

· 基础研究 ·

肿瘤坏死因子 α 和甲基化转移酶抑制 siRNA 对 Raji 细胞中癌 - 睾丸抗原表达的影响 *

杨荣秉 梁 伟 连 觅 徐 兰 初 明 朱蕴兰 余培峰 徐碧荷 王月丹[△]

(北京大学医学部免疫学系 北京 100191)

摘要 目的:研究细胞因子 TNF- α 和针对 DNA 甲基化转移酶的 siRNA 对 Burkitt 淋巴瘤细胞株 Raji 细胞的癌 - 睾丸抗原表达情况的影响。方法:1.加入不同终浓度的细胞因子 TNF- α 与 Raji 细胞株共培养,在不同的时间点检测癌 - 睾丸抗原表达情况的改变。2.转入针对 DNA 甲基化转移酶的 siRNA 检测癌 - 睾丸抗原表达情况的改变。结果:在 TNF- α 作用后,一些细胞组会出现 SSX-1 表达上调,而 siRNA 干扰作用后,转染针对 DNMT1 和 DNMT3b 的细胞组或受 5-aza-dC 作用的细胞组的 PRAME 发生再表达。结论:TNF- α 和 siRNA 都能诱导某些癌睾丸抗原的表达或使其表达增强。

关键词 TNF- α siRNA 癌 - 睾丸抗原 DNA 甲基化转移酶

中图分类号 R392.12 文献标识码 A 文章编号:1673-6273(2012)01-1-04

Effect of TNF- α and RNAi on the Expression File of Cancer-Testis Antigens in Raji Cell Line*

YANG Rong-bing, LIANG Wei, LIAN Mi, XU Lan, CHU Ming, ZHU Yun-lan, YU Pei-feng, XU Bi-he, WANG Yue-dan[△]

(1 Department of Immunology School of Basic Medical Science Peking University Health Science Center, Beijing, 100191, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of TNF- α and RNA interference of DNMTs on the expression file of Cancer-Testis Antigens in Burkitt lymphoma cell line Raji. **Methods:** The expression file of Cancer-Testis antigens mRNA in Raji cell treated with TNF- α and transfected with siRNA was detected by RT-PCR respectively. **Results:** After treated by TNF- α , the expression of SSX-1 and NY-ESO-1 were upregulated in some groups, while PRAME was re-expressed in groups transfected with siRNA towards DNMT1 and DNMT3b or 5-aza-dC. **Conclusion:** TNF- α and siRNA have effect on the expression level of Cancer-Testis Antigens in Raji cell line.

Key Words: TNF- α ; SiRNA; Cancer-Testis Antigens(CTA); DNMT

Chinese Library Classification(CLC): R392.12 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)01-1-04

前言

癌 - 睾丸抗原(CTA)能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^[1]。因此,这类抗原又被视为具有应用前景的肿瘤特异性靶抗原^[2]。一些针对 CT 抗原的肿瘤疫苗(如 NY-ESO-1^[3], MAGE)已被试用于临床治疗并取得了较好的效果。Raji 细胞是从 Burkitt 淋巴瘤患者分离建株的 B 淋巴细胞系,来源于滤泡生发中心细胞,具有高度侵袭性。为了研究 CTA 在肿瘤细胞中表达的调控机制,本研究采用了肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和特异性针对 DNA 甲基化转移酶 DNMT1 和 DNMT3b 小干扰 RNA(siRNA)对 Raji 细胞进行处理,观察其对 CTA 表达水平的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和细胞

重组人 TNF- α 购自 Sigma 公司;总 RNA 提取试剂盒购自 MN 公司;逆转录试剂盒 Fermentas 公司;引物及 siRNA 由上海吉玛生物技术有限公司合成;RPMI1640,胎牛血清,脂质体 LipofectamineTM2000 均购于美国 Gibco 公司;PCR Master Mix 和 DNA Marker 购自北京鼎国生物技术公司。

1.2 细胞培养

Raji 细胞株为本实验室冻存,细胞悬浮生长于 RPMI 1640 培养液中,内含 10%的胎牛血清,另加青霉素和链霉素各 100 U/ml,于 37℃、5%CO₂ 的孵箱中培养。2~3 d 换液传代 1 次,取对数生长期细胞用于后续的实验。

