

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.05.003

## 肿瘤抗原 MAGE-A11 促进 ER 介导的乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖

桑梅香<sup>1,2</sup>, 连易水<sup>2</sup>, 刘飞<sup>1</sup>, 谷丽娜<sup>2</sup>, 单保恩<sup>1,2</sup> (1. 河北医科大学第四医院肿瘤研究所免疫学实验室, 河北石家庄 050011; 2. 河北医科大学第四医院 科研中心, 河北 石家庄 050011)

**[摘要]** **目的:** 探讨黑素瘤抗原(melanoma antigen gene, MAGE)-A11 对雌激素受体(estrogen receptor, ER)介导的乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响。**方法:** 利用 RT-PCR 及 Western blotting 筛选出 ER 表达阳性的人乳腺癌 MCF-7 细胞作为模式细胞, 采用基因转染、RT-PCR 和 Western blotting 检测 MAGE-A11 对 17 $\beta$ -雌二醇(17 $\beta$ -E)诱导的 ER 下游靶基因 *Efp* 表达的影响, 采用免疫共沉淀法检测 MCF-7 细胞中 MAGE-A11 和 ER 蛋白的相互作用, 采用 MTT 法和克隆形成实验分别检测 MAGE-A11 及 17 $\beta$ -E 处理对 MCF-7 细胞生存率和细胞克隆形成数的影响。**结果:** ER 阳性 MCF-7 细胞经 17 $\beta$ -E 处理 24 h 后, 下游靶基因 *Efp* 的 mRNA ( $2.97 \pm 0.16$  vs  $1.71 \pm 0.09$ ,  $P < 0.05$ ) 和蛋白表达水平显著升高 ( $2.65 \pm 0.12$  vs  $0.92 \pm 0.06$ ,  $P < 0.05$ ); 转染 MAGE-A11 的 MCF-7 细胞经 17 $\beta$ -E 24 h 处理后, 其 *Efp* 的 mRNA ( $4.01 \pm 0.19$  vs  $2.97 \pm 0.16$ ,  $P < 0.05$ ) 及蛋白表达 ( $3.52 \pm 0.15$  vs  $2.65 \pm 0.12$ ,  $P < 0.05$ ) 更显著增加。免疫共沉淀结果显示, 外源性 MAGE-A11 与 ER 之间存在相互作用。MCF-7 细胞经 17 $\beta$ -E 处理后细胞增殖率显著增加 [ $(152 \pm 6.7)\%$  vs  $(108 \pm 4.8\%)$ ,  $P < 0.05$ ], 转染 MAGE-A11 的 MCF-7 细胞经 17 $\beta$ -E 处理后细胞增殖率更显著增加 [ $(181 \pm 8.6)\%$  vs  $(152 \pm 6.7)\%$ ,  $P < 0.05$ ]; 17 $\beta$ -E 处理后 MCF-7 细胞克隆形成数显著增多 [ $(77 \pm 5)$  vs  $(18 \pm 2)$  个,  $P < 0.05$ ], 转染 MAGE-A11 的 MCF-7 细胞经 17 $\beta$ -E 处理后细胞的克隆形成数更显著增加 [ $(125 \pm 6)$  vs  $(77 \pm 5)$  个,  $P < 0.05$ ]。**结论:** 在 ER 阳性的乳腺癌 MCF-7 细胞中, MAGE-A11 可通过与 ER 的相互作用增强 ER 介导的 *Efp* 的表达, 从而促进细胞增殖, MAGE-A11 可能成为 ER 阳性乳腺癌内分泌治疗耐药的靶基因。

**[关键词]** 乳腺癌; 黑素瘤抗原 A-11; 雌激素受体; 细胞增殖

**[中图分类号]** R737.9; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2015)05-0566-07

## Tumor antigen MAGE-A11 increases ER-mediated cell proliferation of breast cancer MCF-7 cells

Sang Meixiang<sup>1,2</sup>, Lian Yishui<sup>2</sup>, Liu Fei<sup>1</sup>, Gu Lina<sup>2</sup>, Shan Baoen<sup>1,2</sup> (1. Immunology Laboratory, Tumor Research Institute, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Research Center, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of melanoma antigen gene-A11 (MAGE-A11) on estrogen receptor (ER)-mediated cell proliferation of breast cancer MCF-7 cells. **Methods:** RT-PCR and Western blotting confirmed ER-positive MCF-7 cells were transfected with pCMV-AC-MAGE-A11-GFP and pCMV-AC-GFP respectively. Wild-type and transfected MCF-7 cells were treated with 17 $\beta$ -estradiol (17 $\beta$ -E). After treatment, estrogen-responsive finger protein (Efp) was assessed by RT-PCR and Western blotting, protein interaction between MAGE-A11 and ER by immunoprecipitation, cell viability by MTT assay and colony-forming capacity by colony formation assay. **Results:** Treatment with 17 $\beta$ -E significantly increased Efp mRNA and protein proteins in both wild-type and transfected MCF-7 cells ( $P < 0.05$ ). Evident interactions between MAGE-A11 and ER were detected in both wild-type and transfected MCF-7 cells. Estrogen treatment also significantly increased cell viability and colony formation in wild-type and MAGE-A11-transfected MCF-7

