

磺酰化乳糖基神经酰胺表达水平 对肝癌细胞转移潜能的影响*

吴兴中** 李 尉 本 家 查锡良

(复旦大学上海医学院生物化学与分子生物学系, 上海 200032)

摘要 研究磺酰化乳糖基神经酰胺 (SM3) 的表达水平与肝癌细胞转移潜能的关系. 采用免疫荧光染色和细胞酶联免疫两种方法, 观察了不同转移潜能的肝癌细胞中磺酰化乳糖基神经酰胺的表达水平, 发现高转移性肝癌细胞表达 SM3 的水平明显高于低转移性肝癌细胞. 高转移性肝癌细胞经过 10 $\mu\text{mol/L}$ 维甲酸处理, 抑制肝癌细胞的转移潜能以后, SM3 的表达水平显著下降 ($P < 0.05$), 接近低转移性肝癌细胞水平, 但是 SM3 的前体分子半乳糖基神经酰胺水平并不降低, 提示磺酰化作用受到了抑制. 通过脑苷脂磺酰基转移酶 (CST) 基因的转染, 使 Hep3B 肝癌细胞高表达 SM3. 发现 CST 转染的肝癌细胞与转移相关的行为显著改变, 经黏附试验发现, CST 基因转染的肝癌细胞对层粘连蛋白和玻连蛋白 (vitronectin) 的黏附显著增强, 比未转染的或转染载体的肝癌细胞升高 3~4 倍. 裸鼠体内试验表明, 这种具有高度表达 CST 基因的 Hep3B 细胞比对照组细胞具有更高的转移能力 ($P < 0.05$). 说明磺酰化乳糖基神经酰胺可能与肝癌细胞的转移有关.

关键词 磺酰化乳糖基神经酰胺, 脑苷脂磺酰基转移酶, 肝癌转移

学科分类号 Q539

脑苷脂为细胞膜上的一类脂质分子, 其中乳糖基神经酰胺和半乳糖基神经酰胺的半乳糖基 3 位羟基, 可以被磺酰化修饰, 形成磺酰化乳糖基神经酰胺 (SM3), 或磺酰化半乳糖基神经酰胺 (SM4). 这些磺酰化的脑苷脂在细胞膜上的表达量对细胞功能有重要的作用^[1]. 催化这种磺酰基转移的酶主要是脑苷脂磺酰基转移酶 (cerebroside sulfotransferase, CST, EC2.8.2.11), 它能够催化活性硫酸分子上的磺酰基基团到乳糖基神经酰胺的半乳糖基 3 位羟基上. 脑苷脂分子磺酰化以后不仅会改变分子的静电荷, 还会影响底物分子对配体的亲和力或结合能力, 因此这种磺酰化作用在肿瘤细胞中有重要意义. 有研究显示 CST 基因的表达与恶性肿瘤有关, 在肾癌和胃癌组织中有较高的表达^[2,3], 有人通过临床结肠癌病人的淋巴结转移资料分析, 观察到这些病人的淋巴结转移发生率与病人的磺酰化乳糖基神经酰胺水平有密切关系^[4]. 本文观察不同转移潜能的肝癌细胞磺酰化脑苷脂的水平, 和维甲酸抑制肝癌转移潜能以后的磺酰化脑苷脂的水平, 并转染 CST 基因使之高表达, 进而观察对肝癌细胞转移潜能的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 表达质粒 pCXN2 和人 CST cDNA 和磺酰

化乳糖基神经酰胺 (SM3)、磺酰化半乳糖神经酰胺 (SM4) 标准品由大阪大学赠送, 质粒纯化试剂盒为 GIBCO 公司的 high purity plasmid preparation system, LipofectAMINE 为 Life Technologies 产品, G418 为 Sigma 公司产品, RNA 抽提试剂盒 Trizol、I 型胶原蛋白、层粘连蛋白、纤连蛋白和玻连蛋白和 SM3 单克隆抗体购于 Seikagagu 公司, O4 抗体 (抗 SM3 和 SM4)、抗半乳糖基神经酰胺、抗整合蛋白亚基抗体和抗磷酸化酪氨酸抗体购于 Chemicon 和 DAKO 公司, 尼龙膜、RNA 地高辛标记试剂盒和地高辛发光检测试剂盒为 Roche 公司产品, 细胞培养皿和 96 孔板购于 Falcon 公司.

