

拓扑替康对 HPB-AM 细胞 MAGE 基因表达的影响

雷琦¹,唐锁勤¹,王天有²

(1. 解放军总医院小儿内科,北京 100853; 2. 首都儿科研究所,北京 100020)

[摘要] 目的 探讨抗肿瘤新药拓扑替康(TPT)对T细胞淋巴瘤系HPB-AM细胞株黑色素病抗原(MAGE)基因表达的影响。方法 以T细胞淋巴瘤系HPB-AM细胞株为研究对象,采用RT-PCR方法检测TPT作用不同时间、不同浓度时对HPB-AM细胞株MAGE基因表达的影响。结果 以0.05 μmol/L, 0.10 μmol/L, 0.15 μmol/L和0.20 μmol/L终浓度的TPT作用于HPB-AM细胞,作用12 h后检测MAGE mRNA,随着TPT浓度的增加,MAGE-3 mRNA和MAGE-4 mRNA的表达水平均明显下调,实验组与空白对照组相对表达量比较,在浓度为0.10、0.15和0.20 μmol/L的TPT作用后差异具有显著性意义($P<0.05$)。用浓度0.10 μmol/L的TPT作用于HPB-AM细胞系,作用4、8、12、16 h后检测MAGE mRNA,随着TPT作用时间增长,MAGE-3 mRNA和MAGE-4 mRNA的表达水平明显下调。作用12 h和16 h后,实验组与空白对照组相对表达量比较差异具有显著性意义($P<0.05$)。结论 拓扑替康能抑制HPB-AM细胞中MAGE mRNA的表达,且呈剂量和时间依赖性。

[中国当代儿科杂志,2009,11(8):679-682]

[关键词] MAGE;拓扑替康;HPB-AM细胞

[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)08-0679-04

Effect of topotecan on MAGE gene expression of HPB-AM cells

LEI Qi, TANG Suo-Qin, WANG Tian-You. Department of Pediatrics, General Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100853, China (Tang S-Q, Email:suoqin@yahoo.com)

Abstract: Objective To investigate whether topotecan, a novel anti-tumor agent, down-regulates gene expression of melanoma antigen-encoding (MAGE) in HPB-AM cells. **Methods** MAGE mRNA expression of HPB-AM cells was detected by RT-PCR 4, 8, 12 and 16 hrs after different concentrations (0.05, 0.10, 0.15 and 0.20 μmol/L) of topotecan treatment. **Results** MAGE mRNA expression of HPB-AM cells decreased with increasing concentrations of topotecan 12 hrs after treatment. The MAGE mRNA expression of HPB-AM cells treated by 0.10, 0.15 and 0.20 μmol/L of topotecan was significantly lower than that in the blank control group ($P<0.05$). MAGE mRNA expression of HPB-AM cells was significantly reduced in a time-dependent manner after 0.10 μmol/L of topotecan treatment. The MAGE mRNA expression of HPB-AM cells treated by 0.10 μmol/L of topotecan was significantly lower than that in the blank control group 12 and 16 hrs after treatment ($P<0.05$). **Conclusions** Topotecan is capable of inhibiting the expression of MAGE mRNA of HPB-AM cells in a time- and dose-dependent manner. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (8):679-682]

Key words: MAGE; Topotecan; HPB-AM cell

黑色素瘤抗原(melanoma antigen-encoding, MAGE)是第一个从黑色素瘤中发现的一组肿瘤相关性抗原(tumor-associated antigen, TAA)^[1]。人类MAGE基因家族编码的肿瘤排斥抗原(tumor rejection antigen, TRA)在细胞内经加工产生抗原肽,并与HLA-I类分子结合形成复合物,能诱导自体细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxicity T lymphocyte, CTL)特异性识别,诱导其对相应肿瘤细胞的特异性杀伤。MAGE基因在大多数肿瘤组织中都有较高表达,但在正常组织中(睾丸和胚胎组织除外)均不表达,因

而它可以作为肿瘤特异性诊断和免疫治疗的理想靶位。目前已经有MAGE-1、MAGE-3等疫苗试用于多种肿瘤的临床治疗,并取得了较好的临床效果^[2]。拓扑替康(topotecan, TPT)是新一代的DNA拓扑异构酶I(topoisomerase I, Topo I)抑制剂,通过与DNA/拓扑异构酶I聚合物形成稳定的共价复合物来发挥其抗肿瘤作用。它不仅具有较好的选择性和独特的作用位点,而且抗癌谱广,不易产生多药耐药^[3]。近来发现它对多种难治性实体肿瘤尤其对部分血液系统肿瘤有效^[4],单用TPT治疗复发、难

