

lidID-14 细胞表达 NCAM 并控制其 N-聚糖合成的细胞模型的建立

何发^{1,2}, 王欣^{1,2}, 郭佳^{1,2}, 李崎², 关锋^{1,2}

1 江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

何发, 王欣, 郭佳, 等. lidID-14 细胞表达 NCAM 并控制其 N-聚糖合成的细胞模型的建立. 生物工程学报, 2014, 30(6): 962-971.

He F, Wang X, Guo J, et al. Expression of neural cell adhesion molecule and modification of its N-glycan in lidID-14 cells. Chin J Biotech, 2014, 30(6): 962-971.

摘 要: 神经细胞黏附分子 (Neural cell adhesion molecule, NCAM) 是一类表达于神经元、胶质细胞、骨骼细胞以及自然杀伤细胞表面的糖蛋白。NCAM 在细胞-细胞黏附及神经细胞迁移等过程中起着重要作用, 也是用来研究多聚唾液酸(Polysialic acid, PSA)的模式蛋白。将来源于小鼠乳腺上皮细胞 NMuMG 中的 NCAM 基因克隆到真核表达载体 pcDNA3.1(+), 转染至中国仓鼠卵巢细胞突变株 lidID-14 细胞中, 通过抗生素 G418 筛选及蛋白质印迹法检测, 得到过表达 NCAM 的永久转染细胞株。利用 lidID-14 细胞的特性, 通过无血清的基本培养基中添加半乳糖与否可以轻易操纵 NCAM 分子上糖链的修饰, 为后期研究糖基化对 NCAM 分子功能的影响提供工作基础。

关键词: 糖链, 神经细胞黏附分子, 转染, 多聚唾液酸, lidID-14 细胞

Received: September 13, 2013; **Accepted:** February 10, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81201572).

Corresponding author: Qi Li. Tel: +86-510-85918176; E-mail: liqi@jiangnan.edu.cn

Feng Guan. Tel: +86-510-85918126; E-mail: fengguan@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 81201572) 资助。

网络出版时间: 2014-03-10

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.130478.html>

Expression of neural cell adhesion molecule and modification of its N-glycan in lidD-14 cells

Fa He^{1,2}, Xin Wang^{1,2}, Jia Guo^{1,2}, Qi Li², and Feng Guan^{1,2}

1 Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry & Biotechnology Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Neural cell adhesion molecule (NCAM) is a glycoprotein expressing on the surface of neurons, glial cells, bone cells and natural killer cells. NCAM plays an important role in the process of cell - cell adhesion and cell migration, and is also a model protein to study polysialic acid. In this paper, NCAM gene from mouse mammary gland cells (NMuMG) was cloned into eukaryotic expression vectors pcDNA3.1(+) and transfected into mutant Chinese hamster ovary cells lidD-14. The stable transfection over-expressing NCAM was obtained through the G418 selection and confirmed by Western blotting. Due to unique characters of lidD-14 cells, carbohydrate chain of NCAM molecule can be easily manipulated with or without adding galactose in the serum free medium, and this modification can provide the basis for further studies on the effect of glycosylation on NCAM molecular function.

Keywords: carbohydrate chain, neural cell adhesion molecule, transfection, polysialic acid, lidD-14 cell

糖生物学是 21 世纪生命科学的前沿和热点领域之一,其核心内容是揭示细胞糖链的结构和生物学功能。糖链作为生物信息分子参与细胞生物几乎所有的生命过程,特别是在细胞分化、发育、免疫、老化、癌变、信号传递等生命和疾病过程中起着重要作用^[1]。

糖生物学研究的对象之一是发生了糖基化修饰的糖蛋白。糖蛋白上的糖链主要是通过两种糖基化形式形成糖苷键连接于蛋白的特定氨基酸上,分别形成 N-聚糖和 O-聚糖。N-聚糖是连接在蛋白质肽链中天冬酰胺残基侧链酰胺氮上的寡糖,此类寡糖通常均有一个核心五糖和类似结构的外周糖链。所有的 N-聚糖都有一种相同的核心五糖,由 3 个甘露糖 (Mannose, Man) 和 2 个 N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine, GlcNAc) 组成 (图 1)。根据核心五糖中 2 个

α -Man 上连接的糖链, N-聚糖可分为 3 类:高甘露糖型 (High-mannose type)、复杂型 (Complex type) 和杂合型 (Hybrid type)。而 O-聚糖是指通过 N-乙酰半乳糖胺 (N-acetylgalactosamine, GalNAc) 与肽链的丝氨酸或苏氨酸残基相连接形成的聚糖,它不存在共有的核心结构。在 O-聚糖合成时, GalNAc 第一个被添加到丝氨酸或苏氨酸残基上,然后其他糖类依次添加上去;但是 N-聚糖的合成却不同,它是先合成一个寡糖前体,再整体转移到多肽的天冬酰胺残基上。其中,半乳糖 (Galactose, Gal) 存在于大部分复杂的 N-聚糖的分支上,而且也在很多 O-聚糖上直接与 GalNAc 连接^[2]。

