



细胞表面唾液酸及其连接方式对乳腺癌细胞黏附的影响

唾液酸是蛋白质或脂质糖基化过程中最后添加到寡糖链末端的9碳单糖，与次末端的半乳糖(Gal)、N-乙酰半乳糖胺(N-GalNAc)或糖链上的其他唾液酸以 $\alpha 2, 3$ -、 $\alpha 2, 6$ -或 $\alpha 2, 8$ -方式连接。除了带硫酸基的单糖外，唾液酸是糖蛋白在生理pH环境下携带的唯一的带负电荷的单糖。由于他位于糖链末端并携带负电荷，唾液酸对分子间甚至细胞间的相互作用都有潜在的抑制作用[1]。 $\alpha 2, 6$ -唾液酸转移酶(ST6Gal I)催化唾液酸以 $\alpha 2, 6$ 方式连接到N-连接的糖蛋白糖链末端的Gal $\beta 1, 4$ GlcNAc上，蛋白质和脂质寡糖链的 $\alpha 2, 6$ -唾液酸化与 $\alpha 2, 6$ -唾液酸转移酶的活性密切相关[2][3]。肿瘤细胞和细胞外基质的黏附作用是肿瘤细胞转移的一个重要步骤，唾液酸在其中起了什么作用，文献报道很不一致。为了探索细胞总唾液酸以及唾液酸连接方式对肿瘤细胞黏附性的影响，我们以顺义或反义 $\alpha 2, 6$ -唾液酸转移酶(ST6Gal I)cDNA转染细胞，筛选高、低表达 $\alpha 2, 6$ 唾液酸的细胞克隆，检测各转染细胞的同源凝集作用，并比较唾液酸酶处理前后肿瘤细胞对胶原IV黏附力的变化。

1 材料和方法

1.1 材料

主要试剂和材料参见文献[4][5]。乳腺癌细胞MDA-MB-435购自ATCC公司，人类全长 $\alpha 2, 6$ 唾液酸转移酶cDNA(ST6Gal I-cDNA, 2188 bp)由美国哈佛大学医学院Ivan Stamenkovic博士馈赠。纤维连接蛋白(FN)、胶原IV(Col-IV)以及层粘连蛋白(LN)购自BD公司，蛋白质检测染料浓缩液购自Bio-Rad公司，Calcein-AM购自Molecular Probes公司，FITC-标记的黑接骨木凝集素(FITC-SNA)购自Vector公司，霍乱弧菌唾液酸酶(*Vibrio cholerae*)购自Dade-Behring公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 乳腺癌细胞MDA-MB-435用DMEM培养基(Gibco公司, UK)稀释传代，培养基含10%小牛血清、2 mmol/L谷胺酰胺、100 U青霉素和0.1 mg/ml链霉素。细胞置于37 °C、5% CO₂ 孵箱内传代培养，取对数生长期的细胞进行实验。用0.05%胰蛋白酶/0.02%EDTA消化，再以自身培养基上清液复苏细胞，PBS洗涤。以台盼蓝染色鉴定细胞活力，实验用细胞活力需保持在95%以上。

1.2.2 转染 乳腺癌细胞MDA-MB-435的转染、细胞的亚克隆、ST6Gal I mRNA的表达(RT-PCR)及细胞表面膜连 $\alpha 2, 6$ -唾液酸含量检测(FITC-SNA标记，流式细胞仪)等参照文献说明[4][5]。

1.2.3 乳腺癌细胞在培养皿中的形态学观察 取对数生长期的细胞，用移液管吸去上清液，PBS洗涤2次，0.05%胰蛋白酶/0.02%EDTA 100 μ l消化，1 ml自身培养基上清液复苏细胞，PBS洗涤。含10%小牛血清的DMEM培养基1:10稀释传代。转染细胞培养基中含600 μ g/ml G-418以保持选择压力，在37 °C、5%CO₂培养箱中孵育4和48 h后，在倒置显微镜下观察转染细胞在培养瓶中的形态特征。

1.2.4 乳腺癌细胞-细胞之间的同源凝集试验 肿瘤细胞的细胞-细胞同源凝集试验参照文献[4]所述的方法进行。基本步骤：顺义、反义ST6Gal I cDNA以及空载体转染细胞在DMEM培养基中培养至对数生长期(约

