

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.01.006

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.01.006>

过表达细胞黏附分子1抑制卵巢癌细胞迁移及侵袭

王晓凤, 柳艳飞, 田勇, 何为, 金红艳

(武汉科技大学附属武汉市普仁医院肿瘤科, 武汉 430000)

[摘要] 目的: 研究过表达细胞黏附分子1(cell adhesion molecule 1, CADM1)对卵巢癌增殖、迁移和侵袭的影响。方法: qRT-PCR测定CADM1 mRNA在卵巢癌细胞系SKOV3及人正常卵巢上皮细胞hose中的表达, 将SKOV3细胞分成两组, 即CADM1过表达组和对照组, 转染48 h后Western印迹测定两组CADM1蛋白表达量, 采用lipofectamine 2000分别转染pcDNA3.1-CADM1及pcDNA3.1质粒, 采用CCK-8、克隆形成、细胞划痕及Transwell实验分别检测两组细胞增殖、克隆形成、细胞迁移及侵袭能力。结果: CADM1 mRNA在SKOV3中表达水平显著低于hose细胞系(1.54 ± 0.34 vs. 5.63 ± 0.96 , $P < 0.05$); 转染48 h后, CADM1过表达组和对照组CADM1蛋白表达量分别为 2.53 ± 0.42 , 0.37 ± 0.09 , 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。CADM1过表达组和对照组在0, 24, 48, 72 h 450 nm处的OD值差异无统计学意义($P > 0.05$); CADM1过表达组与对照组克隆形成数相比(60.4 ± 7.6 vs. 58.3 ± 8.2), 差异无统计学意义($P > 0.05$); CADM1过表达组细胞迁移率显著低于对照组($20.3\% \pm 3.5\%$ vs. $60.1\% \pm 4.2\%$, $P < 0.05$); CADM1过表达组侵袭细胞数显著少于对照组(24.5 ± 5.3 vs. 65.1 ± 6.9 , $P < 0.05$)。结论: CADM1在卵巢癌细胞系中低表达, 过表达CADM1对卵巢癌细胞增殖和克隆形成无影响, 但可抑制迁移和侵袭, 起抑癌基因的作用。

[关键词] 细胞黏附分子1; 卵巢癌; 迁移; 侵袭

Overexpression of cell adhesion molecule I inhibits the migration and invasion of ovarian carcinoma

WANG Xiaofeng, LIU Yanfei, TIAN Yong, HE Wei, JIN Hongyan

(Department of Oncology, Wuhan Puren Hospital Affiliated Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of over expression of cell adhesion molecule 1 (CADM1) on cell proliferation, migration and invasion of ovarian carcinoma. **Methods:** The expression level of CADM1 mRNA of SKOV3 and hose was measured by qRT-PCR. The SKOV3 cell line was divided into two groups, CADM1 over-expression group was transfected with pcDNA3.1-CADM1 plasmid, and control group with pcDNA3.1 plasmid by lipofectamine 2000. The expression level of CADM1 of those two groups was measured by Western Blot. The proliferation, clone formation, migration and invasive ability was measured and compared between those two groups by CCK-8, clone formation, cell scratch-wound and Transwell assay respectively. **Results:** The expression

收稿日期 (Date of reception): 2016-08-24

通信作者 (Corresponding author): 金红艳, Email: zzh2016778@sina.com

level of CADM1 mRNA was 1.54 ± 0.34 in SKOV3 cell line and 5.63 ± 0.96 in hose normal cell line, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The protein expression level in CADM1 over-expression group and control group was 2.53 ± 0.42 and 0.37 ± 0.09 respectively after transfected for 48 h, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). There was no significant difference between those two groups in terms of OD value of 450 nm in 0, 24, 48 and 72 h ($P > 0.05$). The number of clone cells was 60.4 ± 7.6 in CADM1 over-expression group, which was higher than that (58.3 ± 8.2) in control group, the difference has no statistical significance ($P > 0.05$). The cell migration rate of CADM1 over-expression group was significantly lower than control group ($20.3\% \pm 3.5\%$ vs. $60.1\% \pm 4.2\%$, $P < 0.05$). The invasive cell number of CADM1 over-expression group was significantly lower than control group (24.5 ± 5.3 vs. 65.1 ± 6.9 , $P < 0.05$). **Conclusion:** CADM1 showed low expression in ovarian carcinoma cell line. Over-expression of CADM1 had no influence on proliferation and clone formation in ovarian carcinoma cell line, while it inhibits the migration and invasive ability which demonstrates that CADM1 was a tumor suppressor.

