

CD146过表达对SKOV3细胞在裸鼠体内成瘤能力的影响

范丽,刘莹,龚宝兰

湖北医药学院附属人民医院妇产科,湖北 十堰 442000

[摘要] 目的:研究CD146基因在卵巢癌细胞SKOV3中过表达对其接种裸鼠皮下生成肿瘤能力的影响。方法:以脂质体介导的CD146基因转染卵巢癌细胞SKOV3, G418筛选阳性克隆细胞,并经Western blot鉴定其过表达CD146蛋白。分别应用MTT与软琼脂克隆形成试验评价过表达CD146克隆细胞对细胞增殖与体外集落形成能力的影响,并将这些细胞接种裸鼠皮下组织,每周观察、记录肿瘤的生长状况至裸鼠处死,称量肿瘤重量并对肿瘤组织进行免疫组织化学染色观察。结果:SKOV3细胞经脂质体转染与G418筛选后,可获得过表达CD146的阳性克隆细胞。CD146过表达明显抑制了SKOV3细胞的体外增殖能力与集落形成能力,亦明显抑制了裸鼠皮下的肿瘤生成能力,其肿瘤重量与体积明显比对照组小($P < 0.05$)。免疫组织化学染色结果表明过表达CD146的SKOV3细胞接种裸鼠生成的肿瘤组织仍可高表达CD146蛋白分子。结论:CD146过表达明显抑制卵巢癌细胞SKOV3的体外增殖能力与裸鼠体内的致瘤性,可能是卵巢癌预后的一个潜在分子标记。

[关键词] 卵巢癌;CD146;细胞黏附分子;SKOV3细胞;肿瘤生成

[中图分类号] R737.31

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)01-0044-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20180110

The effects of CD146 overexpression on the tumorigenesis of ovarian cancer SKOV3 cells in nude mice

Fan Li, Liu Ying, Gong Baolan

Department of Obstetrics and Gynecology, People's Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of CD146 overexpression in ovarian cancer cell line SKOV3 on the tumorigenesis in nude mice. **Methods:** The lipofection-mediated transfection in SKOV3 cells was performed and transfectants were screened by G418 resistance to obtain positive clone cells that overexpressed CD146 protein confirmed by Western blot. MTT assay and colony formation assay on soft agar were used to evaluate the proliferation and colony formation ability of SKOV3 cells that overexpressed CD146, respectively. These positive cells were subcutaneously injected into the nude mice, and the tumorigenesis of SKOV3 was observed and recorded every week until the sacrifice of the nude mice. The tumor weight and volume were measured and immunohistochemical staining was used to detect CD146 expression in the tumor tissue of nude mice. **Results:** After lipofection and G418 screening, the positive clone cells overexpressed CD146 were selected. CD146 overexpression significantly inhibited cell proliferation and decreased colony formation ability in SKOV3 cells *in vitro*, and also inhibited the tumorigenesis of SKOV3 in the nude mice. The tumor weight and volume from the nude mice injected subcutaneously with overexpressed-CD146 SKOV3 cells were respectively lighter and smaller than those of the control ($P < 0.05$). Immunohistochemical staining showed that tumor tissues from nude mice injected with overexpressed-CD146 SKOV3 cells still could express high level of CD146 protein. **Conclusion:** CD146 overexpression can inhibit cell proliferation *in vitro* and tumorigenesis of SKOV3 in nude mice. CD146 may be a potential marker for ovarian cancer prognosis.

[Key words] ovarian cancer; CD146; cell adhesion molecule; SKOV3 cells; tumorigenesis

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(01):0044-0048]

卵巢癌是一种严重威胁妇女生命健康的恶性肿瘤之一。它的发病率尽管不高,但病死率却占据所有妇科肿瘤的首位^[1]。尽管目前对卵巢癌的化学

或手术治疗已经取得了较大进步,然而卵巢癌易复发的特性及其对化疗药物的耐药性使得患者的5年生存率依然低下^[2]。近年来,越来越多的研究发现

细胞黏附分子CD146的异常表达与多种疾病和肿瘤如色素瘤、乳腺癌、膀胱癌与胃癌的发生或侵袭、转移密切相关^[3-5]。进一步研究表明CD146是一个多功能的细胞黏附分子,可促进或抑制肿瘤的生长,在不同肿瘤中的作用并不一致,这或许与不同肿瘤组织的内在微环境不同有关。然而,目前CD146表达对卵巢癌细胞与肿瘤生成的影响并不清楚。因而,为了更好地理解CD146在卵巢癌生成、发展与转移中的作用,本研究选择了几乎不表达CD146的卵巢癌细胞株SKOV3为研究对象,应用脂质体转染SKOV3细胞,筛选过表达CD146的克隆细胞接种裸鼠皮下,观察研究CD146过表达对肿瘤细胞在体内成瘤的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

