论著

文章编号:1000-5404(2010)13-1438-04

CD82/KAI1 在神经胶质瘤细胞株中的表达及对细胞迁移能力的影响

陈 亮[1],罗文萍[2],钟 东[1],王 亮[1],唐兆华[1],杨 刚[1],唐文渊[1] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院神经外科[1],动物中心[2])

[摘要] **目的** 研究 CD82/KAI1 在胶质瘤 CHG-5 及 U251 细胞株的表达及意义。**方法** RT-PCR、免疫细胞化学、免疫荧光检测 CHG-5 及 U251 细胞中 CD82/KAI1 的表达;分别设立 1∶100、1∶200 CD82/KAI1 抗体干预组和空白对照组,通过划痕实验对 CD82/KAI1 对细胞迁移能力的影响进行分析。**结果** ①U251 细胞中 CD82/KAI1 的 mRNA 表达高于 CHG-5 细胞($P<0.01$);U251 细胞中 CD82/KAI1 的蛋白水平表达高于 CHG-5 细胞($P<0.01$)。②CD82/KAI1 抗体干预组迁移细胞数量均显著高于对照组($P<0.05$),且迁移细胞数量随抗体浓度升高而增加($P<0.05$)。**结论** CD82/KAI1 在恶性胶质瘤细胞株中表达,且在 U251 细胞中表达较 CHG-5 细胞高。CD82/KAI1 可抑制胶质瘤 U251 细胞的迁移。

[关键词] CD82/KAI1 基因;CHG-5 细胞;U251 细胞;神经胶质瘤

[中图法分类号] R730.264; R394.2; R73-37 [文献标志码] A

Expression of CD82/KAI1 in glioma cell lines and its effect on cell migration

Chen liang[1], Luo Wenping[2], Zhong Dong[1], Wang Liang[1], Tang Zhaohua[1], Yang Gang[1], Tang Wenyuan[1] ([1]Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, [2]Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the CD82/KAI1 expression in glioma cell lines, CHG-5 and U251. **Methods** CD82/KAI1 expression in CHG-5 and U251 was detected by RT-PCR, immunocytochemistry, and immunofluorescence, respectively. CD82/KAI1 antibodies, diluted at 1∶100 and 1∶200, served as an intervention group and a blank control group, respectively. Effect of CD82/KAI1 expression on cell migration was analyzed by scratch test. **Results** The expression level of CD82/KAI1 mRNA and protein was higher in U251 than in CHG-5 ($P<0.01$). The number of migrated cells was greater in CD82/KAI1 antibody intervention group than in blank control group ($P<0.05$), and increased with the increasing antibody concentration. **Conclusion** CD82/KAI1 is expressed in glioma cell lines, with its expression level higher in U251 than in CHG-5. CD82/KAI1can suppress the migration of glioma U251 cells.

[**Key words**] CD82/KAI1gene;CHG-5 cell;U251 cell;glioma

Corresponding author: Tang Wenyuan, Tel:86-23-89011152, E-mail: twy2007@126.com

胶质瘤为中枢神经最常见的原发性肿瘤,恶性程度高者预后十分差,向临近脑组织的浸润迁移使得手术不能完全切除,少于5%患者能有5年的存活期[1]。肿瘤转移抑制基因 CD82/KAI1 为4次跨膜蛋白超家族(transmembrane 4 superfamily,TM4SF)家族成员,广泛表达于多种组织,于大鼠前列腺癌细胞株中首次发现其抑癌作用,它与肿瘤的发展进程及胚胎的植入极其相关[2]。CD82/KAI-1 与整合素 α3β1、α6β1、α5β1 及基质金属蛋白酶家族成员相关。它可抑制 MMP-2、MMP-9 的活力,还可能通过内吞作用,降低细胞表面的整合素表达[3]。近期研究[4]表明,CD82/KAI1 可通过减弱 c-Met 依赖的信号途径抑制细胞迁移。因此,本研究检测了 CD82/KAI1 在胶质瘤细胞株 CHG-5 及 U251 的表达,及对细胞迁移能力的影响,试图研究 CD82/KAI1 在恶性胶质瘤细胞株 U251 及 CHG-5 中浸润、转移的分子机制和细胞机制,丰富临床诊断和治疗胶质瘤的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

