005, 80(1): 116-117
- [8] De Maria RJ, Repossini A, Dabdoob W, et al. Myocardial perfusion imaging evidence of functionally complete revascularization by minimally invasive direct coronary artery bypass in 2-vessel coronary artery disease[J]. Nucl Cardiol, 2007, 14(6): 860-868
- [9] Dong Ran, Cheng Bao-tian, Liu Tao-shuai, et al. Coronary artery bypass grafting in octogenarians[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(11): 2089-2091
- [10] Cohen DJ, Hout BV, Serruys PW, et al. Quality of life after PCI with drug-eluting stents or coronary-artery bypass surgery [J]. N Engl J Med, 2011, 364(11): 1016-1026
- [11] Park SJ, Kim YH, Park DW, et al. Randomized trial of stents versus bypass surgery for left main coronary artery disease[J]. N Engl J Med, 2011, 364(18): 1718-1727
- [12] Bojar RM. Manual of perioperative care in adult cardiac surgery, 5th ed. Chichester, WILEY-BLACWELL, Ltd, 2011, chapt 11: 437-440
- [13] Wu Qing-yu, Xu Jian-ping, Gao Chang-qing, et al. Coronary artery bypass grafting guide [J]. Chin J Surg, 2006, 11 (22): 1517-1524 (In Chinese)
- [14] Gianoli M, Formica F, Ferro O, et al. The early outcome in patients undergoing off-pump coronary artery bypass grafting: our experience [J]. Ital Heart J, 2005, 6(8): 640-646
- [15] Massoudy P, Thielmann M, Lehmann N, et al. Impact of prior percutaneous coronary intervention on the outcome of coronary artery bypass surgery: A multicenter analysis[J]. The Thoracic and Cardiovascular Surgeon, 2009, 137: 840-845