1.1.2 肝癌细胞株 Hep3B 细胞 来源于美国的 ATCC, 人高、低转移性肝癌细胞株 HMCC 97H 和 HMCC 97L 由复旦大学附属中山医院肝癌研究所提供^[5-7].

1.2 方法

1.2.1 荧光显微镜检测: 细胞培养于载玻片小室, 等细胞贴壁后, 用新鲜配制 4% 多聚甲醛室温下固定 20 min, 然后用磷酸缓冲液洗涤 3 次, 加入抗

* 国家自然科学基金资助项目 (30070183) 和上海市教委重点学科基金资助项目 (B9808010).

** 通讯联系人.

Tel: 021-54237697, E-mail: xz_wu@shmu.edu.cn

收稿日期: 2002-11-08, 接受日期: 2002-12-28

O4 抗体 (抗 SM3 和 SM4) 或抗半乳糖基神经酰胺单克隆抗体 4℃ 过夜, 次日加荧光素标记的二抗和 DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, dilactate), 封片晾干后, Olympus 荧光显微镜观察, 所有细胞核均被 DAPI 染色而显色, 计数 200 个细胞中有绿色荧光的细胞数, 以百分比表示。

1.2.2 细胞酶联免疫测定细胞表面半乳糖基神经酰胺及其磺酰化产物: 高、低转移性肝癌细胞 MHCC97H、L 细胞培养于 10% 胎牛血清, 2×10^5 细胞生长于 96 孔培养板, 经过磷酸缓冲液洗涤 3 次, 4% 多聚甲醛室温下固定 20 min, 加入一抗 O4 抗体 (抗 SM3 和 SM4) 以及抗半乳糖基神经酰胺抗体 4℃ 作用 2 h, 洗涤以后加入碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgM, 底物以对硝基磷酸苯 (pNPP) 显色, 450 nm 波长读数。

1.2.3 基因转染: 全长人 CST 基因的表达框架插入哺乳动物细胞表达载体 pCXN2 中, 插入的顺序均经过序列分析, 证实正确以后进行扩增和纯化, 基因转染采用 LipofectAMINE 方法, 步骤按照公司提供的方案进行, 细胞在转染后第 3 天, 在 400 mg/L G418 中进行筛选, 挑选耐药细胞克隆, 克隆后的细胞维持在含有 G418 的培养基中。

1.2.4 RNA 印迹: 从各转染的细胞中抽提总 RNA 样品于 50% 甲酰胺, 6% 甲醛和 20 mmol/L MOPS (pH 7.0), 在 65℃ 变性后, 加样于 1% 琼脂糖电泳, 转于尼龙膜上, 探针采用地高辛标记的 RNA 片段, 即 pSVK-hCST 质粒在 T7 RNA 聚合酶作用下, 体外合成 CST 基因中的 *Xho*I 片段^[4], 同时掺入地高辛标记的核苷酸, 即形成带有地高辛的 RNA 片段作为探针, 与含有样品 RNA 的尼龙膜在 68℃ 进行杂交过夜, 然后用抗地高辛单克隆抗体 Fab2 片段与尼龙膜结合, 地高辛发光检测试剂盒使 X 光片曝光显影。

1.2.5 薄层层析免疫印迹实验: 细胞用 PBS 冲洗两遍以后, 收集细胞, 经超声波粉碎细胞以后, 用氯仿/甲醇/水 (30: 60: 8) 抽提细胞的脂类, 余下的细胞碎片再用氯仿/甲醇 (2: 1) 抽提一次, 二者合并为细胞的总脂质, 后者上样于 DEAE-A25 (醋酸型) 层析柱, 经过氯仿/甲醇/水 (30: 60: 8) 和甲醇洗涤, 然后用 200 mmol/L 醋酸胺洗脱酸性糖脂, 酸性糖脂经收集后用 SepPak C18 小柱脱盐, 用相当于 0.5 mg 蛋白质的脱盐酸性糖脂上样于高效薄层层析 (TLC) 板, 用氯仿/甲醇/0.2% CaCl_2 (60: 35: 7) 展开, 一部分用硫酸-苔黑酚显

色, 一部分用热转膜方法把糖脂转移到 PVDF 膜, 经抗磺酰化乳糖基神经酰胺单克隆抗体结合, 以及过氧化酶标记的羊抗鼠 IgM 与一抗结合, 过氧化酶可使化学发光试剂 ECL 发光, 曝光 X 光片而显示条带。

