

$\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 基因转染对人结肠癌 LOVO 细胞的作用

李文桦¹ 罗建民² 张英³ 张文^{1Δ}

(¹ 复旦大学附属肿瘤医院肿瘤内科, ² 中心实验室, ³ 复旦大学上海医学院生物化学与分子生物学系-卫生部糖复合物重点实验室 上海 200032)

【摘要】 目的 观察 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 基因转染对人 LOVO 细胞的生物学行为的改变。方法 采用 RT-PCR 和 Western blot 方法检测转染前后 LOVO 细胞中 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 基因的表达, CCK-8 法检测细胞增殖, 流式细胞术分析细胞周期, 并通过体外迁移、侵袭实验检测转染前后 LOVO 细胞运动侵袭能力的变化。结果 LOVO 细胞微弱表达 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ, RT-PCR 和 Western blot 方法验证转染后的 LOVO/FucT-Ⅶ 高表达 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ。转染后细胞生长加快, S 期细胞增多而 G₁ 期细胞减少, 细胞趋化性迁移和侵袭能力增强。结论 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 基因能改变人结肠癌 LOVO 细胞的生物学行为, 增强细胞趋化性迁移和侵袭等转移表型。

【关键词】 结肠癌; $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 基因; 糖基转移酶

【中图分类号】 R 735.3⁺5 **【文献标识码】** A

The effects of $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ gene transfection on human colon cancer cell line LOVO

LI Wen-hua¹, LUO Jian-min², ZHANG Ying³, ZHANG Wen^{1Δ}

(¹ Department of Medical Oncology, ² Central Laboratory, Cancer Hospital, Fudan University; Key Laboratory of Glycoconjugate Research, Ministry of Health-Department of Biochemistry & Molecular Biology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ gene transfection on human colon cancer cell line LOVO. **Methods** Expression of the $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ mRNA and protein was measured by RT-PCR and Western blot. Cell proliferation was measured by CCK-8 assay. Cell cycle was analyzed by flow cytometry. The alteration of LOVO cells metastatic potential before and after $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ gene transfection were assayed by cell chemotactic migration and invasion. **Results** $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ was weakly expressed in human colon cancer cell line LOVO. The expression of $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ in transfected LOVO cells was detected by RT-PCR and Western blot methods. The proliferation of cells was increased after transfection with more cells in S period and less in G₁ period. The cell chemotactic migration and invasion were enhanced after $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ gene transfection. **Conclusions** $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ gene promotes cell proliferation and metastatic potential of LOVO cells.

【Key words】 colorectal cancer; $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ gene; glycosyltransferase

结肠癌目前是第三大高发肿瘤, 转移和进展期结肠癌预后较差, 五年生存率不足 5%, 已成为严重威胁人类健康的一大杀手。异常糖基化是恶性肿瘤转移的重要机制之一, 糖基化改变将影响黏附分子的功能进而改变细胞与细胞以及细胞与细胞间质的相互作用^[1]。末端唾液酸化和高分支糖链的增

加^[2,3]是肿瘤实验模型 N-连接型糖基化异常的两大特征, 尤其是 SLe^x 及其衍生物的表达与肿瘤转移密切相关^[3]。

α 岩藻糖基转移酶是重要的糖基化酶, 参与 Lewis 糖链合成最后一步的岩藻糖化反应, 共有 9 个亚型, 其中 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 是一种与肿瘤转移相关

的糖链加工酶,它能催化岩藻糖基转移到糖蛋白糖链底物,其特异性的产物 SLe^x 在多种肿瘤中高表达并参与调节 CD24 功能,与细胞的黏附、迁移、侵袭密切相关。因此,α1,3 FucT-Ⅶ很有可能是一种肿瘤转移新的生物学指标和防止肿瘤转移可能的治疗靶点,为临床治疗提供参考。日前对于 α1,3 FucT-Ⅶ与肝癌细胞的分化、转移、凋亡关系已有深入研究,然而肠癌中 α1,3 FucT-Ⅶ的作用尚不明确,国内外罕见报道。

本研究通过将 α1,3 FucT-Ⅶ 基因脂质体介入转染来构建高表达 α1,3 FucT-Ⅶ 的 LOVO 细胞株,比较转染前后细胞在增殖、周期以及趋化性迁移和侵袭等转移表型等方面的差异,探讨 α1,3 FucT-Ⅶ 对人结肠癌 LOVO 细胞的生物学作用,以进一步探索 α1,3 FucT-Ⅶ 作为治疗靶点的可能及其机制,以期发现更为有效的结直肠癌治疗方法。