1.1.1 菌株 人胶质瘤 CHG-5 细胞株由第三军医大学西南医院病理学研究所提供,U251 细胞株由重庆医科大学基础学院组织胚胎教研室保存。

1.1.2 主要试剂 PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司,兔抗 CD82/KAI1 多克隆抗体(bs-1470R)购于北京博奥森生物技术有限公司,生物素化兔抗羊二抗、链霉素亲和素-过氧化物酶复

[通信作者] 唐文渊,电话:(023)89011152, E-mail:twy2007@126.com

合物、FITC 标记羊抗兔二抗,FITC 兔抗羊二抗均以及 DAB 显色试剂盒等购自北京中山生物技术有限公司。

1.1.3 引物设计与合成 根据 GenBank 发布的 CD82/KAI1cDNA 编码区序列,采用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计引物,由 TaKaRa 公司合成。上游引物:5′-TCACTATGCTCATGGGCTTCC-3′,下游引物:5′-AATGAGCTCAGTCACGATGCC-3′。PCR 扩增产物为 181 bp。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 胶质瘤 CHG-5 细胞株培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,U251 细胞株,培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,均于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。24 ~ 48 h 传代 1 次。

1.2.2 免疫细胞化学及免疫荧光检测 将细胞生长至 80% 左右,含 1‰ EDTA 的 0.25% 胰酶消化,爬片于无菌盖玻片上,约 48 h 取出爬片,分别按按免疫细胞化学及免疫荧光常规步骤操作,一抗分别以 1∶200,1∶100 稀释,阴性对照以 PBS 代替一抗。

1.2.3 RT-PCR 检测 待细胞爬满培养瓶 90% 时,收集培养细胞,加 Trizol 提取细胞总 RNA,取 0.5 μg 总 RNA 用于 RT-PCR,操作按照试剂盒说明书进行。反应条件为:94 ℃ 预变性 2 min,94 ℃ 30 s,53 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,29 个循环,72 ℃ 延伸 10 min。所得产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.4 划痕实验 U251 细胞浓度以 1×10^5 接种于 6 孔板中培养过夜,待细胞贴壁后,用 100 μl 枪头在培养板底部“一”字划痕,PBS 洗涤,更换新的培养基,分别按 1∶100、1∶200 比例于培养基中加入 CD82/KAI1 抗体,对照组不加抗体,每组分 3 个复孔。培养箱中培养,24 h 和 48 h 后观察细胞迁移结果。

1.3 结果判定

免疫细胞化学、免疫荧光及 PCR 结果由 IPP 6.0 分析软件分析 IOD 值。免疫细胞化学、免疫荧光结果是每张片随机选取 5 个视野分析所得的平均值。PCR 结果为 CD82 目的片段同内参 GAPDH 的光密度比值。划痕实验结果判定:于相差显微镜下观察,随机选择 5 个 100 倍视野内计算迁移至划痕空隙中的细胞总数,每组重复 3 次。