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81001178); 河北省科技支撑计划资助项目(No. 14277732D)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81001178), and the Hebei Science and Technology Supporting Program(No. 14277732D)

**[作者简介]** 桑梅香(1979-), 女, 河北省衡水市人, 博士, 副教授, 河北医科大学第四医院肿瘤研究所, 主要从事肿瘤分子生物学、肿瘤免疫相关研究, E-mail: mxsang@hotmail.com

**[通信作者]** 单保恩(Shan Baoen, corresponding author), E-mail: baoenshan@hotmail.com

**[优先发表]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20151017.1606.004.html>

cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** In ER-positive MCF-7 cells, MAGE-A11 is capable of enhancing the expression of the ER target gene *Efp* and cell proliferation through direct interaction with ER. This finding suggests that MAGE-A11 may offer a potential therapeutic target for resistant ER-positive breast cancer.

[ **Key words** ] breast cancer; melanoma antigen gene-A11 ( MAGE-A11 ); estrogen receptor ( ER ); cell proliferation [ Chin J Cancer Biother, 2015, 22( 5 ): 566-572 ]

黑素瘤抗原( melanoma antigen gene, MAGE )-A11 属于肿瘤抗原 MAGE-A 家族中的成员,在乳腺癌的发生发展中发挥了重要的作用<sup>[1-5]</sup>。笔者前期研究<sup>[3-5]</sup>结果显示,雌激素受体( estrogen receptor, ER)阳性的乳腺癌患者癌组织中肿瘤抗原 MAGE-A11 蛋白的表达也相对较高,且 MAGE-A11 可促进乳腺癌细胞的增殖,提示 MAGE-A11 有可能通过调控 ER 参与了雌激素依赖性的乳腺癌细胞的增殖。本研究选用 ER 阳性的乳腺癌细胞 MCF-7 作为模式细胞,探讨了 MAGE-A11 对 ER 的靶基因 *Efp*( estrogen-responsive finger protein, *Efp* )的表达及 ER 介导的乳腺癌细胞增殖的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株和主要试剂

人乳腺癌 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞由日本千叶县癌中心惠赠。RPMI 1640 培养液购自 Gibco 公司, Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司, pCMV-AC-MAGE-A11-GFP 表达质粒和空载体质粒 pCMV-AC-GFP 购自 OriGene Technologies Inc, 反转录试剂盒 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司, PCR 扩增用 Go Taq® Green Master Mix 试剂盒购自 Promega 公司, 鼠抗人的 ER 单抗购自 Santa Cruz 公司, 鼠抗人的 *Efp* 单抗购自 BD Transduction Laboratories 公司, 兔抗人的  $\beta$ -actin 单抗购自 Santa Cruz 公司, 兔抗人的 GFP 单抗购自 Epitomics 公司。

### 1.2 细胞培养

人乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞在含 10% 胎牛血清、终浓度分别为 100 IU/ml 和 100  $\mu$ g/ml 的青链霉素、8% NaHCO<sub>3</sub> 的 RPMI 1640 培养液中培养, 培养环境为 37 °C 及 5% CO<sub>2</sub>。细胞用 0.05% 胰蛋白酶进行消化传代。

### 1.3 MAGE-A11 基因转染人乳腺癌 MCF-7 细胞

取对数生长期的 MCF-7 细胞, 按 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒说明书所述的方法, 将 pCMV-AC-MAGE-A11-GFP 表达质粒和空载体质粒 pCMV-AC-GFP 转染至 MCF-7 细胞中, 通过在荧光显微镜下观察 GFP 绿色荧光确定转染效率, 转染 48

h 后转染效率达到 60% 以上时收集细胞。

### 1.4 RT-PCR 法检测 MCF-7 细胞中 ER 及 17 $\beta$ -雌二醇( 17 $\beta$ -E )诱导的 ER 下游靶基因 *Efp* 的表达

采用 TRIzol 试剂提取细胞的总 RNA, 用反转录试剂盒 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 按照说明书进行从 RNA 到 cDNA 的制备, 用 Go Taq® Green Master Mix 试剂盒进行 PCR 扩增, *GAPDH* 作为内参照, 所用引物序列及反应条件参见表 1。扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶电泳后观察并拍照。

