

# 白细胞介素-6 参与肿瘤相关抗原 HCA520 对 HEK293 细胞的促增殖作用

钱晓萍\*, 李国栋\*, 韩克军, 陈慰峰<sup>△</sup>

(北京大学基础医学院免疫学系, 北京 100083)

**[摘要]** **目的:** 研究肿瘤相关抗原 HCA520 对 HEK293 细胞增殖的影响, 获得 HCA520 生物学功能的初步提示。**方法:** 构建 pcDNA3-HCA520-flag 真核表达载体转染 HEK293 细胞并建立稳定转染细胞系, 利用 MTT 实验观察 HCA520 对 HEK293 细胞增殖速率的调节。通过 RT-PCR 检测可能参与 HCA520 对 HEK293 细胞增殖促进作用的相关分子, 并用 3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四唑 (MTT) 实验进一步验证目标分子对 HEK293 细胞增殖的作用。**结果:** MTT 实验结果显示 HCA520 显著提高 HEK293 细胞的增殖速率, HCA520 上调白细胞介素-6 在 HEK293 细胞中的表达, 后者部分参与 HCA520 对 HEK293 细胞的促增殖作用。**结论:** HCA520 对 HEK293 细胞的增殖具有促进作用, 并推测可能通过促进细胞恶性增殖在肿瘤发生中发挥作用。

**[关键词]** 抗原, 肿瘤; 细胞系; 细胞分裂; 细胞因子类; 白细胞介素-6

**[中图分类号]** R733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2005)03-0310-04

## Interleukin-6 is involved in the enhanced proliferation of HEK293 cells by the tumor specific antigen of HCA520

QIAN Xiao-ping\*, LI Guo-dong\*, HAN Ke-jun, CHEN Wei-feng<sup>△</sup>

(Department of Immunology, Peking University School of Basic Medical Sciences, Beijing 100083, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effect of tumor specific antigen of HCA520 on the proliferation of HEK293 cells and to obtain some functional implications for HCA520. **Methods:** MTT assay was performed with HEK293 stable cell lines transfected with pcDNA3-HCA520-flag construct. Cytokines probably involved in HCA520 enhanced proliferation were screened by RT-PCR, and effect of these cytokines on the HEK293 cell proliferation was further confirmed by MTT assay. **Results:** HCA520 significantly promoted the proliferation of HEK293 cells, which was at least partially attributed to the up-regulation of IL-6 in HEK293 cells by HCA520. **Conclusion:** HCA520 might accelerate tumorigenesis by promoting proliferation of cancerous cells.

**KEY WORDS** Antigens, neoplasms; Cell line; Cell division; Cytokines; Interleukin-6

HCA520 是用 SEREX 方法从人原发性肝细胞癌中克隆到的一种新的肿瘤相关抗原<sup>[1]</sup>。染色体定位于 16p12.2, 基因全长为 2 396 bp, 编码 196 个氨基酸, 亚细胞定位于细胞浆<sup>[2,3]</sup>。既往研究发现, HCA520 是一个多功能蛋白, 可能通过各种信号途径参与细胞的多种生物学过程。比如 HCA520 是 EF-hand 家族成员, 而且可以与  $Ca^{2+}$  在体外发生结合反应<sup>[4]</sup>; HCA520 作为  $Na^+ - H^+$  交换子 ( $Na^+ - H^+$  exchanger, NHE) 的辅助因子参与肿瘤细胞内 pH 微环境的调节<sup>[5,6]</sup>; HCA520 与钙调神经磷酸酶 (calcineurin) 调节亚单位有较高的同源性 (35%), 可能对其活化有调节作用<sup>[7]</sup>; 此外还可能参与细胞的囊泡

分泌活动等<sup>[8]</sup>。鉴于 HCA520 最初克隆自肿瘤组织, 而且在肝癌中具有较高的表达阳性率 (50%)<sup>[1]</sup>, 因此, HCA520 与肿瘤的发生、发展可能存在一定的关系。本研究探讨了 HCA520 对 HEK293 细胞增殖的影响及可能参与 HCA520 调节作用的细胞因子, 试图寻求 HCA520 参与肿瘤发生、发展过程功能的初步线索。

