

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.27.004

脉络膜黑色素瘤中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达的研究*

闫冰 任凌 罗莎 李眉 戴皓洁[△]

(首都医科大学附属北京同仁医院核医学科 北京 100730)

摘要 目的:整合素 $\alpha_v\beta_3$ 为整合素家族成员之一,是一类跨膜粘附分子,其在多种肿瘤细胞及新生内皮血管细胞中高表达而在成熟血管内皮、上皮细胞及正常细胞中表达较低或无表达。基于这些特征,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 近年来成为分子影像研究的热点之一。鉴于整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在人眼脉络膜黑色素瘤中是否存在表达尚不可知,本课题拟研究整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在人脉络膜黑色素瘤中表达情况,为以整合素 $\alpha_v\beta_3$ 为基础的分子显像提供理论基础。**方法:**培养人源脉络膜黑色素瘤细胞株 OCM-1,使用蛋白免疫印迹方法检测整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在 OCM-1 中表达水平,并使用免疫组化方法检测人脉络膜黑色素瘤病理切片中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达分布。**结果:**蛋白免疫印迹实验表明在 OCM-1 细胞株中存在整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达,其表达水平介于已知高表达整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的头颈鳞癌细胞株 HEP-2 和较低表达整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的头颈鳞癌细胞株 CNE-1 之间,免疫组化方法检测人脉络膜黑色素瘤病理切片中也存在整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达。**结论:**人脉络膜黑色素瘤中具有整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达,可以为后期研究基于整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的分子显像技术提供依据。

关键词: 脉络膜黑色素瘤;整合素 $\alpha_v\beta_3$; OCM-1

中图分类号: R739.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)27-5210-03

The Expression of Integrin $\alpha_v\beta_3$ in Choroidal Melanoma*

YAN Bing, REN Ling, LUO Sha, LI Mei, DAI Hao-jie[△]

(Department of Nuclear Medicine, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100730, China)

ABSTRACT Objective: Integrin $\alpha_v\beta_3$, a member of integrin family, is a kind of trans-membrane adhesion molecule and is highly expressed on various types of tumor cells and the activated endothelial cells but not at all or very little on the mature vascular endothelial, epithelial cells and other normal cells. Based on these characters, integrin $\alpha_v\beta_3$ is becoming one of the most focused molecular imaging research targets in recent years. Considering the fact that the expression of integrin $\alpha_v\beta_3$ in human choroidal melanoma is unknown, the study was designed to evaluate the expression of integrin $\alpha_v\beta_3$ in human choroidal melanoma, which could be the basis of following investigation of imaging targeting integrin $\alpha_v\beta_3$. **Methods:** The expression of integrin $\alpha_v\beta_3$ of OCM-1 cell line was determined by western blot and immunohistochemistry was used to detect the expression of integrin $\alpha_v\beta_3$ of choroidal melanoma histology slides. **Results:** Integrin $\alpha_v\beta_3$ was detected in OCM-1 cell line using western blot. The expression level of integrin $\alpha_v\beta_3$ in OCM-1 is between that level of HEP-2 (human laryngeal cancer cells with highly expression of integrin $\alpha_v\beta_3$) and CNE-1 (human nasopharyngeal cancer cells with low expression of integrin $\alpha_v\beta_3$). Immunohistochemical staining of choroidal melanoma histology slides also shows the expression of integrin $\alpha_v\beta_3$. **Conclusion:** Integrin $\alpha_v\beta_3$ was expressed in choroidal melanoma, which could illuminate the further study of imaging targeting integrin $\alpha_v\beta_3$.

Key words: Choroidal melanoma; Integrin $\alpha_v\beta_3$; OCM-1

Chinese Library Classification: R739.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)27-5210-03

前言

脉络膜黑色素瘤(choroidal melanoma)是成年人发生率很高的眼内原发性恶性肿瘤^[1]。由于其恶性程度高,不仅可致患者视力丧失,更威胁患者的生命,即使在未明确转移前摘除眼球,其5年死亡率仍有17%~53%^[2]。目前常用的诊断方法多为形态学检查^[3,4],功能学检查较少。脉络膜黑色素瘤的治疗包括手术摘除眼球或使用敷贴治疗、温热治疗等保眼球治疗^[5],对于保眼

球治疗患者,由于不切除肿瘤,对其进行治疗后监测格外必要。由于肿瘤的侵袭能力与其大小不完全相关,除采用形态学显像外,功能学显像也不可或缺。而功能显像监测疗效的前提是,有合适的显像分子来评价肿瘤的发生发展。

