

叶酸受体 - α 、Legumain 在视网膜母细胞瘤细胞系的表达实验研究

黄 平 翁郁华 孟永春 南开辉 吕 帆

摘 要 **目的** 研究视网膜母细胞瘤中叶酸受体 - α (FR - α) 和天冬氨酸内肽酶 (Legumain) 的表达, 以视网膜母细胞瘤细胞系 Y - 79 为研究对象, 通过与正常视网膜色素上皮细胞 ARPE - 19 对比, 揭示瘤细胞中两种细胞因子的表达水平。**方法** 应用实时荧光定量 PCR (Q - PCR) 法检测 Y - 79、ARPE - 19 细胞叶酸受体和 Legumain 的 mRNA 表达水平; 运用 Western blot 法检测叶酸受体和 Legumain 的蛋白表达水平。结果 Y - 79 细胞中 FR 和 Legumain 的 mRNA 表达水平分别是 ARPE - 19 的 4 倍和 6.47 倍; Western blot 法检测结果表明 FR - α 在 Y - 79 细胞的蛋白表达水平比 ARPE - 19 细胞高 1.35 倍, 两者有显著性差异 ($P < 0.05$); Legumain 在两种细胞中均以 36kDa 的成熟酶形式表达, Y - 79 细胞中的表达水平比 ARPE - 19 细胞高出 3 倍, 且有显著性差异。**结论** 与正常组织细胞系——视网膜色素上皮细胞 ARPE - 19 相比, 叶酸受体 FR - α 和 Legumain 在视网膜母细胞瘤细胞系中表达要高。

关键词 视网膜母细胞瘤 叶酸受体 Legumain 实时荧光定量 PCR

中图分类号 R739.7

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.09.013

Expression of Folate Receptor - α and Legumain in Retinoblastoma Cell Line. Huang Ping, Weng Yuhua, Meng Yongchun, et al. School of Ophthalmology & Optometry, Wenzhou Medical University, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To investigate the expression of folate receptor - α and Legumain in retinoblastoma. We compared the differential expression of retinoblastoma cell line Y - 79 and retinal pigment epithelial ARPE - 19 cells in both the mRNA and protein levels. **Methods** In our study, the mRNA expression of FR - α and Legumain in two types of cells was detected by Q - PCR. Furthermore, the protein expression level of FR - α and Legumain were also detected by Western blot. **Results** The mRNA expression of FR - α and Legumain in Y - 79 cells were 4 and 6.47 times higher than that in ARPE - 19, respectively, which indicated a higher genetic expression of two cytokines in cancer cells. The results of Western blot showed that, the FR - α protein in Y - 79 cells was 1.35 times more compared with the ARPE - 19 cells, and there was a significantly statistical differences ($P < 0.05$). Legumain existed in the form of 36kDa mature enzyme in both cells, and the expression of Legumain protein in Y - 79 was 3 times higher than ARPE - 19. **Conclusion** Both FR - α and Legumain were overexpressed in RB cell line Y - 79 compared to normal cells ARPE - 19.

Key words Retinoblastoma; Folate receptor; Legumain; Q - PCR

视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, RB) 是婴幼儿眼内最常见的原发性肿瘤之一, 近年来在亚洲越来越引起重视, 其在新生儿中的发生率大约是 1:22000 ~ 1:14000。临床表现为白瞳症、青光眼等, 目前治疗 RB 的首选疗法是化疗联合局部治疗, 而使化疗药物

靶向作用于肿瘤部位是保证化疗效果的关键, 否则由引发的毒性不良反应不容忽视^[1, 2]。

现代研究发现, 肿瘤细胞存在一系列与其增殖密切相关的受体 (receptor), 这类受体在正常细胞中通常不表达或极少表达, 叶酸受体便是其中的一类。叶酸受体 (FR) 在许多肿瘤细胞如卵巢癌、子宫颈癌、鼻咽癌细胞中高表达, 正常组织中除肾脏、胎盘、脉络膜和甲状腺上皮细胞表达 FR - α 外, 极少有叶酸受体高表达^[3-5]。天冬氨酸内肽酶 (asparaginyl endopeptidase, AEP) Legumain 是半胱氨酸蛋白酶 C13 家族的新成员, 主要在肿瘤及其新生血管的内皮细胞和肿瘤相关巨噬细胞中过量表达, 在正常组织中没有或极低表达^[6]。目前基于叶酸受体和 Legumain 在非眼部肿