NCAM 属于免疫球蛋白超家族,是一个细胞膜外具有 5 个 Ig 型结构域和 2 个三型纤连蛋白 (Fibronectin type III, FN3) 结构域的跨膜糖

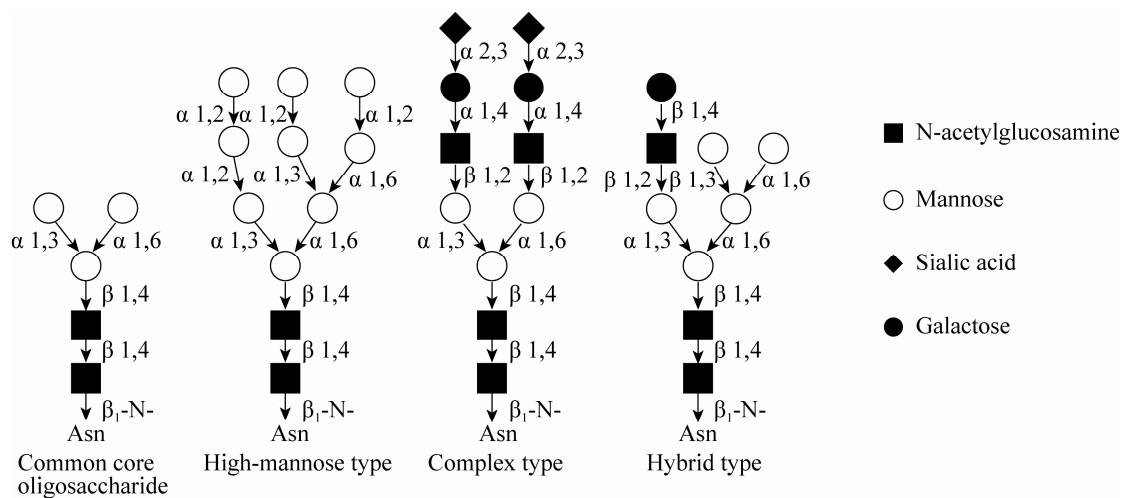


图 1 N-聚糖的结构^[3]

Fig. 1 Structure of N-glycan^[3].

蛋白,其中5个Ig型结构域上带有6个N-糖基化位点^[4]。编码NCAM的mRNA有3种,它们由同一基因的转录产物经不同剪接而成。根据分子量的不同分别命名为NCAM-180、NCAM-140和NCAM-120^[5]。连在NCAM上最主要的糖类是唾液酸,主要以PSA链的形式存在于NCAM的第5和第6个N-糖基化位点上^[6-7]。唾液酸以 $\alpha 2-3$ 键连接于Gal $\beta 1-4$ GlcNAc $\beta 1-2/6$ -核心五糖结构的N-聚糖上,然后在多聚唾液酸转移酶(Polysialyltransferases)作用下以 $\alpha 2,8$ -连接形成含有50-100个唾液酸的线性化多聚物,即PSA^[8-10]。PSA带有诸多负电荷,具亲水性,因此能够形成较大的水合半径。NCAM主要通过胞外的Ig型结构域介导同类分子间结合来调节细胞间的黏附,而PSA的存在使NCAM之间距离过大而失去黏附能力,从而降低了细胞间的黏附作用^[11-13]。由于PSA主要附着在NCAM上,使得NCAM成为研究PSA化作用的模式蛋白。在NCAM分子的3种亚型中,NCAM-140对细胞迁移、肿瘤浸润的作用最明显^[14-15],本课题

组在前期研究中,发现小鼠乳腺上皮细胞(Normal murine mammary gland epithelial, NMuMG)在发生上皮间质转化过程(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)前后,NCAM在mRNA水平以及蛋白水平表达明显上调,其中NCAM-140的蛋白表达量最高且上调幅度最为显著(数据未发表),因此本文选用NCAM-140为研究对象。

本文使用的ldID细胞是一种中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞的突变体,由David M. Kingsley和Monty Krieger筛选得到^[16]。由于ldID细胞存在UDP-Gal/UDP-GalNAc 4-差向异构酶的缺陷,不能利用葡萄糖合成UDP-Gal和UDP-GalNAc^[2],而这两种糖是糖链上Gal和GalNAc的供体,因此导致细胞中不能产生完整的糖链。但是通过外源添加Gal和GalNAc可以完全地纠正该缺陷。正是由于这一缺陷,使得该细胞成为研究糖链生物学功能非常理想的细胞模型,可以通过外源添加Gal或不添加Gal操纵ldID细胞中蛋白的糖链修饰。利用ldID细胞这一特性,

