

$\alpha 1, 2$ -岩藻糖转移酶基因转染增加卵巢癌细胞系 RMG-I Lewis y 抗原的表达

林 蓓¹, 郝莹莹¹, 王冬冬¹, 朱连成¹, 张淑兰¹, 齐藤真木子², 岩森正男³

¹中国医科大学 附属盛京医院妇产科, 沈阳 110004

²日本东京大学医学部小儿科, 日本东京 113-8655

³日本近畿大学理工学部化学科, 日本大阪 577-8502

通信作者: 林蓓 电话: 024-83956387, 传真: 024-83956787, 电子邮件: linbei88@hotmail.com

摘要: **目的** 将人 $\alpha 1, 2$ -岩藻糖基转移酶 ($\alpha 1, 2$ -FT) 基因转染卵巢癌细胞系 RMG-I 并探讨细胞表面 Lewis y 及其他相关糖脂抗原的变化。**方法** 采用 PCR 方法克隆人 $\alpha 1, 2$ -FT 基因编码区 *HFUT-H*, 构建表达载体 pcDNA3.1 (-) -*HFUT-H*, 利用磷酸钙法将其转染入卵巢癌细胞系 RMG-I, 建立 $\alpha 1, 2$ -FT 基因稳定高表达细胞株 RMG-I-H。通过酶活性测定证明转染前后细胞系 $\alpha 1, 2$ -FT 活性的改变, 采用薄层层析、薄层层析免疫染色方法测定转染前后细胞脂质及糖脂, 特别是 II 型寡糖的变化。**结果** 基因转染后细胞 RMG-I-H 中 H-1 抗原及 Lewis y 抗原显著增加, 特别是 Lewis y 抗原为转染前的 20 倍; 而 I 型糖链 Lewis b 显著减少。转染前后细胞膜上的主要脂质成分胆固醇和磷脂质的含量没有变化, 且中性糖脂也没有明显变化。**结论** $\alpha 1, 2$ -FT 基因转染增加 $\alpha 1, 2$ -FT 活性的同时, 增加卵巢癌细胞系 RMG-I Lewis y 抗原的表达; RMG-I Lewis y 高表达细胞系的建立为研究 Lewis y 抗原与卵巢癌生物学行为提供了细胞模型。

关键词: 卵巢肿瘤; $\alpha 1, 2$ -岩藻糖基转移酶; 基因; 转染; Lewis 抗原

中图分类号: R345.5; R344.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-503X(2008)03-0284-06

Transfection of $\alpha 1, 2$ -Fucosyltransferase Gene Increases the Antigenic Expression of Lewis y in Ovarian Cancer Cell Line RMG-I

LIN Bei¹, HAO Ying-ying¹, WANG Dong-dong¹, ZHU Lian-cheng¹,
ZHANG Shu-lan¹, SAITO Makiko², IWAMORI Masao³

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China

²Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo 113-8655, Japan

³Department of Biochemistry, Faculty of Science and Technology, Kinki University, Osaka 577-8502, Japan

Corresponding author: LIN Bei Tel: 024-83956387, Fax: 024-83956787, E-mail: linbei88@hotmail.com

ABSTRACT: Objective To transfect human $\alpha 1, 2$ -fucosyltransferase ($\alpha 1, 2$ -FT) gene to ovarian cancer cell line RMG-I and investigate the antigenic expression change of Lewis y and the other related oligosaccharides. **Methods** The expression vector pcDNA3.1 (-) -*HFUT-H* was constructed by polymerase chain reaction (PCR) to clone human $\alpha 1, 2$ -FT gene coding region. The $\alpha 1, 2$ -FT gene stable high-expression cell line RMG-I-H was established by transfecting pcDNA3.1 (-) -*HFUT-H* to ovarian cell line RMG-I. The