1.4 统计学分析

PCR 及划痕实验结果采用 SPSS 11.0 统计软件进行 χ^2 检验,其余采用 t 检验。

2 结果

2.1 细胞形态及鉴定

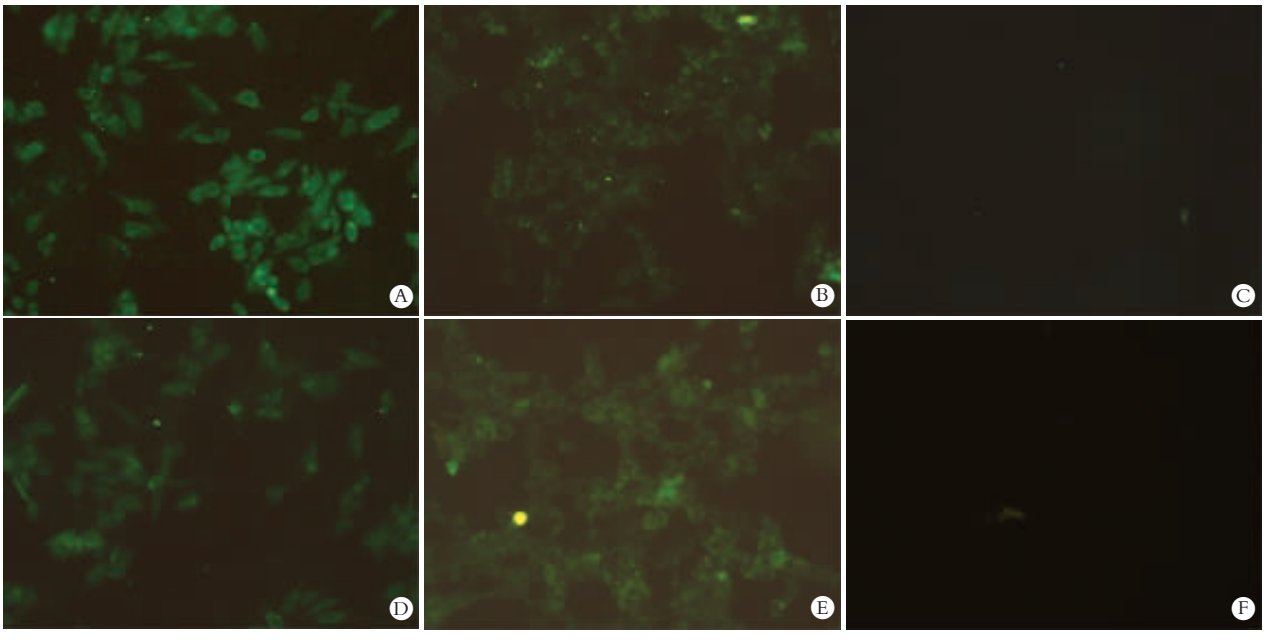
CHG-5 细胞呈多角形或短梭形,有 2 ~ 3 个突起,胞体小而核大居中,免疫荧光检测 GFAP 呈阳性表达,细胞膜与细胞质中均有表达(图 1A);U251 细胞呈梭形及相对较大的多角形,细胞质丰富,GFAP 细胞膜与细胞质均有表达(275.259 ± 96.621)(图 1B),但较 CHG-5(1 233.19 ± 169.562)表达弱($P < 0.01$)。阴性对照组未见绿色荧光(图 1C)。

2.2 免疫荧光结果

Leica 荧光显微成像系统结果显示,在 CHG-5 细胞(图 1D)及 U251 细胞(图 1E)的细胞膜细胞质中均有 CD82/KAI-1 的表达,使用 IPP 分析 IOD 值,可知前者 IOD 值大于后者[(728.638 ± 207.675) *vs* (456.276 ± 146.217),$P < 0.01$]。阴性对照组未见绿色荧光(图 1F)。

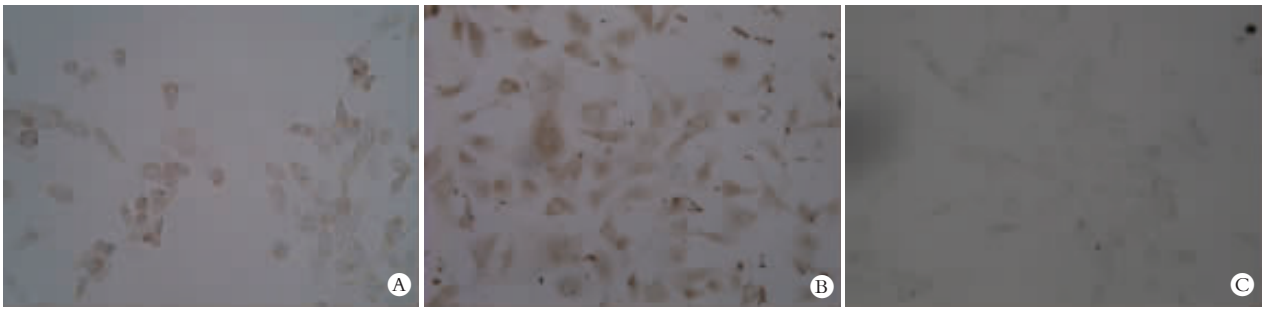
2.3 免疫细胞化学结果

CD82/KAI1 在 U251 细胞胞膜、细胞质中呈阳性表达,棕黄色(图 2B);在 CHG-5 细胞胞膜、细胞质中呈弱阳性表达,淡黄色(图 2A),IPP 分析可知二者 IOD 值差异显著[(14.478 ± 3.906) *vs* (35.372 ± 4.136),$P < 0.01$]。阴性对照组未见阳性反应(图 2C)。



A:GFAP 在 CHG-5 中的表达;B:GFAP 在 U251 中的表达;C、F:阴性对照;D:CD82/KAI1 在 CHG-5 中的表达;E:CD82 在 U251 中的表达