### 1.5 Western blotting 检测 MCF-7 细胞中 ER 及 17 $\beta$ -E 诱导的 *Efp* 的表达

收集细胞, 加入 1  $\times$  SDS 上样缓冲液 300  $\mu$ l, 冰上放置 30 min, 超声裂解细胞, 4 °C、15 000  $\times g$  条件下离心 10 min, 收集上清为细胞裂解液。用 BCA 法蛋白定量, 10% SDA-PAGE 分离, 上样量为 30  $\mu$ g/孔, 转移蛋白质到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜, 加入 1:1 000 稀释的鼠抗人的 ER 单抗或 1:1 000 稀释的鼠抗人的 *Efp* 单抗或 1:4 000 稀释的兔抗人的  $\beta$ -actin 单抗室温孵育 1 h, 膜洗 3 次, 加入 1:3 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的抗鼠或抗兔的二抗, 室温孵育 1 h, 膜洗 3 次, 用 ECL 发光系统进行显影, 对条带进行半定量分析, 以  $\beta$ -actin 作为内参照。

### 1.6 免疫共沉淀( immunoprecipitation, IP )法检测 MCF-7 细胞中 MAGE-A11 和 ER 蛋白的相互作用

MCF-7 细胞转染 pCMV-AC-MAGE-A11-GFP 表达载体, 同时设立空载体对照组, 转染 24 h 后加入 10 nmol/L 的 17 $\beta$ -E 处理细胞 24 h。细胞用 PBS 洗涤两次, 15 000  $\times g$  离心 3 min 去上清, 收集细胞, 加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液 A( pH 7.5 的 25 mmol/L Tris-HCl, 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 1% Triton X-100 ) 500  $\mu$ l, 冰上放置 30 min, 超声裂解细胞, 4 °C、15 000  $\times g$  离心 10 min, 收集上清为细胞裂解液。并用 BCA 法进行蛋白定量, 取含 1 mg 蛋白的细胞裂解液, 加入到新的 EP 管中, 每管中均加入 50% 的 G-Sepharose beads 30  $\mu$ l, 4 °C 缓慢转动 1 h, 高速离心 1 min 后取上清到新的 EP 管中, 加入 1  $\mu$ g 的鼠抗人的 ER 单抗, 4 °C 条件下缓慢转

动过夜,每管中均再加入 G-Sepharose beads 30  $\mu$ l, 4 $^{\circ}$ C 缓慢转动 1 h,高速离心 1 min 后弃上清,用含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液 A 将 beads 轻洗 3 次,加入 2  $\times$  SDS 上样缓冲液 30  $\mu$ l,100  $^{\circ}$ C 煮沸 5 min,8 % SDS-PAGE 分离蛋白,转移蛋白质到 PVDF 膜上,5 % 脱脂奶粉 4  $^{\circ}$ C 封闭过夜,加入 1:1 000 稀释的兔抗人的 GFP 单抗室温孵育 1 h,TBS-T 冲洗 3 次,每

次 5 min。膜洗 3 次,加入 1:3 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的抗兔的二抗室温孵育 1 h,膜洗 3 次,用 ECL 发光系统进行显影,对条带进行定性分析。用和上述相同的方法在免疫沉淀时加入 1  $\mu$ g GFP 抗体,经 SDS-PAGE 分离蛋白及转膜后用 1:1 000 稀释的鼠抗人的 ER 单克隆抗体检测 ER 的蛋白条带。

表 1 引物序列及反应条件  
Tab. 1 Primer pairs used for amplification reaction

Gene	Primer	Annealing (t/ $^{\circ}$ C)	Cycles
ER	F: 5'- AGCACCTGAAGTCTCTGGA -3'	56	32
	R: 5'- GATGTGGGAGAGGATGAGGA -3'		
Efp	F: 5'- TCCACTACTGGGAGGTGGAG -3'	56	30
	R: 5'- GAAGATGACAAAGCCGTGGT -3'		
GAPDH	F: 5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3'	58	22
	R: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'		

1.7 MTT 法检测转染 MAGE-A11 及 17 $\beta$ -E 刺激对 MCF-7 细胞生存率的影响

细胞密度以 5 000 个/孔接种于 96 孔板中过夜贴壁(共接种 3 块 96 孔板,每块 96 孔板为一个时间点,每块培养板接种 4 个组,每组 5 个复孔,第一组和第三组为空载体对照组,第二组和第四组为 MAGE-A11 转染组)。细胞贴壁后,第三组和第四组分别加入 10 nmol/L 的 17 $\beta$ -E 处理 0、24 和 48 h。分别加入 10  $\mu$ l 的 MTT 溶液(100 mg/ml)继续孵育 4 h,测量在 490 nm 处的光密度(D)值。以对照组结果为 100 %,计算细胞贴壁 24、48 h 后相对于 0 h 的细胞生存率。细胞生存率(%) = 实验组平均 D 值/对照组平均 D 值  $\times$  100%