Keywords cell adhesion molecule 1 (CADM1); ovarian carcinoma; migration; invasion

卵巢癌是世界范围内女性常见的恶性肿瘤之一, 排第7位, 每年新发239 000例卵巢癌患者, 约159 000女性死于卵巢癌^[1]。由于卵巢癌早期并没有明显症状, 往往在确诊时已是肿瘤晚期^[2]。虽然手术仍是治疗卵巢癌的最好方法之一, 但术后转移仍是影响卵巢癌预后的重要因素。目前卵巢癌的迁移及侵袭机制尚未完全揭示, 深入研究卵巢癌迁移及侵袭机制对深入探讨卵巢癌的发病发展机制具有重要的意义。细胞黏附分子1 (cell adhesion molecule 1, CADM1) 位于11q23.2染色体上, 其编码一个免疫球蛋白超家族黏附分子^[3], 为抑癌基因, 在肝癌^[4]、乳腺癌^[5]、胃癌^[6]等多种肿瘤中下调表达, 并参与侵袭、转移等多个肿瘤生物学过程。然而CADM1对卵巢癌增殖、迁移和侵袭的作用尚未见报道。本研究于2014年10月至2016年1月期间, 研究CADM1对卵巢癌增殖、迁移和侵袭的影响。

1 对象与方法

1.1 对象

卵巢癌细胞系SKOV3及人正常卵巢上皮细胞系hose购自武汉大学医学院实验中心; TRIzol RNA提取试剂、cDNA反转录试剂盒、qRT-PCR试剂盒均购自TaKaRa公司; CADM1和GAPDH qRT-PCR检测引物由广州锐博生物科技有限公司合成; CADM1、GAPDH一抗购自美国BD公司, 二抗购自武汉博士德生物科技有限公司; 蛋白提取试剂RIPA裂解液购于上海碧云天生物技术有限公司;

Transwell小室购自美国Millipore公司。CCK-8细胞增殖检测试剂盒购自于上海碧云天生物技术有限公司, 真核表达质粒pcDNA3.1, CADM1过表达质粒(pcDNA3.1-CADM1)构建以及测序验证均由上海生工技术服务有限公司完成。

1.2 细胞培养、转染及分组

卵巢癌SKOV3细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养, 并置于37 °C、5% CO₂培养箱。待细胞生长至70%~80%汇合度时, 用0.25%的胰蛋白酶进行传代培养, SKOV3细胞分成两组, CADM1过表达组和对照组, 采用lipofectamine 2000分别转染pcDNA3.1-CADM1及pcDNA3.1质粒, 具体步骤和方法按试剂说明书进行, 培养24 h后行后续实验。

1.3 qRT-PCR法

采用TRIzol试剂按说明书提取卵巢癌细胞系SKOV3中总RNA, 取1 μg总RNA反转成cDNA, 按qRT-PCR说明书要求配制反应体系进行PCR扩增反应。以GAPDH基因为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算CADM1基因在SKOV3及Atcc细胞系中的相对表达量。CADM1上游引物: 5'-GAATCCCAACAGGCAGACC-3', 下游引物: 5'-TTTGCCAGCTCTATACCGATC-3'; GAPDH上游引物: 5'-TCATACTCCTGCTTGCTGAT-3', 下游引物: 5'-GGGACCTGACTGACTACCTC-3'。