[收稿日期]2008-12-24;[修回日期]2009-02-18
[基金项目]国家高技术研究发展计划(863)资助(No:2007AA021004)。
[作者简介]雷琦,女,硕士,医师。主攻方向:儿童血液肿瘤疾病。
[通讯作者]唐锁勤,男,主任医师,解放军总医院小儿内科,邮编:100853。

治非霍奇金淋巴瘤有效率达40%^[5]。虽然TPT在治疗白血病、淋巴瘤等恶性血液病的临床实验中已显示了明显的抗肿瘤活性,但对其作用的分子机制尚不清楚。TPT对淋巴瘤细胞的作用及其与MAGE基因之间的关系有待探讨。本研究旨在探讨TPT对淋巴瘤细胞株HPB-AM的MAGE基因表达的影响,为进一步了解拓扑替康对肿瘤细胞的作用机制,提高拓扑替康的临床疗效提供有意义的实验资料。通过预试验我们检测出HPB-AM细胞表面表达MAGE-3和MAGE-4基因。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

选取T细胞淋巴瘤细胞系HPB-AM,用含10%胎牛血清(fetal calf serum,FCS),100 U/mL青霉素,100 μg/mL链霉素的RPMI 1640培养基,于37℃、5% CO₂饱和湿度恒温培养箱中培养,传代。实验用对数生长期细胞,台盼蓝拒染率在95%以上。

1.2 PCR引物设计

MAGE引物根据文献^[6],MAGE-3序列为Sense:5'-TGG AGG ACC AGA GGC CCC C-3',antisense:5'-GGA CGA TTA TCA GGA GGC CTG C-3'(725 bp);MAGE-4序列为:sense:5'-GAG CAG ACA GGC CAA CCG-3',antisense:5'-AAG GAC TCT GCG TCA GGC-3'(446 bp);内参照GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)引物根据文献设计^[7],序列为:sense:5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3',antisense:5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'(87 bp),均由北京赛百盛公司合成。

1.3 TPT对HPB-AM细胞MAGE基因mRNA表达的影响

取对数生长期的HPB-AM细胞悬浮于含10%FBS血清,不含抗生素的RPMI 1640培养液中,接种于96孔培养板中。每组设4个平行孔,每孔200 μL(含5×10⁴个细胞),置37℃,5% CO₂孵箱培养24 h。实验组分别加入浓度为0.05 μmol/L,0.10 μmol/L,0.15 μmol/L,0.20 μmol/L的TPT,空白对照组加入等量的培养基,37℃,5% CO₂孵育箱内培养细胞。分别于加药后4,8,12和16 h离心收集培养的细胞,以0.8 mL TRIzol TM Reagent (Invitrogen)按说明书提取细胞总提取RNA,溶于20 μL DEPC水中,紫外分光光度计测定浓度和纯度。在25 μL逆转录体系中加入RNA 5 μg,80℃水浴5 min,37℃ 1.5 h,取2 μL为模板行PCR扩增。反

应条件为MAGE-3:94℃预变性4 min,94℃ 1 min、72℃,2 min、72℃,2 min,30个循环,72℃ 10 min;MAGE-4:94℃预变性4 min,94℃ 1 min、68℃ 1 min、72℃,1 min,30个循环,72℃ 10 min。取PCR产物行2%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外凝胶成像系统(BIO-RAD Flour-STM Multimager)下检测、照相,并用其附带处理软件Multi-analyst做量化统计分析,测定各阳性电泳条带的PCR平均光密度值,以MAGE/GAPDH的PCR光密度值作为MAGE基因mRNA水平相对值。

1.4 统计学方法

应用SPSS 10.0统计软件进行统计学处理,统计学数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两样本均数的比较采用独立样本的t检验,多样本均数的比较采用单因素方差分析。重复10次独立试验,检验水准以P<0.05为差异有显著性。