1.3 加入 TNF- α 后细胞株的培养

取对数生长期的 Raji 细胞,移入 6 孔板用无血清 1640 培

* 基金项目 国家自然科学基金资助项目(30771995)

作者简介 杨荣秉(1986-)男,硕士研究生,主要研究方向 肿瘤免疫。电话:82801747, E-mail: yrbws@163.com

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

(收稿日期:2011-05-29 接受日期:2011-06-23)

养 细胞密度调整为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。细胞因子 TNF- α 用 PBS 分装 , 在 6 孔板的各个孔中加入不等量的 TNF-a 细胞因子 ,使得培养液终浓度分别为 250 ,500 ,1000 pg/ml。在分别作用 4 和 6 小时后 ,收集细胞 ,提取 mRNA ,通过 RT-PCR 的方法检测 CTA 的表达水平。

1.4 siRNA 转染 Raji 细胞

按照文献设计针对 DNMT1 和 DNMT3b 的双链 RNAi 序列^[4] ,寡核苷酸序列如下 :

DNMT1: 正义链 ,5-TCT GTC CGT TCA CAT GTG TTT CCT GTCC ;

反义链 ,5-ACA CAT GTG AAC GGA CAG ATT CCT GTC TC

(nucleotide positions 61,544-61,565; GenBank accession no. NM_001379);

DNMT3b: 正义链, 5-AGA TGA CGG ATG CCT AGA GTT CCT GTC TC ;

反义链, 5-CTC TAG GCA TCC GTC ATC TTT CCTGTC TC

(nucleotide positions 46,915-46,936; GenBank accession no. NM_006892)。

取对数生长期细胞 , 调整密度为每孔 1×10^6 个细胞接种至六孔板中。分别进行如下处理 :1)DNMT1+3b 组 :采用针对 DNMT1 和 DNMT3b 的 siRNA 转染细胞,转染后培养 6h ,更换无血清培养基后继续培养至 48h。2)DNMT1 组 : 采用针对 DNMT1 的 siRNA,转染后培养 6h ,更换无血清培养基后继续培

养至 48h。3)DNMT3b 组 :采用针对 DNMT3b 的 siRNA 转染后培养 6h ,更换无血清培养基后继续培养至 48h。4)阳性对照组 :使用终浓度 5mg/m L 的 5- 杂氮脱氧胞嘧啶(5-Aza-dC)培养 6h ,更换无血清培养液培养至 48h ;5)阴性对照组 :采用无序列 siRAN 转染细胞 ,转染后培养 6h ,更换无血清培养基后继续培养至 48h。

以上各组中脂质体浓度均为 $2 \mu\text{l}/\text{ml}$ 。细胞转染步骤按 Li-pfectamine 2000TM 脂质体转染试剂说明书进行。

1.5 RT-PCR 检测 CTA 和 DNMT 相关基因表达

在各组细胞到达处理的时间点后 ,采用 Trizol 提取上述各组细胞总 RNA , 按 fermentas kit 的说明书反转录制备 cDNA。在 GeneBank 中检索 DNMT1 (NM_001130823.1) 、DNMT3b (NM_175848.1) 、CT10 (NM_016249) 、MAGE-A1(NM_004988.4) 、PRAME (NM_206955.1)、SP17(NM-001009738.1)、NY-ESO-1 (NM-001327.2)、HCA587 (AF-151378.1)、HCA661 (NM-016521.2)和 SSX1 (NM_005635.2)等 CTA 的 cDNA 序列 ,利用 PREMIER6 软件设计对应的扩增引物 ,并由北京鼎国公司合成 (表 1) 。引物工作液浓度为 $10 \mu\text{mol}/\text{L}$, 在 $20 \mu\text{l}$ 反应体系 (表 2)中进行 PCR。反应参数 : 94°C 变性 30 s , 60°C 退火 30 s , 72°C 延伸 1 min ,共 28-35 个循环 ,第一个循环前预变性 94°C 3 min ,最后一个循环结束后 72°C 延伸 10 min。收集 PCR 产物 ,在 2.0%琼脂糖凝胶中电泳 ,GOLDENVIEW (上海雷浩信息科技有限公司)显色 ,凝胶成像仪(北京六一仪器厂 WD-9413B)拍照记录结果 ,并用软件进行条带分析。