基金项目: 国家国际科技合作专项基金资助项目 (2012DFB30020); 浙江省自然科学基金资助项目 (LY12H12005); 温州市科技计划项目 (Y20130115)

作者单位: 325027 温州医科大学眼视光学院 (黄平、孟永春、南开辉、吕帆); 100049 北京, 中国科学院大学材料科学与光电技术学院 (翁郁华)

通讯作者: 南开辉, 电子信箱: nankh@163.com; 吕帆, 电子信箱: lufan@mail.eye.ac.cn

瘤靶向治疗中的作用已有研究,然而它们在视网膜母细胞瘤中的表达及作用却鲜有报道。Kansara 等^[7]首次报道了 RB 细胞系 Y-79 对叶酸分子具有特异性的内吞作用,即是基于 Y-79 细胞表达叶酸受体的事实,但未对受体的表达进行定量研究。Boddu 等^[8]发现药物载体经叶酸修饰后,Y-79 细胞对药物的摄取量提高了 4 倍。Haugen 等^[9]研究发现 Legumain 高表达于肿瘤细胞,可用于靶向治疗。Guo 等^[10]发现 Legumain 显著过表达于转移原发性胃癌中,它可以作为具有转移或复发胃癌风险患者的预后生物标志物。以上研究均表明,叶酸受体和 Legumain 可作为恶性肿瘤诊断的标志物和药物治疗及药物载体设计的有吸引力的靶点^[11,12]。

本研究运用实时荧光定量 PCR 法和 Western blot 法分别从基因和蛋白水平揭示叶酸受体和 Legumain 在视网膜母细胞瘤细胞系和正常视网膜细胞系中的表达水平,以期对 RB 的靶向治疗增添理论依据。

材料与方法

1. 实验试剂:Trizol 试剂、DEPC-treated water、DNA-free 试剂盒、RNase Zap、Power SYBR Green PCR Master Mix、Microamp optical adhesive film、96-well reaction plate 等购于英潍捷基(上海)贸易有限公司;M-MLV reverse transcriptase、dNTP Mix、RNasin/Ribonuclease inhibitor、random primers 购于上海普洛麦格生物产品有限公司;Amersham Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers 购于 GE Healthcare 公司;叶酸受体一抗(山羊多抗)、叶酸受体二抗(驴抗羊)、Legumain 一抗(鼠单抗)、Legumain 二抗(羊抗鼠)购于 santacruz 公司;内参 HRP-GAPDH 购于 Cell signaling 公司;人视网膜母细胞瘤细胞系 Y-79(HTB-18)和人视网膜色素上皮细胞系 ARPE-19(CRL-2302)细胞系均购自南京科佰生物科技有限公司。

2. 实验方法:(1)细胞培养:ARPE-19 细胞在 37℃、5% CO₂ 条件下培养,采用含 10% FBS、100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素的 DMEM/F12(1:1)培养基,待细胞生长至 80~90% 融合时以 1:3 到 1:10 比例传代培养。Y-79 细胞在 37℃、5% CO₂ 条件下培养,培养基为含 20% FBS、100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液中悬浮培养,2~3 天传代 1 次。(2)引物设计:基因序列基于 Genbank 查询结果,利用 Primer Premier 软件设计内参 GAPDH 与目的基因引物序列,由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成引物。(3)反转录 PCR:ARPE-19 细胞按照 6×10⁴ 个/毫升浓度、每孔 1ml 种于 24 孔细胞板,待细胞融合成单层后,每孔加入 0.5ml Trizol 试剂,根据 Trizol 试剂盒说明提取细胞总 RNA,悬浮细胞每 5×10⁶ 个细胞加 1ml Trizol,提取的 RNA 经过 DNAase I 纯化,并运用 Nanodrop 核酸-蛋白检测仪测定 RNA 浓度及纯度。取适量 RNA,运用 OligodT 和 M-MLV RT 聚合酶、随机引物反