1.2.6 流式细胞仪检测: 培养的细胞经 PBS 洗涤两次以后, 收集于试管中并与抗磺酰化乳糖基神经酰胺单克隆抗体在 4℃ 作用 2 h, 经洗涤后与荧光素标记的羊抗鼠 IgM 在 4℃ 作用 1 h, 洗涤后使细胞分散成单个细胞状态, Dickson FACScaliber 分析, 每个标本收集 2 万个细胞, 荧光信号用 CellQuest 软件分析处理。

1.2.7 细胞黏附: I 型胶原蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白和玻连蛋白溶于 PBS, 4 μg /孔, 包被 96 孔板, 对照用 1% 的 BSA, 4℃ 过夜, PBS 洗涤两次以后, 加 1% 阻断试剂 (Block reagent) 置于 4℃ 4 h, 洗涤 2 次后, 加无血清培养基 37℃ 0.5 h, 加入悬浮细胞 2×10^4 /孔, 37℃ 孵育 15~60 min, PBS 洗涤, MTT 染色, 560 nm 波长读数。

1.2.8 动物实验: 动物体内肿瘤转移实验根据 Miyoshi 等^[8]的方法。培养的细胞经过 PBS 洗涤两次以后, 再用 Hank's 液洗涤 1 次, 使细胞分散成单个细胞状态, 并悬浮于 Hank's 液中, 配制成 1×10^7 个/ml, 经手术直视下于 Balb/C 裸鼠脾脏内注射 0.1 ml 细胞悬液, 各个实验组裸鼠均为 4 周龄, 雌性, 无菌恒温条件下饲养, 50 天以后解剖, 观察转移灶的形成, 组织送病理切片。

2 结 果

2.1 高低转移性肝癌细胞表面 SM₃ 的表达

MHCC97H 和 MHCC97L 细胞分别为高转移性和低转移性肝细胞性肝癌细胞, 由复旦大学附属中山医院肝癌研究所建立和鉴定^[5~7]。O4 抗体同时识别 SM3 和 SM4, MHCC 肝癌细胞经 O4 抗体结合以后, 再用荧光标记的二抗结合, 结果 MHCC97H 细胞 (高转移性) 的阳性率 (43%) 明显高于 MHCC97L 细胞 (低转移性) (20%) (图 1)。半乳糖基脑苷脂是 SM3 和 SM4 前体分子, MHCC 肝癌细胞经半乳糖基脑苷脂抗体结合以后, 再用荧光标记的二抗结合, 结果也类似, MHCC97H 细胞的荧光阳性率为 (35%), 比 MHCC97L 细胞 (21%) 高。

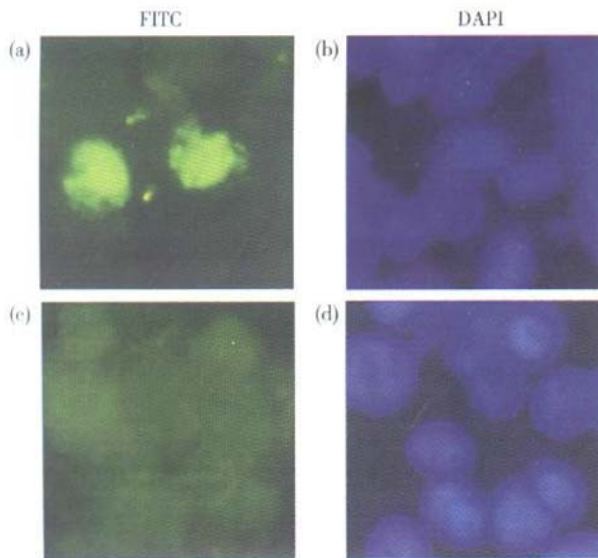


Fig. 1 Fluorescence staining with O4 monoclonal antibody

(a) and (b): MHCC97H cells; (c) and (d): MHCC97L cells.

用细胞酶联免疫法测定细胞表面磺酰化乳糖基神经酰胺表达, 结果也显示, 高转移性肝癌细胞 (MHCC97L 细胞) O4 抗体的结合量显著高于低转移性肝癌细胞 O4 抗体的结合量 ($P < 0.05$). 半乳糖脑苷脂的表达量在高转移性肝癌细胞也较低转移性肝癌细胞高 ($P < 0.05$) (表 1).