### 1 材料与方法

#### 1.1 细胞培养

本实验所用的细胞培养基为添加 10% (体积分数) 小牛血清 (NCS) 的 DMEM, 其中含有 1.5

mmol/L 谷氨酰胺,50 u/mL 的青霉素和 50 u/mL 的链霉素。HEK293 细胞和 HCA520 转染株均在饱和湿度、5% (体积分数) CO<sub>2</sub>、37 °C 孵箱中培养。

1.2 HEK293 细胞的稳定转染

根据 HCA520 的基因序列,将包括全部编码区的 cDNA 片段连入 pcDNA3 载体的 CMV 启动子下游,构建 pcDNA3-HCA520-flag 真核表达质粒<sup>[3]</sup>。HEK293 细胞以每孔 2.5 × 10<sup>5</sup> 的密度接种于六孔板中,生长至 80% 满时进行转染。将 1 μg 重组质粒与 3 μL TransFast™ 转染试剂 (Promega) 和无血清 DMEM 混合,总体积为 1 mL,混匀并室温孵育 15 min。将待转染细胞以无血清 DMEM 洗两遍,然后加入上述转染试剂混合物孵育 1 h,再加入 37 °C 预热的 2% (体积分数) NCS-DMEM。转染 48 h 后,用 2.5 g/L G418 (GIBCO) 筛选转染成功的细胞株。以

有限稀释法建立单克隆细胞株,通过 RT-PCR 鉴定稳定表达 HCA520 的细胞株。本实验以 pcDNA3 空载体平行转染 HEK293 细胞,作为空载体对照。

1.3 RT-PCR

各细胞株均采用 TRIZOL 一步法提取总 RNA。mRNA 逆转录采用 Promega 公司试剂盒。基本操作步骤:取总 RNA 2 μg,补无 RNA 酶的水至 9.9 μL,70 °C,10 min,迅速放于冰上。每个反应管加入 10.1 μL 混合试剂 [MgCl<sub>2</sub>, 25 mmol/L × 4 μL; 10 × 反应缓冲液, 2 μL; dNTP, 10 mmol/L × 2 μL; RNA 酶抑制物, 0.5 μL; AMV 逆转录酶, 0.6 μL; Oligo (dT)<sub>15</sub>, 1 μL], 42 °C, 1 h。95 °C, 5 min 终止反应后,每管补水至 100 μL, -20 °C 冻存备用。所有 PCR 反应均为 32 个循环,1% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳鉴定,引物和 PCR 反应条件见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列、反应条件和片段长度  
Table 1 Related parameters for RT-PCR reactions

Genes	Primer sequences	Reaction conditions	Products size
HCA520	F: 5'-CAGGCATGAGATGCTGCAGGTTCTCCGTC-3' R: 5'-TGTGGTCTGTTAGGAACCGGGCTGCACAG-3'	94 °C, 20 s; 70 °C, 15 s; 72 °C, 50 s	829 bp
EGF	F: 5'-CAGGTAATGGAGCGAAGCTTTTCAT-3' R: 5'-GAGTTAAATGCCATCACTGTATCT-3'	94 °C, 20 s; 57 °C, 20 s; 72 °C, 40 s	624 bp
TNF-α	F: 5'-ACAAGCCTGTAGCCCAATGTT-3' R: 5'-AAAGTAGACCTGCCACAGACT-3'	94 °C, 20 s; 57 °C, 20 s; 72 °C, 40 s	729 bp
IL-6	F: 5'-ATGAACCTCTTCTCCACAAGCGC-3' R: 5'-GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3'	94 °C, 20 s; 64 °C, 20 s; 72 °C, 50 s	628 bp
GM-CSF	F: 5'-GGAGCATCTGAATGCCATC-3' R: 5'-ATCTGGGTGACACAGGAAG-3'	94 °C, 20 s; 57 °C, 20 s; 72 °C, 20 s	261 bp