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

Gene	Sequence	Size of product
β -actin	F:CGTGGACATCCGCAAAGA R:GAAAGGGTGTAAACGCAACTAAG	304bp
DNMT1	F:5'CCGTCACCCCTGTTTCTG3' R:5' GTCTTAATTTCACATACAGTGG3'	254 bp
DNMT3b	F:5' TGAAACAAGGCACAGTTTTTT3' R:5' TGGTGCTATTTTGTAGAATAAGGA3'	170 bp
CT10	F:5'AAAGAGCAATACATGTGCGAC3' R:5' CTTTGCAATTTCTGTCCCATATG3	139bp
HCA587	F:5' CACAGATGAGGAAGAGGAGGAA3' R: 5' GACCACCAAGAATCAGAGAAGAG3'	104bp
HCA661	F:5' CGGCAGGTTCCAGGTCTAAT3' R:5' GAGGTCGTCATCGTTGTTGTC3	167bp
MAGE-A1	F:5' ATGAGTTGCAGCCAAGGC3' R:5' CAACCATCCCTTAAAAAAAACA3'	222bp
CT9	F:5' GCTCGGACACAGGAACCTA3' R:5' GCTTCTGATGACTGCTGATGTT3'	176bp
NY-ESO-1	F:5' CGCCTGCTTGAGTTCTACCT3' R:5' GTCAGTCGGATAGTCAGTATGTTG3'	158bp
PRAME	F:5' AAGCAGCCACAGTTTCAG3' R:5' GTACTTCCCAAGCCAGAATC3'	238bp
SSX-1	F:5' GTTTCAAAGTCACCCTCCC 3' R:5' TGCTTCTGACACTCCCTTC 3'	203bp

表 2 PCR 反应体系
Table 2 PCR reaction system

cDNA	2 μ l
Forward Primer	1 μ l
Reverse Primer	1 μ l
PCR Master Mix	10 μ l
ddH ₂ O	6 μ l
Total	20 μ l

2 结果

2.1 CTA 基因在 Raji 细胞中的表达

NY-ESO-1、SSX-1、MAGE-A1、CT9、HCA587、HCA661、CT10、PRAME mRNA 表达情况如图 1。其中 SSX-1 和 NY-ESO-1 在 Raji 细胞中表达 ,其他均不表达。

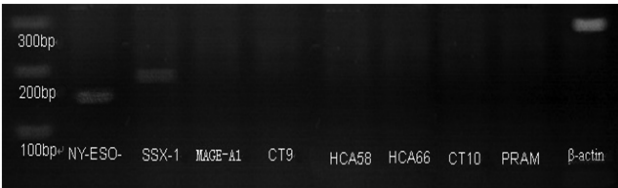


图 1 检测 8 种 CTA 基因在 Raji 细胞的表达情况
Fig.1 Expression file of 8 CTA genes in Raji cells

2.2 TNF-α 对 Raji 细胞株 CTA 表达的调节

CT10、SSX-1、MAGE-A1、CT9、HCA587、HCA661、NY-ESO-1、PRAME mRNA 表达结果如图 2。其中 SSX-1 的表达水平在 250 pg/ml 4 小时和 6 小时组表达升高 ,NY-ESO-1 在 1000 pg/ml 6 小时组升高。其他的 CTA 在 Raji 细胞株均无表达 , TNF-α 也不能激活其再表达。