转录合成 cDNA,取适量 cDNA 进行普通 PCR,所用引物见表 1,PCR 条件如下:94℃ 变性 45s,56℃ 退火 1min,72℃ 延伸 45s,循环 30 次,最后 72℃ 延伸 10min,PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳并观察。(4)定量 PCR:运用 SYBR-green 法进行 Q-PCR,比较 FR-α 和 Legumain 在 Y-79 和 ARPE-19 细胞中的表达水平。具体方法为:取 7.5μl SYBR-green,6μl 经 DEPC 处理的水,0.5μl 特异性引物和 1μl cDNA,混匀,经 4℃、2000r/min 离心 1min,放入 PCR 仪按照如下程序进行定量测定:95℃ 5min,96℃ 20s,58℃ 30s,72℃ 45s,45 个循环,80℃ 时采集荧光信号,GAPDH 作为各样品的内参。PCR 产物经溶解曲线进行特异性鉴定(图 1),采用相对临界值法计算 mRNA 含量。(5)细胞总蛋白的提取:ARPE-19 细胞种于 6 孔板培养,待细胞融合后,移去培养液,用冰冷的 PBS 溶液洗涤两遍,每孔加入 100μl RIPA 裂解液,使用前加入蛋白酶抑制剂 PMSF 使之终浓度为 10nmol/L,冰上裂解 15min,用细胞刮刮下细胞,并转移至 EP 管中。Y-79 细胞处理方法如下:2000×g 离心细胞培养液 5min,收集约 2×10⁷ 个细胞,移去培养液,用冰冷的 PBS 洗涤细胞 2 遍,加入 0.6ml RIPA 裂解液,冰上裂解 30min,其余步骤同上。获得的细胞裂解液经 4℃、10000×g 离心 15min,吸取上清液,BCA 法测定蛋白浓度,-80℃ 保存备用。(6)免疫印迹:所获细胞裂解液用于 SDS-PAGE 电泳,使每孔蛋白上样量为 40μg,按照堆积胶 80V 分离胶 120V 电压电泳,电泳结束后切胶,在 200mA 恒流条件下半干法转膜 100min,蛋白条带转移至硝酸纤维素膜上。目的条带用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1h,分别孵育羊抗人 FR-α (1:100)一抗和鼠抗人 Legumain 一抗(1:200),4℃ 孵育过夜,PBST 洗涤条带 5 次,每次 5min;室温分别孵育驴抗羊(1:5000)、羊抗鼠二抗(1:2000)1h,PBST 洗涤 5 次,每次 5min,化学发光法显影。实验至少重复 3 次,以 α-tubulin 为内参。所得 Western blot 法条带用 Quantity one 软件对灰度值进行分析计算,相对蛋白含量=目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值。

3. 统计学方法:用 2^{-ΔCt} 法计算 mRNA 含量,每个样品取 6 次测定的平均值,采用 SAS 9.0 软件进行统计分析,各组间差异采用单因素方差分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

表 1 RT-PCR 基因引物序列 ($\bar{x} \pm s$)

基因	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
FR-α	上游引物 AGGACAGACATGGCTCAGCG	136
	下游引物 TGTGGTGCTTGGCGTTCATG	
Legumain	上游引物 CAACTACTGCTGCCAACC	252
	下游引物 CTTTGCCTTTCATACCT	