2 结果

2.1 不同TPT浓度对HPB-AM细胞MAGE mRNA表达的影响

以0.05,0.10,0.15,0.20 μmol/L终浓度的TPT作用于HPB-AM细胞,12 h后分别检测细胞MAGE mRNA表达水平的变化。结果显示,随着TPT浓度的增加,MAGE-3 mRNA和MAGE-4 mRNA的表达水平均明显下调。浓度为0.10,0.15和0.20 μmol/L的TPT作用后,实验组与空白对照组相对表达量相比较,差异具有显著性(P<0.05)。表明TPT抑制HPB-AM细胞中MAGE mRNA的表达具有浓度依赖性。作用相同时间,TPT对MAGE mRNA的抑制作用呈现较好的剂量-效应关系(图1,2)。

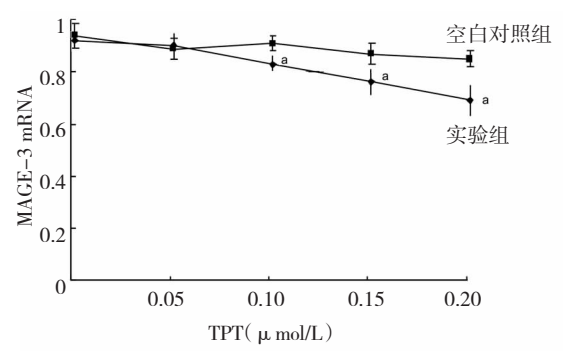


图1 不同TPT浓度对HPB-AM细胞MAGE-3 mRNA表达的影响 浓度分别为0.05,0.10,0.15,0.20 μmol/L的TPT作用于HPB-AM细胞12 h后,实验组的MAGE-3 mRNA的表达随浓度的增强而减低。当浓度为0.10,0.15和0.20 μmol/L作用后,实验组与空白对照组比较差异具有显著性。a:与空白对照组比较,P<0.05

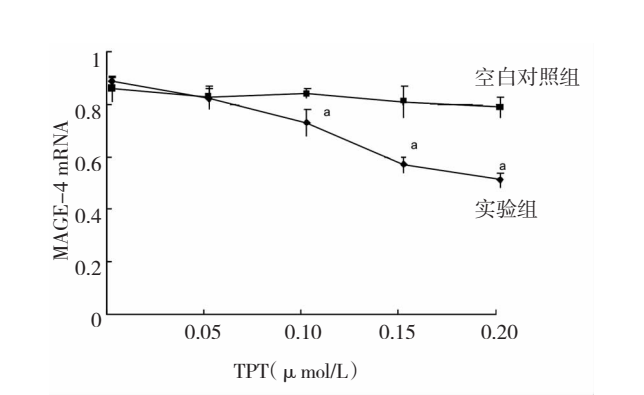


图2 不同TPT浓度对HPB-AM细胞MAGE-4 mRNA表达的影响 浓度分别为0.05,0.10,0.15,0.20 μmol/L的TPT作用于HPB-AM细胞,作用12 h后,实验组的MAGE-4 mRNA的表达随浓度的增强而减低。TPT浓度为0.10,0.15和0.20 μmol/L后,实验组与空白对照组比较差异具有显著性。a:与空白对照组比较, $P < 0.05$ 。

同一时间点不同浓度的TPT(0.05,0.10,0.15,0.20 μmol/L)对HPB-AM细胞MAGE基因的抑制作用,随浓度的升高而增强,浓度 ≥ 0.10 μmol/L后与空白对照比较差异具有显著性意义($P < 0.05$)。

2.2 TPT作用不同时间对HPB-AM细胞MAGE mRNA表达的影响

用浓度0.10 μmol/L的TPT作用于HPB-AM细胞系,4,8,12和16 h后检测MAGE mRNA表达水平的变化,结果显示,随着TPT作用时间增长,MAGE-3 mRNA和MAGE-4 mRNA的表达水平明显下调,与空白对照组相对表达量相比较,作用12,16 h后,差异具有显著性意义($P < 0.05$)。表明TPT抑制HPB-AM细胞中MAGE mRNA的表达具有时间依赖性。作用浓度相同,TPT对MAGE mRNA的抑制作用呈现较好的时间-效应关系(图3,4)。

相同浓度TPT在不同时间点(4,8,12,16 h)对HPB-AM细胞MAGE mRNA的抑制作用随作用时间延长而增强,作用12 h和16 h后与空白对照比较差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

3 讨论

本实验用RT-PCR方法在mRNA水平检测TPT对HPB-AM细胞株MAGE基因表达的影响,同一时间点不同浓度的TPT(0.05,0.10,0.15,0.20 μmol/L)对HPB-AM细胞MAGE基因的抑制作用,随浓度的升高而增强,与实验前比较差异具有显著性意义;同一浓度TPT在不同时间点(4,8,12,16 h)对HPB-AM细胞MAGE基因的抑制作用随作用时间延长而