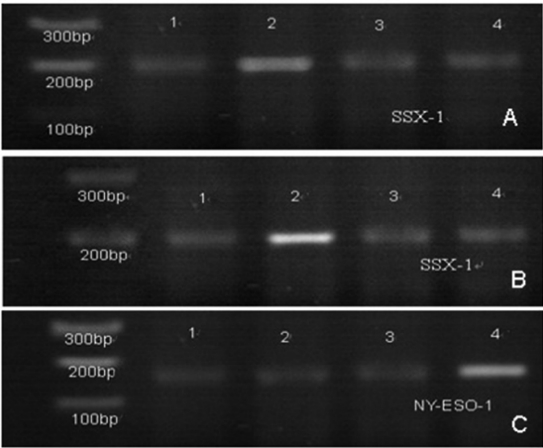


图 2 SSX-1 和 NY-ESO-1 基因的 mRNA 在 Raji 细胞株的表达 :A. TNF-α 处理 4 小时后 SSX-1 的表达 ;B. TNF-α 处理 6 小时后 SSX-1 的表达 ;C. TNF-α 处理 6 小时后 NY-ESO-1 的表达。从左至右各组如下 :1.未处理的 Raji 细胞 ;2.250 pg/ml 处理组 ;3.500 pg/ml 处理组 ;4.1000 pg/ml 处理组

Fig.2 Effect of TNF-α on the expression of SSX-1 and NY-ESO-1 in Raji cell line detected by RT-PCR :A. SSX-1 expression after 4 h ; B. SSX-1 expression after 6 h ; C. NY-ESO-1 expression after 6 h. Groups:1. Untreated Raji cells; 2. Treated with TNF-α 250 pg/ml; 3. Treated with TNF-α 500 pg/ml; 4. Treated with TNF-α 1000 pg/ml

2.3 TNF-α 对 Raji 细胞株 DNMT1 和 DNMT3b 表达的影响

经 TNF-α 处理后 ,Raji 细胞的 DNMT1 和 DNMT3b 的表达与未处理组相比较 ,并未发生明显变化(图 3)。这说明 TNF-α 对 Raji 细胞 CTA 表达的影响并不需要通过 DNMT1 和 DNMT3b 作为中介。

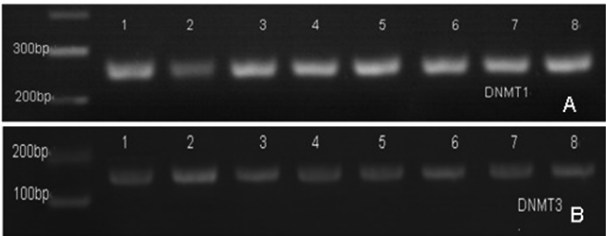


图 3 DNMT1 和 DNMT3b 在 Raji 细胞株的表达情况。A.Raji 细胞 DNMT1 的表达 ;B. Raji 细胞 DNMT3b 的表达。实验分组 :1为未处理的 Raji 细胞,4 小时组 ;2 为 250 pg/ml 4 小时处理组 ;3 为 500 pg/ml 4 小时处理组 ;4 为 1000 pg/ml 4 小时处理组 ;5 为未处理 Raji 细胞 6 小时组 ;6 为 250 pg/ml 6 小时处理组 ;7 为 500 pg/ml 6 小时处理组 ;8 为 1000 pg/ml 6 小时组

Fig.3 Effect of TNF-α on the expression of DNMT1 and DNMT3b in Raji cell line detected by RT-PCR: A. expression of DNMT1 in Raji cells; B. expression of DNMT3b in Raji cells. Groups: 1. Untreated Raji cell,for 4 h; 2. Treated with 250 pg/ml, for 4h; 3. Treated with 500 pg/ml, for 4h; 4. Treated with 1000 pg/ml, for 4h; 5. Untreated Raji cell,for 6 h; 6. Treated with 250 pg/ml, for 6h; 6. Treated with 500 pg/ml, for 6h; 7. Treated with 1000 pg/ml, for 6h

2.4 RT-PCR 检测 siRNA 干扰后 DNMT1 和 DNMT3b 的表达

DNMT1 + 3b 组、DNMT1 组、DNMT 3b 组、受相应 siRNA 干扰,DNMT 的表达均降低 ;在阳性对照组中 DNMT 的表达明显降低、阴性对照组中 DNMT 的表达较强 (图 4)。

2.5 siRNA 干扰后 Raji 细胞 CTA 的表达情况

经 RT-PCR 筛选后 ,发现被针对 DNMT1+3b 的 siRNA 或阳性对照组 5-aza-dC 处理后的 Raji 细胞能诱发 PRAME 基因的再表达 (图 5)。而单独针对 DNMT1 或 DNMT3b 的 siRNA 干扰并没能产生相同的效应 ,这表明 DNMT1 和 DNMT3b 的联合作用导致了 PRAME 基因的再表达。