本实验将 NCAM-140 的基因稳定转染到该细胞中并表达,用蛋白质印迹法 (Western blotting) 筛选 NCAM-140 过表达的细胞株,为进一步研究 PSA 对 NCAM-140 的功能奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

NMuMG 细胞来自于美国模式培养物集存库 ATCC。Id1D-14 细胞来自于美国华盛顿大学 Sen-itiroh Hakomori 实验室。大肠杆菌 JM109 及质粒 pcDNA3.1(+)由本室保存。

细胞 RNA 提取试剂盒和质粒提取试剂盒购于北京康为世纪生物科技有限公司;逆转录试剂盒 ReverTra Ace- α -和 T4 DNA 连接酶购于 TOYOBO 公司;Hind III 和 Xho I 内切酶、1 kb DNA ladder marker、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购于 TaKaRa 公司;Pfu DNA 聚合酶和 Pro-Light HRP 化学发光检测试剂购于天根生化科技有限公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 抗体购于碧云天生物技术研究所以;T-PER 组织总蛋白抽提试剂购于美国 Thermo 公司;DMEM 培养基、HAM'S/F-12 培养基、胎牛血清和青霉素/链霉素溶液购于 Life Technologies 公司;LipofectamineTM 2000 转染试剂购于 Invitrogen 公司;抗生素 G418 和胰岛素购于美国 Sigma 公司;NCAM 抗体和 ITS (Insulin-transferrin-selenium) 购于美国 BD 公司;GSL-II-FITC (Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia lectin II, GSL-II; Fluorescein isothiocyanate, FITC) 购于美国 VECTOR 公司;引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 引物设计和目的基因的扩增

从 NMuMG 细胞中提取总 RNA,在逆转录

酶的作用下合成 cDNA。根据 NCAM-140 基因序列 (GenBank Accession No. NM_001081445.1) 设计引物,上游引物序列:5'-CCCAAGCTTATGCTGCGAACTAAGGATCT-3' (引入酶切位点 Hind III),下游引物序列:5'-CCGCTCGAGTCATGCTTTGCTCTCATTCT-3' (引入酶切位点 Xho I)。然后以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 条件为:94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 40 s,56 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 2 min 30 s,共 30 个循环;然后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳验证后送上海英潍捷基贸易有限公司测序得到确认。

1.2.2 pcDNA3.1(+)/NCAM 真核表达载体的构建

扩增得到的 NCAM-140 基因用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化,然后用 Hind III 和 Xho I 分别双酶切 NCAM-140 基因和 pcDNA3.1(+),酶切产物再纯化后在 16 °C 下用 T4 DNA 连接酶连接过夜,然后将连接产物转化到 JM109 感受态细胞中,在含有氨苄青霉素的 LB 固体平板上 37 °C 过夜培养,挑取生长的单菌落提取质粒,经单双酶切及测序鉴定,得到构建成功的重组真核表达载体 pcDNA3.1(+)/NCAM-140。

1.2.3 细胞培养

NMuMG 细胞在含 10%胎牛血清 (FBS)、10 μ g/mL 胰岛素、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基中生长,Id1D-14 细胞在含 5% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 HAM'S/F-12 培养基中生长;这两种细胞均在 37 °C 下含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

Id1D-14 细胞在含 5% FBS 的 HAM'S/F-12 培养基中培养 12 h,然后吸去培养基,加入无血清培养基轻轻清洗一遍,再用添加了 ITS

(1 1 000 加入)、Gal (20 $\mu\text{mol/L}$) 和 GalNAc (200 $\mu\text{mol/L}$) 的无血清 HAM'S/F-12 培养基培养 48 h^[17], 即可完全修复 IdID-14 细胞的糖链缺陷。

1.2.4 细胞转染及阳性单克隆的筛选

将重组质粒 pcDNA3.1(+)/NCAM-140 和对照质粒 pcDNA3.1(+)转染 IdID-14 细胞, 方法参照 LipofectamineTM 2000 的说明书。转染 6 h 后换含 5% FBS 的培养基培养 24 h, 然后以 1 10 传代。继续培养 24 h 后换含 250 $\mu\text{g/mL}$ G418 的培养基筛选 2 周。挑取单细胞克隆继续在含 250 $\mu\text{g/mL}$ G418 的培养基中扩大培养。然后提取总蛋白用蛋白质印迹法检测, 将表达 NCAM-140 的细胞保存并取少量细胞铺于 10 cm 的细胞培养皿中, 继续培养进行第 2 次单克隆筛选, 以得到过表达 NCAM-140 的永久转染细胞株。