change of $\alpha 1, 2$ -FT activity in the cell line before and after the tranfection was confirmed by the determination of enzymatic activity. The changes of cell lipid and glucolipid, especially the change of type II oligosaccharide, in the cell line before and after the tranfection was determined by Thin-Layer Chromatography (TLC) and TLC immunostaining method, respectively. **Results** The H-1 antigen and Lewis y antigen were obviously increased in the cell line RMG-I-H, especially the latter one, which was 20 times higher than before, and the type I saccharide chain Lewis b was decreased significantly. The main lipid components on the cell membrane, cholesterol and phosphatides, showed no change in the cell lines before and after the tranfection, and the neutral glycolipid also showed no obvious change. **Conclusions** The tranfection of $\alpha 1, 2$ -FT gene can increase the activity of $\alpha 1, 2$ -FT in the cell line RMG-I and mainly increase the expression of Lewis y antigen simultaneously. The construction of RMG-I Lewis y high expression cell line provides a cell model for further study on the relationship between Lewis y antigen and biological behaviors in the ovarian cancer.

Key words: ovarian cancer; $\alpha 1, 2$ -fucosyltransferase; gene; tranfection; Lewis antigen

Acta Acad Med Sin, 2008,30(3):284-289

细胞膜上存在的糖复合物与细胞间的相互黏附、识别、细胞恶变、侵袭及转移等细胞生物学特性密切相关^[1-3]。细胞癌变后细胞中的糖复合物,特别是细胞膜上糖复合物中的糖链部分发生结构和量的变化,使其作为肿瘤标志物在临床工作中被广泛应用。在卵巢癌,主要表现为 II 型糖链的变化,如 Lewis y 及 Lewis x (Le^x) 血型抗原等的改变。75% 的上皮性卵巢癌出现 Lewis y 不同程度的过量表达;上皮性卵巢癌肿瘤标志物 CA₁₂₅ 的结构中含有 Lewis y 结构^[4],说明 Lewis y 与上皮性卵巢癌关系密切。Lewis y 抗原是双岩藻糖基化的寡糖,属于 Lewis 血型家族。Lewis y 抗原主要表达于胚胎发生时期,在成人,其表达则限于粒细胞和上皮组织细胞表面^[5]。然而,Lewis y 的过表达多见于来自上皮组织的癌细胞,如卵巢、胰腺、前列腺、结肠和非小细胞肺癌等。多项研究表明,细胞表面糖基 Lewis y 是肿瘤相关性抗原,且与癌症患者的发展及预后有关^[6-8]。所以,阐明 Lewis y 在上皮性卵巢癌发生、发展、转移中的作用就显得尤为重要。细胞表面糖链的表达主要受糖基转移酶活性及底物含量调节。本研究将野生型 $\alpha 1, 2$ -岩藻糖基转移酶 ($\alpha 1, 2$ -fucosyltransferase, $\alpha 1, 2$ -FT) 基因转入卵巢癌细胞系 RMG-I,建立 $\alpha 1, 2$ -FT 基因高表达细胞系 RMG-I-H,观察转染前后细胞系中 Lewis y 抗原等糖复合物的变化,为探讨 $\alpha 1, 2$ -FT 基因及 Lewis y 抗原与卵巢癌发生、发展、转移的关系提供细胞模型。