整合素 $\alpha_v\beta_3$ 是近年发现的比较优越的分子显像位点。整合素 $\alpha_v\beta_3$ 是整合素家族的一员,整合素家族是一组粘附分子,介导细胞与细胞间及细胞与胞外基质间的相互作用。整合素家族成员均是由两条多肽链(α 链和 β 链)组成的异源二聚体跨膜

* 基金项目:首都医科大学临床科研合作课题基金项目(12JL88)

作者简介:闫冰(1983-),女,博士,技师,主要研究方向:核医学与分子影像,E-mail: ice_490@163.com

[△] 通讯作者:戴皓洁,E-mail: daihj@trhos.com

(收稿日期:2013-10-18 接受日期:2013-11-16)

糖蛋白分子,目前发现近 20 种 α 链和 11 种 β 链,组成 25 种以上不同的整合素分子,其中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 作为明星分子备受关注,其在成熟血管内皮及上皮细胞表达较低或无表达,而在多种肿瘤细胞和新生血管内皮细胞呈现高表达^[6]。整合素 $\alpha_v\beta_3$ 通过介导血管内皮细胞迁移和维持细胞活性以促进肿瘤新生血管生成,为肿瘤提供生长所需的氧气和营养,从而介导肿瘤细胞突破血管、侵袭、转移^[6,7]。精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp,RGD)三肽序列可以特异性与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体结合^[8,9]。因此,使用核素标记 RGD 肽就可表征肿瘤内整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的表达量。各种放射性标记的 RGD 肽已经成为正电子发射断层扫描(PET)或单光子发射断层扫描(SPECT)的示踪剂^[10-13]。

脉络膜黑色素瘤中是否表达整合素 $\alpha_v\beta_3$ 尚不明确,本研究拟研究脉络膜黑色素瘤细胞株及病理切片中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的表达情况,为以整合素 $\alpha_v\beta_3$ 为靶点的分子影像研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株、组织切片和试剂

永生化人脉络膜黑色素瘤细胞株 OCM-1 由首都医科大学附属北京同仁医院眼科研究所赠送;永生化人喉鳞癌细胞株 HEP-2 和人鼻咽鳞癌细胞株 CNE-1 购自中国医学科学院细胞库;人脉络膜黑色素瘤病理切片来源于首都医科大学附属北京同仁医院病理科;RPMI-1640 培养基、小牛血清、青霉素/链霉素(GIBCO);电泳 SDS-PAGE 缓冲液、转膜缓冲液、上样缓冲液、 β -actin 抗体(北京康为世纪);电泳仪及转膜仪(Biorad);整合素 $\alpha_v\beta_3$ 抗体(北京博奥森生物)。

1.2 细胞培养

将 OCM-1 细胞及用于对照实验的人头颈鳞癌细胞 HEP-2、CNE-1 常规培养于含 10% 小牛血清和 1% 青、链霉素双抗的 RPMI-1640 培养基中,置于 5% CO_2 、饱和湿度、37℃ 培养箱中孵育。

1.3 蛋白免疫印迹实验

细胞生长至汇合度为 70%-80%,用 0.25% 的胰蛋白酶消化,500×g 离心 10 min,用预冷的 PBS 冲洗 3 次,加入 RIPA 细胞裂解液[含 50 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT),2% 十二烷基硫酸钠(SDS),0.1% 溴酚蓝,10% 甘油,pH6.8]。细胞样品在 7% SDS 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,电泳结束后将蛋白转移至硝酸纤维素膜,用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭 1 h,在封闭液中加入一抗,4℃ 过夜,用 PBS 冲洗 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温 1 h。用化学发光检测系统检测。使用 ImageJ 软件对条带定量,以整合素定量值/ β -actin 定量值作为整合素相对定量值。

1.4 病理切片整合素 $\alpha_v\beta_3$ 免疫组化染色

整合素 $\alpha_v\beta_3$ 单抗的工作浓度为 1:200。 $\alpha_v\beta_3$ 表达半定量分析参照 Fromowitz^[14]法,光镜下以细胞膜或细胞浆出现明显的棕褐色颗粒为阳性,无着色或与背景色一致为阴性。每张切片按阳性着色强度评分:无着色为 0 分,浅棕褐色为 1 分,棕褐色为 2 分,深棕褐色为 3 分;完全随机选取 5 个高倍视野($\times 400$

倍)按阳性细胞百分率评分,无阳性细胞为 0 分,1%-25% 为 1 分,26%-49% 为 2 分, $\geq 50\%$ 为 3 分, $>80\%$ 为 4 分。着色强度和阳性细胞百分率评分相加的结果为表达评分。