1.4 Western blotting

细胞裂解后提取总蛋白并经 Bradford 试剂定量,12.5% (体积分数) 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离后,电转移到硝酸纤维素膜。5% (质量分数) 的脱脂奶粉封闭 1 h 后,按 1:10 000 的比例加入兔抗 HCA520 多克隆抗体 (一抗),室温孵育 1 h 后,用 Tris 缓冲液 (TBS) 洗去未结合的抗体 (10 min × 3 次),然后加入碱性磷酸酶标记的二抗 (Promega),室温反应 1 h 后,用 TBS 洗去未结合的二抗 (10 min × 3 次);最后加入 BCIP/NBT (Promega) 显色。

1.5 3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四唑 (MTT) 增殖分析

将对数生长期的细胞接种于 96 孔板中,空载体对照和 HCA520 转染组各设 5 个复孔,每孔 5 × 10<sup>4</sup> 个细胞。继续培养 48 h 后,吸去正常培养基,每孔加入无血清 DMEM 配制的 MTT (1 g/L) 50 μL。孵育 6 h 后每孔加 120 μL 终止液 (浓盐酸: 异丙醇

的体积比 1:300), 37 °C, 10 min 至颗粒完全溶解后,酶标仪 490 nm 波长处测取光密度。用 MTT 实验检测 IL-6 的促增殖作用时,不同浓度的 IL-6 分别在 HEK293 细胞铺板时加入培养基中,其余步骤如上所述。

1.6 统计学分析

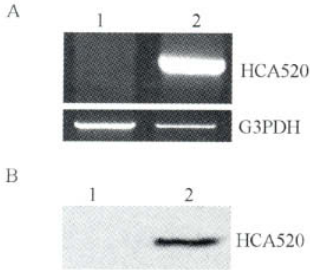
MTT 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异利用单因素方差分析配合 LSD 检验进行比较。统计分析使用 SPSS10.0 软件包, P < 0.05 被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 HCA520 稳定转染株的鉴定

经过 G418 筛选和有限稀释,得到 HEK293 细胞的单克隆稳定转染株。对建成的稳定转染细胞系进行了 RT-PCR 和 Western blotting 检测,分别在 mRNA 水平和蛋白水平对 HCA520 的表达情况进行了鉴定。如 RT-PCR 结果显示 (图 1A), 在筛选到的一个转染细胞系中可以检测到 HCA520 的高表达,

而在空载体对照中则没有表达。而且,这一结果也得到了 Western blotting 的验证(图 1B),即该株细胞系在蛋白水平上也有 HCA520 的表达,从而为后续 HCA520 的功能研究提供了便利。



1, mock control; 2, HCA520 transfectant.

图 1 HEK293 细胞稳定转染株的鉴定

Figure 1 Identification of HEK293 stable transfectants

### 2.2 HCA520 促进 HEK293 细胞的增殖

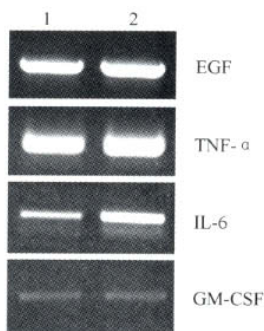
为进一步观察 HCA520 对 HEK293 细胞生物行为可能的影响,进行了 MTT 实验,并发现 HCA520 明显促进 HEK293 细胞的增殖。将空载体对照组的吸光度值设为 1,并对比两组的吸光度值,可以看到 HCA520 组的增殖速率是对照组的大约 2.8 倍( $P < 0.05$ )。

### 2.3 增殖相关细胞因子的检测

为明确在 HCA520 对 HEK293 细胞的促增殖作用中可能发挥作用的细胞因子,分别对 EGF, TNF- $\alpha$ , IL-6 和 GM-CSF 在 HCA520 转染株和对照细胞株中的表达情况进行了对比。经过 32 个循环的 RT-PCR,结果显示 EGF, TNF- $\alpha$  和 GM-CSF 在两株细胞系中的表达没有明显改变,但 IL-6 在 HCA520 转染株中的表达明显高于空载体对照(图 2)。即 IL-6 可能参与 HCA520 对 HEK293 的促增殖作用。