材料和方法

主要试剂与仪器 限制性内切酶 BamH I、EcoR

I、G₄₁₈ (geneticin, 新霉素) 为美国 GIBCO 公司产品;质粒转染用试剂盒 (Cell Pfect Transfection Kit) 为美国 Pharmacia 公司产品;质粒纯化试剂盒 GFXTM Micro Plasmid Prep Kit 及 NucleoBond Plasmid Kits 分别为美国 Pharmacia 公司及 Clontech Laboratories 产品;基因克隆试剂盒 Original TA cloning kit 为美国 Invitrogen 公司产品;AmpliTaq GoldTM 及测序用试剂盒 Big-dyeTM terminator cycle sequencing ready reaction kit 为美国 PE Applied Biosystems 公司产品;GDP-¹⁴C-fucose (270.0mCi/mmol) 为美国 ECE 公司产品。测序仪 ABI PRISMTM 310Genetic Analyzer 为美国 Perkin Elmer 制造;影像分析仪 BAS2000 为日本 Fuji Film 公司制造;液体闪烁计数器 Tri-Carb1500 为美国 Packard 公司制造。神经节四酰基鞘氨醇 (gangliotetraosylceramide, G₄Cer) 由单唾液酸四己糖神经节苷脂 (monosialotetrahexosyl ganglioside, GM₁) 通过唾液酸酶处理制备。抗乳丁糖神经酰胺 (lactotetraosylceramide, Lc₄Cer) 单克隆抗体和鼠抗 Lewis b (Le^b)-Lewis y 单克隆双抗体由实验室自行合成。抗 H-1 单克隆抗体、抗 Le^x 单克隆抗体、抗 Lewis y 单克隆抗体及抗异乳丁糖神经酰胺 (neolactotetraosylceramide, nLc₄Cer) 单克隆抗体分别由日本国家癌症中心 (东京) Hirohashi 博士和 Otsuka Pharmaceutical 公司 (日本德岛) Taki 博士馈赠。抗 Le^x 单克隆抗体由 Seikagaku 公司提供 (日本东京)。薄层层析 (Thin-layer chromatography, TLC) 板购自 Sigma 公司。脂酰基鞘氨醇单己糖 (ceramide monohexoid, GlcCer)、神经酰胺糖脂质 (ceramide dihexoside, LacCer)、三己糖酰基鞘氨醇 (ceramide trihexoside, Gb₃Cer)、四己糖酰基

鞘氨醇 (ceramide tetrahexoside, Gb₄Cer)、唾液酸化乳丁糖神经酰胺 (sialyl-lactotetraosylceramide, IV³ NeuAc-Lc₄Cer)、唾液酸化异乳丁糖神经酰胺 (sialyl-neolactotetraosylceramide, IV³ NeuAc-nLc₄Cer)、Lc₄Cer、nLc₄Cer、Lewis a (Le^a)、Le^b、Le^x、Lewis y、唾液酸化 Le^a (sialyl-Le^a, NeuAc-Le^a)、唾液酸化 Le^x (sialyl-Le^x, NeuAc-Le^x) 等由本实验室提纯或合成。

细胞系、质粒及菌株 卵巢癌细胞系 RMG-I 由日本东京大学岩森正男教授惠赠。表达质粒 pcDNA3.1 (-) 为美国 Invitrogen 公司产品; 转染用大肠杆菌 (Competent Cell) JM109 为日本 TOYOBO 公司产品。

人 $\alpha 1, 2$ -FT 基因的克隆 采用常规蛋白酶 K 酚/氯仿抽提法, 提取人白细胞中基因组 DNA, 并以此为模板行 PCR 反应。根据人类 *FUT-1* 基因 (基因库编号: M35531) 设计引物, 上游引物: 5'-CATGTG-GCTCCGGAGCCATCGTC-3', 下游引物: 5'-GCTCT-CAAGGCTTAGCCAATGTCC-3', 由 Pharmacia 公司 (日本) 合成。PCR 反应体系 50 μ l, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 9 min, 进入循环, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 65 $^{\circ}$ C 90 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 25 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 部分 PCR 产物于含 0.5% 溴乙锭的 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后, 在紫外线 (320 nm) 下观察特异性条带。利用 TA 克隆试剂盒将 PCR 产物直接连接于载体 pCR2.1 后, 转染于大肠杆菌 INV α F', 具体操作参照试剂盒说明进行。随机选取 15 个菌落, 利用 PCR 方法测定插入片断长度, 方法如下: PCR 反应体系 20 μ l, 反应条件同上, 引物为载体上引物 T7 Promoter Primer 及 M13 reverse, 模板为大肠杆菌, 根据 PCR 产物长度, 选取阳性克隆^[9]。