1.4 Western 印迹实验

采用Western印迹法, 转染后培养48 h后, 收集

两组细胞, 加入裂解液提取细胞总蛋白, 30 μg 总蛋白上样, 浓缩胶80 V电泳40 min, 分离胶100 V电泳2 h。湿法转膜, 5%脱脂奶粉封闭2 h; 分别加入CADM1一抗(1:200)和GAPDH(1:200)过夜。加入二抗山羊抗鼠1:1000孵育2 h。ECL化学发光, 凝胶成像系统显影。用Quantity One 1-D分析软件(美国Bio-Rad公司)对蛋白质印迹条带进行定量。以目的蛋白测定值与GAPDH的比值作为目标蛋白的相对表达量。

1.5 CCK-8 增殖实验

分别将CADM1过表达组和对照组消化成单细胞悬液, 按 2×10^3 个/孔接种到96孔板, 每孔培养基体积200 μL 。在分别培养0, 24, 48, 72 h后, 每孔加入20 μL CCK-8溶液, 继续培养1 h后, 用酶标仪在450 nm波长下测定各孔吸光度值, 以时间为横坐标, 吸光度值为纵坐标绘制卵巢癌细胞增殖曲线。

1.6 克隆形成实验

将CADM1过表达组和对照组消化成单细胞悬液, 并按300个/孔接种至6孔板, 常规培养10~14 d, 当出现肉眼可见的细胞集落时终止培养, 用PBS清洗3遍后, 甲醇固定15 min, PBS清洗3遍后, 加入0.1%结晶紫溶液室温染色30 min, 蒸馏水缓慢冲洗后晾干, 观察细胞克隆大小并计数克隆数目。

1.7 细胞划痕实验

将CADM1过表达组和对照组细胞消化成单细胞悬液并接种于6孔板, 待细胞融合后, 用灭菌枪头沿直线用力划直线。划痕后即刻和48 h在显微镜下观察细胞划痕修复情况, 计算细胞迁移率, 实验重复3次, 取平均值, 迁移率越高, 表示迁移能力越强。

1.8 细胞侵袭实验

采用Transwell细胞侵袭实验。两组各取 2×10^4 个细胞, 种在Transwell小室的碳酸磷脂表面, 上室BioCoatTM包被Matrigel基质胶(BD Biosciences, 美国), 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h。取出上层小室, 将膜下面的细胞与1%多聚甲醛混合, 用0.2%结晶紫溶液染色15 min。用显微镜计数进入膜下的细胞量, 随机取10个视野($\times 200$), 计算平均值。实验重复3次, 取

平均值。

1.9 统计学处理

实验数据采用SPSS19.0软件进行统计分析。计量资料实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CADM1 在卵巢癌及人正常卵巢上皮细胞系中的表达

qRT-PCR检测卵巢癌细胞系SKOV3及人正常卵巢上皮细胞系hose中的表达, 结果示: CADM1 mRNA在SKOV3中表达水平显著低于Atcc(1.54 ± 0.34 vs. 5.63 ± 0.96 , $P < 0.05$)。

2.2 CADM1 过表达组和对照组 CADM1 蛋白表达量的比较

转染48 h后, 蛋白印迹实验示: CADM1过表达组和对照组CADM1蛋白表达量分别为 2.53 ± 0.42 , 0.37 ± 0.09 , 两组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 过表达 CADM1 对卵巢系增殖和克隆形成的影响

CCK-8实验: CADM1过表达组和对照组在0, 24, 48, 72 h 450 nm处的OD值差异无统计学意义($P > 0.05$, 图1A); 克隆形成实验: 在 $\times 200$ 视野下, CADM1过表达组克隆形成数为(60.4 ± 7.6)个, 对照组克隆形成数为(58.3 ± 8.2)个, 两组相比, 差异无统计学意义($P > 0.05$, 图1B)。

2.4 过表达 CADM1 对卵巢癌迁移、侵袭能力的影响

细胞划痕实验: 48 h后, CADM1过表达组迁移率为 $20.3\% \pm 3.5\%$, 对照组迁移率为 $60.1\% \pm 4.2\%$, 两组比较, CADM1过表达组迁移率显著低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图2A); Transwell侵袭实验: CADM1过表达组侵袭细胞数为(24.5 ± 5.3)个(200倍视野), 对照组侵袭细胞数为(65.1 ± 6.9)个(200倍视野), CADM1过表达组侵袭细胞数显著少于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图2B)。