卵巢癌细胞株SKOV3购于中科院上海细胞库,以添加10%胎牛血清(杭州四季青公司)的RPMI1640培养基培养于37℃、5%CO₂培养箱内。脂质体转染试剂Lipofectamine 2000、G418(Life Technologies公司,美国)。CD146抗体、β-actin抗体(Santa Cruz公司,美国)。BCA蛋白定量试剂盒(广州吉赛生物科技有限公司)。质粒pcDNA3.1与CD146-pcDNA3.1由张建艺教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染

将卵巢癌细胞SKOV3接种于6孔板,待其生长至70%~80%融合开始进行细胞转染。将6 μL Lipofectamine 2000与2 μg质粒CD146-pcDNA3.1混合;对照组则以相同体积的Lipofectamine 2000与2 μg空质粒载体pcDNA3.1(不含CD146基因片段)混合。室温下静置20 min,让其形成DNA-脂质体复合物,而后吸去6孔板中的细胞培养液,Opti-MEM清洗2次,将形成的DNA-脂质体复合物加入上述培养有SKOV3细胞的6孔板中,然后放入培养箱孵育6 h。随后添加含5%胎牛血清的RPMI1640培养基继续培养48 h,去除上层培养液,用0.25%胰酶消化、传代后重新添加完全培养基(含10%胎牛血清和0.9 mg/mL的G418)进行克隆筛选。约15 d后可见许多克隆细胞出现,用胰酶消化细胞、传代扩大培养。

1.2.2 Western blot 鉴定转染后CD146在SKOV3细胞中的表达

SKOV3细胞经转染与G418筛选后,1 500 r/min离心收集细胞,加入细胞裂解液裂解,提取总蛋

白。BCA法定量后进行10% SDS-PAGE电泳1.5 h,电泳结束后进行电转膜1 h,将蛋白转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,而后用TBST洗涤2次,5%脱脂奶粉孵育2 h,与鼠抗人一抗CD146于4℃下孵育过夜, TBST洗涤3次后,与羊抗小鼠二抗室温下孵育1 h,在化学发光仪上显影。β-actin作为加样量内参照。

1.2.3 MTT 实验

胰酶消化细胞,收集制成细胞悬液,将过表达CD146的实验组细胞与对照组细胞分别接种于96孔板,接种密度为 5×10^4 个/孔,每组设8个平行孔,待细胞长至24、48、72、96 h,分别于每孔加入10 μL MTT溶液(5 mg/mL),继续孵育4 h后,去除培养液,每孔加入150 μL 二甲基亚砷,置摇床上低速震荡10 min,用酶标仪检测490 nm处的吸光度值。

1.2.4 软琼脂克隆形成试验

用三蒸水分别配制1.2%与0.7%的琼脂糖溶液,灭菌后置于40℃水浴。胰酶消化,收集细胞,轻轻吹打,制成单细胞悬液,调细胞浓度至 1×10^3 个/mL。按1:1比例将1.2%琼脂糖与RPMI1640培养基(含20%胎牛血清)混合后,加入10 cm的细胞培养皿,冷却凝固。再按1:1比例将0.7%琼脂糖与RPMI1640培养基混合,随后加入0.2 mL细胞悬液,充分混匀后加入上述铺有1.2%琼脂糖的培养皿中,置于细胞培养箱中培养10 d,计数每个培养皿中形成的细胞集落数(>10个细胞定义为1个集落或克隆)。