Table 1 Observation of sulfatide and galactosylcerebroside on various metastatic potential cells of hepatocellular carcinoma

Antibodies	Treatment	A_{450}	
		MHCC 97H cells	MHCC 97L cells
O4 antibody	control	0.0307 ± 0.0024	$0.0266 \pm 0.0040^{1)}$
	retinoic acid	$0.0261 \pm 0.002^{1)}$	
anti galactosyl cerebroside	control	0.0248 ± 0.0023	$0.0179 \pm 0.0041^{1)}$
	retinoic acid	0.0233 ± 0.0023	

¹⁾ $P < 0.05$. MHCC 97H and 97L cells were the hepatocellular carcinoma cells with high and low metastatic potentials. Data in the table are the optical absorption value at wave length of 450 nm.

2.2 肝癌细胞受抑制后 SM₃ 的表达

我们前期工作观察到维甲酸作用肝癌细胞可以抑制肝癌细胞的转移倾向^[9]. MHCC97H 肝癌细胞经过 $10 \mu\text{mol/L}$ 的维甲酸作用以后, 与作用前相比, O4 抗体的结合量显著下降 ($P < 0.05$) (表 1). 但是磺酰化脑苷脂的前体半乳糖基脑苷脂表达量并没有显著的改变 ($P > 0.05$) (表 1). 可见, 经过维甲酸作用以后, 主要是半乳糖基脑苷脂的磺

酰化作用受到抑制, 造成磺酰化脑苷脂的表达下降.

2.3 脑苷脂磺酰基转移酶基因转染

2.3.1 转染细胞的 mRNA 表达: 半乳糖基脑苷脂的磺酰化主要由脑苷脂磺酰基转移酶 (CST) 所催化. CST 基因通过表达载体 pCXN2 转染肝癌细胞 Hep3B. 经 G418 筛选获得 18 个克隆细胞, 载体 pCXN2 (Mock) 基因转染获得 11 个克隆细胞. 抽提所有转染细胞的总 RNA 样品之后, 每个样品 $10 \mu\text{g}$ RNA 进行琼脂糖电泳, RNA 印迹转移电泳分析 CST 基因转染的细胞, 在相当于 18 S 处可见一条杂交带, 克隆 6, 8 细胞表达较高 (图 2), 而载体转染的细胞 11 个克隆均无明显的条带. 本试验所采用的探针与 CST 基因克隆者所用的探针相同^[4], 因此, 进一步用薄层层析法分析 CST 催化产物的表达.

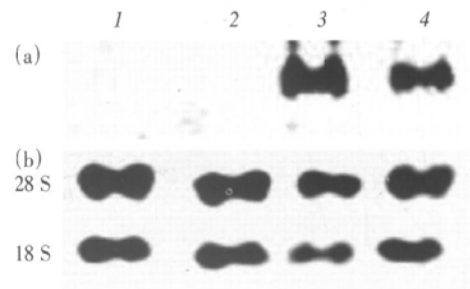


Fig. 2 Northern blot analysis of the cells transfected with CST gene and the vector

1, 2: vector-transfected cells; 3, 4: CST-transfected cells;

(a) CST mRNA; (b) ribosomal RNA.

2.3.2 转染基因产物分析: 用相当于 0.5mg 蛋白质的酸性糖脂样品点样于 TLC 板, 展开后, 一部分经硫酸-苔黑酚染色显带, 在相当于标准 SM3 处 Hep3B-CST 克隆 6, 8 比 Mock 细胞的条带深, 在相当于 SM4 处无明显的条带; 另一部分经樱草黄染色 (图 3a), 印迹转移于 PVDF 膜, O4 单克隆抗体染色显带结果见图 3b, Hep3B CST 克隆 6, 8 在 SM3 处可见条带, Mock 细胞则无. 因此下述实验均采用克隆 6 和 8 细胞.

2.3.3 转染细胞表面的磺酰化乳糖基神经酰胺表达: 采用流式细胞仪检测转染细胞表面的磺酰化脑苷脂的表达, 结果显示, CST 基因转染的克隆 6 和 8 检测峰均比载体转染的两个克隆明显右移, CST 基因转染的细胞荧光检测平均强度为 264.64, 载体转染的细胞平均荧光强度为 78.64, 阴性对照仅为 35.50. 荧光显微镜检测结果也显示, 与对照

组相比, CST 克隆 6 和 8 细胞有较强的荧光, 而 Mock 细胞则无明显的荧光信号 (照片未出示). 抗 SM3 单克隆抗体和 O4 抗体 (识别 SM3 和 SM4) 结果相同, 说明细胞表面以 SM3 (磺酰化乳糖基神经酰胺) 为主.