80%平铺), 将细胞培养基转移至15 ml的Falcon离心管内, $\times 450\text{ g}$ 离心5 min, 备用; PBS洗涤细胞2次, 0.2% 胰蛋白酶消化1 min, 再用上述培养基上清液洗脱并收获细胞, 以达到灭活胰蛋白酶和复活细胞目的; $\times 450\text{ g}$ 离心5 min, 弃上清, 收集细胞。将细胞用含钙和镁离子的Heng's液悬浮, 为使细胞成为单细胞悬液, 用巴士德吸管反复吹打数次, 再将细胞悬液通过22号注射器针头, 台盼蓝染色, 镜检, 记数, 细胞活力须保持在95%以上。将细胞用Heng's液稀释成 $2 \times 10^6/\text{ml}$, 取1 ml细胞悬液在封闭的巴士德吸管内 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 静置1 h, 使细胞发生自发凝集作用, 然后将细胞悬液小心注入内置不同孔径尼龙滤网的空柱内(上下两层拦截滤网的孔径分别为 $40\text{ }\mu\text{m}$ 和 $10\text{ }\mu\text{m}$), 柱子与一收集导管相连, 由一低压泵产生负压引导细胞悬液缓慢通过柱子和滤膜(速率为 $1\text{ ml}/\text{min}$)。在巴士德吸管内形成的大小不一的细胞凝集块将分别被 $40\text{ }\mu\text{m}$ 和 $10\text{ }\mu\text{m}$ 孔径滤膜所滞留, 未凝集的单个细胞将通过滤膜并被收集到试管中, 离心, 弃上清, 取细胞沉淀物。小心将 $40\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜以及 $10\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜连同所拦截的细胞分别收集到1.5 ml试管中, 从而得到3组具有不同凝集倾向的细胞群(凝集直径分别为 $>40\text{ }\mu\text{m}$ 、 $<40\text{ }\mu\text{m}$ 和 $>10\text{ }\mu\text{m}$ 、 $<10\text{ }\mu\text{m}$)。用0.5 ml 0.1 N 的稀硫酸溶液在 $96\text{ }^\circ\text{C}$ 裂解细胞1 h, 然后用Bio-Rad蛋白定量检测法测定各部分细胞的总蛋白含量, 同时以不同浓度的小牛血清白蛋白(BSA)为标准参照物作一标准曲线, 计算出各部分细胞的蛋白含量, 并以该部分细胞的蛋白含量代表相应细胞数量。为了便于比较, 我们以凝集因子(AF)来评价各转染细胞的凝集倾向, 并设定 $AF = (4 \times P_{40} + 2 \times P_{10}) / P_0$ (P_{40} 为 $40\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜拦截的细胞总蛋白含量, P_{10} 为 $10\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜拦截的细胞总蛋白含量, P_0 为通过滤膜的细胞总蛋白含量)。同源凝集实验每个转染克隆(顺义、反义及空载体)同时做双份样品, 重复5次实验, 取平均值。

1.2.5 乳腺癌细胞对胶原IV的黏附实验 96孔微滴板分别用 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{孔}$ 的FN、 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{孔}$ 的LN和 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{孔}$ IV型胶原蛋白包被, 在通风橱内 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜自然干燥, 随后每孔加入 $2\text{ }\mu\text{g}$ 的小牛血清白蛋白(BSA)封闭1 h。将96孔板倒转轻拍, 备用。细胞如上述方法洗脱收集离心后, 2×10^6 细胞用 $5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 的Calcein-AM(一种绿色荧光标记物, 进入胞内后可被内源性酯酶水解成绿色荧光物质—钙黄绿素Calcein, 并保留在胞质中)于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 处理15 min。细胞经HBSS洗涤后, 一部分细胞用 50 mU 的唾液酸酶处理($500\text{ }\mu\text{l}$ Imidazole缓冲液, $\text{pH} 6.8$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 作用30 min), 另一部分仅用Imidazole缓冲液处理作为对照。然后, 每孔加入 1×10^4 细胞/ $100\text{ }\mu\text{l}$ 并在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育60 min。用PBS洗涤2次后, 黏附到微滴板上的细胞以Tecan酶标仪上选择激发光波长 485 nm 、散射光波长 530 nm 读取荧光强度代表相对细胞数; 未黏附的细胞也一并收集并检测荧光强度作为对照。黏附率($\%$) = 黏附细胞荧光强度/总体细胞荧光强度 $\times 100\%$ 。