质粒的提取、纯化及测序 采用质粒提取、纯化试剂盒提取、纯化质粒; dideoxynucleotide terminator 方法进行基因序列分析, 具体方法如下: PCR 反应系 20 μ l, 其中包括: 质粒 0.4 μ g, 引物 3 pmol, BigDyeTM Premixture 8 μ l; 反应条件: 96 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 进入循环, 96 $^{\circ}$ C 10 s, 50 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 4 min, 25 个循环。所得产物加热处理后, 利用测序仪 ABI PRISMTM 310Genetic Analyzer 进行测序, 测序结果利用 Gene Bank database 进行分析。测序使用引物为载体上引物及部分已知基因序列。

表达载体 pcDNA3.1 (-) -*HFUT-H* 的构建 将上述纯化、测序的质粒及表达载体 pcDNA3.1 (-) 进行 BamH I/EcoR I 双酶切, 产物行 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳后, 在紫外线 (320 nm) 下观察特异性条

带, 回收特异性条带部分产物, 采用 DNA 回收试管 (SUPRECTM-01, TaKaRa, 日本) 从琼脂糖凝胶中分别提取、纯化目的 DNA 及载体 DNA, 两者用 T4 DNA 连接酶处理后, 转染于大肠菌 JM 109, 随机挑选 10 个菌落, 采用 PCR 方法测定插入片断长度及方向, 对确有插入的克隆再次进行测序确认后, 利用质粒提取试剂盒 NucleoBond Plasmid Kits 提取质粒。

基因转染及筛选 采用质粒转染用试剂盒将表达载体 pcDNA3.1 (-) -*HFUT-H* 转染细胞 RMG-I, 具体方法参照试剂盒说明书进行。G₄₁₈ 筛选浓度为 400 ~ 1 400 mg/L, 维持浓度为 800 ~ 1 000 mg/L。同时建立转染空质粒 pcDNA3.1 的细胞系 RMG-I-C 作为对照。

$\alpha 1, 2$ -FT 活性的测定 转染前、后细胞在含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中培养, 取指数生长期细胞用 PBS 缓冲液洗涤 2 次后, 加入 0.25 mol/L 的蔗糖溶液悬浮细胞, 超声波破碎细胞, 700 g 离心 15 min, 取上清测定其 $\alpha 1, 2$ -FT 活性。反应体系中包括: 底物 Gg₄Cer 38 nmol, 10.37 μ mol/L GDP [1-¹⁴C]-岩藻糖 (270.2 mCi/mmol, NEN), 20 mmol/L MnCl₂、1% Triton X-100、50 mmol/L 甲次砷酸盐-盐酸缓冲液 (pH5.8) 及酶 (0.4 mg 蛋白), 总体积为 100 μ l, 混合液在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 h 后, 用 300 μ l 氯仿/甲醇 (体积比为 2:1) 终止反应, 混匀, 500 g 离心 2 min, 去除上层水溶液, 下层干燥后进行 TLC (CD TLC plate, Merck 公司, 德国) 分析, 展开溶液为氯仿/甲醇/CaCl₂ (55:45:10; V/V)。实验进行 3 次, 结果取平均值进行分析。采用影像分析仪和液体闪烁计数器测定反应产物的放射活性, 具体方法见参考文献 [10]。

脂质的提取及分化 取指数生长期转染前、后细胞 (约 5 $\times 10^7$ 个) 冷冻干燥, 提取总脂质。然后采用阴离子交换柱 (DEAE-Sephadex, 酸性) 层析, 将其分化成为中性和酸性两部分, 具体方法见参考文献 [11]。