1.8 集落形成实验检测转染 MAGE-A11 及 17 $\beta$ -E 刺激后 MCF-7 细胞的克隆形成数

MCF-7 细胞以 3  $\times$  10<sup>3</sup> 个/皿的密度接种于直径 10 cm 的培养皿中(共接种 4 个组,分组同 1.7),细胞贴壁生长过夜,第二天第三组和第四组中加入 10 nmol/L 的 17 $\beta$ -E 处理,且每组均加入终浓度为 400  $\mu$ g/ml 的 G418 进行筛选,每周换液一次,筛选 2 周后对细胞进行姬姆萨染色。具体方法为:将培养皿中的培养液吸净,1  $\times$  PBS 轻洗两次,加入 5 ml 95% 乙醇,室温固定 15 min,用 5 ml 双蒸水轻洗 3 次,加入 10 ml 稀释的姬姆萨染液(50 ml 双蒸水中加入 50 滴姬姆萨原液),室温静置 4 ~ 6 h,用 5 ml 双蒸水将细胞轻洗两次,将培养皿倒置于干燥的滤纸上干燥

过夜,拍照并计数培养皿底的细胞克隆数(以肉眼可见的直径 >1 mm 的克隆计为阳性克隆)。

1.9 统计学处理

以上实验均重复 3 次。应用 SPSS 13.0 统计学软件,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,均数比较采用两样本的 t 检验,P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 中 ER mRNA 和蛋白的表达

RT-PCR(图 1A)和 Western blotting 结果(图 1B)显示,在 mRNA 和蛋白水平上,乳腺癌 MCF-7 细胞中 ER 表达阳性,MDA-MB-231 中 ER 表达阴性。提示,MCF-7 细胞为 ER 阳性细胞,MDA-MB-231 细胞为 ER 阴性细胞。

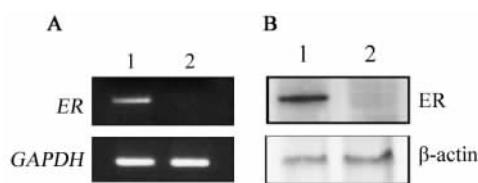


图 1 乳腺癌 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 中 ER 的表达状态  
Fig. 1 Expression of ER in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells  
A: RT-PCR assessment of ER mRNA;  
B: Western blotting analysis of ER protein

### 2.2 MAGE-A11 对 17β-E 诱导的 ER 下游靶基因 *Efp* mRNA 表达的影响

RT-PCR 检测结果(图 2)显示,ER 阳性的乳腺癌 MCF-7 细胞用 10 nmol/L 的 17β-E 处理 24 h 后,ER 的下游靶基因 *Efp* 的 mRNA 表达水平上显著升高(2.97 ± 0.16 vs 1.71 ± 0.09;第三组 vs 第一组),说明 17β-E 可诱导 ER 的下游靶基因 *Efp* 的表达。单独转染 *MAGE-A11* 并不能促进 *Efp* 的 mRNA 表达(1.65 ± 0.07 vs 1.71 ± 0.09,  $P < 0.05$ ;第二组 vs 第一组),但转染 *MAGE-A11* 组的 MCF-7 细胞经 17β-E 处理后,*Efp* 的 mRNA 表达较经 17β-E 处理的空载体对照组显著增加(4.01 ± 0.19 vs 2.97 ± 0.16,  $P < 0.05$ ;第四组 vs 第三组),提示外源性的 *MAGE-A11* 增加了雌激素依赖性的 *Efp* mRNA 表达。

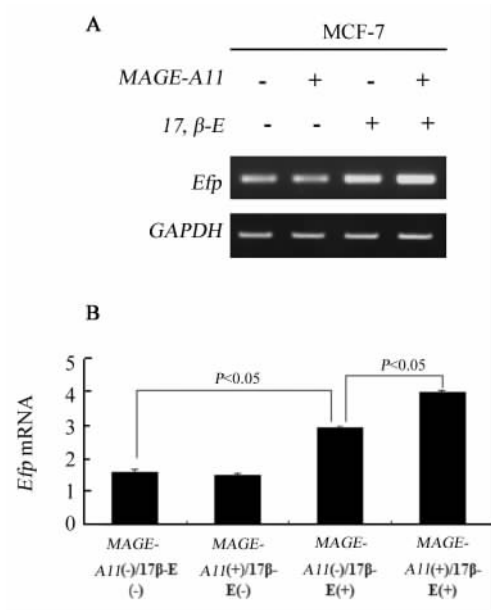


图 2 RT-PCR 检测 MAGE-A11 对 17β-雌二醇诱导的 ER 下游靶基因 *Efp* 表达的影响

Fig. 2 Effect of MAGE-A11 on 17β-estradiol-induced *Efp* mRNA abundance

A: Representative RT-PCR analysis showing *Efp* and *GAPDH* bands on agarose gel; B: A bar graph showing semi-quantitative changes in *Efp* mRNA

Western blotting 检测结果(图 3)显示,ER 阳性的乳腺癌细胞 MCF-7 用 10 nmol/L 的 17β-E 处理 24 h 后,ER 的下游靶基因 *Efp* 的蛋白表达水平显著升高(2.65 ± 0.12 vs 0.92 ± 0.06;第三组 vs 第一组),说明 17β-E 可诱导 ER 的下游靶基因 *Efp* 的表达。单独转染 *MAGE-A11* 并不能促进 *Efp* 的蛋白表达(1.01 ± 0.07 vs 0.92 ± 0.06,  $P < 0.05$ ;第二组 vs