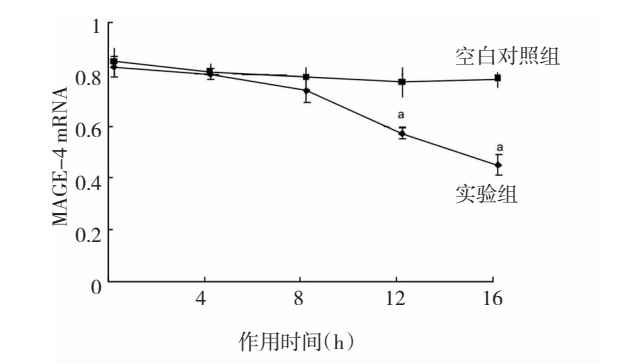


图3 TPT作用不同时间对HPB-AM细胞MAGE-3 mRNA表达的影响 半定量RT-PCR方法检测浓度为0.10 μmol/L的TPT作用4,8,12,16 h后,实验组MAGE-3 mRNA的表达随时间的延长而减低。作用12,16 h后,与空白对照组比较,差异具有显著性。a:与空白对照组比较, $P < 0.05$ 。

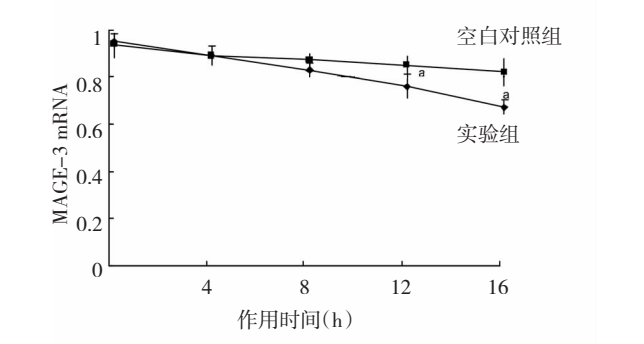


图4 TPT作用不同时间对HPB-AM细胞MAGE-4 mRNA表达的影响 半定量RT-PCR方法检测浓度为0.10 μmol/L的TPT作用4,8,12,16 h后MAGE-4 mRNA的表达随时间的延长而减低。作用12,16 h后,与空白对照组比较,差异具有显著性。a:与空白对照组比较, $P < 0.05$ 。

增强,与实验前比较差异均有显著性意义。因此TPT抑制HPB-AM细胞MAGE基因呈剂量和时间的依赖性。

免疫治疗是肿瘤的辅助治疗方法之一,肿瘤免疫治疗的关键是发现并利用肿瘤特异抗原。MAGE基因现在正被作为这一类抗原试用于临床上。MAGE抗原经加工后,产生8~12个氨基酸的抗原肽,可与HLA I类分子结合形成抗原肽-HLA I类分子复合物,递呈到细胞表面,活化自体T淋巴细胞,形成细胞毒性T淋巴细胞(CTL),识别并杀伤肿瘤细胞,从而发挥抗肿瘤作用。以MAGE-3为基础的肿瘤免疫治疗效果已被体内外实验证实。了解化疗药物和机体自身肿瘤免疫之间的相互关系对于临床治疗具有积极的意义。本实验正是基于此目的,了解临床抗肿瘤新药TPT与肿瘤特异性抗原MAGE mRNA表达之间的关系。从试验结果来看,随着

TPT 的浓度增加,MAGE mRNA 的表达减少;随着 TPT 作用时间的延长,MAGE mRNA 的表达也是减少的,两者呈负性相关。进一步提示我们,化疗可能会抑制机体自身的肿瘤免疫作用。基于 MAGE 基因这一类的免疫治疗如何与化疗有效的联合运用还需要进一步研究。

目前,以 MAGE 基因/抗原为基础的肿瘤免疫治疗途径主要有以下几种:①抗原递呈细胞途径:即用 MAGE 抗原肽孵育自体抗原递呈细胞,再将其制成疫苗接种到表达 MAGE 蛋白及相应 HLA-I 类分子的肿瘤细胞内,诱导特异性 CTL 应答^[8]。②黑色素瘤细胞接种途径,即将表达 MAGE 蛋白的黑色素瘤细胞制成疫苗接种肿瘤患者。③基因转染途径。④树突细胞接种途径。⑤MAGE 抗原肽接种途径,即将 MAGE 抗原肽直接接种到肿瘤患者体内。并取得了一定的成果。其中抗原递呈细胞途径、基因转染途径、树突细胞接种途径和 MAGE 抗原肽接种途径都是可以考虑运用到淋巴瘤治疗中的方法。