材料和方法

α1,3 FucT-Ⅶ 基因转染 人结肠癌 LOVO 细

表 1 RT-PCR 引物序列和反应条件

Tab 1 The primer sequences and reaction conditions for RT-PCR

Primer		Sequence	Size(bp)	T(°C)	Cycle
GAPDH	Up	5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'	307	58	28
	Down	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGCTGTA-3'			
FucT-Ⅶ	Up	5'-CACCTCCGAGGCATCTTCAACTG-3'	497	58	30
	Down	5'-CGTTGGTATCGGCTCTCATTGATG-3'			

Western blot 法检测蛋白表达 用 PBS 洗细胞 2~3 次,加入细胞裂解液(晶美公司)裂解细胞,用 Lowry 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳分离细胞总蛋白,每孔上样 70 μg,通过电泳使蛋白转移印迹到 PVDF 膜上。PBST 液封闭 PVDF 膜,加入山羊抗人 FucT-Ⅶ 一抗(L-14, Santa Cruz)和 HRP 标记的兔抗山羊 IgG 二抗(Dako Cytomation),使用 ECL 试剂发光,X-胶片曝光,显影定影记录条带。

CCK 法检测细胞增殖 对数期各细胞制成细胞悬液,分组接种于 96 孔板中,每孔滴加 100 μL (5 000 个细胞/孔)细胞悬液,每组设 8 个复孔,将培养板置于 37 °C,5% CO₂ 孵育箱中,待细胞贴壁后,第 1、2、3、4、5 天作为一个检测点,每孔加 CCK-8 试剂(Cell Counting Kit-8, Dojindo Laboratories, Japan)10 μL,继续培养 3 h 后,TECAN Sunrise F039300A 型酶标仪检测 450 nm 处吸光度(D₄₅₀ 值)。

流式细胞术检测细胞周期 细胞在无血清培养基条件下培养 2 d 后加入正常培养液(含 10% FBS

胞购自 ATCC。α1,3 FucT-Ⅶ pcDNA3.0 质粒由日本 SOKA 大学 Narimatsu 教授惠赠。使用 Lipofectamine 试剂转染质粒,按 1000 μg/mL 浓度加入 G418(Promega 公司),经 3~4 周筛选出稳定高表达 α1,3 FucT-Ⅶ 基因的细胞克隆。

转染前后 α1,3 FucT-Ⅶ 表达的测定

RNA 分离及 RT-PCR 检测 使用 Trizol 试剂抽提细胞总 RNA (Life Technologies Inc.,完全按照使用说明书进行)并使用 DU800UV/Vis Spectrophotometer 仪器检测 RNA 纯度和浓度,再以 α1,3 FucT-Ⅶ 特异性引物、使用 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 及 Taq DNA polymerase (Fermentas life science,均按照产品说明书要求)完成逆转录 PCR,持家基因为 GAPDH。ChemiImage 5500 Imaging System(Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)对凝胶电泳结果进行扫描并定量分析。以 FucT-Ⅶ/GAPDH 光密度比值来半定量 mRNA 水平的表达。α1,3 FucT-Ⅶ 特异性引物和 GAPDH 引物序列详见表 1。

的 RPMI 1640)继续培养 12 h,收集细胞。用 95% 乙醇固定, PBS 清洗 1 次,弃上清液,加入曲通(Tritonx-100)1 mL,室温下静止 10 min,离心 1 500 r/min 5 min, PBS 清洗 1 次,弃上清液,加 RNASE 酶 1 mL,37 °C 水浴恒温箱振荡 10 min,离心后再加碘化丙啶(Propidium iodide)1 mL 染色,用孔径 60 U 的尼龙网过滤后,存放在 4 °C 冰箱内,用流式细胞仪(Becton Dickinson FacsCalibur)检测细胞的 DNA 含量,并以 Modfit 程序人工校正。

细胞趋化性迁移能力的测定 按 5 × 10⁵ 细胞/mL 浓度将处于对数生长期的 LOVO/FucT-Ⅶ、LOVO/VEC 和 LOVO 细胞用无血清的 1640 培养液制成细胞悬液,取 100 μL 细胞悬液(5 × 10⁴ 细胞)加入 Transwell 上室,600 μL 含 10% 小牛血清 1640 培养液加入下室,37 °C 孵育 18 h,用棉签轻轻擦去小室上层细胞后用中性甲醛固定并常规 HE 染色。高倍镜下(×400)随机计数 5 个视野的侵袭细胞数,取平均值表示细胞体外趋化性迁移能力的强弱。

