文章编号:1000-5404(2008)16-1529-03

论著

间皮素与CA125在卵巢癌中的共定位表达及意义

王 莉[1,2],李 娜[2],吴小华[2,3] ([1]河北省人民医院妇产科,石家庄 050051;[2]河北医科大学附属第四医院妇产科,石家庄 050011;[3]白求恩国际和平医院妇产科,石家庄 050082)

摘 要:目的 通过对上皮性卵巢癌中间皮素和CA125的表达、定位和细胞黏附的研究,探讨间皮素的功能。**方法** 采用间接免疫荧光双标记染色法、Western blot检测间皮素和CA125的表达及定位,通过人工基底膜成分的黏附实验和EDTA介导的细胞分离实验检测细胞黏附功能。**结果** 间皮素和CA125主要分布在细胞膜,间皮素蛋白在3种细胞系表达由强到弱依次为OVCAR-3、SKOV-3、3AO,3AO和SKOV-3对塑料基质和人工基底膜Matrigel的黏附能力明显低于OVCAR-3($P<0.01$)。**结论** 在3种卵巢癌细胞系和卵巢癌组织中间皮素和CA125均有不同程度的表达,存在共定位关系,间皮素的表达与细胞黏附功能相关联。

关键词: 间皮素;CA125;卵巢肿瘤;黏附
中图法分类号: R394.2;R730.23;R737.31 **文献标识码:** A

Expressions and significance of mesothelin and CA125 in human epithelial ovarian cancer

WANG Li[1,2], LI Na[2], WU Xiao-hua[2,3] ([1]Department of Gynaecology and Obstetrics, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, [2]Department of Gynaecology and Obstetrics, The Fourth Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, [3]Department of Gynaecology and Obstetrics, The Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, China)

Abstract: Objective To investigate the function of mesothelin by analyzing the location, the expressions and the adhesive ability of mesothelin and CA125 in human epithelial ovarian cancer. Methods Mesothelin and CA125 protein expressions and locations in human epithelial ovarian cancer tissues and cell lines were determined by indirect immunofluorescence double maker and Western blot. Cell adhesive ability was detected by EDTA-induced cell detachment. Results Mesothelin and CA125 were specifically located in cytomembrane of human epithelial ovarian cancer cells. Expressions of mesothelin in the SKOV-3 and 3AO cells were weaker than those in the OVCAR-3. SKOV-3 and 3AO cells adhered less effectively to plastic substance and matrigel than OVCAR-3 ($P<0.01$). Conclusion Different expressions and co-location of mesothelin and CA125 were found in in the 3 kinds of human epithelial ovarian cancer tissues and cell lines. The expression level of mesothelin may be related to cell adhesive ability.

Key words: mesothelin; CA125; ovarian neoplasms; adhesion

卵巢癌5年生存率仅为20%~30%,发现时往往已是晚期,且手术和化疗的疗效欠佳,在妇科恶性肿瘤中预后最差。本课题组前期用cDNA微阵列方法分析了卵巢上皮性癌和正常卵巢皮质的基因表达谱,发现间皮素(mesothelin,MSLN)基因是卵巢上皮性癌组织中表达上调最显著的基因,并证实卵巢上皮性肿瘤组织中间皮素和糖类抗原125(CA125)表达有显著的一致性[1]。国外实验大多集中在间皮素的免疫靶向治疗和作为肿瘤标志物的研究[2,3],而关于间皮素的功能及与CA125的共定位关系还不十分明确。本实验对人上皮性卵巢癌中间皮素和CA125的表达及定位,间皮素表达与细胞黏附功能的关系进行检测,旨在探讨间皮素在卵巢癌种植转移中的潜在地位。

基金项目: 国家自然科学基金(30572093)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30572903)
作者简介: 王 莉,女,河北省保定市人,博士研究生,副主任医师,主要从事妇科肿瘤方面的研究。电话:(0311)85988154,E-mail: wangli719@126.com
通信作者: 吴小华,电话:(0311)87978390,E-mail:xiaohuawu65@yahoo.com
收稿日期: 2007-09-17;**修回日期:** 2007-11-12