TLC 及 TLC 免疫染色法 采用 TLC 方法测定转染前后细胞磷脂、胆固醇及中脂质 GlcCer、LacCer、Gb₃Cer、Gb₄Cer 的含量, TLC 免疫染色法测定转染前后细胞中 Lc₄Cer、nLc₄Cer、H-1、H-2、Le^x、Lewis y、Le^a、Le^b、IV³ NeuAc-Lc₄Cer、IV³ NeuAc-nLc₄Cer、NeuAc-Le^a、NeuAc-Le^x 等糖链抗原的变化, 方法同参考文献 [11, 12]。

统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件, 检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$

为差异有显著性。

结 果

α1, 2-FT 基因高表达细胞系 RMG-I-H 的建立

H 基因的编码区长度为1 112 bp, 采用 TA 克隆试剂盒克隆 H 基因后进行测序, 证明克隆基因与报道完全一致, 为反向插入。利用 BamH I/EcoR I 双酶切后, 将其再次重组于表达载体 pcDNA3.1 (-), 构建出 H 基因的表达载体 pcDNA3.1 (-)-HFUT-H。采用磷酸钙法, 将外源性野生型 H 基因转入卵巢癌细胞系 RMG-I, 利用药物 G₄₁₈ 筛选出新霉素耐药性克隆, 选出其中 4 个克隆分别为 RMG-I-H 1、2、3 及 4, 通过 RT-PCR 法及细胞 α1, 2-FT 活性测定均证实 H 基因稳定表达。

各组细胞系中 α1, 2-FT 活性的变化

以 G₄Cer 为底物分别测定细胞 RMG-I-H、RMG-I-C 和 RMG-I 的 α1, 2-FT 活性, 结果显示转染后细胞 RMG-I-H 的活性为 (73.9 ± 10.3) pmol · mg protein⁻¹ · h⁻¹, 为 RMG-I 细胞 [(2.9 ± 0.2) pmol · mg protein⁻¹ · h⁻¹] 及 RMG-I-C 细胞 [(2.8 ± 0.6) pmol · mg protein⁻¹ · h⁻¹] 的 20~30 倍, 转染后细胞系 α1, 2-FT 的活性明显增加 (P < 0.0001)。

RMG-I 和 RMG-I-H 细胞脂质成分的变化

TLC 检测结果显示, 转染前、后卵巢癌细胞 RMG-I 和 RMG-I-H 的主要脂质成分胆固醇和磷脂的含量没有变化; 除 LacCer 增加外, 球 (globo-) 系列糖脂的含量在 RMG-I 细胞和 RMG-I-H 细胞之间差异也无显著性 (表 1)。

RMG-I、RMG-I-H 细胞 I 型及 II 型抗原的变化

采用 TLC 免疫染色法测定转染前后细胞中 I 型、II 型乳 (lacto-) 系列抗原及其相关糖脂的变化, 结果显示, 在 RMG-I 细胞中, 含有半乳糖末端的糖脂主要为 Lc₄Cer 和 Le^X, 基因转染成功后, 它们分别转变为 H-1 和 Lewis y。Lewis y 的浓度在转染后的细胞中较原 RMG-I 细胞增加了大约 20 倍, 达到 0.20 mg/g 干燥细胞 (图 1)。虽然 H-1 较转染前增加近 10 倍, 但其转染后的含量仅为 Lewis y 的 1/4。作为 Lewis y 同分异构体的 Le^b 在 RMG-I 细胞中可被检测出, 而在转染成功细胞中明显减少, 特别是含有 Le^b 的蛋白几乎检测不出。Le^b 和 Lewis y 的前体糖脂 Le^a 和 Le^X 浓度均有所下降。RMG-I 细胞中能检测到 nLc₄Cer 的少量存在, 而在转染后的细胞中却无法测出; 相反 RMG-I 细胞中

未检测到 H-2, 而在转染后的细胞中却可以检测到 H-2 的存在。同 Le^b 一样, IV³ NeuAc-nLc₄ Cer 和 NeuAc-Le^X 在转染成功细胞中的浓度相对于其在原 RMG-I 细胞中的浓度也有所下降 (表 2)。