结 果

1. RT-PCR 产物鉴定:经 RT-PCR、琼脂糖凝胶电泳结果显示(图 2),叶酸受体、Legumain 在 ARPE-19 和 Y-79 细胞中(图 3)的 PCR 产物条带清晰单

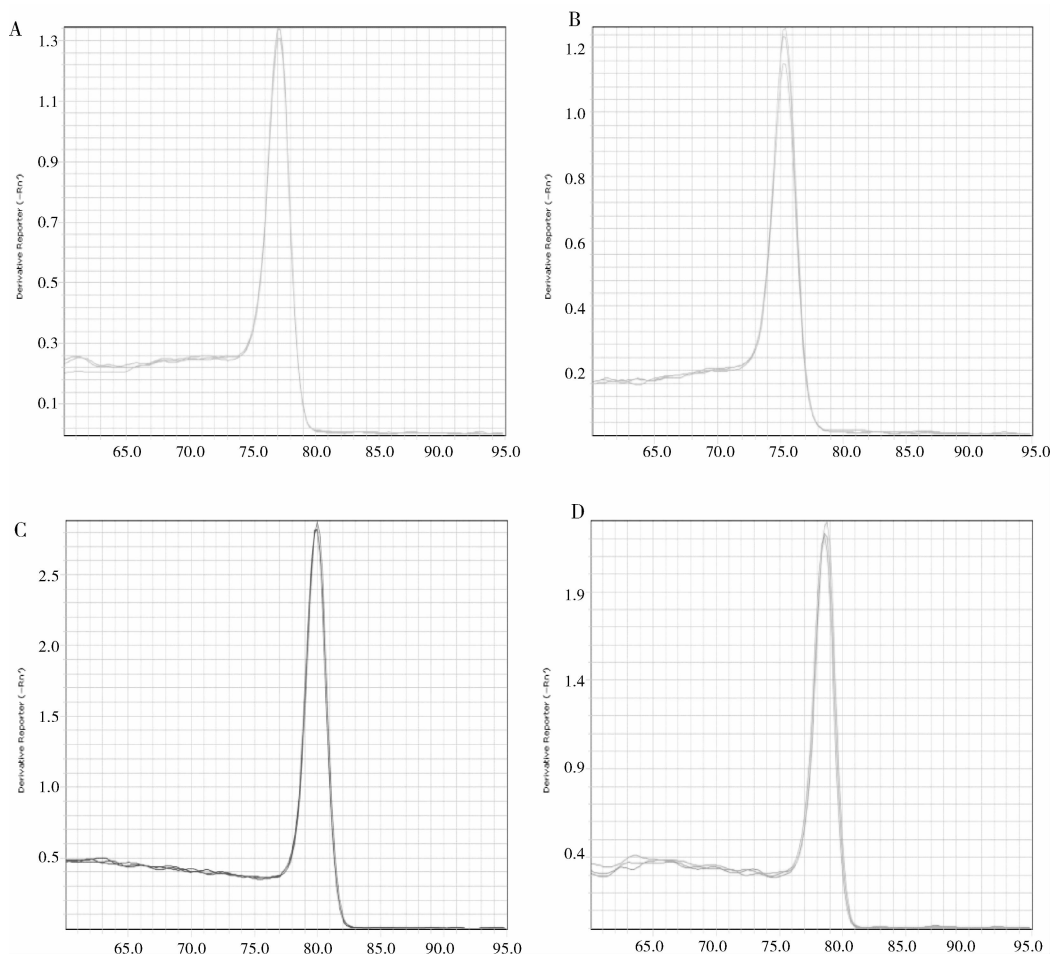


图 1 Q-PCR 扩增产物溶解曲线

A、B 为 FR- α 溶解曲线；A. Y-79 细胞；B. ARPE-19 细胞。C、D 为 Legumain 溶解曲线；C. Y-79 细胞；D. ARPE-19 细胞

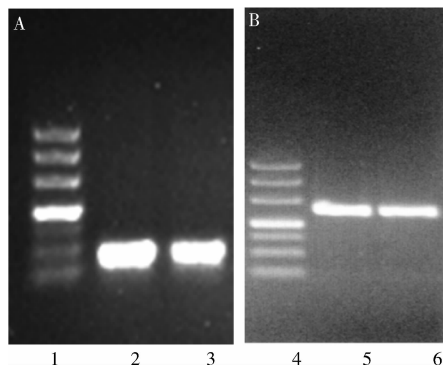


图 2 FR- α 、Legumain RT-PCR 产物
琼脂糖凝胶电泳图

A. FR- α 特异性引物 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳；1. 500bp DNA ladder；2. Y-79 细胞 RT-PCR 产物；3. ARPE-19 细胞 RT-PCR 产物。B. Legumain 特异性引物 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳；4. 500bp DNA ladder；5. Y-79 细胞 mRNA 产物；6. ARPE-19 细胞 mRNA 产物