1 材料与方法

1.1 材料

人卵巢癌细胞系 OVCAR-3 为低分化浆液性乳头状腺癌，SKOV-3 为中分化浆液性乳头状腺癌，3AO 为低分化黏液性腺癌，均购自中科院细胞库，由本校附属第四医院科研中心传代保存，培养于 37 ℃、50 ml/L CO_2、饱和湿度、100 ml/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中，2.5 g/L 胰酶消化，取对数生长期细胞备用；组织标本：选取本校附属第四医院 2003 年 5－11 月经手术切除的上皮性卵巢癌标本 5 例，未经过放疗或化疗，手术后均经病理确诊，其中低分化浆液性囊腺癌 2 例，中分化 1 例，高分化 1 例，黏液性腺癌 1 例。低分子量蛋白标准、蛋白质提取试剂盒、考马斯亮蓝检测试剂盒等均购自北京赛百盛生物公司，人工基底膜 Matrigel 为 Sigma 公司产品，间皮素鼠抗人单克隆抗体 K1 购自美国 ZYMED 公司，CA125 兔抗人多克隆抗体购自北京博奥森生物公司，FITC 标记羊抗兔多抗、罗丹明标记羊抗鼠多抗、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠多抗、β-actin 抗体均购自中杉金桥生物公司，抗人可溶性间皮素相关蛋白单克隆抗体 2H10 为本课题组自制并经过鉴定[4]。LSM510 型激光共聚焦显微镜为 ZEISS 公司产品。

1.2 间接免疫荧光双标记染色法

细胞爬片，丙酮固定。手术标本均经甲醛固定，常规石蜡包埋，4 μm 厚切片。间皮素单抗 K1、2H10，CA125 多抗稀释浓度分别为 1∶100、1∶200、1∶200。羊血清封闭抗原后加 K1 或 2H10 37 ℃孵育 1 h，PBS 振洗，加 CA125 多抗 ，37 ℃孵育 1 h。以后各步均避光操作，顺序滴加 1∶100 的 2 种荧光二抗孵育，振洗后保存。激光共聚焦显微镜观察并计量检测荧光强度，罗丹明激发波长为 543 nm，FITC 激发波长为 488 nm。PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 Western blot 检测蛋白质表达

提取培养细胞的总蛋白，考马斯亮蓝检测试剂盒蛋白定量，12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳，4 ℃冷库恒流 150 mA 3 h 电转移至 PVDF 膜，奶粉封闭后加入 1∶50 稀释的间皮素单抗 K1、1∶200 的 2H10 或 β-actin 抗体 4 ℃过夜，漂洗后 1∶1 000 稀释辣根过氧化物酶标记二抗 37 ℃ 2 h，DAB 试剂盒显色。β-actin 作为内参照，相对分子质量为 43×10^3。

1.4 细胞黏附性检测

1.4.1 EDTA 介导的细胞分离实验　检测细胞对塑料基质的黏附能力。将 2×10^5 个待测细胞接种于 6 孔培养板，培养至 95% 饱和密度，洗涤后加入 0.02% EDTA 1 ml/孔，37 ℃ 水平摇床 100 r/min 振摇，分别于 5、10、15、20 min 后收集消化液，仍未脱落之细胞加胰酶消化后吹打，计数各时相消化液中的细胞数。

细胞脱落率(%) = 各时相脱落细胞数/细胞总数 ×100%

1.4.2 对人工基底膜的黏附实验　50 μg/ml Matrigel、1% 牛血清白蛋白(BSA)或 300 μg/ml 多聚赖氨酸，100 μl/孔加入 96 孔平底培养板，每个时相点设 4 个复孔，37 ℃孵育 2 h，PBS 洗涤 2 遍备用；待测细胞用 0.25% 胰酶消化，于预包被培养板每孔加入细胞 3×10^4 个，37 ℃孵育 2 h，PBS 洗涤 2 遍，去除未黏附细胞，消化后计数，以多聚赖氨酸预包被者为 100%，计算各种细胞对人工基底膜成分黏附的相对百分率。

以上每组实验均设立对照并重复 3 次。

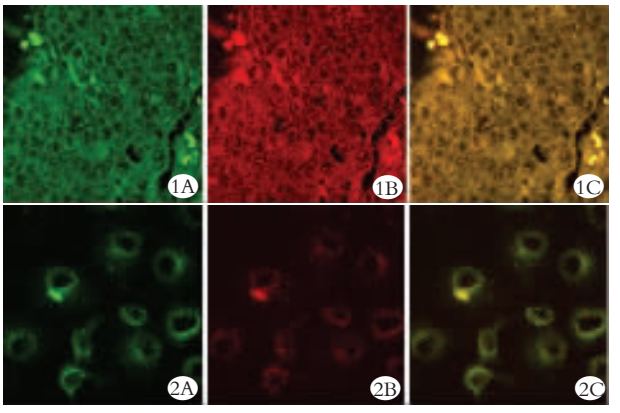
1.5 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件进行 t 检验和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 上皮性卵巢癌中间皮素和 CA125 的表达及定位