第一组),但与转染空载体对照组相比,转染 *MAGE-A11* 组的 MCF-7 细胞经 17β-E 处理后,*Efp* 的蛋白表达较经 17β-E 处理的空载体对照组显著增加(3.52 ± 0.15 vs 2.65 ± 0.12,  $P < 0.05$ ;第四组 vs 第三组),提示外源性的 *MAGE-A11* 增加了雌激素依赖性的 *Efp* 蛋白表达。

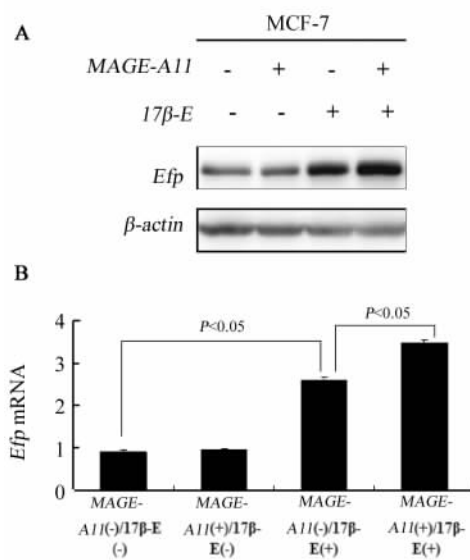


图 3 Western-blotting 检测 MAGE-A11 对 17β-雌二醇诱导的 ER 下游靶基因 *Efp* mRNA 表达的影响

Fig. 3 Effect of MAGE-A11 on 17β-estradiol-induced *Efp* mRNA protein content

A: representative Western blotting analysis showing *Efp* mRNA and β-actin bands; B: a bar graph showing semi-quantitative changes in *Efp* protein content

### 2.3 MAGE-A11 与 ER 蛋白之间的相互作用

免疫共沉淀检测结果(图 4)显示,MCF-7 细胞转染 GFP-MAGE-A11 表达载体后,利用 ER 抗体识别蛋白裂解液中的 ER 蛋白,所得到的蛋白复合物中包含了 MAGE-A11 蛋白,而在未转染 MAGE-A11 的对照组中,ER 的沉淀物中未包含 MAGE-A11 蛋白;同样,如图 4B 的结果显示,MCF-7 细胞转染 pCMV-AC-MAGE-A11-GFP 表达载体后,利用 GFP 抗体识别蛋白裂解液中的外源性 MAGE-A11 蛋白,所得到的蛋白复合物中也包含了 ER 蛋白,而在未转染 MAGE-A11 的对照组中,GFP 的沉淀物中未包含 ER 蛋白。以上结果提示,外源性 MAGE-A11 与 ER 之间的在细胞中存在蛋白相互作用,MAGE-A11 有可能通过与 ER 之间的蛋白相互作用增加 ER 介导的 *Efp* 的表达。

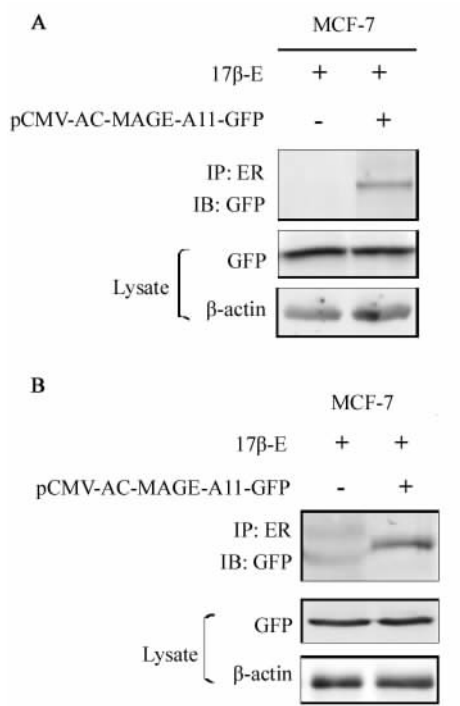


图 4 免疫共沉淀方法检测 MAGE-A11 与 ER 蛋白之间的相互作用

Fig. 4 Immunoprecipitation analysis showing interactions between MAGE-A11 and ER under an overexpression condition

A: Immunoprecipitates of ER includes exogenous MAGE-A11 protein; B: Immunoprecipitates of exogenous MAGE-A11 includes ER protein