### 2.4 IL-6 对 HEK293 细胞的促增殖作用

通过在 HEK293 培养基中加入不同剂量的 IL-6,利用 MTT 实验对 IL-6 的促增殖作用进行了验证。与不加 IL-6 的空载体组相比,IL-6 在 100  $\mu$ /mL 和 200  $\mu$ /mL 两个浓度下,对 HEK293 细胞的增殖没有明显改变;而在 400  $\mu$ /mL 和 800  $\mu$ /mL 两个浓度下,对该细胞具有明显的促增殖作



1, mock control; 2, HCA520 transfectant  
2 增殖相关细胞因子的 RT-PCR 检测  
Figure 2 RT-PCR detection for growth related cytokines

用,尤其在 400  $\mu$ /mL 的剂量下作用最强,吸光度值约为对照组的 1.7 倍( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

HCA520 是从肝细胞性肝癌中克隆到的肿瘤相关抗原,在正常组织中的表达较为局限,主要集中于肾、前列腺、小肠和结肠;此外,HCA520 不表达于正常肝组织,但在肝癌组织中的阳性率却高达 50%<sup>[1]</sup>。另有文献报道,HCA520 在正常组织中并没有表达<sup>[6]</sup>,而仅高表达于多种肿瘤组织和肿瘤细胞系中,并通过调节 NHE 的活性抵抗血清缺失诱导的细胞凋亡。因此,HCA520 可能在肿瘤的发生和发展过程中发挥重要的调节作用。细胞的恶性增殖是肿瘤发生的特征之一,因此我们在 HEK293 细胞中表达 HCA520,以观察其是否对细胞的增殖具有调节作用。MTT 试验结果证实,HCA520 明显促进 HEK293 细胞的增殖,从而为 HCA520 可能参与肿瘤的发生提供了初步的试验依据。

人胚肾细胞系(HEK293)的细胞形态和生物学行为类似上皮细胞,而且受多种信号转导途径的调节,因此常用来做基因转染以研究蛋白质的生物学功能。为了进一步探讨可能在 HEK293 增殖通路中发挥作用的细胞因子,我们选择并检测了可能参与肾脏细胞和上皮细胞增殖的分子,包括 EGF, TNF- $\alpha$ , IL-6 和 GM-CSF。与空载体对照相比,IL-6 在 HCA520 转染株中出现明显的上调表达,结果提示 IL-6 可能在 HCA520 对 HEK293 细胞的促增殖作用中发挥重要功能。IL-6 主要由单核细胞、纤维母细胞、淋巴细胞和部分上皮细胞分泌,并且有文献报道 IL-6 是肾细胞肾癌(RCC)的自分泌生长因子<sup>[9]</sup>。而来源于胚胎肾的 HEK293 细胞被证实表达内源性 IL-6 受体,与 IL-6 配体结合后,通过 JAK-STAT 信号途径调节靶细胞的增殖<sup>[10]</sup>。本研究 MTT 试验中,IL-6 在 400  $\mu$ /mL 的剂量下对 HEK293 细胞的促增殖作用最强,进一步确证了 IL-6 对细胞增殖的调节作用。

综上所述,肿瘤相关抗原 HCA520 对 HEK293 细胞具有明显的促增殖作用(2.8 倍),其对细胞增殖的促进作用至少部分地解释了其在肿瘤组织中的高表达。HCA520 上调 IL-6 在 HEK293 细胞中的表达,后者显著提高 HEK293 细胞的增殖速度(1.7 倍)。但由于 IL-6 并不能完全解释 HCA520 对 HEK293 细胞的促增殖作用,因此除了 IL-6,可能还有其他分子参与了 HCA520 的促增殖活性。而且,HCA520 对细胞周期的影响以及相关的信号转导途