表 1 转染前后细胞类脂含量的变化

Table 1 Changes of lipids in RMG-I cells and the transfectants (mg/g dry cells, $\bar{x} \pm s$)

类脂 Lipids	RMG-I	RMG-I-H
胆固醇 Cholesterol	23.0 ± 1.06	27.5 ± 3.02
磷脂 Phospholipid	1.50 ± 0.20	1.85 ± 0.35
中性糖脂 Neutral glycolipid		
GlcCer	0.24 ± 0.05	0.21 ± 0.05
LacCer	0.18 ± 0.03	0.32 ± 0.02*
Gb ₃ Cer	1.42 ± 0.02	2.02 ± 0.02
Gb ₄ Cer	1.12 ± 0.01	1.55 ± 0.02

GlcCer: 脂酰基鞘氨醇单己糖; LacCer: 神经酰胺糖脂; Gb₃ Cer: 三己糖酰基鞘氨醇; Gb₄ Cer: 四己糖酰基鞘氨醇; 与 RMG-I 组比较, * P < 0.01

GlcCer: ceramide monohexoid; LacCer: ceramide dihexoside; Gb₃ Cer: ceramide trihexoside; Gb₄ Cer: ceramide tetrahexoside; * P < 0.01 compared with RMG-I group

表 2 转染前后细胞 Lewis 血型抗原的变化

Table 2 Changes of Lewis blood-group antigen in RMG-I and the transfectants (mg/g of dry cells)

乳糖系列糖链 Lactoseries carbohydrate chain	RMG-I	RMG-I-H
乳糖系列 I 型糖链 Lactoseries type 1 chain		
Lc ₄ Cer	0.05	tr
IV ³ NeuAc-Lc ₄ Cer	tr	*
Le ^a	0.02	tr
Le ^b	0.02	tr
H-1	tr	0.05
NeuAc-Le ^a	tr	*
乳糖系列 II 型糖链 Lactoseries type 2 chain		
nLc ₄ Cer	tr	*
IV ³ NeuAc-nLc ₄ Cer	0.06	tr
Le ^X	0.30	0.27
Le ^Y	0.01	0.20
H-2	*	tr
NeuAc-Le ^X	0.05	tr

Lc₄ Cer: 乳丁糖神经酰胺; IV³ NeuAc-Lc₄ Cer: 唾液酸化乳丁糖神经酰胺; H-1: 1 型 H 抗原; NeuAc-Le^a: 唾液酸化 Le^a; nLc₄ Cer: 异乳丁糖神经酰胺; IV³ NeuAc-nLc₄ Cer: 唾液酸化异乳丁糖神经酰胺; H-2: 2 型 H 抗原; NeuAc-Le^X: 唾液酸化 Le^X; tr: 痕量 (<0.005 mg/g 干燥细胞); *: 未检测出

Lc₄ Cer: lactotetraosylceramide; IV³ NeuAc-Lc₄ Cer: sialyl-lactotetraosylceramide; Le^a: Lewis a; Le^b: Lewis b; H-1: type 1 of H antigen; NeuAc-Le^a: sialyl-Le^a; nLc₄ Cer: neolactotetraosylceramide; IV³ NeuAc-nLc₄ Cer: sialyl-neolactotetraosylceramide; Le^X: Lewis x; Le^Y: Lewis y; H-2: type 2 of H antigen; NeuAc-Le^X: sialyl-Le^X; tr: trace amount (<0.005 mg/g of dry cells); *: not detected



图1 薄层层析免疫染色法测定基因转染前后细胞 Lewis y 含量的变化

Fig 1 Thin-layer chromatography immunostaining of Lewis y from RMG-I cells and the transfectants