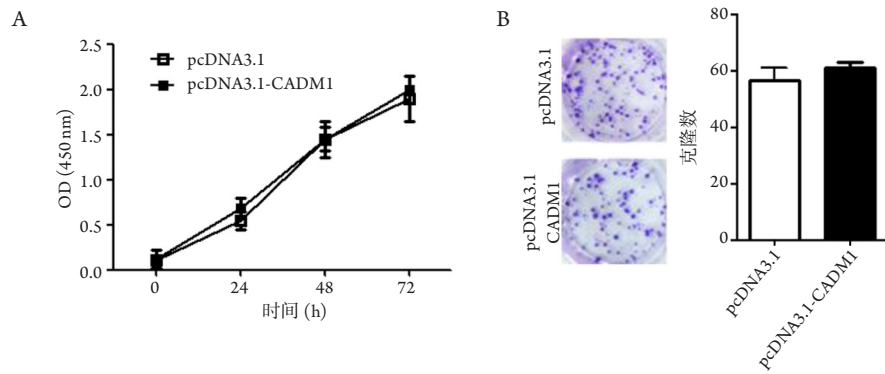


图1 过表达CADM1对卵巢癌细胞SKOV3增殖和克隆形成的影响

Figure 1 Effect of overexpression of cell adhesion molecule 1 on proliferation and clone formation ability of breast cancer SKOV3 cell line

(A) CCK-8法检测两组细胞对卵巢癌增殖的影响; (B) 平板克隆形成实验检测两组克隆形成能力($\times 200$)。

(A) Proliferation ability was measured and compared by CCK-8 assay between two groups; (B) clone formation ability was measured and compared by clone formation assay between two groups ($\times 200$).