3 讨论

抗原特异性的免疫治疗手段能够特异地识别肿瘤细胞 ,同时消灭转移在身体各处正常组织中的肿瘤细胞 ,是一种理想的抗肿瘤治疗措施。长期以来 ,筛选具有应用价值的肿瘤特异的

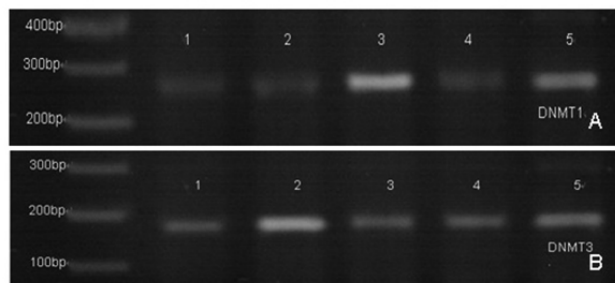


图4 RT-PCR 检测 Raji 细胞的 DNMT1 和 DNMT3b 基因的表达, 1 - 5 依次为 DNMT1 + 3b 组, DNMT1 组, DNMT3b 组, 阳性对照组、阴性对照组

Fig.4 Expression of DNMT1 and DNMT3b genes detected by PCR.

Groups: 1. DNMT1+3b ;2. DNMT1; 3. DNMT3b; 4. Positive control; 5. Negative control

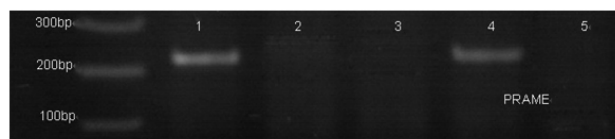


图5 RT-PCR 检测 siRNA 干扰后 PRAME 基因的表达, 1 - 5 依次为 DNMT1 + 3b 组, DNMT1 组, DNMT3b 组, 阳性对照组、阴性对照组

Fig.5 Expression of PRAME gene detected by PCR after transfected with agents. Groups: 1. DNMT1+3b ;2. DNMT1; 3. DNMT3b; 4. Positive control; 5. Negative control

抗原分子是抗原特异性免疫治疗的一个核心问题。近年来, CTA 因其表达的特异性和较强的免疫原性, 成为肿瘤免疫治疗的研究热点^[5]。然而, CTA 在不同的肿瘤细胞中表达具有差异, 并且即使在同一种肿瘤组织中表达也具有异质性, 这些都会影响免疫治疗的效果^[6]。

TNF- α 能够促进肿瘤的发生和发展, 又可以对肿瘤细胞发挥毒性效应^[7-9]。在 Raji 细胞表面存在两种 TNF- α 受体, TNFR1 和 TNFR2。其中, TNFR1 主要参与凋亡信号的传导, 而 TNFR2 则传递细胞增殖的信号^[10]。研究证明 Raji 细胞表面有高密度的 TNFR2 表达^[11]。环境中低浓度 TNF- α 可以经由 TNFR2 诱导增殖, 而高浓度的 TNF- α 则能通过细胞表面低表达的 TNFR1 诱导凋亡^[12]。这也可以解释为何不同不同浓度条件在 Raji 细胞引起不同的效应。例如在终浓度为 250 pg/ml 时, TNF- α 可以引发 Raji 细胞增殖, 在终浓度为 500 pg/ml 时, 5 小时前有增殖抑制效应, 其后却可以诱导 Raji 细胞增殖, 而在最高终浓度 1000 pg/ml 时, 会强烈抑制其增殖, 并诱导细胞凋亡^[12]。