1. Lewis y 标准品; 2. RMG-I 细胞; 3. RMG-I-H 细胞

1. Lewis y standard; 2. RMG-I cell; 3. RMG-I-H cell

讨 论

上皮性卵巢癌主要表现为 Lewis y 不同程度的过量表达, Lewis y 表达与病变呈正相关^[7,8]。细胞表面糖链的表达量主要受合成酶活性及底物含量所调节, $\alpha 1, 2$ -FT 是 Lewis y 合成的关键酶。Sepp 等^[13] 研究显示, 将人 $\alpha 1, 2$ -FT 基因导入猪内皮细胞后, Lewis y 表达量明显上升。所以本研究将野生型 $\alpha 1, 2$ -FT 基因转入卵巢癌细胞系 RMG-I, 建立 $\alpha 1, 2$ -FT 基因高表达细胞系 RMG-I-H, 观察转染前后细胞系中糖脂, 特别是 I、II 型抗原及相关糖复合物的变化, 结果证实作为细胞主要成分的磷脂及胆固醇含量在基因转染前后没有变化, 中性糖脂也没有明显变化。但是岩藻糖转移酶活性的提高引起糖脂成分改变, 不仅是糖脂自身发生岩藻糖基化, 而且对相关的糖脂底物也有一定影响。例如, 在原 RMG-I 细胞中乳糖系列 I 型糖链家族的主要糖脂为 Lc_4Cer 、 Le^a 和 Le^b , 而在转染成功细胞中却是 H-1 占绝对优势, Lc_4Cer 经岩藻糖基化几乎全部转换成 H-1 糖脂, 而在转染成功的细胞中几乎检测不到 Lc_4Cer , 这说明 Le^a 和 Le^b 的减少可能是因为其底物 Lc_4Cer 经岩藻糖基化转变成了 H-1。而 RMG-I 细胞中的乳糖系 II 型糖链家族的糖脂, 如 Le^x 、Lewis y、 IV^3 NeuAc-n Lc_4Cer 和 NeuAc- Le^x 的浓度超过了 0.01 mg/g 干燥细胞; 但是转染后细胞 RMG-I-H 中乳糖系列 II 型糖链家族的糖脂只有 Le^x 和 Lewis y。RMG-I-H 中 Le^x 的 42.6% 转化

成为 Lewis y, 远高于原 RMG-I 细胞的 3.2%, 这一转化率的提高可能是引起 IV^3 NeuAc-n Lc_4Cer 和 NeuAc- Le^x 降低的原因。

以 Gg_4Cer 为底物检测岩藻糖转移酶的活性, 在转染成功细胞 RMG-I-H 中活性为原 RMG-I 细胞和对照组 RMG-I-C 细胞中的 20~30 倍, 与转染成功细胞中岩藻糖基化糖脂浓度升高现象相符。表明基因转染成功细胞中 Lewis y 和 H-1 浓度增高是由于岩藻糖转移酶活性的增加所致。然而, 作为 Lewis y 同分异构体的 Le^b 在 RMG-I 细胞中可被检测出, 却在转染成功细胞中明显减少。岩藻糖转移酶活性升高对于 Le^b 和 Lewis y 浓度反向变化的影响可能是受其前体糖脂 Le^a 和 Le^x 浓度的影响。与 Le^b 一样, IV^3 NeuAc-n Lc_4Cer 和 NeuAc- Le^x 在转染成功细胞中的浓度相对于其在原 RMG-I 细胞中的浓度也有下降。因此, 岩藻糖基转移酶活性的提高可以改变底物乳糖系列糖脂的转化过程, 导致其结构明显改变, 但不影响其他支路, 如 globo-系列糖脂类。由于乳糖系列 I 型糖链家族与 II 型糖链家族中底物 Le^a 和 Le^x 代谢率的差异使得两个家族之间代谢模式有所差异, 前者的合成潜能低于后者。 Le^a 在转染成功细胞中减少到痕迹量是由于其底物 Lc_4Cer 的岩藻糖基化增高; Le^x 的岩藻糖基化却使其自身的合成更加活跃, 结果使其前体 n Lc_4Cer 减少, 进一步导致了 IV^3 NeuAc-n Lc_4Cer 的减少。在多步骤酶联反应链中一步合成潜能的改变就会引起糖脂成分的变化。