1.2.5 裸鼠皮下成瘤试验

雌性无胸腺裸鼠10只,鼠龄4~5周,体重约20 g(华中科技大学实验动物中心),饲养于湖北医药学院SPF级动物房,动物饲料及水源均经消毒处理。实验分成两组,每组5只,对照组接种转染空质粒载体的SKOV3细胞;实验组则接种过表达CD146的SKOV3克隆细胞。分别培养上述所需细胞,待细胞生长至约90%融合,用0.25%胰酶消化,离心收集细胞,调整细胞密度为 5×10^6 个/mL,体积为0.05 mL,待裸鼠麻醉后,立即用1 mL注射器将上述浓度和体积的细胞分别接种于裸鼠腹部皮下(5×10^6 个/只裸鼠)。裸鼠接种细胞后继续饲养,每周观察、记录肿瘤的生长状况,并用游标卡尺测量肿瘤的长度与宽度。根据文献中的公式^[6]:体积(V)= $\pi/6(d_1 \times d_2)^{3/2}$ 计算肿瘤体积(d_1 为肿瘤长度, d_2 为肿瘤宽度)。于细胞接种裸鼠的第40天将其处死,取出肿瘤组织称重后,浸入10%福尔马林固定,用于组织切片。

1.2.6 免疫组织化学染色

将肿瘤组织行常规石蜡包埋、切片,3% H₂O₂室

温孵育 10 min,以消除内源性过氧化物的活性,在 1 × 柠檬酸钠沸水中煮 10 min,以使抗原修复。PBS 洗 2 遍,添加 5% 正常山羊血清封闭 10 min,滴加一抗 CD146 (1:250),阴性对照以相同体积的 PBS 代替一抗,室温下孵育 1 h。PBS 洗 3 次,滴加二抗 (1:150),室温下孵育 30 min,PBS 洗 3 次,滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液,室温孵育 20 min,PBS 洗 3 次后用 DAB 显色 10 min。随后用苏木素反染细胞核,二甲苯透明 3 次后,中性树胶封片,自然干燥,在显微镜下观察、拍照。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件进行数据处理,实验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较采用 One-Way ANOVA 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blot 检测 CD146 基因转染 SKOV3 细胞后的表达水平

通过脂质体将含人 CD146 cDNA 基因的质粒 (CD146-pcDNA3.1) 转染卵巢癌细胞株 SKOV3,并经 G418 筛选,获得阳性细胞克隆。Western blot 检测结果表明这些阳性细胞可高表达 CD146 蛋白(图 1);而对照组是转染了不含 CD146 cDNA 基因的空质粒载体,结果其细胞基本不表达 CD146 蛋白。

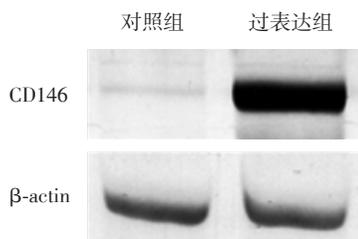
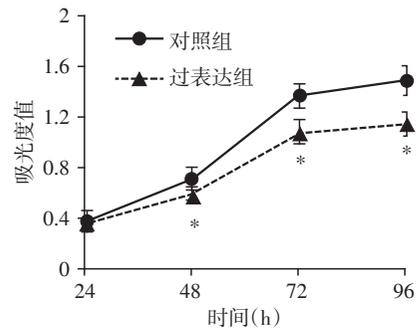


图 1 Western blot 结果显示 SKOV3 细胞转染后可高表达 CD146 蛋白

Figure 1 Western blotting showed that SKOV3 cells expressed high level of CD146 protein after transfection

2.2 CD146 过表达对细胞体外增殖与集落形成能力的影响

MTT 检测结果表明,过表达 CD146 的 SKOV3 细胞接种培养 48 h 后,与对照相比较,其增殖明显受到抑制(图 2)。软琼脂克隆形成试验结果表明 CD146 过表达 SKOV3 细胞的体外集落形成数为 (22 ± 4) 个,与对照组 (38 ± 5) 个相比较,形成的集落数量明显减少。



与对照组相比, $P < 0.05, n=3$ 。

图 2 MTT 结果表明 CD146 过表达明显抑制 SKOV3 细胞的体外增殖能力

Figure 2 MTT showed that CD146 overexpression effectively inhibited SKOV3 cell proliferation *in vitro*