图 1 GFAP 及 CD82 在 CHG-5、U251 细胞中的表达 (免疫荧光 ×200)



A:CD82 在 CHG-5 中的表达;B: CD82/KAI1 在 U251 中的表达;C:阴性对照

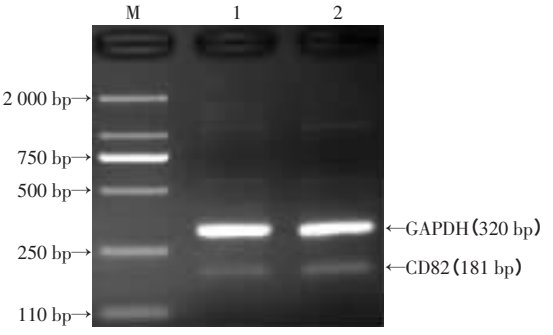
图2 免疫细胞化学检测 CD82 在 CHG-5、U251 细胞中的表达 (S-P ×200)

2.4 RT-PCR 结果

U251 细胞孔与 CHG-5 细胞孔均在 181 bp 可见条带。U251 细胞中 CD82/KAI-1 的 mRNA 水平高于 CHG-5(63 862/112 179 *vs* 49 016/149 585, $P<0.01$,图3)。

2.5 划痕实验结果

倒置相差显微镜显示,以1∶100、1∶200 加入 CD82/KAI1 抗体 24 h 后,抗体干预组随着抗体浓度的提高,迁移细胞数量增加($P<0.05$)。对 U251 细胞划痕后以 CD82/KAI1 抗体 1∶100 浓度比处理的细胞在划痕 48 h 后细胞基本铺满空白区。本实验结果表明,CD82/KAI1 能够抑制 U251 细胞的迁移。见图4,表1。