1.2.5 蛋白质印迹法检测 NCAM 表达

收集细胞, 加入 T-PER 组织总蛋白抽提试剂, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解细胞 30 min, 离心取上清, 使用 BCA 法测定蛋白浓度。样品加入 5 \times 蛋白上样缓冲液混合, 煮沸 5 min, 取 20 μg 蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳; 电泳后, 将蛋白转移至 0.45 μm PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h; 随后加入一抗 (1 1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h, 用 1 \times TBST 洗 5 次; 加辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 (1 5 000), 室温作用 1 h, 用 1 \times TBST 洗 5 次, 然后用 Pro-Light HRP 化学发光检测试剂显色, 用 Bio-Rad ChemiDocTM XRS+ 系统扫描成像。

1.2.6 蛋白质印迹法检测糖链修饰后的 NCAM

在 6 孔板中每孔接种 2×10^5 个细胞, 用含 5% FBS 的 HAM'S/F-12 培养基培养 24 h, 吸去培养基后用无血清培养基冲洗一遍; 然后分别加入含有 5% FBS、ITS、ITS+Gal (5 $\mu\text{mol/L}$,

10 $\mu\text{mol/L}$ 或 20 $\mu\text{mol/L}$)+GalNAc (200 $\mu\text{mol/L}$) 的培养基培养 48 h (ITS 以 1 1 000 加入, 以下实验相同), 用上述方法提取蛋白, 测蛋白浓度, 最后用蛋白质印迹法检测。

1.2.7 凝集素细胞染色

在 24 孔板中放入圆形盖玻片, 用胰酶消化细胞制成细胞悬液, 每孔加入 0.5 mL 含 5% FBS 的培养基, 细胞量为 2×10^4 个。培养 24 h 后换液, 分别用含有 5% FBS、ITS、ITS+Gal 和 ITS+Gal+GalNAc 的培养基继续培养 24 h。然后吸出培养基, 用 1 \times PBS 洗 2 遍, 4% 多聚甲醛固定 15 min; 用 1 \times PBS 洗 3 遍, 加入 0.1% Triton X-100 溶液通透化细胞 10 min; 再用 1 \times PBS 洗 3 遍, 1% BSA 溶液 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。然后用浓度为 0.7 $\mu\text{g/mL}$ GSL-II-FITC/PBS 室温下避光孵育 3 h, 1 \times PBS 洗 3 遍, Hoechst 33342 染色 10 min, 最后将细胞爬片倒扣在滴有 Glycergel 固封剂的载玻片上, 晾干后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光保存。用尼康倒置荧光显微镜 ECLIPSE Ti-U 在 10 \times 60 倍下观察。

1.2.8 流式细胞检测

在 12 孔板中加入细胞, 每孔细胞量为 1×10^5 个, 在 5% FBS 的培养基中培养 12 h。分别用含有 5% FBS、ITS、ITS+Gal (5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$ 或 20 $\mu\text{mol/L}$)+GalNAc (200 $\mu\text{mol/L}$) 的培养基继续培养 48 h。然后用胰酶消化 3 min, 细胞悬液转移到离心管中, 加入 1 \times PBS 洗 2 遍, 2 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min 收集细胞; 用 1 mL 预冷的 1 \times PBS 重悬细胞, 加入 1 μg GSL-II-FITC 混匀, 冰上孵育 30 min, 然后 2 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心, 用 PBS 洗去多余的凝集素。用 1 mL 预冷的 1 \times PBS 重悬细胞, 转移到流式细胞管中。用美国 BD 公司生产的流式细胞仪 FACSCalibur 分析细胞的荧光强度。

2 结果与分析

2.1 目的基因的扩增及重组载体的酶切验证

以 NMuMG 细胞的 cDNA 为模板,使用上述引物在高保真 *Pfu* DNA 聚合酶的作用下进行 PCR 扩增,所得 NCAM-140 基因片段大小为 2 547 bp。将 NCAM-140 基因插入到 pcDNA3.1(+)质粒中,构建成 pcDNA3.1(+)/NCAM-140 真核表达载体。转化 JM109 感受态,筛选到的转化子再提质粒进行单、双酶切验证(图 2)。如图 2 所示,重组质粒经过单酶切(泳道 3)和双酶切(泳道 2)后均出现理论上大小的 DNA 片段。另外,基因测序结果也与 GeneBank 中的 NCAM-140 序列完

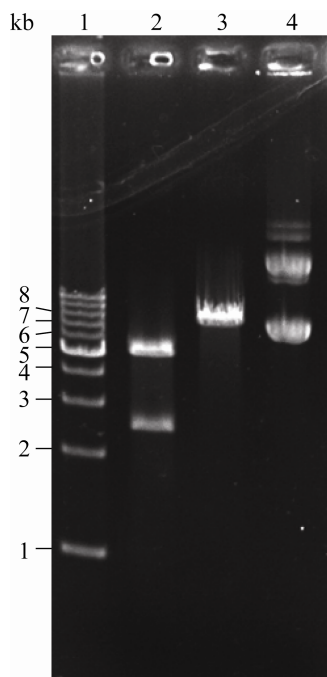


图 2 重组表达载体 pcDNA3.1(+)/NCAM-140 的酶切验证

Fig. 2 Identification of pcDNA3.1(+)/NCAM-140 recombinant vector by enzyme digestion. 1: 1 kb DNA ladder marker; 2: pcDNA3.1(+)/NCAM-140 digested with *Hind* III and *Xho* I; 3: pcDNA3.1(+)/NCAM-140 digested with *Hind* III; 4: pcDNA3.1(+)/NCAM-140 vector.