1.3 统计学处理

采用SPSS统计软件行方差分析, 率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 乳腺癌细胞MDA-MB-435在培养皿中的形态学特征

如图1所示, 转染顺义ST6Gal I cDNA的乳腺癌细胞MDA-MB-435在传代4 h后的贴壁率为 $(68.1 \pm 3.5)\%$, 贴壁细胞展开完全(图1A), 继续培养48 h后细胞呈长梭形、单层生长, 伸出细长“伪足”, 在贴壁的同时显示具有动力移行倾向, 细胞与细胞之间的连接比较松散(图1B); 相比之下, 转染反义ST6Gal I cDNA的肿瘤细胞在传代4 h后细胞大部仍呈圆形, 贴壁率仅为 $(21.1 \pm 3.2)\%$ (图1C), 与顺义转染和空载体转染相比贴壁率显著降低, 连续培养48 h后细胞多呈卵圆形, 成簇群落样生长(图1D)。而空载体转染克隆在传代4 h后(图1E)贴壁率为 $(71.5 \pm 2.9)\%$, 与顺义转染相比无明显差异, 但细胞铺开程度不如顺义转染细胞充分; 培养48 h后细胞扁平并完全贴壁, 呈单层生长(图1F)。

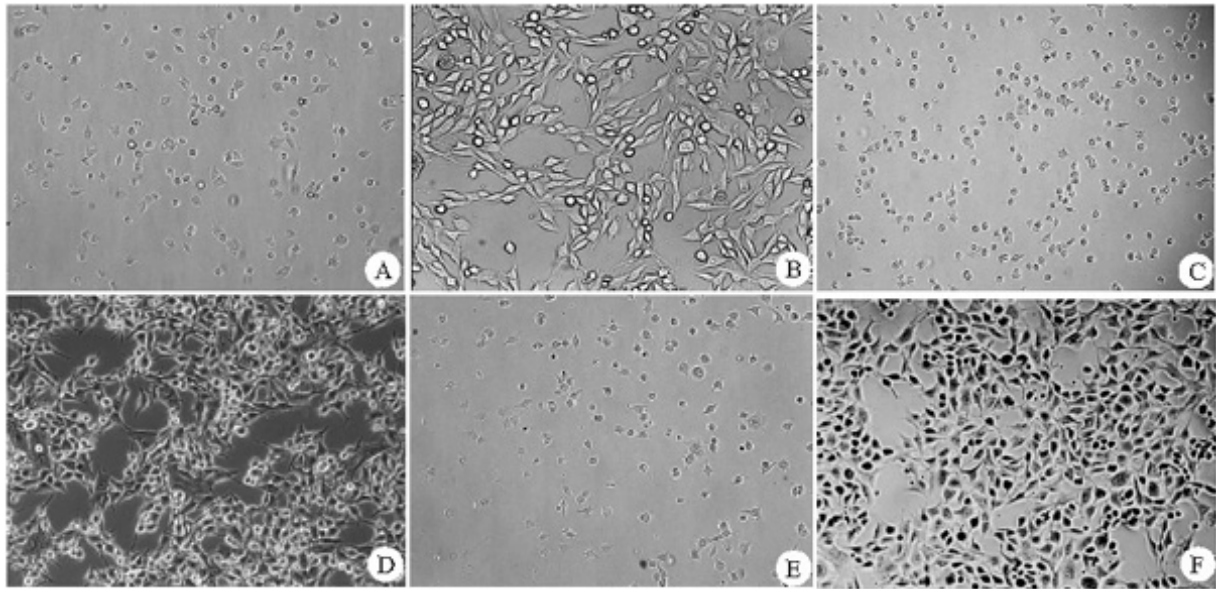


图1 乳腺癌细胞MDA-MB-435转染顺义或反义ST6Gal I cDNA后的贴壁速率和贴壁生长的形态学特征
Fig.1 Attachment rate of MDA-MB-435 cells transfected with ST6Gal I cDNA in sense or antisense direction in cell culture flask and cell morphology of transfectants growing in culture medium (Original magnification: $\times 100$)

Transfectants were selected with G418 and observed at 4 and 48 h of cell culture under contrast phase microscope. A and B represent the cell morphology of sense-transfected cells attached to the wall of the culture flask at 4 h and 48 h of cultivation; C and D represent the cell morphology of antisense-transfectants at 4 h and 48 h of cultivation; E and F are mock transfectants of MDA-MB-435 cells at 4 and 48 h of culture.