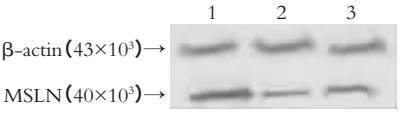
卵巢癌组织双标记荧光染色可见间皮素标记为红色荧光，CA125 标记为绿色荧光，主要分布在细胞膜，二者重叠呈黄色荧光，说明间皮素和 CA125 共定位。4 例浆液性囊腺癌组织标本间皮素和 CA125 全部阳性染色，荧光强度与分级无关；1 例黏液性腺癌阴性染色。在细胞系 OVCAR-3、SKOV-3、3AO 中，同样可见间皮素和 CA125 共定位分布于细胞膜(图 1、2)，其中 SKOV-3、3AO 荧光染色稍弱于 OVCAR-3。Western blot 检测 3 种细胞间皮素表达量，在相对分子质量为 40×10^3 处均有不同程度特异性条带的表达，蛋白表达从强到弱依次为 OVCAR-3、SKOV-3、3AO(图 3)。K1 抗体检测和 2H10 检测的结果一致。



A：CA125 表达阳性；B：间皮素表达阳性；C：CA125 和间皮素共定位表达

图 1　卵巢癌细胞膜间皮素和 CA125 双标记荧光染色观察　(×400)

图 2　OVCAR-3 细胞膜间皮素和 CA125 双标记荧光染色观察　(×600)

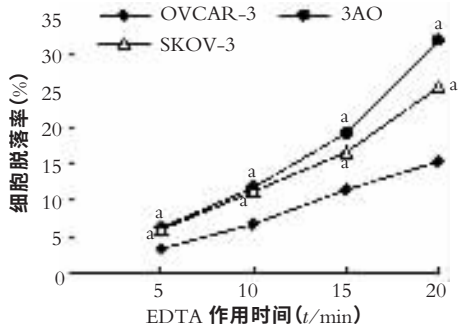


1：OVCAR-3；2：3AO；3：SKOV-3

图 3　3 种细胞的间皮素蛋白表达

2.2 细胞黏附性检测

EDTA 介导的细胞分离实验中，OVCAR-3 各时相点细胞脱落率均低于 SKOV-3 和 3AO($P<0.01$)，SKOV-3 和 3AO 两者比较无显著差别(图 4)。OVCAR-3、3AO、SKOV-3 对人工基底膜 Matrigel 的黏附率分别为(70.4 ± 2.5)%、(45.7 ± 2.1)%、(47.3 ± 3.9)%，OVCAR-3 的黏附能力显著强于 3AO、SKOV-3($P<0.01$)，而 3AO 和 SKOV-3 相比黏附率无明显差别($P>0.05$)。



a: $P<0.01$,与 OVCAR-3 比较

图 4　EDTA 介导的 3 种细胞脱落率比较

3　讨论

间皮素是一种细胞表面糖蛋白,通常仅表达在胸膜腔、腹膜腔和心包腔的间皮细胞。近年来发现间皮素在恶性胸膜间皮瘤、胰腺癌和卵巢癌等恶性肿瘤中过表达,并可能参与肿瘤的黏附转移,与卵巢癌细胞在腹腔内的种植转移有关[5]。CA125 也是细胞表面糖蛋白,相对分子质量为(250 ~ 500) × 10^3,血清 CA125 是目前临床上最常用的卵巢上皮性癌的肿瘤标记物,是一个很好的卵巢癌病情监测随访的指标[6]。Rump 等[7]认为 CA125 是间皮素的配体,通过 N-末端的细胞外功能区的重复片段与间皮素结合在一起,共同参与细胞黏附。抗间皮素抗体能阻断卵巢癌细胞 OVCAR-3 的 CA125/间皮素的结合,CA125 可能通过与间皮细胞的间皮素结合促进卵巢癌转移至腹腔[8,9]。