#### 2.4 MAGE-A11 对 17β-E 依赖性的乳腺癌细胞增殖的影响

MTT 检测结果(图 5)显示,17β-E 处理 24 h 后,MCF-7 细胞增殖率与对照组相比显著增加 [(152 ± 6.7)% vs (108 ± 4.8)%,  $P < 0.05$ ; 第三组 vs 第一组]。与转染空载体对照组相比,转染 MAGE-A11 组的 MCF-7 细胞经 17β-E 处理 24 h 后,细胞的增殖率较空载体对照组显著增加 [(181.0 ± 8.6)% vs (152.0 ± 6.7)%,  $P < 0.05$ ; 第四组 vs 第三组],说明 MAGE-A11 可增加 17β-E 诱导的 MCF-7 细胞的增殖。17β-E 处理 48 h 后,MCF-7 细胞增殖率与对照组相比显著增加 [(260.0 ± 9.7)% vs (176.0 ± 6.8)%,  $P < 0.05$ ; 第三组 vs 第一组]。转染 MAGE-A11 组的 MCF-7 细胞经 17β-E 处理 24 h 后,细胞的增殖率较经 17β-E 处理的空载体对照组显著增加 [(303.0 ± 10.1)% vs (260.0 ± 9.7)%,  $P < 0.05$ ; 第四组 vs 第三组],说明 MAGE-A11 可增加 17β-E 诱导的 MCF-7 细胞的增殖。

如图 6 克隆形成实验结果显示,单独转染 MAGE-A11 可增加 MCF-7 细胞的克隆形成数 [(18.0 ± 2.0) vs (51.0 ± 4.0)个; 第一组 vs 第二组],17β-E 处理后的 MCF-7 细胞克隆形成能力显著增高 [(18.0 ± 2.0) vs (77.0 ± 5.0)个,  $P < 0.05$ , 第一组 vs 第三组],MAGE-A11 可增加 17β-E 诱导的 MCF-7 细胞的克隆形成能力 [(77.0 ± 5.0) vs (125.0 ± 6.0)个,  $P < 0.05$ , 第三组 vs 第四组)。以上结果提示,MAGE-A11 可促进 17β-E 依赖性的乳腺癌细胞的克隆形成能力。

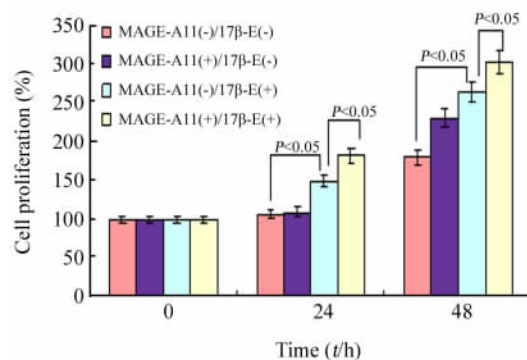


图 5 MTT 法检测不同条件处理后 MCF-7 细胞的增殖  
Fig. 5 Proliferation of cell viability of MCF-7 cells treated as indicated

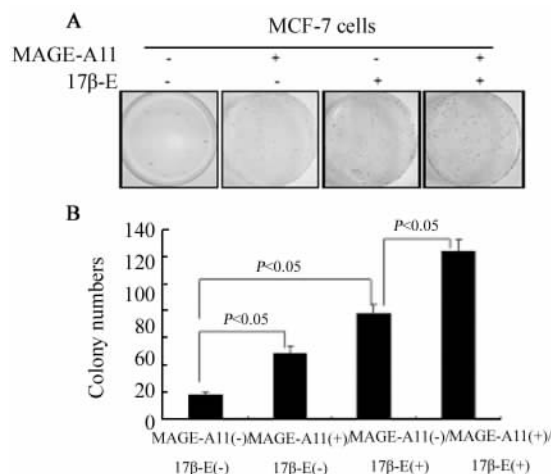


图 6 克隆形成实验检测不同条件处理后 MCF-7 细胞的克隆形成能力  
Fig. 6 Colony-forming capacities of MCF-7 cells treated as indicated

### 3 讨论

ER 是一种核受体,雌激素通过 ER 来调节下游靶基因的转录。雌激素和 ER 结合后,ER 通过其本

身的 DNA 结合结构域与其下游靶基因上的雌激素反应元件( estrogen-responsive element, ERE )相结合来调控这些靶基因的转录。其中, *Efp* 是 ER 下游的一个非常重要的靶蛋白,其主要表达于雌激素靶向性的组织和细胞中,如乳腺上皮及子宫上皮细胞<sup>[6-7]</sup>。*Efp* 基因敲除的小鼠表现为子宫发育不全及雌激素反应性降低<sup>[8]</sup>。*Efp* 在乳腺癌中也存在高表达现象,乳腺癌细胞中敲除 *Efp* 可抑制细胞的增殖<sup>[9]</sup>。因此,*Efp* 被认为是雌激素依赖性细胞增殖的一个至关重要的指标<sup>[10-11]</sup>,*Efp* 的表达高低可反映 ER 的转录活性。*ER* 调控下游靶基因的转录是一个复杂的过程,该过程需要多种基因和蛋白参与。本课题组前期研究显示,ER 阳性的乳腺癌患者的癌组织中肿瘤抗原 MAGE-A11 蛋白的表达也相对较高<sup>[3-5]</sup>,并且外源性 MAGE-A11 促进了人乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖<sup>[5]</sup>。因此推测,MAGE-A11 有可能参与了雌激素依赖性的细胞增殖,其对乳腺癌细胞增殖的影响有可能部分或完全通过 ER 途径来发挥作用。