全一致,表明 pcDNA3.1(+)/NCAM-140 真核表达载体构建成功。

2.2 蛋白质印迹法检测 NCAM 的表达及在不同处理下糖链的连接情况

将 pcDNA3.1(+)/NCAM-140 重组载体转染到 lid-14 细胞,得到 15 株单克隆细胞,提取这 15 株细胞及转染对照质粒 pcDNA3.1(+)细胞的蛋白进行 Western blotting 检测,经验证最终得到 6 株过表达 NCAM-140 的细胞株。如图 3A 所示,转染重组载体并过表达 NCAM-140 的细胞在 140 kDa 处检测到目的条带,而泳道 7 的对照组未检测到很明显的条带。说明转染的 NCAM-140 基因在 lid-14 细胞中得到稳定地表达,建立了小鼠 NCAM-140 基因稳定转染的细胞株。

将该 lid-14/NCAM-140 细胞在分别含有 5% FBS、ITS、ITS+GalNAc+Gal (5 μ mol/L、10 μ mol/L 或 20 μ mol/L) 的培养基中培养,用

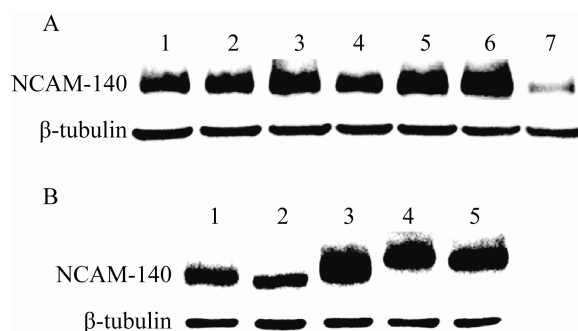


图 3 Western blotting 检测 lid-14 中 NCAM-140 的表达

Fig. 3 Western blotting analysis of NCAM-140 expressed in lid-14 cells. (A) Lane 1-6: NCAM-140 expressed in lid-14/NCAM-140 cells; lane 7: NCAM-140 expressed in control group. (B) Expression of NCAM-140 in 5% FBS medium (1), ITS medium (2), ITS+5 μ mol/L Gal +200 μ mol/L GalNAc (3), ITS+10 μ mol/L Gal +200 μ mol/L GalNAc (4), or ITS+20 μ mol/L Gal+200 μ mol/L GalNAc (5).

Western blotting 检测 NCAM-140 的表达及分子量大小。从图 3B 中可知 NCAM-140 的分子量大小具有明显的区别。在只添加 ITS 时,培养基中没有合成糖链所必需的 Gal 和 GalNAc, NCAM-140 上只有有缺陷的短糖链修饰,分子量最小。当添加不同浓度的 Gal 时,细胞合成糖链的缺陷逐渐被纠正。在含 5% FBS 的培养基中培养时,细胞也能合成少量完整的糖链,这是由于 FBS 含有少量的 Gal 所致。而当 Gal 的浓度增加到 20 $\mu\text{mol/L}$ 时,NCAM-140 的泳动速率最慢,表示 NCAM 上合成有较为完整的糖链。

2.3 凝集素检测稳定转染细胞株的糖链完整性

凝集素 GSL-II 能专一性地识别寡糖链非还原末端上以 α -或 β -连接的 GlcNAc。由于 N-聚糖除高甘露糖型外,连接五糖核心的结构大部分为 Gal β 1-4 GlcNAc 结构。Id1D 细胞存在 UDP-Gal 和 UDP-GalNAc 4-差向异构酶的缺陷,使细胞在只含有葡萄糖的培养基中不能合成 UDP-Gal 和 UDP-GalNAc,最终导致细胞合成的 N-聚糖不完整,其末端多以 GlcNAc 结束。而在基本培养基中添加 Gal 和 GalNAc 后,细胞可以通过补救途径合成 UDP-Gal 和 UDP-GalNAc,进而产生完整的 N-聚糖。如图 4A 所示,在含 ITS 的无血清培养基中,Id1D/NCAM-140 细胞合成的 N-聚糖末端暴露出更多的 GlcNAc,因此对 GSL-II-FITC 的结合最强,也产生最强的荧光信号。因此在含有 5% FBS 的培养基中,Id1D/NCAM-140 细胞合成的 N-聚糖末端的 GlcNAc 有小部分被血清中含有的少量 Gal 进一步修饰,导致荧光信号略微减弱。而在含有足够的 Gal 或 GalNAc 的无血清培养基中,过量的 Gal 中和了 N-聚糖末端的 GlcNAc,保证了 Id1D/NCAM-140 细胞合成 N-聚糖的完整性,该条件下 GSL-II-FITC 的结合能力最弱,其荧光