细胞侵袭能力的测定 按 1:3 的比例混合 Matrigel(购自 BD 公司)和无血清 1640 培养液制成人工基底膜铺在 Transwell 小室(购自 BD 公司)上,37℃ 孵育 2~3 h 使其凝固,按 1×10^6 细胞/mL 浓度将处于对数生长期的 LOVO/FucT-Ⅶ、LOVO/VEC 和 LOVO 细胞用无血清的 1640 培养液制成细胞悬液,取 100 μ L 细胞悬液(1×10^5 细胞)加入 Transwell 上室,600 μ L 含 10% 小牛血清 1640 培养液加入下室,37℃ 孵育 24 h,以下步骤同趋化性迁移能力测定。

统计学分析 采用 STATA7.0 统计软件,方差分析进行多组间均数比较,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

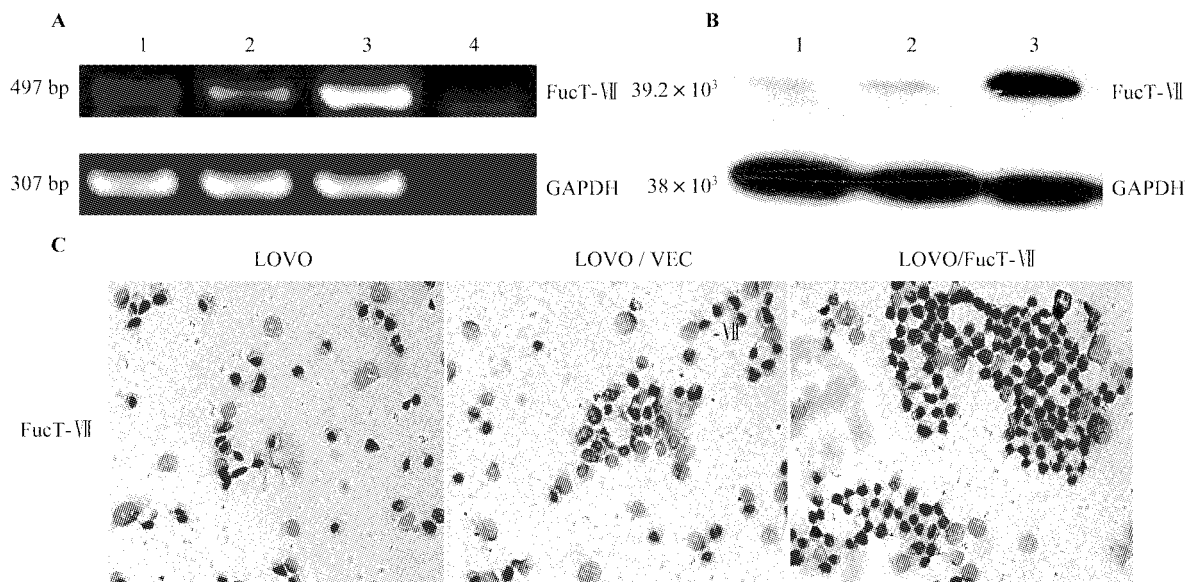


图 1 RT-PCR(A)和 Western blot(B)和细胞免疫化学(C $\times 100$)检测转染前后 LOVO 细胞中 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 的表达

Fig 1 Expression of $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ in LOVO cells after transfection was detected by RT-PCR(A) and Western blot(B) and cell immunostaining(C $\times 100$)

For (A) and (B): Lane 1: LOVO; Lane 2: LOVO/VEC; Lane 3: LOVO/FucT-Ⅶ clone; Lane 4: negative control (without mRNA template)

$\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 对 LOVO 细胞增殖速度的影响
转染 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 后的 LOVO/FucT-Ⅶ 细胞增殖速度较 LOVO 细胞和 LOVO/VEC 细胞有显著提高($F = 353.75, P < 0.05$),第 1,2,3,4 天的增长率分别为 15.9%,17.0%,20.8% 和 37.8%。由于空载体的转入使 LOVO/VEC 细胞第 1 天出现增殖速度的轻度抑制($F = 34.92, P = 0.088$),之后即与未转染的 LOVO 细胞保持相似的生长曲线,但到第 4 天增殖速度较原 LOVO 细胞增快,但仍不及 LOVO/FucT-Ⅶ 细胞($P < 0.05$)(图 2)。