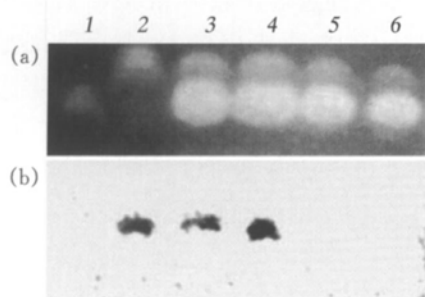


Fig. 3 Identification of SM3 in the cells transfected with CST gene

1, 2: standard SM4 and SM3; 3, 4: CST-transfected clone 6 and 8; 5, 6: vector-transfected clones (mock cells). (a) primulin staining; (b) O4 monoclonal antibody staining.

2.4 细胞黏附试验

CST 基因转染的细胞和 Mock 细胞分别对 I 型胶原蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白以及玻连蛋白进行黏附试验, 结果观察到 CST 基因转染的细胞对胶原蛋白孵育 15 min 至 1 h 后, 其黏附作用与 Mock 细胞的黏附作用相似, 没有明显的改变. 对纤连蛋白的黏附也无明显的改变. 对层粘连蛋白的黏附, CST 基因转染的克隆 (6, 8) 细胞黏附力均有轻度的增强, 但对玻连蛋白的黏附力则表现为明显增强趋势, 孵育 30 min, CST 克隆 6 和 8 即有较明显的增强, 至 45 min, CST 克隆 6, 8 细胞的黏附率分别为 $(13.6 \pm 1.27)\%$ 和 $(9.5 \pm 3.1)\%$, Mock 克隆 6, 8 细胞的黏附率分别为 $(3.9 \pm 1.39)\%$ 和 $(3.6 \pm 1.36)\%$; 孵育至 1 h, CST 克隆 6, 8 细胞为 $(19.2 \pm 1.68)\%$ 和 $(25.9 \pm 0.73)\%$, Mock 6, 8 细胞黏附率为 $(13.5 \pm 1.01)\%$ 和 $(11.8 \pm 2.54)\%$.

2.5 体内转移实验

为进行转移能力的测定试验, 我们对 CST 基因转染的 Hep3B 细胞作动物体内试验, 注射载体转染的细胞到 10 只裸鼠脾脏组织内, 分别注射 CST 克隆 6 和 8 细胞到 6 只和 5 只裸鼠脾脏组织中, 50 天以后观察腹腔内淋巴结和肝脏组织的转移灶. 结果观察到: 在载体组 10 只裸鼠中, 9 只裸鼠脾脏和腹腔淋巴结均无转移灶的形成; 在 5 只 CST8 注射的裸鼠有 2 只有肝脏和腹腔淋巴结的转

移; 6 只 CST6 注射的裸鼠中, 3 只有肝脏转移灶的形成, 其中 2 只裸鼠死亡. 转移灶病理组织检查显示为肝癌细胞.