综上, 本研究通过将 $\alpha 1, 2$ -FT 基因转入卵巢癌细胞系 RMG-I, 建立 $\alpha 1, 2$ -FT 及 Lewis y 高表达细胞系 RMG-I-H, 为今后的研究提供了细胞模型。

参 考 文 献

- [1] Lopez-Ferrer A, de Bolos C, Barranco C, *et al.* Role of fucosyltransferases in the association between apomucin and Lewis antigen expression in normal and malignant gastric epithelium [J]. Gut, 2000, 47(3):349-356.
- [2] Peracaula R, Tabares G, Lopez-Ferrer A, *et al.* Role of sialyltransferases involved in the biosynthesis of Lewis antigens in human pancreatic tumour cells [J]. Glycoconj J, 2005, 22(3):135-144.
- [3] Aubert M, Panicot L, Crotte C, *et al.* Restoration of alpha (1, 2) fucosyltransferase activity decreases adhesive and metastatic properties of human pancreatic cancer cells [J]. Cancer Res, 2000, 60(5):1449-1456.

- [4] Yin BW, Finstad CL, Kitamura K, *et al.* Serological and immunochemical analysis of Lewis y (Le^y) blood group antigen expression in epithelial ovarian cancer [J]. *Int J Cancer*, 1996, 65(4):406-412.
- [5] Detke M, Palfi G, Loibner H. Activation-dependent expression of the blood group-related Lewis Y antigen on peripheral blood granulocytes [J]. *J Leukoc Biol*, 2000, 68(4):511-514.
- [6] Madjd Z, Parsons T, Watson NF, *et al.* High expression of Lewis y/b antigens is associated with decreased survival in lymph node negative breast carcinomas [J]. *Breast Cancer Res*, 2005, 7(5):R780-R787.
- [7] 刁斌, 黄金双, 林蓓, 等. Le^y 抗原在卵巢上皮性肿瘤中的表达及意义 [J]. *现代肿瘤医学*, 2008, 16(3):335-338.
- [8] Chieng DC, Rodriguez-Burford C, Talley LI, *et al.* Expression of CEA, Tag-72, and Lewis-Y antigen in primary and metastatic lesions of ovarian carcinoma [J]. *Hum Pathol*, 2003, 34(10):1016-1021.
- [9] 林蓓, 齐藤真木子, 岩森正男. 小鼠三种 $\alpha 1, 2$ 岩藻糖转移酶的底物特异性 [J]. *中国医学科学院学报*, 2005, 27(6):761-766.
- [10] Lin B, Hayashi Y, Saito M, *et al.* GDP-fucose: beta-galactoside $\alpha 1, 2$ - fucosyltransferase, MFUT- II , and not MFUT- I or- III , is induced in a restricted region of the digestive tract of germ-free mice by host-microbe interactions and cycloheximide [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1487(2-3):275-285.
- [11] Lin B, Kubushiro K, Akiba Y, *et al.* Alteration of acidic lipids in human sera during the course of pregnancy: characteristic increase in the concentration of cholesterol sulfate [J]. *J Chromatogr B*, 1997, 704(1-2):99-104.
- [12] Lin B, Saito M, Sakakibara Y, *et al.* Characterization of three members of murine $\alpha 1, 2$ -fucosyltransferases; change in the expression of the Se gene in the intestine of mice after administration of microbes [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2001, 388(2):207-215.
- [13] Sepp A, Skacel P, Lindstedt R, *et al.* Expression of $\alpha 1, 3$ -galactose and other type 2 oligosaccharide structures in a porcine endothelial cell line transfected with human $\alpha 1, 2$ -fucosyltransferase cDNA [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(37):23104-23110.

(2007-08-27 收稿)