M:标准;1:CHG-5;2:U251

图3 CHG-5 及 U251 细胞中 CD82/KAI1 mRNA 的表达

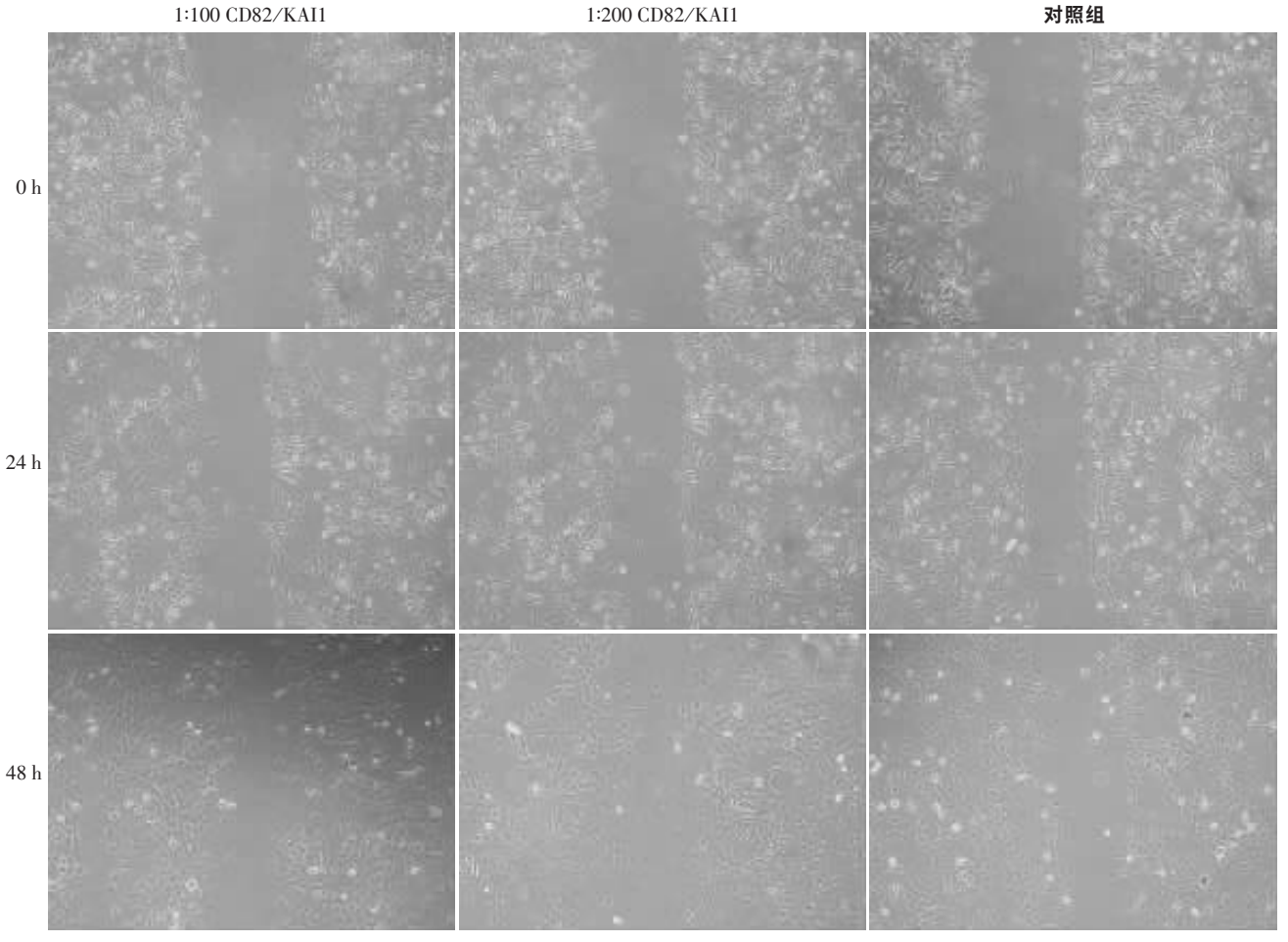


图4 各组细胞划痕修复实验结果 (倒置相差显微镜 ×100)

表 1 不同 CD82/KAI1 抗体浓度在不同时间点对 U251 细胞迁移能力的影响($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	0 h	24 h	48 h
对照组	0.000±0.000	106.333±5.131	189.333±11.503[a]
1:200 CD82/KAI1	0.000±0.000	136.333±9.609	216.000±16.093[a]
1:100 CD82/KAI1	0.000±0.000	177.000±4.582	273.000±15.716

a: $P<0.05$, 与 1:100 CD82/KAI1 组比较

3 讨论

胶质瘤的侵袭进程与其他肿瘤类似:增殖解离;黏附;降解细胞外基质并伴随新生血管事件。目前研究较为清楚的为 Wnt 信号通路,HGF 及其受体 c-Met 参与的 MAPK/ERK 及 AKT 信号转导途径[5]。在这些经典的途径中,整合素家族及基质金属蛋白酶家族众多成员发挥了重要作用。

CD82/KAI1 为抑癌基因,定位于人染色体 11pl1.2,编码含有 267 个氨基酸的蛋白质,于多种恶性肿瘤中表达下调,赋予肿瘤细胞的高迁移、侵袭能力。在各种黏附细胞中,免疫共沉淀中发现,CD82/KAI1 与 α3β1、α6β1、α5β1 共表达。同时在上述这些细胞中重新表达 CD82/KAI1 可以观察到细胞的黏附作用降低,而这种能力可能是通过内吞细胞表面的整合素而实现的[6]。研究[7,8]同时发现,在高侵袭能力的胶质瘤细胞株中,α5β1 是整合素中表达最丰富的蛋白,促进侵袭性的胶质瘤细胞与细胞外基质及其周围其他细胞的相互作用,进入健康的脑组织。在恶性胶质瘤中,MMP-2、MMP-9 高表达,而高表达的 MMP-2 对于赘生细胞的侵袭性特性十分重要;MMP-9 可能主要是调节血管重建[9]。据文献[10]报道,在肺癌细胞中,重新高表达 CD82 可以使得 MMP-9 活性降低。c-Met 为酪氨酸激酶受体,其配体为 HGF,二者在胶质瘤中过表达,对胶质瘤的细胞增殖,迁移,侵袭十分关键。CD82/KAI1 还可以通过抑制 c-Met 和 EGFR 的活化而抑制肿瘤细胞的增殖;通过减弱 c-Met 诱导的 Ras 及 PI3K 依赖的信号途径抑制细胞迁移[11-13]。但其具体机制有待进一步探讨。