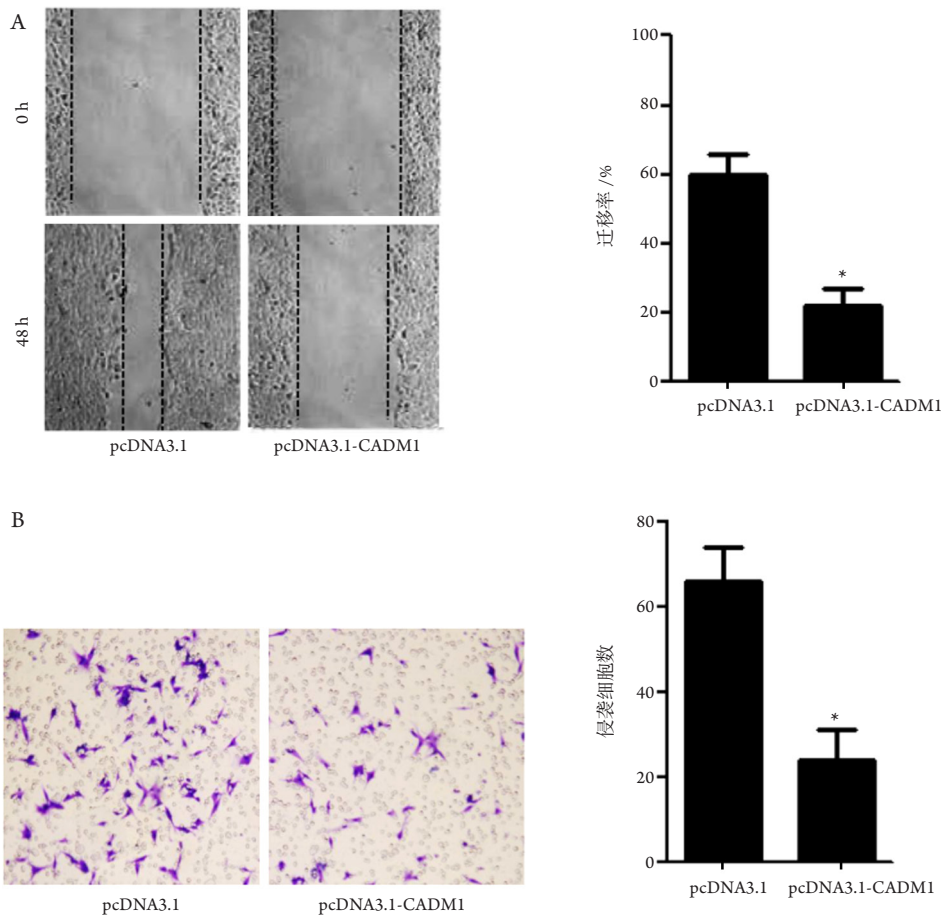


图2 两组细胞迁移侵袭能力测定

Figure 2 Migration and invasion ability was measured

(A) 细胞划痕实验检测两组细胞迁移能力($\times 200$); (B) Transwell实验检测两组细胞侵袭能力($\times 200$)。* $P < 0.05$ 。

(A) Migration ability was measured and compared by cell wound assay between two groups ($\times 200$); (B) invasion ability was measured and compared by Transwell assay between two groups ($\times 200$). * $P < 0.05$.

3 讨论

卵巢癌是妇产科常见的恶性肿瘤, 恶性程度高, 5年生存率为25%~30%^[1]。复发与转移仍是影响卵巢癌预后的重要因素之一。现代肿瘤学认为, 肿瘤的复发转移是一系列的分子或信号通路突变的结果。CADM1基因定位于11q23.2染色体, 属于免疫球蛋白超家族, 其胞外链有3个免疫球蛋白样的模体, 可介导同质性或异质性细胞黏附^[7], 并参与肿瘤侵袭及转移等过程。Nowacki等^[8]分析251例神经母细胞瘤组织芯片, 发现CADM1较正常组织低表达, 且低表达与不良预后相关, 在神经母细胞瘤中过表达CADM1抑制增殖及克隆形成, 导致细胞活动能力下降, 表明CADM1是个抑癌基因。Zhang等^[4]报道在34/82(41.5%)肝癌组织及肝癌细胞系中存在CADM1启动子区域甲基化, 并且用去甲基化药物处理肝癌细胞系后, 可恢复CADM1表达, 有甲基化的肝癌组织复发率显著高于无甲基化的肝癌组织(70.6% vs. 33.3%)。Li等^[9]报道miR-10b可靶向结合CADM1, 过表达miR-10b抑制CADM1表达, 可增强肝癌细胞的活动性并促进侵袭。Sun等^[10]报道miR-1246可通过抑制CADM1表达促进肝癌细胞迁移和侵袭。在乳腺癌中^[5], CADM1被报道在肿瘤组织中低表达, 且与乳腺癌分期及淋巴结转移相关, 在46%的乳腺癌组织中发现存在CADM1启动子区域甲基化, 并且CADM1低表达可促进脑转移。在胃癌中, Yang等^[6]通过双荧光素酶实验发现miR-126可靶向与CADM1结合, 并且miR-126的高表达与CADM1的低表达都为I期胃癌的危险因素, miR-126通过下调CADM1, 促进胃癌细胞的迁移和侵袭。在正常的内皮祖细胞中, 通过TNF- α , NF- κ B信号通路上调CADM1的表达能够促进内皮祖细胞的迁移^[11]。CADM1能够抑制食管癌细胞Eca109从G1期向S期转化诱导凋亡发生, 抑制肿瘤细胞增殖从而抑制肿瘤在小鼠体内生长^[12]。在Faraji等^[13]的研究中发现, CADM1影响肿瘤的转移并不是通过影响肿瘤细胞的增殖或侵袭等特性, 而是一种依赖宿主的适应性免疫方式, CADM1发挥肿瘤转移抑制功能是通过促使肿瘤细胞对于免疫监控机制更敏感来实现。但CADM1在卵巢癌中的具体功能及其作用机制尚不清楚。

本研究通过检测卵巢癌细胞系SKOV3及人正常卵巢上皮细胞系hose中的表达, 发现CADM1 mRNA在卵巢癌细胞系中显著低表达与正常卵巢上皮细胞系, 进一步通过转染CADM1过表