2.3 CD146 过表达对 SKOV3 细胞致瘤性的影响

为阐明 CD146 过表达对卵巢癌细胞 SKOV3 在体内对肿瘤生成的影响,我们将过表达 CD146 的 SKOV3 细胞接种于裸鼠腹部皮下组织,以观察这些细胞在裸鼠体内的致瘤性。动物实验结果表明,接种过表达 CD146 的 SKOV3 细胞在裸鼠体内生成的肿瘤明显比对照组小(图 3)。对生成的肿瘤组织进行称重,结果表明过表达组的肿瘤组织平均重量是 (20.1 ± 5.7) mg,而对照组的肿瘤组织平均重量为 (340.2 ± 120.8) mg,两者具有明显的统计学差异 ($P < 0.05$)。从细胞接种裸鼠直至处死裸鼠(第 42 天),过表达组的肿瘤平均体积增长缓慢,表明体内的肿瘤生长较慢;而对照组的肿瘤平均体积在细胞接种第 14 天后迅速增长,表明体内的肿瘤生长较快。对同一时间段内的肿瘤平均体积进行比较,过表达组的肿瘤平均体积明显小于对照组的肿瘤平均体积,两者间差异有统计学意义(图 4)。

2.4 免疫组织化学染色观察

SKOV3 细胞接种裸鼠腹部皮下至第 42 天将裸鼠处死,取出裸鼠体内的肿瘤组织,10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋、切片,然后行免疫组织化学染色。对照组的肿瘤切片染色较浅,与阴性对照结果

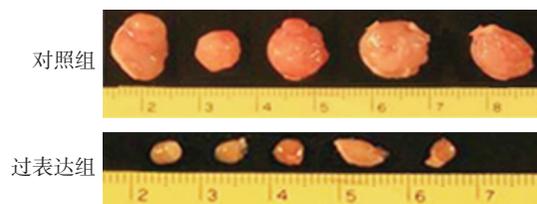


图 3 CD146 过表达明显抑制 SKOV3 细胞在裸鼠体内致瘤
Figure 3 CD146 overexpression effectively suppressed SKOV3 cell tumorigenesis in nude mice

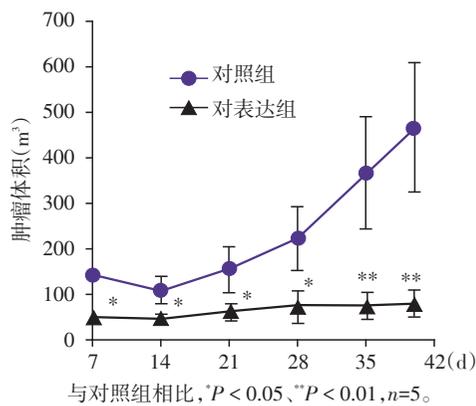
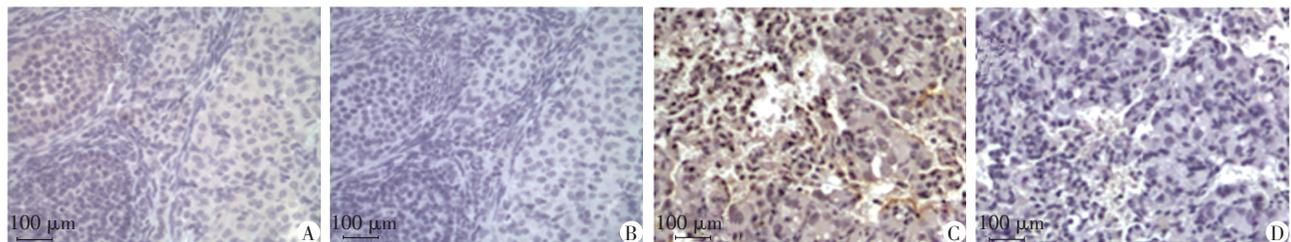


图4 CD146过表达对SKOV3细胞在裸鼠皮下生成肿瘤体积的影响

Figure 4 CD146 overexpression reduced the volume of SKOV3 tumors in nude mice



A、B:对照组肿瘤组织切片,C、D:过表达组肿瘤组织切片。A、C加入了CD146抗体孵育;B、D为阴性对照,相同体积的PBS代替CD146抗体孵育。

图5 肿瘤组织的免疫化学染色

Figure 5 Immunohistochemistry of SKOV3 tumor tissues

后密切相关^[4-5]。然而,CD146在卵巢癌中的确切作用尚不清楚。本文通过研究CD146分子的过表达对SKOV3细胞的体外增殖能力、软琼脂克隆形成能力及对裸鼠体内的成瘤作用,将有助于更好地理解该分子在卵巢癌的发生或转移中的作用。