$\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 对 LOVO 细胞周期的影响
LOVO 细胞经 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 基因转染后细胞周期出现了显著的改变。流式细胞仪检测结果显示,LOVO/FucT-Ⅶ 细胞较 LOVO 细胞相比 G_0-G_1 期

结 果

$\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 基因在阳性克隆细胞中的表达
转染后的细胞在 mRNA 水平高表达 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ,RT-PCR 电泳后可见 497 bp 条带,相比未转染的 LOVO 细胞和转染空载体 LOVO/VEC 细胞中仅有微弱的 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 表达。进而 Western blot 验证在蛋白水平上的表达,显示转染后细胞 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 强表达。细胞组织化学检测发现 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 主要集中表达于转染后的细胞胞质中(图 1)。选取 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 完整蛋白高表达的转染细胞株用于后续实验,命名为 LOVO/FucT-Ⅶ。

细胞比例减少(分别为 26.95% 和 36.65%),S 期细胞比例增多了约 10%(分别为 73.05% 和 62.64%),

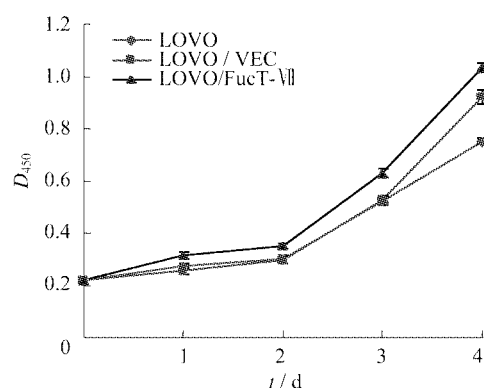


图 2 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 转染后 LOVO 细胞增殖曲线的改变

Fig 2 Effect of $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ on LOVO cells proliferation

凋亡指数变化不大(分别为 23.44% 和 21.75%)。值得注意的是,同时对 LOVO/VEC 细胞周期的检测显示其 S 期细胞比例(57.47%)要少于 LOVO 细胞, G_0-G_1 期(42.53%)多于 LOVO 细胞。此结果表明 pcDNA3.0 空载体的转入可能会造成 G_1/S 期转换的减慢,但在 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 基因转染后这一空载体效应得到了逆转,甚至 G_1/S 期转换更快于原 LOVO 细胞,提示了 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 具有增多 S 期细胞分布,进而促进细胞增殖的作用(表 2)。

$\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 对细胞侵袭能力的影响 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 转染后细胞趋化性迁移能力明显提高,比原 LOVO 细胞提高了 38.4% ($P < 0.01$), LOVO/VEC 与 LOVO 细胞趋化性迁移能力相似 ($P >$

0.05)。同时, LOVO/FucT-Ⅶ 细胞侵袭能力明显强于 LOVO 细胞,提高了 56.4% ($P < 0.01$), LOVO/VEC 未显示出侵袭能力的改变 ($P > 0.05$)。结果显示 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 基因的转入能增强细胞趋化性迁移和侵袭等转移表型(图 3)。

表 2 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 转染 LOVO 细胞后对细胞周期的影响
Tab 2 The different cell cycle distribution of LOVO after $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ transfection

Cycle	LOVO	LOVO/VEC	LOVO/FucT-Ⅶ
G_0-G_1	36.65%	42.53%	26.95%
G_2-M	0.71%	0.00%	0.00%
S	62.64%	57.47%	73.05%
Apoptosis	21.75%	17.19%	23.44%
G_2/G_1	1.97	1.98	2.04