达质粒, 上调CADM1的表达, 行细胞增殖和克隆形成实验发现, 两组的OD值及克隆形成数无显著性差异, 提示CADM1过表达对卵巢癌增殖无影响。两组行细胞划痕及Transwell侵袭实验显示: 过表达组迁移率显著低于对照组, CADM1过表达组侵袭细胞数显著少于对照组, 提示CADM1过表达显著抑制卵巢癌迁移和侵袭, 表明CADM1是卵巢癌的一个抑癌基因, 这与CADM1在神经母细胞瘤、肝细胞癌、乳腺癌、胃癌、食管癌所起的作用类似。其具体的作用机制仍需要进一步研究。目前普遍认为上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是导致肿瘤转移的重要原因^[14]。CADM1作为细胞的黏附分子, 我们推测其表达缺失或降低可能会影响肿瘤细胞的EMT转化, 但CADM1影响卵巢癌细胞的迁移侵袭能力是否是通过调控EMT转化仍有待进一步研究。综上所述, 本研究首次在卵巢癌中发现CADM1低表达, 并且CADM1过表达并不影响增殖和克隆形成, 可抑制迁移和侵袭, 其在卵巢癌中起抑癌的作用。

参考文献

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): e359-e386.
2. Timms JF, Menon U, Devetyarov D, et al. Early detection of ovarian cancer in samples pre-diagnosis using CA125 and MALDI-MS peaks[J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2011, 8(6): 289-305.
3. Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, et al. SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly[J]. *Science*, 2002, 297(5586): 1525-1531.
4. Zhang W, Zhou L, Ding SM, et al. Aberrant methylation of the CADM1 promoter is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma treated with liver transplantation[J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(4): 1053-1062.
5. Takahashi Y, Iwai M, Kawai T, et al. Aberrant expression of tumor suppressors CADM1 and 4.1 B in invasive lesions of primary breast cancer[J]. *Breast Cancer*, 2012, 19(3): 242-252.
6. Yang Z, Wang R, Zhang T, et al. MicroRNA-126 regulates migration and invasion of gastric cancer by targeting CADM1[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(8): 8869-8880.
7. Wakayama T, Ohashi K, Mizuno K, et al. Cloning and characterization of a novel mouse immunoglobulin superfamily gene expressed in early spermatogenic cells[J]. *Mol Reprod Dev*, 2001, 60(2): 158-164.
8. Nowacki S, Skowron M, Oberthuer A, et al. Expression of the tumour

- suppressor gene CADM1 is associated with favourable outcome and inhibits cell survival in neuroblastoma[J]. *Oncogene*, 2008, 27(23): 3329-3338.
9. Li Q, Zhou L, Yang F, et al. MicroRNA-10b promotes migration and invasion through CADM1 in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Tumor Biol*, 2012, 33(5): 1455-1465.
 10. Sun Z, Meng C, Wang S, et al. MicroRNA-1246 enhances migration and invasion through CADM1 in hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 616.
 11. Prisco AR, Hoffmann BR, Kaczorowski CC, et al. Tumor necrosis factor α regulates endothelial progenitor cell migration via CADM1 and NF- κ B[J]. *Stem Cells*, 2016, 34(7): 1922-1933.
 12. Liang QL, Chen GQ, Liu QL, et al. Tumor suppressor TSLC1 inhibits growth, proliferation, invasiveness and angiogenesis in nude mice xenografted tumor of Eca109 cells[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(6): 1507-1515.
 13. Faraji F, Pang Y, Walker RC, et al. Cadm1 is a metastasis susceptibility gene that suppresses metastasis by modifying tumor interaction with the cell-mediated immunity[J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(9): e1002926.
 14. De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(2): 97-110.

本文引用: 王晓凤, 柳艳飞, 田勇, 何为, 金红艳. 过表达细胞黏附分子1抑制卵巢癌细胞迁移及侵袭[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(1): 29-34. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.01.006

Cite this article as: WANG Xiaofeng, LIU Yanfei, TIAN Yong, HE Wei, JIN Hongyan. Overexpression of cell adhesion molecule 1 inhibits the migration and invasion of ovarian carcinoma[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(1): 29-34. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.01.006