信号也相应最弱。由于 NCAM 主要被 N-聚糖修饰,而 GalNAc 在此过程中几乎没有参与,因此 GalNAc 对 GSL-II-FITC 结合细胞产生的荧光信号没有影响。

为进一步验证上述结果,用流式细胞术检测了在不同浓度的 Gal 培养条件下,Id1D/NCAM-140 细胞对 GSL-II-FITC 的结合能力。如图 4B 所示,当细胞培养在含 ITS 的无血清的培养基中,细胞 N-聚糖末端多为 GlcNAc,荧光信号最强。添加 5% FBS 或者逐渐提高 Gal 的浓度,Id1D/NCAM-140 细胞 N-聚糖进一步发生修饰,导致 GSL-II 结合能力减弱,因此在流式细胞实验结果中表现出荧光信号逐渐减弱,该结果与荧光显微细胞照相的结果完全一致。

3 讨论

蛋白质、核酸和糖是构成生命的三类大分子,由于糖链的结构非常复杂,不像核酸和蛋白质具有通用的模板,而且糖链结构测定及糖链合成等关键技术还不成熟,导致对糖链的研究远远落后于对蛋白质和核酸的研究,糖链对生命的影响仍然存在太多的奥秘亟待探索和研究^[18]。随着生命科学的发展,糖生物学越来越被人们所重视,已然成为 21 世纪生命科学新的研究热点领域。其中,糖蛋白作为最普遍也是最重要的糖缀合物,已成为研究糖链结构与功能的重要实验对象,其中的 NCAM 是一个用来研究糖链尤其是 PSA 链合成及功能的模式糖蛋白。因此,本研究选择 NCAM-140 为研究对象,通过转染使其在糖链合成存在缺陷的 Id1D-14 细胞中稳定过表达,可以人为地控制 NCAM 上糖链的修饰,为后续研究 NCAM 上糖链对其蛋白功能的行使提供细胞模型。