3 讨论

本文对不同转移潜能肝癌细胞的磺酰化脑苷脂表达水平进行了观察, 发现高转移性肝癌 MHCC97H 细胞表达磺酰化脑苷脂的水平远高于低转移性胃癌细胞, 采用细胞免疫荧光染色和细胞酶联免疫吸附两种检测方法, 其结果相同, 因此认为高水平表达磺酰化脑苷脂可能与肝癌细胞的转移潜能有关系. 在体外采用维甲酸抑制肝癌细胞的转移潜能以后^[9], MHCC97H 细胞的磺酰化脑苷脂的水平显著降低 ($P < 0.05$), 达到低转移性肝癌细胞的水平; 而磺酰化脑苷脂的前体分子半乳糖基神经酰胺并不受抑制, 提示维甲酸主要抑制了磺酰化的作用. CST 是一种脑苷脂磺酰基转移酶, 主要催化活性硫酸分子的磺酰基到脑苷脂的半乳糖 3 位羟基上^[1], 这种催化的产物为磺酰化脑苷脂. 因此我们利用 CST 基因转染, 建立起 CST 高表达的肝癌细胞. 经转染以后, 肝癌细胞的磺酰化脑苷脂主要是 SM3, 因为 TLG-免疫印迹显示条带主要在 SM3 位置, 而且 O4 抗体与抗 SM3 单克隆抗体结合试验结果相同. 磺酰化的乳糖基神经酰胺的分子有了一个硫酸基团, 使分子变成带有负电荷的酸性糖脂, 可以改变分子与其他配体的亲和力. 唾液酸化的酸性糖脂如 GM 和 GD 系列的鞘糖脂在肿瘤的转化过程中有重要的作用, 近来对磺酰化的髓磷脂有少数报道^[10]. 也有报道^[11]表明肝素蛋白聚糖经硫酸乙酰化后可能与肿瘤的转移有一定的关系. 近年来研究表明^[2, 4, 12], 磺酰化脑苷脂 CST 基因的表达与肾、胃等恶性肿瘤有关, 临床资料分析磺酰化糖脂与结肠癌的转移发生率有正比关系^[3], 而且磺酰化脑苷脂可以与一些和肿瘤细胞转移有重要关系的黏附分子相结合, 如选择素^[13, 14]、中肾细胞因子^[15]、血栓素^[14]、amphoterin^[16]和肝细胞生长因子^[17]等. 本文结果显示 CST 基因转染的肝癌细胞在裸鼠体内的转移能力明显增强. 虽然本文报告的裸鼠数量还较少, 但是转移与未转移经卡方检验仍然有显著性意义 ($P < 0.05$). 我们同时进行了 C57BL/6 小鼠的体内转移实验, 结果也类似, CST 基因转染的细胞有明显多的转移灶形成, 可见 CST 基因的高表达可能会促进肝癌细胞的转移. 此外, CST 基因转染后的 Hep3B 细胞对层粘连蛋

白的黏附力和玻连蛋白的黏附力增强, 这和文献报道一致, 磺酰化的乳糖基神经酰胺可以直接与玻连蛋白相结合^[18]. 玻连蛋白是一种多功能的蛋白质, 可以作为整合蛋白的受体, 在肿瘤转移过程中有重要作用, 对肿瘤细胞具有肝趋化性, 还可以诱导肿瘤细胞转移并侵犯肝脏组织^[19]. 对玻连蛋白有结合力的宫颈癌 SiHa 细胞比对玻连蛋白没有结合力的 HeLa 细胞的转移潜能要高得多^[20], 说明玻连蛋白可以介导肿瘤细胞的转移. CST 基因转染后, Hep3B 细胞的乳糖基神经酰胺磺酰化加强, 可能增强了肝癌细胞转移潜能.