径尚待进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Wang Y, Han KJ, Pang XW, et al. Large scale identification of human hepatocellular carcinoma associated antigens by autoantibodies [J]. *J Immunol*, 2002, 169:1102 - 1109
- 2 杨美香,曲 迅,韩克军,等. 生物信息学在新基因 HCA520 研究中的作用 [J]. *药物生物技术*, 2004, 11:216 - 220
- 3 杨美香,曲 迅,韩克军,等. 肿瘤相关抗原 HCA520 真核表达载体的构建及细胞内表达的定位分析 [J]. *细胞生物学杂志*, 2004, 26:193 - 196
- 4 杨美香,韩克军,曲 迅,等. 肝细胞癌相关抗原编码基因 HCA520 与钙离子的结合分析 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2004, 20:145 - 147
- 5 Pang T, Su X, Wakabayashi S, et al. Calcineurin homologous protein as an essential cofactor for Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276:17367 - 17372
- 6 Pang T, Wakabayashi S, Shigekawa M. Expression of calcineurin B homologous protein 2 protects serum deprivation-induced cell death by serum-independent activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277:43771 - 43777
- 7 李国栋,王月丹,陈慰峰. CHP 与钙调神经磷酸酶的活性调节 [J]. *自然科学进展*, 2004, 14:852 - 855
- 8 Nakamura N, Miyake Y, Matsushita M, et al. KIF1Bbeta2, capable of interacting with CHP, is localized to synaptic vesicles [J]. *J Biochem (Tokyo)*, 2002, 132:483 - 491
- 9 Horiguchi A, Oya M, Marumo K, et al. STAT3, but not ERKs, mediates the IL-6-induced proliferation of renal cancer cells, ACHN and 769P [J]. *Kidney Int*, 2002, 61:926 - 938
- 10 von Laue S, Finidori J, Maamra M, et al. Stimulation of endogenous GH and interleukin-6 receptors selectively activates different Jaks and Stats, with a Stat5 specific synergistic effect of dexamethasone [J]. *J Endocrinol*, 2000, 165:301 - 311

(2005-04-01 收稿)  
(本文编辑:王 蕾)

## · 消息 ·

### 第五届亚洲 - 太平洋地区国际口腔正畸大会在北京召开

2005年3月31日至4月2日,第五届亚洲-太平洋地区国际口腔正畸大会(5th Asian-Pacific Orthodontic Conference, 5th APOC)在北京友谊宾馆隆重召开。大会由中华口腔医学会正畸专业委员会和中国香港矫正学会共同举办,21个国家和地区的231名外宾与810名国内代表参加了会议。亚洲-太平洋地区国际口腔正畸大会每隔3年举办一次,迄今已有15年历史,见证和促进了近十年来亚太地区正畸事业为世界正畸事业的发展作出的巨大贡献。本次大会系中国首次争取到举办权,这也是国际系列口腔正畸学术年会第一次进入中国。本次大会特邀嘉宾规模、国内外参会人数均创大会记录,而会议接待、组织的高效精密深得国内外同行的好评。

开幕式上,亚太正畸学会会长三谷英夫教授、本次大会组委会联合主席傅民魁教授、中华口腔医学会正畸专业委员会主任委员林久祥教授发言致词。中华口腔医学会会长张震康教授对来宾表达了热忱的欢迎。本次会议由62个大会发言,22个青年论坛发言,146张壁报展示,237篇文摘,矫治病例展示,厂家商展和会后8个专题讲座组成,共计3个会

场,3个展厅。

大会邀请到世界正畸医师联盟主席,美国正畸医师协会会长,欧洲正畸学会会长,日本矫正学会会长,韩国矫正学会会长,泰国矫正学会会长,新加坡矫正学会会长,马来西亚矫正学会下届会长,中国香港矫正学会会长;以及日、韩 MEAW 技术研究会,日本亚历山大矫正技术学会,日本生物渐进技术研究会等的代表;此外东京、冈山、北海道、森田、大阪、广岛、横滨等地的医科大学的矫正系主任,及韩国汉城等5个医科大学的矫正系主任率队参加了会议。

近年深受瞩目的恒牙期严重骨性 III 类牙颌畸形的非手术矫正、骨牵引技术、无托槽矫正技术(Rainer-Reginald Mithke, 德国)、舌侧矫正技术(Didier Fillion, 法国)和亚洲的5种种植支抗的代表人物,均出席会议并做学术发表。报告所覆盖口腔正畸学术领域的广度、深度、新颖性和代表性,会后获得良好反馈。本次大会的成功举办是中国正畸发展史上的一件大事,对我国正畸事业的发展将是巨大的推动。

(中华口腔医学会正畸专业委员会)