一，无引物二聚体、杂条带等非特异性条带，BLAST 分析结果显示，使用的引物均能够产生相应大小的产

物，其中 FR- α 片段大小为 136bp，Legumain 为 252bp。

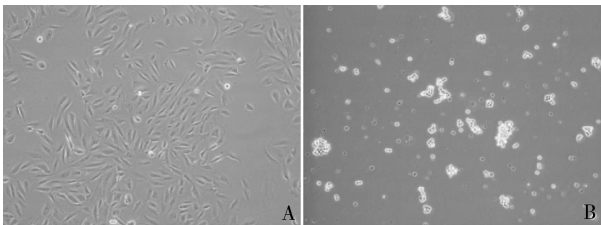


图 3 ARPE-19 细胞和 Y-79 细胞形态
A. ARPE-19；B. Y-79

2. Q-PCR 分析：通过 Q-PCR 法观察叶酸受体、Legumain 基因扩增片段的溶解曲线，发现各基因均呈现单一的信号峰，平行样品间溶解曲线重复性好（图 1）。mRNA 表达水平结果显示，Y-79 细胞中 FR- α 的 mRNA 表达水平是 ARPE-19 的 4 倍（ $t = 13.430$ ）；和 Legumain 的 mRNA 表达水平 Y-79 为

ARPE-19 的 6.47 倍($t=9.134$)(图 4)。

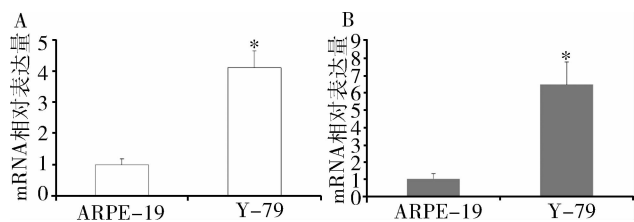


图 4 mRNA 相对表达量

A. FR- α ; B. Legumain; 与 ARPE-19 相比, * $P<0.05$

3. Western blot 法检测结果: Western blot 法检测结果显示(图 5), FR- α 在 Y-79 细胞的表达水平比 ARPE-19 细胞略高, FR- α / α -tubulin 灰度均值及标准差($\bar{x} \pm s$)在 Y-79、ARPE-19 两种细胞中分别为 0.258 ± 0.008 、 0.191 ± 0.003 , 经 t 检验两者差异有统计学意义($t=8.151$, $P<0.05$); Legumain 在两种细胞中均以 36kDa 的成熟酶形式表达, Y-79 细胞中的表达水平比 ARPE-19 细胞高出 3 倍(图 6), Legumain/ α -tubulin 灰度均值在两种细胞中分别为 0.909 ± 0.011 、 0.269 ± 0.009 , 两者之间差异有统计学意义($t=21.603$, $P<0.05$)。

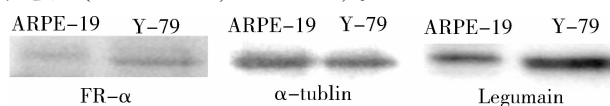


图 5 Western blot 法蛋白条带

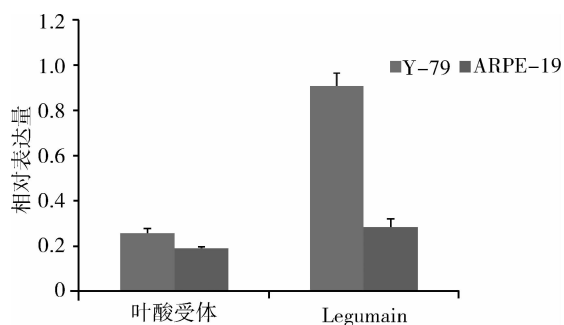


图 6 叶酸受体、Legumain 蛋白相对表达量

讨 论

化学药物治疗是治疗恶性肿瘤的一种重要手段,而化疗药物产生毒性不良反应的主要原因是药物没有选择性。如何实现抗肿瘤药物靶向输送,使药物集中作用于肿瘤细胞,提高药物在肿瘤的生物分布,是目前抗肿瘤药物研发的一个热点,而肿瘤靶点的选择很关键。与正常细胞相比,肿瘤细胞表面常常高表达一些受体或者抗原(靶点),比如叶酸受体(FR-