本研究探讨了 MAGE-A11 与 ER 之间的相互作用机制及对雌激素依赖性乳腺癌细胞增殖的影响。实验筛选了两种乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 中 ER 的表达状况。结果显示,MCF-7 细胞中 ER 表达阳性,MDA-MB-231 细胞中 ER 表达阴性,因此选择了 MCF-7 细胞作为研究 MAGE-A11 与雌激素依赖性细胞增殖关系的模式细胞。为了研究 MAGE-A11 对雌激素介导的 ER 活性的影响,将 MCF-7 细胞分别转染外源性 MAGE-A11 和(或)用  $17\beta$ -E 处理细胞,并用 RT-PCR 和 Western blotting 法检测 ER 的下游靶基因 *Efp* 的表达,结果显示, $17\beta$ -E 处理可显著增加 *Efp* 的表达水平,单独转染 MAGE-A11 并不能诱导 *Efp* 的表达,但外源性的 MAGE-A11 增加了雌激素依赖性的 *Efp* 的表达。以上结果提示, $17\beta$ -E 与其受体 ER 结合后可诱导下游靶基因 *Efp* 的表达,MAGE-A11 有可能通过与 ER 的蛋白相互作用增加  $17\beta$ -E 介导的 *Efp* 的表达。免疫共沉淀的法检测结果显示,外源性的 MAGE-A11 与 ER 之间存在蛋白相互作用,提示 MAGE-A11 有可能通过与 ER 之间的蛋白相互作用增加 ER 诱导的 *Efp* 的表达。虽然本实验未在体内条件下检测出 MAGE-A11 蛋白与 ER 的相互作用,但外源性的实验结果提示了在过表达情况下两者存在相互作用的分子机制。因此,在 MAGE-A11 高表达的 ER 阳性乳腺癌细胞中,MAGE-A11 有可能与 ER 相互作用,并在雌激素存在的情况下介导 ER 的活性。MTT 分析结果显

示, $17\beta$ -E 处理后的 MCF-7 细胞增殖能力显著增加,MAGE-A11 可增加  $17\beta$ -E 诱导的 MCF-7 细胞的增殖能力。克隆形成实验的结果显示, $17\beta$ -E 处理后的 MCF-7 细胞克隆形成能力显著增高,且 MAGE-A11 可增加  $17\beta$ -E 诱导的 MCF-7 细胞的克隆形成能力。以上结果提示,MAGE-A11 可促进雌激素依赖性的乳腺癌细胞的增殖。

MTT 结果显示,单独转染 MAGE-A11 24h 不能增加 MCF-7 细胞的存活率,但单独转染 MAGE-A11 可以增加 MCF-7 细胞的克隆形成数,其可能是由于克隆形成实验中 MAGE-A11 转染时间较长的缘故。由于单独转染 MAGE-A11 也可增加 ER 阳性细胞的克隆形成数,因此 MAGE-A11 的促细胞增殖功能并不是完全的雌激素依赖性的,其也可能通过其他雌激素非依赖性的途径来促进细胞增殖,进而发挥其癌基因的功能。MAGE-A11 是否对 ER 阴性乳腺癌细胞的增殖也有一定的影响还需要进一步的实验证实。

目前,对于 MAGE-A11 的研究主要集中在其通过雄激素受体途径促进前列腺癌细胞的增殖方面。在前列腺癌中,MAGE-A11 通过与 AR 氨基末端特定的氨基酸基序 FXXLF 相互作用,并通过 EGF 依赖性的 MAGE-A11 磷酸化和泛素化机制来增加 AR 的转录活性,从而促进 AR 依赖性的前列腺癌细胞的生长,进而加速前列腺癌的进展<sup>[12-14]</sup>。MAGE-A11 还可以通过抑制脯氨酰羟甲基化及在缺氧或正常氧浓度下稳定 HIF- $\alpha$  蛋白来增强 HIF 的功能,从而调控细胞的生长<sup>[15]</sup>。

本研究结果提示,在 ER 阳性的乳腺癌细胞中,在雌激素存在的情况下 MAGE-A11 有可能通过与 ER 相互作用,作为辅助激活因子增加 ER 诱导下游靶基因的能力,从而促进雌激素依赖性乳腺癌细胞的增殖。因此,MAGE-A11 在 ER 阳性的乳腺癌细胞的内分泌治疗耐药中可能发挥了一定的作用,MAGE-A11 可能会成为 ER 阳性乳腺癌内分泌治疗耐药的靶点。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Sang M, Wang L, Ding C, et al. Melanoma-associated antigen genes--An update [ J ]. Cancer Letters, 2011, 302( 2 ): 85-90.
- [ 2 ] Sang M, Lian Y, Zhou X, et al. MAGE-A family: attractive targets for cancer immunotherapy [ J ]. Vaccine, 2011, 29( 47 ): 8496-8500.
- [ 3 ] Hou S, Sang M, Geng C, et al. Expression of MAGE-A9 and MAGE-A11 in breast cancer and their expression mechanism [ J ]. Arch Med Res, 2014, 45( 1 ): 44-51.