参 考 文 献

- 1 Konke K, Tsuda M, Hirabara Y, *et al.* Molecular cloning and expression of cDNA encoding human β phosphoadenylsulfate: galactosylceramide β -sulfotransferase. *J Biol Chem*, 1997, **272** (8): 4864~4868
- 2 Kobayashi T, Honke K, Tsunematsu I, *et al.* Detection of cerebroside sulfotransferase mRNA in human gastric mucosa and adenocarcinoma. *Cancer Lett*, 1999, **138** (1~2): 45~51
- 3 Morichika H, Hamanaka Y, Tai T, *et al.* Sulfatides as a predictive factor of lymph node metastasis in patients with colorectal adenocarcinoma. *Cancer*, 1996, **78** (1): 43~47
- 4 Honke K, Tsuda M, Hirahara Y, *et al.* Cancer associated expression of glycolipid sulfotransferase gene in human renal cell carcinoma cells. *Cancer Res*, 1998, **58** (17): 3800~3805
- 5 Sun F X, Tang Z Y, Liu K D, *et al.* Establishment of a metastatic model of human hepatocellular carcinoma in nude mice via ortho topic implantation of histologically intact tissues. *Int J Cancer*, 1996, **66** (2): 239~243
- 6 Tian J, Tang Z Y, Ye S L, *et al.* New human hepatocellular carcinoma (HCC) cell line with highly metastatic potential (MHCC97) and its expressions of the factors associated with metastasis. *Br J Cancer*, 1999, **81** (5): 814~821
- 7 Li Y, Tang Z Y, Ye S L, *et al.* Establishment of cell clones with different metastatic potential from the metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97. *World J Gastroenterol*, 2001, **7** (5): 630~636
- 8 Miyoshi E, Noda K, Ko J H, *et al.* Overexpression of alpha-6 fucosyltransferase in hepatoma cells suppresses intrahepatic metastasis after splenic injection in athymic mice. *Cancer Res*, 1999, **59** (9): 2237~2243
- 9 Wu X Z, Lu H, Zhong L, *et al.* Changes of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in hepatocarcinogenesis and in the proliferation and differentiation of rat liver cancer cells. *Cell Biol Int*, 1997, **21** (6): 375~380
- 10 Nygren C, von Holst H, Ericson K, *et al.* Patients with primary brain tumours have elevated serum titres of antibodies to the myelin glycolipid sulphatide. *Eur Neurol*, 2001, **45** (1): 38~42
- 11 Sanderson R D. Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis. *Semin. Cell Dev Biol*, 2001, **12** (2): 89~98
- 12 Tsuda M, Egashira M, Niikawa N, *et al.* Cancer associated alternative usage of multiple promoters of human GalCer sulfotransferase gene. *Eur J Biochem*, 2000, **267** (9): 2672~2679
- 13 Ding Z, Kawashima H, Miyasaka M. Sulfatide binding and activation of leukocytes through an L-selectin independent pathway. *J Leuk Biol*, 2000, **68** (1): 65~72
- 14 Merten M, Thiagarajan P. Role for sulfatides in platelet aggregation. *Circulation*, 2001, **104** (24): 2955~2960
- 15 Kurosawa N, Kadomatsu K, Ikematsu S, *et al.* Midkine binds specifically to sulfatide the role of sulfatide in cell attachment to midkine coated surfaces. *Eur J Biochem*, 2000, **267** (2): 344~351
- 16 Chou D K, Evans J E, Jungalwala F B. Identity of nuclear high-mobility-group protein, HMG-1, and sulfoglucuronyl carbohydrate-binding protein, SBP-1, in brain. *J Neurochem*, 2001, **77** (1): 120~131
- 17 Kobayashi T, Honke K, Miyazaki T, *et al.* Hepatocyte growth factor specifically binds to sulfoglycolipids. *J Biol Chem*, 1994, **269** (13): 9817~9821
- 18 Yoneda A, Ogawa H, Kojima K, *et al.* Characterization of the ligand binding activities of vitronectin: interaction of vitronectin with lipids and identification of the binding domains for various ligands using recombinant domains. *Biochemistry*, 1998, **37** (18): 6351~6360
- 19 Kamiyama F, Maeda T, Yamane T, *et al.* Inhibition of vitronectin-mediated haptotaxis and haptoinvasion of MG-63 cells by domain 5 (D5 (H)) of human high-molecular-weight kininogen and identification of a minimal amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **288** (4): 975~980
- 20 Chatterjee N, Chatterjee A. Role of alphaVbeta3 integrin receptor in the invasive potential of human cervical cancer (SiHa) cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2001, **20** (3): 211~221

Correlation Between The Expression Level of Sulfated Lactosyl Ceramide and Metastasis Potential of Hepatocellular Carcinoma*

WU Xing-Zhong**, LI Wei, BEN Jia, ZHA Xi-Liang

(Department of Biochemistry, Shanghai Medical School, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract The relationship between sulfated lactosyl ceramide expressional level and hepatocellular carcinoma metastasis potential was investigated. By means of immunofluorescent staining and cell ELISA with monoclonal antibodies against sulfated lactosyl ceramide or galactocerebroside, it was observed that the expression of sulfated lactosyl ceramide in high metastasis hepatocarcinoma cells was significantly higher than those in low metastasis hepatocarcinoma cells. After the hepatocarcinoma cells with high metastatic potential were treated with

10 $\mu\text{mol/L}$ retinoic acid, the level of sulfated lactosyl ceramide on the cell surface was significantly reduced ($P < 0.05$) to the level closing to the low metastatic hepatocarcinoma cells. The level of galactocerebroside which was the precursor of sulfated lactosyl ceramide did not change significantly. This indicated that the sulfation was inhibited after retinoic acid treatment. Therefore the cerebroside sulfotransferase gene were transferred into hepatocarcinoma cells and selected sulfated lactosyl ceramide highly-expressed clones. Through adhesive assay, it was observed that the control cells were quite poor in adhesive to vitronectin and laminin, the transfected cells were significantly enhanced in the adhesion to vitronectin and laminin. After 45 minute incubation, the adhesive percentage of the cells was 3~4 time higher in CST-transfected cells than those in control cells. By animal experiments there were more metastatic foci in the liver or lymph nodes in CST-transfected groups than the control ($P < 0.05$). The results suggested that the high expression of SM3 in hepatocarcinoma cells promoted metastasis in nude mice and enhanced the adhesion to vitronectin.