α) 以及一些酶,如天冬氨酸内肽酶 Legumain 等^[9,13-17]。

在研究视网膜母细胞瘤的两种细胞因子表达情况时,本研究选用了 Y-79 细胞系作为 RB 的细胞模型。Y-79 细胞系来源于视网膜肿瘤的具有多潜能分化的神经细胞系^[18]。研究表明,该细胞系兼具神经元和神经胶质特征,常作为 RB 的体外模型用于研究视网膜神经的分化及抗肿瘤药物的效率评价,也是研究视网膜性质及代谢作用的常用的体外细胞模型。ARPE-19 是另外一种常用的人源视网膜细胞系,其与 RPE 细胞有类似的上皮细胞形态、极化特性、离子通道表达、转运子以及相关的特异标记^[19]。

本研究应用了先进的实时荧光定量 PCR、Western blot 法分别比较了正常视网膜色素上皮细胞和视网膜母细胞瘤细胞的叶酸受体和 Legumain 在基因和蛋白水平的表达,结果表明, Y-79 细胞中 FR- α 和 Legumain 的 mRNA 表达水平分别是 ARPE-19 的 4 倍和 6.47 倍($P<0.05$), 此与 Jwala 等^[20]对叶酸受体的表达研究结论一致; Y-79 的两种蛋白的表达水平分别是 ARPE-19 细胞的 1.35 倍和 3 倍。与 Y-79 中叶酸受体的主动转运过程不同, Legumain 主要通过通过对特定肽段的水解来发挥效应的^[9,21]。Legumain 主要在实体肿瘤表面高表达,然而目前尚未有其在眼组织、眼肿瘤表达的报道,本研究也丰富了对视网膜母细胞瘤的了解。本研究发现,基因表达与蛋白表达结果存在一定差异,究其原因,很可能是从基因翻译成蛋白质的过程经历了一系列的转录后调控步骤, mRNA 在编辑的过程中被剪切,造成部分 RNA 发生沉默。

现有的肿瘤治疗药物很少有基于肿瘤细胞异常结构设计的,而肿瘤标志分子的筛选与鉴定在一定程度上提供了解决问题的关键思路,如利用纳米技术设计和构建连接叶酸的药物载体、利用多肽合成技术,构建基于 Legumain 酶活性响应的纳米药物控释载体,均为叶酸受体、Legumain 过量表达的肿瘤治疗提供了技术支持。关于视网膜母细胞瘤标志物的研究不多,尤其系统性从基因、蛋白表达水平进行综合评价,本研究也为视网膜母细胞瘤的靶向治疗提供了一定的理论与实践基础。

参考文献

- Shields CL, Lally SE, Leahey AM, et al. Targeted retinoblastoma management: when to use intravenous, intra-arterial, periocular, and intravitreal chemotherapy[J]. Current Opinion in Ophthalmology, 2014, 25(5):374-385