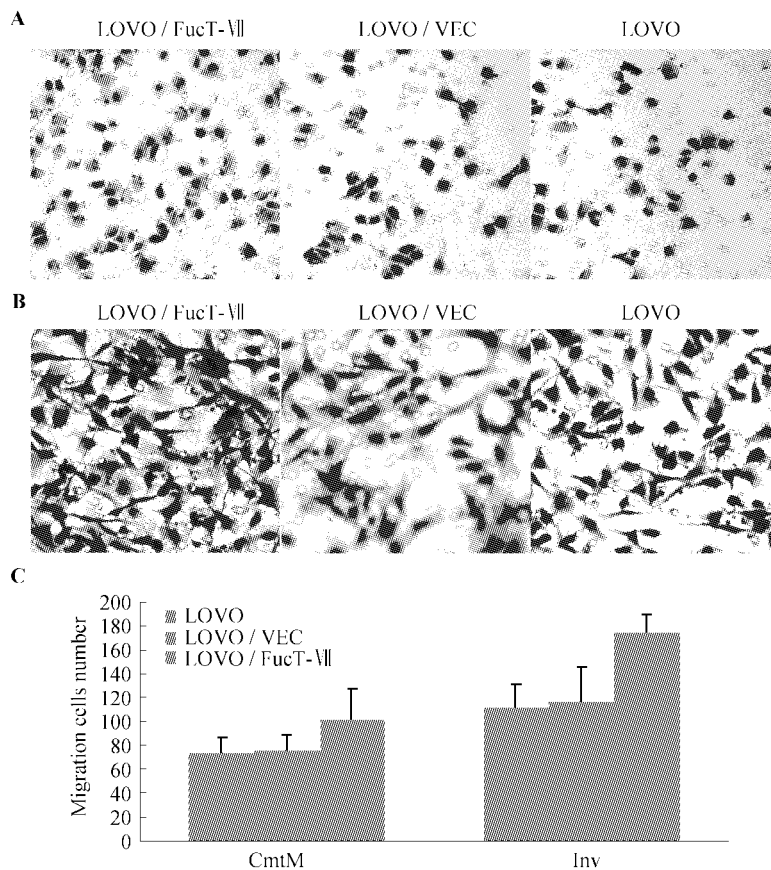


图 3 LOVO/FucT-Ⅶ、LOVO/VEC 和 LOVO 细胞趋化性迁移(A)和侵袭能力(B)的差异($\times 200$ HE)

Fig 3 Comparison of LOVO/FucT-Ⅶ, LOVO/VEC and LOVO cell on the cell migration(A) and invasion(B) ($\times 200$ HE)

讨 论

$\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ 是岩藻糖基转移酶系中一个,自 1994 年 Sasaki 等人应用表达克隆的方法在 THP-C 细胞 cDNA 文库中克隆出来后,对其基因表达和生物学功能的研究不断开展。FucT-Ⅶ 的 cDNA 全长为 1.7 kb,开放阅读框架编码 342 个氨基酸,其相对

分子量 Mr 约为 39.2×10^3 ,基因定位在染色体 9q34.3。FucT-Ⅶ 是 II 类跨膜拓扑结构,N 端有 14 个氨基酸位于细胞质,接着为 19 个氨基酸的疏水跨膜区以及位于高尔基体内的 309 个氨基酸的催化结构域。FucT-Ⅶ 能在一系列造血细胞和 HEV 中表达^[4]。

先期的研究^[5]显示将 FucT-Ⅶ cDNA 转染 H7721 肝癌细胞后能通过对下游细胞周期蛋白依

赖性蛋白激酶抑制剂(CDKI)p27Kip1 的调节促进磷酸化,从而显著加快细胞的生长,转染后的细胞易于通过 G_1 至 S 期的转变时间点。我们的研究将 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ转染入原本微弱表达的 LOVO 细胞中,构建 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ高表达的结直肠癌细胞株系,同样也发现了细胞生长增殖的改变。pcDNA 3.0 空载体的转入可能在一定程度上影响了细胞生长,造成空载体细胞在第 1 天出现轻度增殖抑制,但第 2 天后空载体细胞恢复至与 LOVO 细胞相似的生长速度;这一现象并未在 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ转染后的 LOVO/FucT-Ⅶ中观察到,LOVO/FucT-Ⅶ细胞增殖速度持续加快,第 4 天的增长率达到 37.8%,由此推断 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ基因具有较强的促进细胞增殖的能力,这种促进的正向作用甚至压过了初期由于空载体转入引起的对增殖速度的负向影响。这一设想在对转染前后细胞周期的检测中也获得了证实。 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ的转染后的细胞易于通过 G_1 至 S 期的转变时间点,S 期的细胞增多($>10\%$),而 G_1 期减少(约 10%);空载体转染的 LOVO/VEC 细胞 G_1 /S 期细胞比例较原 LOVO 细胞反要增多,考虑到空载体本身对细胞生长周期的影响,更肯定了 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ促进增殖生长的作用。而这一促进作用是否也是通过与肝癌细胞内同样的下游信号途径而产生的有待进一步的研究验证。