2.2 乳腺癌细胞的黏附性检测

2.2.1 乳腺癌细胞的同源凝集实验 与空载体转染相比, ST6Gal I cDNA反义转染、顺义转染细胞的凝集系数分别为空载体转染细胞的175%和81%, 提示反义转染细胞的细胞-细胞黏附力呈显著增强的倾向 ($P=0.005$), 顺义转染细胞的细胞-细胞黏附能力则明显减弱 ($P=0.03$)。这种方法所检测的细胞-细胞黏附力的变化与转染细胞在培养皿中的形态学变化相一致, 即顺义转染克隆细胞与细胞之间的连接较为松散, 而反义转染克隆细胞与细胞之间的连接则较为紧密, 更易相互凝集, 成群落样生长。

2.2.2 乳腺癌细胞与胶原IV的黏附作用

2.2.2.1 细胞表面总唾液酸对肿瘤细胞和胶原IV黏附的影响 乳腺癌细胞MDA-MB-435母代细胞以及转染细胞用唾液酸酶处理后对细胞外基质(胶原IV)的黏附率均显著降低, 黏附率下降至唾液酸酶处理前的31%~57%, 表明细胞表面唾液酸水平直接影响乳腺癌细胞MDA-MB-435与胶原IV的黏附。

2.2.2.2 $\alpha 2, 6$ -唾液酸水平对瘤细胞和细胞外基质(胶原IV)黏附的影响 与空载体转染比较, 顺义转染克隆细胞表面与胶原IV的黏附增强(为空载体转染的145%, $P<0.05$), 而反义转染克隆细胞与胶原IV的黏附降低(为空载体转染的63%, $P<0.05$), 提示细胞膜表面蛋白质和脂质的 $\alpha 2, 6$ -唾液酸化与细胞和胶原IV的黏附相关。

3 讨论

肿瘤细胞体外培养的形态学改变与细胞的动性、对细胞外基质的黏附性和侵袭性变化有关[6][7][8][9]。虽然人们对细胞表面的唾液酸化与细胞的转移潜力的关系作过多种实验与分析, 但并没有形成一致的结论。Yogeeswaran[10]报告细胞表面的总唾液酸与多种鼠类肿瘤细胞株的转移潜力呈正相关; 一种淋巴细胞杂交瘤去除细胞表面唾液酸后其侵袭和转移潜力均降低, 高唾液酸化结肠癌细胞HCT-116a和HT-29和胶原IV的黏

附与肿瘤细胞在体内的侵袭力相关,与FN和LN无关[11];唾液酸酶处理降低结肠癌细胞LS174T对细胞外基质Matrigel的黏附, SNA抑制肿瘤细胞和细胞外基质的结合[12]。也有相反的报道,如淋巴瘤MDAY-D2细胞株其转移性表型细胞表面呈高唾液酸化,唾液酸酶的处理增强它们与细胞外基质的黏附,而低转移力的突变株MDW40(WGAR)与胶原IV和FN的黏附增强,但与LN无关[13][14]。造成这些差异的原因可能来自不同的实验方法和不同的肿瘤细胞类型,如多采用细胞突变株作为研究对象,但肿瘤细胞的转化常常伴随多基因突变,在这些细胞体系中可能存在更重要的影响肿瘤转移的其他因素,而不仅是细胞表面的唾液酸化情况。我们以基因转染方式造成细胞的单一分子表型的变化(当然也可能仍然不是唯一的变化),可能是研究细胞表面 $\alpha 2, 6$ 唾液酸化对细胞黏附功能影响的较为理想的模式。