Key words sulfated lactosyl ceramide, cerebroside sulfotransferase, hepatocarcinoma metastasis

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30070183) and Key Subject Foundation of Shanghai Municipal Education Committee (B9808010).

** Corresponding author. Tel: 86-21-54278329, E-mail: xz_wu@shmu.edu.cn

Received: November 8, 2002 Accepted: December 28, 2002

知识与动态

锁核酸的特点及其应用

李生茂^{1,2)} 徐 祥¹⁾ 梁华平¹⁾ 李 磊¹⁾

(¹⁾第三军医大学大坪医院野战外科研究所一室, 重庆 400042; ²⁾武警青海总队医院外科, 西宁 810000)

近期, 锁核酸 (locked nucleic acid, LNA) 作为一种新颖的核苷酸衍生物在药学研究领域引起了人们的广泛关注, 有希望成为分子水平治疗各种疾病的新突破口. 它是一种特殊的双环状核苷酸衍生物, 结构中含有一个或多个 2'-O, 4'-C-亚甲基- β -D-呋喃核糖核酸单体, 核糖的 2'-O 位和 4'-C 位通过不同的缩水作用形成氧亚甲基桥、硫亚甲基桥或胺亚甲基桥, 并连接成环形, 这个环形桥锁定了呋喃糖 C3'-内型的 N 构型, 降低了核糖结构的柔韧性, 增加了磷酸盐骨架局部结构的稳定性. 由于 LNA 与 DNA/RNA 在结构上具有相同的磷酸盐骨架, 故其对 DNA、RNA 有很好的识别能力和强大的亲和力. 与其他寡核苷酸类似物相比, LNA 有很多优点: a. 和 DNA、RNA 互补的双链有很高的热稳定性 ($\Delta T_m = 3 \sim 8^\circ\text{C}$); b. 抗 3' 脱氧核苷酸酶降解的稳定性; c. LNA-DNA 杂交物能激活 RNase H; d. 水溶性好, 自由穿入细胞膜, 易被机体吸收; e. 体内无毒性作用; f. 高效的自动寡聚化作用, 合成方法相对简单, 部分或完全修饰的 LNA 寡核苷酸链可用氨基磷酸法在 DNA 自动合成仪上合成.

正因为 LNA 具有以上无可比拟的优点, 人们对它产生了浓厚的兴趣, 并将其运用于基因研究的各个领域以及疾病的诊断和治疗的研究中. LNA 与 DNA 结合后, 可对靶 mRNA 序列进行专一性的降解, 或通过“基因封条作用”抑制基因的表达. 利用 LNA 对互补 RNA 或 DNA 序列有高

度的亲和力这一特性, 可以用合成的寡核苷酸去识别细胞内的核苷酸靶体, 从而提高人们对细胞进程的控制能力, 还可用来抑制或阻断肿瘤基因的表达, 使肿瘤细胞发生凋亡. 也可将 LNA 引入到圈套寡核苷酸的设计中. 在 κB 序列的外端加上 LNA 碱基, 产生 LNA-DNA-LNA 复合聚合体, 能够有效地保护 κB 不被核酶降解, 且不干扰 κB 序列与转录因子的结合. 利用纯 LNA 寡聚体对杂交的高亲和力, 可以提高 DNA 微阵列技术和 DNA 诊断技术. 如 LNA 寡核苷酸捕获探针可运用于基因错配鉴定中, 也可用来同时进行大批病人的基因分型, 配合 PCR 技术, LNA 可检测 DNA 序列中的点突变. 可见 LNA 作为反义药物具有美好的发展前景, 它似乎能替代目前各类 DNA/RNA 类似物在疾病研究、诊断和治疗中的应用. 人们可以利用 LNA 的特点, 来开发一个具有更高性能的生物技术平台. 例如, 适当设计 LNA 寡聚体, 充当“生物导弹”, 通过“链侵入”的方式, 直接或序列选择性地结合于双链 DNA, 这样能大大简化目前的 DNA 诊断模式. 更重要的是开发 LNA 药物, 不仅是针对靶 mRNA (反义治疗), 而且针对基因本身 (反基因治疗). 我们相信, 随着对 LNA 的各项研究的深入, 它的更多的优点将被展现出来, 成为核酸识别、基因化学研究及诊断和治疗肿瘤、炎症、病毒感染、心血管疾病等不治之症的有效工具.