MAGE-3₁₆₈₋₁₇₆ 肽段由 HLA-A1 分子呈递给 CTL 发挥抗肿瘤作用早已应用于临床研究,并取得了很好的疗效。MAGE-3 在淋巴瘤细胞上高表达给淋巴瘤的抗原递呈细胞途径治疗提供了前提条件。由于 HLA-A2(+) 人群的比例最高(全球为 49%,我国为 53%),而且 MAGE-3、MAGE-4 都能由 HLA-A2 分子呈递,因而由 HLA-A2 分子呈递的肿瘤抗原 CTL 表位在淋巴瘤免疫治疗中可能具有重要的应用价值。但是 HLA-A2 分子呈递 CTL 发挥的抗肿瘤作用在临床运用效果欠佳。分析原因,虽然一些淋巴瘤患者表达 MAGE-3、MAGE-4 抗原,但是其在体内肿瘤细胞表面的表达量不足,可能达不到足以刺激机体免疫细胞增殖的程度,因而仍然能逃避免疫系统的监视,所以,适当浓度的 MAGE-3、MAGE-4 抗原蛋白可以作为淋巴瘤的疫苗,用于激活淋巴瘤患者的免疫细胞,增强其特异性免疫应答能力。有研究表明,MAGE 基因的特异性表达可能由其启动子区域的甲基化/去甲基化机制调控^[9]。人们发现一种 DNA 甲基转移酶抑制剂——5-氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-deoxycytidine,DAC)能够上调 MAGE 基因表达并增加 CTLs 识别。如将 DAC 与肿瘤细胞一起孵育,可使肿瘤细胞的 MAGE 基因表达率增高^[10],从

而扩大特异性免疫治疗的范围。今后可以试用 DAC 培育淋巴瘤细胞,看是否能够上调 MAGE-3、MAGE-4 基因的表达,减弱化疗药物的影响作用,为进一步临床试验提供条件。

[参 考 文 献]

[1] van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma[J]. Science, 1991, 254(5038):1643-1647.

[2] Marchand M, van Baren N, Weynants P, Brichard V, Dréno B, Tessier MH, et al. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1[J]. Int J Cancer, 1999, 80(2):219-230.

[3] De Plaen E, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De Smet C, et al. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family[J]. Immunogenetics, 1994, 40(5):360-369.

[4] Muscatelli F, Walker AP, De Plaen E, Stafford AN, Monaco AP. Isolation and characterization of a MAGE gene family in the Xp21.3 region[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(11):4987-4991.

[5] Crump M, Couban S, Meyer R, Rudinskas L, Zanke B, Gluck S, et al. Phase II study of sequential topotecan and etoposide in patients with intermediate grade non-Hodgkin's lymphoma; a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group study[J]. Leuk Lymphoma, 2002, 43(8):1581-1587.

[6] Russo V, Dalerba P, Ricci A, Bonazzi C, Leone BE, Mangioni C, et al. MAGE BAGE and GAGE genes expression in fresh epithelial ovarian carcinomas[J]. Int J Cancer, 1996, 67(3):457-460.

[7] Hara I, Hara S, Miyake H, Yamanaka K, Nagai H, Gohji K, et al. Expression of MAGE genes in testicular germ cell tumors[J]. Urology, 1999, 53(4):843-847.

[8] Pratesi G, Tortoreto M, Corti C, Giardini R, Zunino F. Successful local regional therapy with topotecan of intraperitoneally growing human ovarian carcinoma xenografts[J]. Br J Cancer, 1995, 71(3):525-528.

[9] De Smet C, Courtois SJ, Faraoni I, Lurquin C, Szikora JP, De Backer O, et al. Involvement of two Ets binding sites in the transcriptional activation of the MAGE1 gene[J]. Immunogenetics, 1995, 42(4):282-290.

[10] Mou DC, Cai SL, Peng JR, Wang Y, Chen HS, Pang XW, et al. Evaluation of MAGE-1 and MAGE-3 as tumour-specific markers to detect blood dissemination of hepatocellular carcinoma cells[J]. Br J Cancer, 2002, 86(1):110-116.

(本文编辑:吉耕中)