细胞黏附分子CD146又叫MCAM、Mel-CAM和A32,属于免疫球蛋白基因超家族,具有免疫球蛋白样的V-V-C2-C2-C2结构域,是一个单次跨膜的糖蛋白分子,N末端位于细胞外,C末端位于胞质内并具有多个可被蛋白激酶C、蛋白激酶A和酪蛋白激酶2识别的位点,表明CD146蛋白分子广泛参与各种细胞信号途径^[8]。目前对CD146配体的研究依然缺乏,在内皮细胞上已鉴定的配体主要有半乳糖凝集素1和血管内皮生长因子受体2^[9-10]。在不同细胞中,CD146可能具有不同配体或具有多个配体,并且功能上CD146通过结合不同配基,建立细胞与细胞或细胞与基质之间的相互作用。在本研究中,通过脂质体转染含CD146 cDNA基因的质粒进入SKOV3细胞,并通过G418抗性筛选,获得了过表达CD146的细胞。结果表明CD146的过表达明显抑制细胞

类似,表明这些肿瘤组织几乎不表达CD146蛋白分子。而过表达CD146的SKOV3细胞接种裸鼠产生的肿瘤组织,其切片的免疫组织化学染色结果呈棕褐色,着色区主要位于细胞膜、胞质与细胞间隙,表明这些部位可高表达CD146蛋白分子(图5)。

3 讨论

卵巢癌是女性生殖系统中最严重的一种恶性肿瘤,由于发生初期缺乏明显症状及有效的早期诊断标记,多数患者在初次诊断时已经处于癌症晚期,其预后并不理想,给患者带来严重的生命威胁^[7]。因而,寻找有效的生物标记对于卵巢癌的早期诊断与治疗具有重要意义。目前,许多研究发现细胞黏附分子CD146的异常表达与乳腺癌、色素瘤患者的预

的体外增殖。然而另一项研究表明,通过干扰RNA抑制CD146的表达,抑制了腺样囊性癌细胞的增殖与侵袭^[11]。Zigler等^[12]的研究发现CD146并不影响色素瘤细胞的体外增殖,甚至与在裸鼠体内的作用完全相反,这或许与AKT的信号途径是否被激活有关^[13]。以往研究发现,CD146可激活肿瘤内的AKT信号途径,而AKT是PI3K介导细胞增殖存活的重要调控因子。CD146与AKT的相互作用在色素瘤细胞、前列腺癌细胞与正常细胞如人脐静脉内皮细胞被观察到,但目前为止,它们的相互作用还没有在宫颈癌、肝癌与卵巢癌中被发现。由此可见,CD146对细胞增殖的影响与其上游或下游的信号途径密切相关。

CD146自从被发现是恶性色素瘤细胞表面的一个特定抗原以来,越来越多的研究资料表明CD146广泛过表达于各种肿瘤细胞,是不同肿瘤潜在的诊断标记与预后指标^[3]。过去对CD146的多数研究都是通过下调其表达水平来研究CD146分子对肿瘤或肿瘤细胞的影响,并且多数研究结果均支持CD146分子可以促进肿瘤的生长、转移及血管生成,是治疗肿瘤的一个潜在靶点^[14]。本研究中通过应

用软琼脂克隆形成试验评价CD146的过表达对细胞的体外集落形成能力的影响。其结果表明,CD146过表达明显减少SKOV3细胞的体外集落形成数量。以往研究已经证实,体外集落形成能力是细胞体外致瘤性的一种表现,它与细胞的体内致瘤性具有正相关性^[15],这与本实验结果相符。将过表达CD146的SKOV3细胞接种裸鼠腹部皮下组织,结果发现这些过表达CD146的SKOV3细胞在裸鼠体内并不能促进肿瘤生长,而是抑制了肿瘤生长。免疫组织染色结果进一步证实了快速生长的肿瘤组织不表达CD146蛋白分子,而过表达组的肿瘤组织则可检测到CD146的高表达。这些结果似乎表明CD146的过表达能够抑制卵巢癌细胞SKOV3在裸鼠体内的致瘤性。该作用与Shih等^[16]在乳腺癌细胞MCF-7过表达CD146可抑制细胞在SCID小鼠体内的肿瘤生长具有相似的作用。近年来研究发现,CD146过表达可抑制乳腺癌细胞MDA-MB-231的体外侵袭能力^[17]。另一项研究发现,与CD146分子同源的白细胞黏附分子CD166/ALCAMN末端片段可抑制基质金属蛋白酶2的激活,从而降低细胞的体外迁移与侵袭能力,并能抑制肿瘤细胞在裸鼠体内的转移^[18]。综合这些研究资料及本研究结果,似乎表明CD146分子是一个抑制卵巢癌细胞生长或转移的调控因子。尽管如此,本研究也存在不足之处,未来研究需要收集大量的卵巢癌与癌旁组织标本,以检测CD146在临床样本中的表达。CD146过表达抑制SKOV3成瘤的分子机制有待今后进一步阐明。