[ 4 ] Lian Y, Sang M, Ding C, et al. Expression of MAGE-A10 and MAGE-A11 in breast cancers and their prognostic significance: A retrospective clinical study [ J ]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138( 3 ): 519-827.

[ 5 ] 连易水, 桑梅香, 周欣亮, 等. 乳腺癌组织中黑素瘤抗原-A11 的表达及其促进乳腺癌细胞的增殖 [ J ]. 肿瘤, 2011, 31( 9 ): 830-834.

[ 6 ] Urano T, Saito T, Tsukui T, et al. Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumor growth [ J ]. Nature, 2002, 417( 6891 ): 871-875.

[ 7 ] Ikeda K, Inoue S. Estrogen receptors and their downstream targets in cancer [ J ]. Arch Histol Cytol, 2004, 67( 5 ): 435-442.

[ 8 ] Orimo A, Inoue S, Minowa O, et al. Underdeveloped uterus and reduced estrogen responsiveness in mice with disruption of the estrogen-responsive finger protein gene, which is a direct target of estrogen receptor  $\alpha$  [ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96( 21 ): 12027-12032.

[ 9 ] Ueyama K, Ikeda K, Sato W, et al. Knockdown of Efp by DNA-modified small interfering RNA inhibits breast cancer cell proliferation and in vivo tumor growth [ J ]. Cancer Gene Ther, 2010, 17( 9 ): 624-632.

[ 10 ] Ikeda K, Orimo A, Higashi Y, et al. Efp as a primary estrogen-responsive gene in human breast cancer [ J ]. FEBS Lett, 2000, 472( 1 ): 9-13.

[ 11 ] Horie K, Urano T, Inoue S. Efp as a new molecular target for breast cancer therapy [ J ]. Anticancer Drugs, 2003, 14( 1 ): 1-2.

[ 12 ] Bai S, He B, Wilson EM. Melanoma antigen gene protein MAGE-11 regulates androgen receptor function by modulating the interdomain interaction [ J ]. Mol Cell Biol, 2005, 25( 4 ): 1238-1257.

[ 13 ] Bai S, Wilson EM. 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.

[ 14 ] Askew EB, Bai S, Hnat AT, 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.

[ 15 ] Aprelikova O, Pandolfi S, Tackett S, et al. Melanoma antigen-11 inhibits the hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2 and activates hypoxic response [ J ]. Cancer Res, 2009, 69( 2 ): 616-624.

[ 收稿日期 ] 2015 -04 -25                      [ 修回日期 ] 2015 -09 -10

[ 本文编辑 ] 阮芳铭

• 读者 • 作者 • 编者 •

### 《中国肿瘤生物治疗杂志》“转化医学”栏目征稿启事

转化医学( translational medicine )是近年国际医学领域出现的新热潮,是实验研究与临床研究双向转化( bench to bedside and bedside to bench )的研究体系,转化医学为基础研究和临床医疗之间架起了桥梁,从而把基础医学研究的最新成果快速、有效地转化为临床疾病诊治的药物、技术和手段,有力地推动医学科学的发展。

为了顺应转化医学的发展热潮,为我国广大肿瘤防治工作者提供有关“转化医学”信息传播和学术交流的平台,促进转化医学在肿瘤学领域的发展,本刊特开辟“转化医学”新栏目,并向广大肿瘤防治工作者征集“转化医学”相关稿件。

本刊“转化医学”栏目文稿内容包括以下几个方面:

- ( 1 )宣传“转化医学”的观念、理论、研究体系、研究模式和方法、发展趋势等;
- ( 2 )讨论我国肿瘤学领域深入开展“转化医学”研究的策略和措施;
- ( 3 )介绍国外肿瘤学领域“转化医学”发展的新闻、成功案例和发展动向;
- ( 4 )我国作者肿瘤学领域“转化医学”的研究成果和经验体会;
- ( 5 )与“转化医学”有关的在肿瘤学领域有发表价值的其他文稿。

“转化医学”文稿的写作格式要求,如果是( 4 )类中的原创性研究成果文稿,格式同本刊论著( 基础研究和临床研究 );如果是( 1 )、( 2 )、( 3 )和( 5 )类的文稿,格式类似于本刊的综述,篇幅在 5 000 字以内,附中文摘要( 报道式、非结构式 ),文内图表用中文表达,参考文献应精选最主要的 20 篇左右。文稿的文字力求简洁明了、通顺流畅、层次清楚、重点突出。如文稿有新颖性,可进入本刊快速发表通道,在 3 个月左右发表。

( 本刊编辑部 )