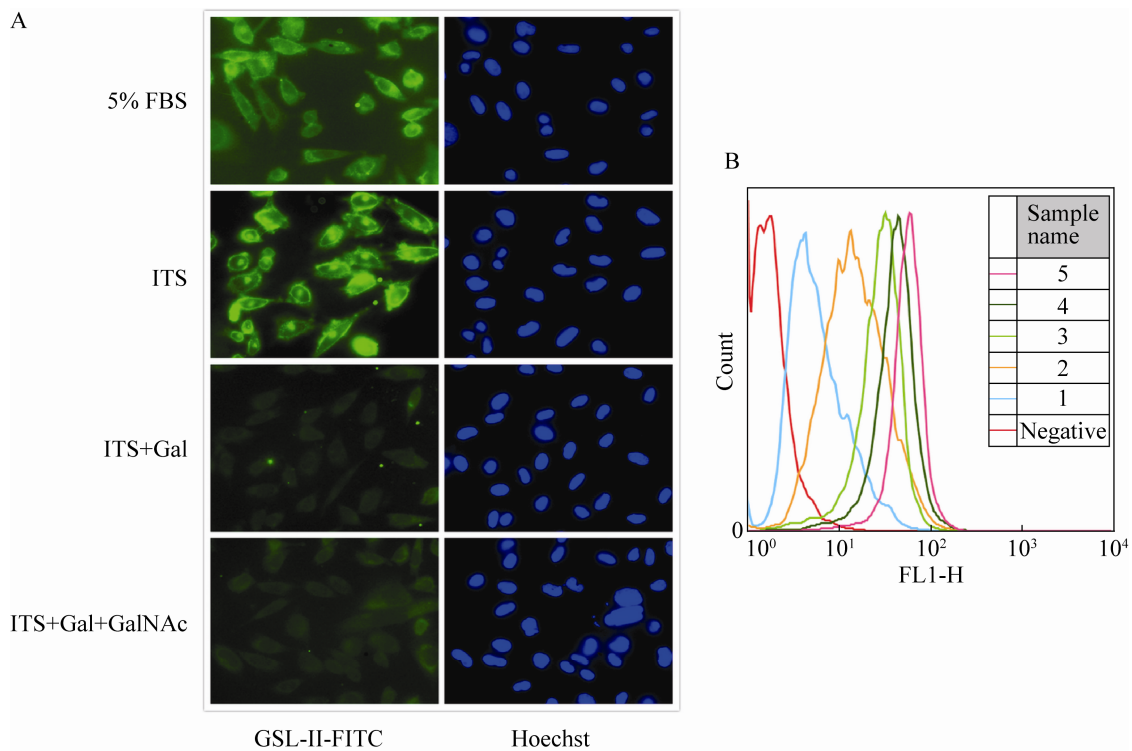


图 4 IdID-14 细胞的凝集素 GSL-II-FITC 染色

Fig. 4 GSL-II-FITC staining of IdID-14 cell. (A) Left: cell staining with GSL-II-FITC; right: nuclei staining with Hoechst. (B) Flow cytometric patterns showing GSL-II-FITC labeling of IdID-14/NCAM-140 cells. 1: ITS+20 $\mu\text{mol/L}$ Gal+200 $\mu\text{mol/L}$ GalNAc; 2: ITS+10 $\mu\text{mol/L}$ Gal+200 $\mu\text{mol/L}$ GalNAc; 3: 5% FBS; 4: ITS+5 $\mu\text{mol/L}$ Gal+200 $\mu\text{mol/L}$ GalNAc; 5: ITS only; Negative: cell didn't staining with GSL-II-FITC.

本研究从小鼠胸腺上皮细胞中克隆 NCAM-140 基因，构建了真核表达载体 pcDNA3.1(+)/NCAM-140。将该重组载体转染 IdID-14 细胞，成功筛选到过表达 NCAM-140 的单克隆转染细胞株，用 Western blotting 检测验证了 NCAM-140 的表达（图 3A）。通过对 IdID-14/NCAM-140 细胞进行凝集素染色显示，该细胞在含有 Gal 和 GalNAc 的培养基中培养后，IdID-14 细胞中有缺陷的糖链能完全被修复（图 4A 和 4B）。此外，如图 3B 所示，分别在含有 5% FBS、ITS、ITS+Gal 和 ITS+Gal+GalNAc 的培养条件下分别对 NCAM-140 分子量大小的

检测结果也间接说明：可以利用 IdID-14 细胞的特点调控 NCAM 分子上 N-聚糖的延长，最终实现对 NCAM 多聚唾液酸化的控制，为后续对 PSA 的研究提供理想的细胞模型。

PSA 主要附着在 NCAM 分子上，PSA 在胚胎发育时期表达量较高，在成人组织中表达较少，而且其表达也局限于脑部神经组织^[19-20]，但在某些特定脑区如嗅球和海马，PSA 的表达水平仍然很高^[21]。NCAM 上的 PSA 对神经细胞迁移、轴突生长、生物节律的控制、神经可塑性记忆的形成都有一定影响^[22-23]，而且在嗅球形成中也起重要作用^[21]。表达无唾液酸修饰

NCAM 的小鼠表现出神经轴突生长减弱, 免疫力低下, 甚至无法发育生长^[24-25], 说明了 PSA 在大脑发育中的重要作用。此外, 在一些恶性肿瘤组织中, 如成神经细胞瘤、肾母细胞瘤等也发现了 PSA 的高表达, 高表达的 PSA 可以显著促进癌细胞的分离、浸润和转移^[24,26]。

近来, Lehembre^[15]等发现 NMuMG 和 MCF7 细胞在发生 EMT 时, NCAM 的表达显著上升, 其亚细胞定位改变, 并与 P59^{F_{yn}} 结合后激活了 FAK 激酶介导的信号通路, 而阻碍了 FGFs 介导的 PLC γ /PKC α 和 Ras/Raf/MAPK 信号通路, 提高细胞的侵袭与迁移能力。EMT 是肿瘤细胞恶性增殖及转移的重要过程, 而 NCAM 以及 NCAM 上的 PSA 链都与癌细胞的浸润和转移相关, 因此研究 NCAM 上的 PSA 以及 PSA 对 NCAM 功能的影响, 将有助于深入了解 PSA 及 NCAM 在癌症发生及转移中的作用。由于 PSA 是与 N-聚糖末端的 Gal 形成糖苷键而连接在 NCAM 上的, 所以, 本研究构建的 IdID-14/NCAM-140 细胞模型, 可以通过在基本培养基中调节 Gal 浓度的大小以方便地操纵 NCAM 上 PSA 链的合成, 该实验模型为进一步研究 PSA 的修饰以及 PSA 链的长短对 NCAM 介导的细胞粘附及相关信号通路影响的研究提供了良好的基础。