本研究中所用的具有代表性的两种人卵巢浆液性腺癌细胞系中 OVCAR-3 的间皮素表达量最高,SKOV-3 其次,黏液性腺癌细胞系 3AO 表达相对最弱;4 例浆液性囊腺癌间皮素阳性表达,1 例黏液性腺癌阴性,说明卵巢浆液性癌的间皮素表达高于黏液性癌。与文献[1,10]报道一致。低分化 OVCAR-3 细胞间皮素表达高于中分化的 SKOV-3 细胞,提示间皮素表达可能与肿瘤分级有关。间皮素表达与卵巢癌病理分期、分级相关,说明间皮素可能通过增强细胞黏附来促进肿瘤细胞种植在腹膜上,导致肿瘤扩散。测定间皮素的量可以帮助判断卵巢癌的预后[10]和指导进行靶向治疗。本课题组已经制备成功间皮素的抗体[4],并证实 2H10 抗体和 K1 定位一致,但抗体效价却比 K1 要高,此抗体将来可用于血清检测间皮素 ELISA 试剂盒研制或用于抗体靶向治疗研究。

并不是所有卵巢上皮性癌都同样表达间皮素,故通过对间皮素表达量不同的细胞黏附功能的研究,可以间接了解间皮素的功能。OVCAR-3 细胞的黏附能力强于 SKOV-3 和 3AO,与间皮素表达基本一致,提示间皮素的表达量与细胞黏附功能可能呈正相关;细胞黏附率与间皮素的表达量不完全呈正比,所以除了间皮素和 CA125 可能影响细胞黏附功能外,还有许多与黏附相关的因素在起作用,他们与间皮素和 CA125 的关系还有待于进一步研究。

间皮素与 CA125 均细胞膜染色,并重叠分布,证实其共定位关系明确,说明肿瘤细胞表面同时存在这两种抗原。而腹膜间皮细胞表面也同时存在这两种抗原[5,11],肿瘤细胞之间与间皮细胞之间通过间皮素/CA125 的特异性结合而相互黏附[8],如果消除这种黏附可能会抑制肿瘤转移,达到治疗的目的。

参考文献:

[1] 吴小华, 王小玲, 张立芳, 等. 卵巢上皮性肿瘤组织中间皮素和 CA_{125} 表达及其相关性研究[J]. 中华妇产科杂志, 2005, 40(10): 709 - 711.

[2] Hassan R, Bullock S, Premkumar A, *et al*. Phase I study of SS1P, a recombinant anti-mesothelin immunotoxin given as a bolus I. V. infusion to patients with mesothelin-expressing mesothelioma, ovarian, and pancreatic cancers[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(17): 5144 - 5149.

[3] Huang C Y, Cheng W F, Lee C N, *et al*. Serum mesothelin in epithelial ovarian carcinoma: a new screening marker and prognostic factor [J]. Anticancer Res, 2006, 26(6C): 4721 - 4728.

[4] 陈书成, 刘雅坤, 吴小华, 等. 抗人可溶性间皮素相关蛋白单克隆抗体的制备及特性鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(3): 246 - 248.

[5] Chang K, Pastan I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(1): 136 - 140.

[6] Bast R C Jr., Badgwell D, Lu Z, *et al*. New tumor markers: CA125 and beyond[J]. Int J Gynecol Cancer, 2005, 15(Suppl 3): 274 - 281.

[7] Rump A, Morikawa Y, Tanaka M, *et al*. Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion[J]. 2004, 279(10): 9190 - 9198.

[8] Gubbels J A, Belisle J, Onda M, *et al*. Mesothelin-MUC16 binding is a high affinity, N-glycan dependent interaction that facilitates peritoneal metastasis of ovarian tumors[J]. Mol Cancer, 2006, 5(1): 50.

[9] 史惠蓉, 寇歆馨. 卵巢上皮性肿瘤组织及患者血清 CA125 检测[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2008, 43(2): 324 - 326.

[10] Yen M J, Hsu C Y, Mao T L, *et al*. Diffuse mesothelin expression correlates with prolonged patient survival in ovarian serous carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(3 Pt 1): 827 - 831.

[11] Zeimet A G, Marth C, Offner F A, *et al*. Human peritoneal mesothelial cells are more potent than ovarian cancer cells in producing tumor marker CA-125[J]. Gynecol Oncol, 1996, 62(3): 384 - 389.

(编辑　陈聪连)