本实验中乳腺癌细胞MDA-MB-435转染顺义或反义 $\alpha 2, 6$ 唾液酸转移酶ST6Gal I cDNA后在体外培养状态下细胞形态发生了较为明显的变化。顺义转染细胞形态变得细长,显示出一定程度的动力活性(伸出“伪足”),细胞呈“松弛型”,细胞与细胞之间的连接显得更为疏松,而贴壁速度则加快,这种变化与Le Marer等[7]报道的鼠成纤维细胞FRras-转化突变株的过度 $\alpha 2, 6$ 唾液酸化的形态学变化颇为相似,该细胞型显示出更强的侵袭力。另一方面,反义转染细胞则呈圆形或卵圆形,细胞呈“紧凑型”,细胞与细胞的连接更为紧密,细胞易聚集并呈集落样生长,贴壁速度下降。“松弛型”黑色素瘤细胞比“紧凑型”具有更强的动力活性,在培养瓶上更快地形成单层,更容易被胰蛋白酶从培养瓶上洗脱下来[6]。而原本悬浮生长的腹水瘤EAT细胞的变异株表达高活性的 $\alpha 2, 6$ 唾液酸转移酶活性后呈贴壁生长[15],肿瘤细胞高表达 $\alpha 2, 6$ 唾液酸后赋予细胞更高的动力活性和贴壁生长能力[16];对B淋巴细胞而言, $\alpha 2, 6$ 唾液酸化增强有利于B细胞从骨髓中逸出并进入血循环,调节体液免疫功能[17]。

顺义转染的MDA-MB-435细胞表面 $\alpha 2, 6$ 唾液酸化程度升高,细胞-细胞之间的同源凝集作用下降,而反义转染的乳腺癌细胞表面 $\alpha 2, 6$ 唾液酸化程度降低,细胞-细胞之间的同源凝集作用增强。看来细胞表面高 $\alpha 2, 6$ 唾液酸化有两方面的作用,一方面,它降低了细胞与细胞之间的黏附,另一方面,则促进细胞与基质的黏附。这种相反的效应可能源自黏附过程中不同的受体-配体系统的相互作用。同源凝集也许对唾液酸的残基聚集产生的分子空间构像变化以及静电的干扰作用更为敏感。譬如,神经细胞黏附分子(NCAM)上的多聚唾液酸负性调节NCAM依赖的细胞-细胞黏附[18]。本实验结果与之前报告的从原发结肠癌组织分离出来的结肠癌细胞唾液酸化升高者细胞凝集性降低相一致[19],但也有文献报道细胞表面唾液酸与乳腺癌细胞MCF-7的凝集作用无关[20],可能由于不同的细胞类型黏附分子表达特征不同,其黏附作用并非都呈唾液酸依赖。

细胞-基质间的黏附作用主要由整合素家族介导,整合素由 α 和 β 亚单位异二聚体组成。整合素和它们的配基(胶原、纤维结合蛋白、层粘连蛋白等)之间的亲合力取决于不同的细胞类型,整合素的糖基化或唾液酸化可能对它们之间的亲合力起调制作用。已经证实,整合素 $\alpha 1\beta 1$ 和 $\alpha 2\beta 1$ 是细胞表面的胶原IV和胶原I的结合受体[21],但 $\beta 1$ 同时也是LN的受体, B16-F10黑色素瘤细胞 $\beta 1$ 整合素的唾液酸化与胶原IV和FN的结合有关,但与LN无关[22]; Iwabuchi等[23]发现,唾液酸酶处理可完全消除胶原IV结合蛋白对胶原IV的黏附以及中性粒细胞对胶原IV包被的微孔板的黏附,提示唾液酸对中性粒细胞和胶原IV的黏附同样重要。最近的报告表明,结肠癌组织中整合素 $\beta 1$ 亚单位呈过度 $\alpha 2, 6$ 唾液酸化,结肠癌细胞株SW48转染ST6Gal I cDNA后 $\beta 1$ 整合素的过度 $\alpha 2, 6$ 唾液酸化增强了结肠腺癌细胞对胶原I的黏附和侵袭作用,但与层粘连蛋白无关[16]。另外也有报告黑色素瘤A373细胞株 $\alpha 3\beta 1$ 的去唾液酸化增强其与FN以及LN的黏附,但与胶原IV无关[24]。由于对整合素家族的多种异二聚体的唾液酸化特别是 $\alpha 2, 6$ 唾液酸化的研究还不多,进一步了解唾液酸在整合素和基质的黏附中所起的作用将有助于寻找防止肿瘤转移的新策略。

参考文献:

[1]Varki A. Sialic acids as ligands in recognition phenomena[J]. FASEB J, 1997, 11(4): 248-55.

[2]Harduin-Lepers A, Recchi MA, Delannoy P. 1994, the year of sialyltransferases[J]. Glycobiology, 1995, 5(8): 741-58.

[3]Dall'Olio F. The sialyl- $\alpha 2, 6$ -lactosaminyl-structure: biosynthesis and

functional role[J]. *Glycoconj J*, 2000, 17(10): 669-76.