REFERENCES

- [1] Jin C. Glycobiology-essential for discovery of gene's function. J Grad School Chin Acad Sci, 2001, 18(1): 66-75 (in Chinese).
金城. 糖生物学——破解基因组功能的必由之路. 中国科学院研究生院学报, 2001, 18(1): 66-75.
- [2] Kingsley DM, Kozarsky KF, Hobbie L, et al. Reversible defects in O-linked glycosylation and LDL receptor expression in a UDP-Gal/UDP-GalNAc 4-epimerase deficient mutant. Cell, 1986, 44: 749-759.
- [3] 燕秋. 第三章 糖复合物[EB/OL]. [2014-01-25]. <http://61.187.179.69/ec2006/C26/Course/Content/N85/200505111617.htm>.
- [4] Hildebrandt H, Mühlenhoff M, Gerardy-Schahn R. Polysialylation of NCAM. Adv Exp Med Biol, 2010, 663: 95-109.
- [5] Li J, Dai G, Cheng YB, et al. Polysialylation promotes NCAM-mediated cell migration in an FGFR-dependent manner, but independent of adhesion capability. Glycobiology, 2011, 21(8): 1010-1018.
- [6] Geyer H, Bahr U, Liedtke S, et al. Core structures of polysialylated glycans present in neural cell adhesion molecule from newborn mouse brain. Eur J Biochem, 2001, 268(24): 6587-6599.
- [7] von der Ohe M, Wheeler SF, Wuhler M, et al. Localization and characterization of polysialic acid-containing N-linked glycans from bovine NCAM. Glycobiology, 2002, 12(1): 47-63.
- [8] Kleene R, Schachner M. Glycans and neural cell interactions. Nat Rev Neurosci, 2004, 5(3): 195-208.
- [9] Gascon E, Vutskits L, Kiss JZ. Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. Brain Res Rev, 2007, 56(1): 101-118.
- [10] Kiss JZ, Rougon G. Cell biology of polysialic acid. Curr Opin Neurobiol, 1997, 7(5): 640-646.
- [11] Yang P, Major D, Rutishauser U. Role of charge and hydration in effects of polysialic acid on molecular interactions on and between cell membranes. J Biol Chem, 1994, 269(37): 23039-23044.
- [12] Johnson CP, Fujimoto I, Rutishauser U, et al. Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion. J Biol Chem, 2005, 280(1): 137-145.
- [13] Fujimoto I, Bruses JL, Rutishauser U. Regulation of cell adhesion by polysialic acid: effects on cadherin, immunoglobulin cell adhesion molecule,

- and integrin function and independence from neural cell adhesion molecule binding or signaling activity. *J Biol Chem*, 2001, 276(34): 31745–31751.
- [14] Prag S, Lepekhin EA, Kolkova K, et al. NCAM regulates cell motility. *J Cell Sci*, 2002, 115: 283–292.
- [15] Lehembre F, Yilmaz M, Wicki A, et al. NCAM-induced focal adhesion assembly: a functional switch upon loss of E-cadherin. *EMBO J*, 2008, 27: 2603–2615.
- [16] Kingsley DM, Krieger M. Receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein: somatic cell mutants define multiple genes required for expression of surface receptor activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(17): 5454–5458.
- [17] Ono M, Handa K, Withers DA, et al. Motility inhibition and apoptosis are induced by metastasis-suppressing gene product CD82 and its analogue CD9, with concurrent glycosylation. *Cancer Res*, 1999, 59: 2335–2339.
- [18] Jin C. Glycobiology: the extension of genomics and proteomics. *World Sci-tech R & D*, 2001, 23(2): 31–34 (in Chinese).
金城. 糖生物学: 基因组学和蛋白质组学的延伸. *世界科技研究与发展*, 2001, 23(2): 31–34.
- [19] Seki T, Arai Y. Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci Res*, 1993, 17(4): 265–290.
- [20] Theodosis DT, Rougon G, Poulain DA. Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: polysialylated neural cell adhesion molecule in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(13): 5494–5498.
- [21] Brusés JL, Rutishauser U. Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development. *Biochimie*, 2001, 83(7): 635–643.
- [22] Stummeyer K, Dickmanns A, Mühlenhoff M, et al. Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12(1): 90–96.
- [23] Yamamoto N, Inui K, Matsuyama Y, et al. Inhibitory mechanism by polysialic acid for lamina-specific branch formation of thalamocortical axons. *J Neurosci*, 2000, 20(24): 9145–9151.
- [24] Weinhold B, Seidenfaden R, Röckle I, et al. Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem*, 2005, 280(52): 42971–42977.
- [25] Angata K, Huckaby V, Ranscht B, et al. Polysialic acid-directed migration and differentiation of neural precursors are essential for mouse brain development. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(19): 6659–6668.
- [26] Câmara J, Jarai G. Epithelial-mesenchymal transition in primary human bronchial epithelial cells is Smad-dependent and enhanced by fibronectin and TNF-alpha. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 2010, 3: 2.

(本文责编 郝丽芳)