$\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ只能对远端的 $\alpha 2,3$ 唾液酸化的半乳糖胺单位岩藻糖化形成特异性产物 SLe^x。多项研究显示 SLe^x 的高表达提示乳腺癌、结直肠癌等肿瘤不良预后及高危复发可能^[6-8]。作为选凝素的配体,SLe^x 其与内皮细胞表达的 E-选凝素相互作用是肿瘤转移的始动机制,介导肿瘤细胞与内皮细胞的识别。近期研究显示 FucT-Ⅶ及其产物通过对细胞黏附、迁移和侵袭的影响而对肝癌细胞 H7721 的转移能力起至关重要的作用^[9]。在我们的研究中,同样发现转染了 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ后的人结肠癌 LOVO 细胞的趋化性迁移能力和侵袭能力有了明显的增强。这一促进转移表型作用可能与 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ作用与底物糖蛋白后岩藻糖 FUC 和唾液酸 SA 的功能有关。已有研究证实^[10] SA 在癌细胞与人脐静脉内皮细胞结合过程中更为重要,SLe^x 单抗 KM93 具有阻断肝癌细胞与 HUVECs 的黏附、迁移和侵袭这一作用的功能。在我们进一步的研究中,也发现转染 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ后 SLe^x 表达水平及糖蛋白 CD24 糖基化水平的明显上升;同时,对结直肠癌组织标本的检测也发现 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ高表达(待发表资料), $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ及其糖基化产物在促进肿瘤转移中的起着重要的作用。

$\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ基因能改变人结肠癌 LOVO 细胞的生物学行为,增强细胞趋化性迁移和侵袭等转移表型。我们的研究为进一步探索 $\alpha 1,3$ FucT-Ⅶ作为结肠癌转移治疗靶点的可能及其机制奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Yamamoto H, Swoger J, Greene S, *et al.* b-1, 6-N-acetylglucosamine bearing N-glycans in human gliomas: implications for a role in regulating invasivity[J]. *Cancer Res*, 2000,60(1):134-142.
- [2] Guo HB, Zhang Y, Chen HL. Relationship between metastasis-associated phenotypes and N-glycan structure of surface glycoproteins in human hepatocarcinoma cells[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001,127(4):231-236.
- [3] Liu F, Zhang Y, Zhang XY, *et al.* Transfection of the nm23-H1 gene into human hepatocarcinoma cell line inhibits the expression of sialyl Lewis X, alpha1,3 fucosyltransferase VII, and metastatic potential[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2002,128(4):189-196.
- [4] Sasaki K, Kurata K, Funayama K, *et al.* Expression cloning of a novel alpha1, 3-fucosyltransferase that is involved in biosynthesis of the sialyl Lewis X carbohydrate determinants in leukocytes[J]. *J Biol Chem*, 1994,269:14 730-14 737.
- [5] Wang QY, Guo P, Duan LL, *et al.* $\alpha 1,3$ -fucosyltransferase-Ⅶ stimulates the growth of hepatocarcinoma cells via cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005,62(2):171-178.
- [6] Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, *et al.* Increased expression of sialyl Lewis x antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study[J]. *Cancer Res*, 1993,53(15):3 632-3 637.
- [7] Jeschke U, Mylonas I, Shabani N, *et al.* Expression of sialyl lewis X, sialyl Lewis A, E-cadherin and cathepsin-D in human breast cancer: immunohistochemical analysis in mammary carcinoma *in situ*, invasive carcinomas and their lymph node metastasis[J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(3A): 1 615-1 622.
- [8] Malagolini N, Santini D, Chiricolo M, *et al.* Biosynthesis and expression of the Sda and sialyl Lewis x antigens in normal and cancer colon[J]. *Glycobiology*, 2007,17(7):688-697.
- [9] Qi HL, Zhang Y, Ma J, *et al.* Insulin/protein kinase B signalling pathway upregulates metastasis-related phenotypes and molecules in H7721 human hepatocarcinoma cell line[J]. *Eur J Biochem*, 2003,270(18):3 795-3 805.
- [10] 张英,张夏英,刘飞,等. 细胞表面糖链末端唾液酸和岩藻糖与某些细胞生物学行为的关系[J]. *实验生物学报*, 2002,35(4):271-277.