CD82/KAI1 为跨膜蛋白,而本实验通过免疫荧光及免疫组化检测发现,CHG-5 及 U251 细胞的细胞膜及细胞质中均有 CD82/KAI1 表达。尉晓蔚等[14]研究中发现 CD82/KAI1 异位表达于小鼠子宫基质细胞细胞核,而这种异位表达的意义还未知。在恶性程度为Ⅳ级的恶性胶质瘤 U251 细胞株中,我们发现了 CD82/KAI1 的 mRNA 及蛋白水平表达都高于恶性程度较低的 CHG-5 细胞株。在划痕实验中,1∶100,1∶200 CD82/KAI1 抗体处理组细胞迁移数量高于空白对照组,说明在恶性胶质瘤 U251 细胞中,CD82/KAI1 的表达对细胞的迁移产生了抑制效应。这种抑制能力可能与降低 c-Met 信号通路有关。下一步可以通过检测不同恶性等级的胶质瘤临床样本中 CD82/KAI1 的表达,以进一步明确其意义。

综上所述,本实验发现肿瘤抑制基因 CD82/KAI1 在恶性胶质瘤细胞株中表达,且恶性程度高者表达较恶性程度低者高。CD82/KAI1 可抑制恶性胶质瘤细胞 U251 的迁移,具体机制有待进一步研究。

志谢 对重庆医科大学附属第一医院眼科学实验室给于本实验技术支持表示感谢

参考文献:

[1] Xie J, Li Y, Huang Y, *et al*. Anesthetic pentobarbital inhibits proliferation and migration of malignant glioma cells[J]. Cancer Lett, 2009, 282(1): 35-42.

[2] Gellersen B, Briese J, Oberndorfer M, *et al*. Expression of the metastasis suppressor KAI1 in decidual cells at the human maternal-fetal interface: Regulation and functional implications[J]. Am J Pathol, 2007, 170(1): 126-139.

[3] Miranti C K. Controlling cell surface dynamics and signaling: how CD82/KAI1 suppresses metastasis[J]. Cell Signal, 2009, 21(2): 196-211.

[4] Takahashi M, Sugiura T, Abe M, *et al*. Regulation of c-Met signaling by the tetraspanin KAI-1/CD82 affects cancer cell migration[J]. Int J Cancer, 2007, 121(9): 1919-1929.

[5] Abounader R, Laterra J. Scatter factor/hepatocyte growth factor in brain tumor growth and angiogenesis[J]. Neuro Oncol, 2005, 7(4): 436-451.

[6] He B, Liu L, Cook G A, *et al*. Tetraspanin CD82 attenuates cellular morphogenesis through down-regulating integrin alpha6-mediated cell adhesion[J]. J Biol Chem, 2005, 280(5): 3346-3354.

[7] Samandari E, Visarius T, Zingg J M, *et al*. The effect of gamma-tocopherol on proliferation, integrin expression, adhesion, and migration of human glioma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(4): 1329-1333.

[8] Farber K, Synowitz M, Zahn G, *et al*. An alpha5beta1 integrin inhibitor attenuates glioma growth[J]. Mol Cell Neurosci, 2008, 39(4): 579-585.

[9] Akella N S, Ding Q, Menegazzo I, *et al*. A novel technique to quantify glioma tumor invasion using serial microscopy sections[J]. J Neurosci Methods, 2006, 153(2): 183-189.

[10] Jee B K, Park K M, Surendran S, *et al*. KAI1/CD82 suppresses tumor invasion by MMP9 inactivation *via* TIMP1 up-regulation in the H1299 human lung carcinoma cell line[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(2): 655-661.

[11] Martens T, Schmidt N O, Eckerich C, *et al*. A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth *in vivo*[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(20 Pt 1): 6144-6152.

[12] Chu S H, Zhang H, Ma Y B, *et al*. c-Met antisense oligodeoxynucleotides as a novel therapeutic agent for glioma: *in vitro* and *in vivo* studies of uptake, effects, and toxicity[J]. J Surg Res, 2007, 141(2): 284-288.

[13] Chu S, Yuan X, Li Z, *et al*. C-Met antisense oligodeoxynucleotide inhibits growth of glioma cells[J]. Surg Neurol, 2006, 65(6): 533-538.

[14] 尉晓蔚, 张倩, 谭冬梅, 等. 重组腺病毒 CD82/KAI1 对小鼠子宫基质细胞内 α5、β3、MMP-9、E-cadherin 和 β-catenin 蛋白表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(7): 572-576.

(**收稿**:2009-11-18;**修回**:2010-02-04)

(编辑 吴培红)