- 2 Bartuma K, Pal N, Kosek S, *et al.* A 10 – year experience of outcome in chemotherapy – treated hereditary retinoblastoma[J]. *Acta Ophthalmologica*, 2014,92(5):404 – 411
- 3 Keating E, Lemos C, Goncalves P, *et al.* Acute and chronic effects of some dietary bioactive compounds on folic acid uptake and on the expression of folic acid transporters by the human trophoblast cell line BeWo[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2008,19(2):91 – 100
- 4 Assaraf YG, Leamon CP, Reddy JA. The folate receptor as a rational therapeutic target for personalized cancer treatment[J]. *Drug Resistance Updates*, 2014,17(4 – 6):89 – 95
- 5 Walters CL, Arend RC, Armstrong DK, *et al.* Folate and folate receptor alpha antagonists mechanism of action in ovarian cancer[J]. *Gynecologic Oncology*, 2013,131(2):493 – 498
- 6 Wu W, Luo Y, Sun C, *et al.* Targeting cell – impermeable prodrug activation to tumor microenvironment eradicates multiple drug – resistant neoplasms[J]. *Cancer Research*, 2006,66(2):970 – 980
- 7 Kansara V, Paturi D, Luo S, *et al.* Folic acid transport via high affinity carrier – mediated system in human retinoblastoma cells[J]. *Int J Pharm*, 2008,355(1 – 2):210 – 219
- 8 Boddu SH, Jwala J, Chowdhury MR, *et al.* In vitro evaluation of a targeted and sustained release system for retinoblastoma cells using Doxorubicin as a model drug[J]. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 2010,26(5):459 – 468
- 9 Haugen MH, Boye K, Nesland JM, *et al.* High expression of the cysteine proteinase legumain in colorectal cancer – implications for therapeutic targeting[J]. *European Journal of Cancer*, 2015,51(1):9 – 17
- 10 Guo P, Zhu Z, Sun Z, *et al.* Expression of legumain correlates with prognosis and metastasis in gastric carcinoma[J]. *PloS one*, 2013,8(9):e73090
- 11 Wang L, Chen S, Zhang M, *et al.* Legumain: a biomarker for diagnosis and prognosis of human ovarian cancer[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2012,113(8):2679 – 2686
- 12 Liu C, Sun C, Huang H, *et al.* Overexpression of legumain in tumors is significant for invasion/metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy[J]. *Cancer Research*, 2003,63(11):2957 – 2964
- 13 Leamon CP, Reddy JA. Folate – targeted chemotherapy[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004,56(8):1127 – 1141
- 14 Zhao XB, Lee RJ. Tumor – selective targeted delivery of genes and antisense oligodeoxyribonucleotides via the folate receptor[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004,56(8):1193 – 1204
- 15 Sivakumar B, Aswathy RG, Nagaoka Y, *et al.* Multifunctional carboxymethyl cellulose – based magnetic nanovector as a theragnostic system for folate receptor targeted chemotherapy, imaging, and hyperthermia against cancer[J]. *Langmuir*, 2013,29(10):3453 – 3466
- 16 Guaragna A, Chiaviello A, Paoletta C, *et al.* Synthesis and evaluation of folate – based chlorambucil delivery systems for tumor – targeted chemotherapy[J]. *Bioconjug Chem*, 2012,23(1):84 – 96
- 17 Dall E, Brandstetter H. Mechanistic and structural studies on legumain explain its zymogenicity, distinct activation pathways, and regulation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013,110(27):10940 – 10945
- 18 Yorek MA, Dunlap JA, Spector AA, *et al.* Effect of ethanolamine on choline uptake and incorporation into phosphatidylcholine in human Y79 retinoblastoma cells[J]. *Journal of Lipid Research*, 1986,27(11):1205 – 1213
- 19 Ablonczy Z, Dahrouj M, Tang PH, *et al.* Human retinal pigment epithelium cells as functional models for the RPE in vivo[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011,52(12):8614 – 8620
- 20 Jwala J, Vadlapatla RK, Vadlapudi AD, *et al.* Differential expression of folate receptor – alpha, sodium – dependent multivitamin transporter, and amino acid transporter (B(0, +)) in human retinoblastoma (Y – 79) and retinal pigment epithelial (ARPE – 19) cell lines[J]. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 2012,28(3):237 – 244
- 21 Hasegawa S, Yamasaki M, Fukui T. Degradation of acetoacetyl – CoA synthetase, a ketone body – utilizing enzyme, by legumain in the mouse kidney[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014,453(3):631 – 635

(收稿日期:2015 – 03 – 14)

(修回日期:2015 – 03 – 30)

(上接第 12 页)

- 16 Simone P, Broek AJ, Rensing BJ, *et al.* Reduced CD26 expression is associated with improved cardiac function after acute myocardial infarction Insights from the REPERATOR Study[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2012,53(6):899 – 905
- 17 Emanuele E, Minoretto P, Martinelli V, *et al.* Circulating levels of soluble CD26 are associated with phobic anxiety in women[J]. *Progress in Neuro – Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 2006,30(7):1334 – 1336
- 18 Inoue N, Takayama T, Hisamatsu T, *et al.* CD4⁺ T lymphocytes with high CD26 surface expression are involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. *Gastroenterology*, 2009,136(5):A – 250
- 19 Somborac – Bacura A, Suncica Bć, Lada R, *et al.* Decreased soluble dipeptidyl peptidase IV activity as a potential serum biomarker for COPD[J]. *Clinical Biochemistry*, 2012,45(15):1245 – 1250

(收稿日期:2015 – 01 – 22)

(修回日期:2015 – 02 – 02)