总之,CD146是一个多功能的细胞黏附分子,它的异常表达可能与卵巢癌的发生或癌细胞的转移、侵袭密切相关。通过对CD146基因功能的深入研究,可为临床上卵巢癌的早期诊断或治疗提供新的靶点和思路,开发以CD146为靶点的抗肿瘤药物,从而为癌症患者带来福音。

[参考文献]

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 7-30
- [2] Suprasert P, Chalapati W. Detection of recurrence in a surveillance program for epithelial ovarian cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(12): 7193-7196
- [3] Wang Z, Yan X. CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion [J]. *Cancer Lett*, 2013, 330(2): 150-162
- [4] Luo Y, Zheng C, Zhang J, et al. Recognition of CD146 as an ERM-binding protein offers novel mechanisms for melanoma cell migration [J]. *Oncogene*, 2012, 31(3): 306-321
- [5] Mostert B, Kraan J, Bolt-de Vries J, et al. Detection of circulating tumor cells in breast cancer may improve through enrichment with anti-CD146 [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 127(1): 33-41
- [6] Passaniti A, Isaacs JT, Haney JA, et al. Stimulation of human prostatic carcinoma tumor growth in athymic mice and control of migration in culture by extracellular matrix [J]. *Int J Cancer*, 1992, 51(2): 318-324
- [7] Cannioto RA, Trabert B, Poole EM, et al. Ovarian cancer epidemiology in the era of collaborative team science [J]. *Cancer Causes Control*, 2017, 28(5): 487-495
- [8] Anfosso F, Bardin N, Vivier E, et al. Outside-in signaling pathway linked to CD146 engagement in human endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(2): 1564-1569
- [9] Jiang T, Zhuang J, Duan H, et al. CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis [J]. *Blood*, 2012, 120(11): 2330-2339
- [10] Jouve N, Despoix N, Espeli M, et al. The involvement of CD146 and its novel ligand Galectin-1 in apoptotic regulation of endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(4): 2571-2579
- [11] Chen W, Zhang HL, Jiang YG, et al. Inhibition of CD146 gene expression via RNA interference reduces in vitro perineural invasion on ACC - M cell [J]. *J Oral Pathol Med*, 2009, 38(2): 198-205
- [12] Zigler M, Villares GJ, Dobroff AS, et al. Expression of Id-1 is regulated by MCAM/MUC18: a missing link in melanoma progression [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(10): 3494-3504
- [13] Li G, Kalabis J, Xu X, et al. Reciprocal regulation of Mel-CAM and AKT in human melanoma [J]. *Oncogene*, 2003, 22(44): 6891-6899
- [14] Ma X, Wang J, Liu J, et al. Targeting CD146 in combination with vorinostat for the treatment of ovarian cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(3): 1681-1687
- [15] Leone A, Flatow U, King CR, et al. Reduced tumor incidence, metastatic potential, and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells [J]. *Cell*, 1991, 65(1): 25-35
- [16] Shih LM, Hsu MY, Palazzo JP, et al. The cell-cell adhesion receptor Mel - CAM acts as a tumor suppressor in breast carcinoma [J]. *Am J Pathol*, 1997, 151(3): 745-751
- [17] Ouhtit A, Gaur RL, Adb Elmageed ZY, et al. Towards understanding the mode of action of the multifaceted cell adhesion receptor CD146 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1795(2): 130-136
- [18] Weidle UH, Eggle D, Klostermann S, et al. ALCAM/CD166: cancer-related issues [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2010, 7(5): 231-243

[收稿日期] 2016-12-03