DNA 甲基化转移酶 DNMT1 和 DNMT3b 是表观调控肿瘤细胞 CTA 基因表达的关键酶^[13]。DNMT1 是维持基因组甲基化状态的主要催化酶, 而 DNMT3b 主要负责全新甲基化合成^[14]。研究表明基因敲除 DNMT1 和 DNMT3b 会诱导 CTA 在肿瘤细胞的表达或使已表达的 CTA 表达上调。本研究使用了针对人 DNMT1 和 DNMT3b 的 mRNA 的特异性 siRNA, 能够专一性的有效抑制 DNMT1 和 DNMT3b 基因的表达, 以检测对 Raji 细胞 CTA 基因表达的影响。DNMT 抑制物 5-Aza-dC 可以通过抑制 DNA 甲基化转移酶而激活多种 CTA 的表达, 如在人类

黑色素瘤细胞中激活 MAGE-A1 的表达^[15]。

本研究结果表明, 应用 TNF- α 或抑制 DNMT, 能够诱导 Raji 细胞表达的 SSX-1、NY-ESO-1 和 PRAME 等 CTA 的表达上调。这表明, 采用适当的细胞因子治疗或基因干扰措施等辅助性手段, 可能有助于提高肿瘤细胞表达的 CTA 水平, 提高其免疫原性, 促进机体免疫系统对肿瘤细胞的识别和杀伤。从而, 为进一步深入探讨细胞因子和表观遗传改变对 CTA 表达调控的影响, 改善针对 CTA 的抗肿瘤免疫疗法中的效果提供新的思路和初步的实验依据。

参考文献(References)

- [1] Fijak M, Meinhardt A. The testis in immune privilege [J]. Immunological Reviews, 2006, 213(1): 66-81
- [2] Old LJ. Cancer-Testis (CT) antigens-a new link between gametogenesis and cancer [J]. Cancer Immun, 2001, 1(1): 1-7
- [3] Nicholaou T, Ebert L, Davis I D, et al. Directions in the immune targeting of cancer: lessons learned from the cancer-testis Ag NY-ESO-1 [J]. Immunol Cell Biol, 2006, 84(3): 303-317
- [4] Lue YW, Rahmatpanah F, Shi HD, et al. Double RNA Interference of DNMT3b and DNMT1 Enhances DNA Demethylation and Gene Re-activation [J]. Cancer research, 2003, 63, 6110-6115
- [5] Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy [J]. Cancer Science, 2009, 100(11): 2014-2021
- [6] Xie X, Wacker HH, Huang S, et al. Differential expression of cancer-testis genes in histological subtypes of non-Hodgkin's lymphomas [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(1): 167-173
- [7] Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2002, 13: 135-141
- [8] Rubin MF, Werbajh S. TNF-alpha enhances estrogen-induced cell proliferation of estrogen-dependent breast tumor cells through a complex containing nuclear factor-kappa B [J]. Oncogene, 2006, 25: 1367-1377
- [9] Baxevas CN, Voutsas F, Tsitsilonis OE, et al. Compromised anti-tumor responses in tumor necrosis factor-alpha knockout mice. Eur [J]. Immunol, 2003, 30: 1957-1966
- [10] Johrer K, Janke K, Krugmann J, et al. Transendothelial migration of myeloma cells is increased by tumor necrosis factor (TNF-alpha) via TNF receptor 2 and autocrine up regulation of MCP-1 [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10: 1901-1910
- [11] Zhang HL, Yan D, Shi X, et al. Transmembrane TNF-a mediates "forward" and "reverse" signaling, inducing cell death or survival via the NF-B pathway in Raji Burkitt lymphoma cells [J]. Leukocyte Biology, 2008, 84: 789-797
- [12] Vladimir J, Gordana B, Vesna K. Effect of TNF- α on Raji cells at different cellular levels estimated by various methods [J]. Ann Hematol, 2006, 85: 86-94
- [13] James SR, Link PA, Karpf AR. Epigenetic regulation of X-linked cancer/germline antigen genes by DNMT1 and DNMT3b [J]. Oncogene, 2006, 25, 6975-6985
- [14] Michał WŁ, Paweł PJ. The role of DNA methylation in cancer development [J]. Folia histochemica et cytobiologica, 2006, 44: 143-154
- [15] Adam R, Karpf A. A Potential Role for Epigenetic Modulatory Drugs in the Enhancement of Cancer/Germ-Line Antigen Vaccine Efficacy [J]. Epigenetics, 2006, 1(3): 116-120