[4]Lin S, Kemmner W, Grigull S, et al. Cell surface α 2,6-sialylation affects adhesion of breast carcinoma cells[J]. *Exp Cell Res*, 2002, 276(1): 101-10.

[5]林绍强, 李君武, 王晓玉 等. α 2,6-唾液酸转移酶(ST6GalI)的表达对结肠癌细胞唾液酸化的影响[J]. *现代临床医学生物工程学杂志*, 2004, 10(1): 1-4.

[6]Clark SR, Brody JS, Sidebottom E. Morphological and metastatic murine melanoma variants: motility, adhesiveness, cell surface and in vivo properties[J]. *Br J Cancer*, 1987, 56(5): 577-84.

[7]Le Marer N, Stehelin D. High α -2,6-sialylation of N-acetyl-lactosamine sequences in ras-transformed rat fibroblasts correlates with high invasive potential[J]. *Glycobiology*, 1995, 5(2): 219-26.

[8]Dall'Olivo F, Malagolini N, Di Stefano G, et al. Alpha 2,6 sialylation of N-acetyl-lactosaminic sequences in human colorectal cancer cell lines. Relationship with non-adherent growth[J]. *Int J Cancer*, 1991, 47(2): 291-7.

[9]Morgenthaler J, Kemmner W, Brossmer R. Sialic acid dependent cell adhesion to collagen IV correlates with in vivo tumorigenicity of the human colon carcinoma sublines HCT116, HCT116a and HCT116b[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 171(2): 860-6.

[10]Yogeeswaran G, Salk PL. Metastatic potential is positively correlated with cell surface sialylation of cultured murine tumor cell lines[J]. *Science*, 1981, 212(4502): 1514-6.

[11]Collard JG, Schijven JF, Bikker A, et al. Cell surface sialic acid and the invasive and metastatic potential of T-cell hybridomas[J]. *Cancer Res*, 1986, 46(7): 3521-7.

[12]Bresalier RS, Ho SB, Schoepner HL, et al. Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(5): 1354-67.

[13]Dennis J, Waller C, Timpl R, et al. Surface sialic acid reduces attachment of metastatic tumour cells to collagen type IV and fibronectin[J]. *Nature*, 1982, 300(5889): 274-6.

[14]Takano R, Muchmore E, Dennis JW. Sialylation and malignant potential in tumour cell glycosylation mutants[J]. *Glycobiology*, 1994, 4(5): 665-74.

[15]Knibbs RN, MacCallum DK, Lillie JH, et al. Wild-type and cultured Ehrlich ascites tumour cells differ in tumorigenicity, lectin binding patterns and binding to basement membranes[J]. *Glycobiology*, 1994, 4(4): 419-28.

[16]Seales EC, Jurado GA, Brunson BA, et al. Hypersialylation of beta1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(11): 4645-52.

[17]Hennet T, Chui D, Paulson JC, et al. Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(8): 4504-9.

[18]Fukuda M. Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(10): 2237-44.

[19]Bosch J, Brossmer R, Kemmner W, et al. Preparation and characterization of differently aggregated colorectal carcinoma cell subpopulations from surgical specimens[J]. *Cancer Detect Prev*, 1998, 22(4): 319-29.

[20]Steelant WF, Recchi MA, Noe VT, et al. Sialylation of E-cadherin does not change

the spontaneous or ET-18-OMe-mediated aggregation of MCF-7 human breast cancer cells[J]. Clin Exp Metastasis, 1999, 17(3): 245-53.

[21] Dickeson SK, Mathis NL, Rahman M, et al. Determinants of ligand binding specificity of the alpha(1) beta(1) and alpha(2) beta(1) integrins[J]. J Biol Chem, 1999, 274(45): 32182-91.

[22] Veiga SS, Chammas R, Cella N, et al. Glycosylation of beta-1 integrins in B16-F10 mouse melanoma cells as determinant of differential binding and acquisition of biological activity[J]. Int J Cancer, 1995, 61(3): 420-4.

[23] Iwabuchi K, Nagaoka I, Someya A, et al. Type IV collagen-binding proteins of neutrophils: possible involvement of L-selectin in the neutrophil binding to type IV collagen[J]. Blood, 1996, 87(1): 365-72.

[24] Pochee E, Litynska A, Amoresano A, et al. Glycosylation profile of integrin alpha 3 beta 1 changes with melanoma progression[J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1643(1-3): 113-23.

[回结果列表](#)