1.5 统计学处理

用 SPSS 11.0 软件处理实验资料,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,两组间计量资料比较采用 T-test 检验, $P<0.05$ 视为有显著统计学意义。

2 结果

2.1 OCM-1 细胞中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达的研究

图 1 所示为 OCM-1 细胞中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达,以 HEP-2 和 CNE-1 细胞做为对照,在前期实验中,我们已经证实这两种细胞株中表达整合素 $\alpha_v\beta_3$,且在 HEP-2 中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达高于 CNE-1^[13],三次独立重复实验定量分析表明,OCM-1 细胞中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达量低于 HEP-2,而高于 CNE-1 细胞表达量($P<0.05$)。

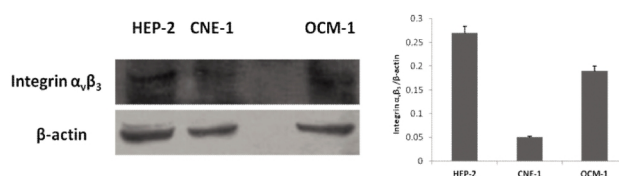


图 1 HEP-2、CNE-1 和 OCM-1 中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的表达

Fig. 1 The expression of integrin $\alpha_v\beta_3$ in HEP-2, CNE-1 and OCM-1

2.2 人脉络膜黑色素瘤病理切片中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达的研究

图 2 所示人脉络膜黑色素瘤组织大部分区域均可见较多棕褐色颗粒,其分布较均匀,Fromowitz 法评分为 3.71 ± 0.36 ,对比前期实验中皮下接种 HEP-2 和 CNE-1 的荷瘤鼠病理切片中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达^[13],可以认为人脉络膜黑色素瘤肿瘤组织 $\alpha_v\beta_3$ 表达为中等水平。

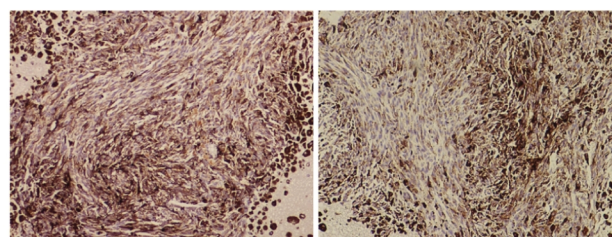


图 2 脉络膜黑色素瘤病理切片整合素 $\alpha_v\beta_3$ 免疫组化染色($\times 100$)

Fig. 2 Immunohistochemistry of human choroidal melanoma ($\times 100$)

3 讨论

整合素 $\alpha_v\beta_3$ 已经被证明在多种肿瘤中存在表达^[16-18],而在人脉络膜黑色素瘤中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达情况尚不可知。本研究采用蛋白免疫印迹及免疫组化两种方法,对人脉络膜黑色素瘤中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达情况进行探讨。蛋白免疫印迹表明整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在 OCM-1 细胞株中存在表达,且表达水平介于整合素 $\alpha_v\beta_3$ 高表达头颈鳞癌细胞株 HEP-2 及低表达细胞株 CNE-1 之

间,免疫组化方法也表明在人脉络膜黑色素瘤病理切片中存在整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达。

做为分子显像的明星分子,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 已经被证明能够鉴别诊断多种肿瘤^[19-21],其是否能够应用于人脉络膜黑色素瘤的鉴别诊断尚有待研究。在前期研究中我们报道,使用 SPECT 对荷头颈鳞癌肿瘤鼠进行平面显像时肿瘤计数 / 正常组织计数值与体内放射性分布实验结果相符,并与免疫组化染色所示的 $\alpha_v\beta_3$ 表达水平呈正相关,说明前期实验中所使用的 ^{99m}Tc 标记的 RGD 显像剂能够准确反映肿瘤 $\alpha_v\beta_3$ 表达水平,即能够成为检测肿瘤 $\alpha_v\beta_3$ 表达的可靠方法^[15]。鉴于 OCM-1 细胞中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达量介于 HEP-2 与 CNE-1 细胞表达量之间,我们将采用动物模型进行进一步实验以研究放射性核素标记的 RGD 显像剂是否能够较好的监测荷人脉络膜黑色素瘤肿瘤鼠中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达水平。

本实验选用的病理切片较少,且缺乏随访数据,因此无法判断整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在脉络膜黑色素瘤发生的初期即有表达还是在转移瘤中才高表达,这需要在后续研究加以探讨。此外,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在脉络膜黑色素瘤中的功能也需要加以研究。

综上所述,本研究首次阐明整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在 OCM-1 细胞中及人脉络膜黑色素瘤病理切片中存在表达,为接下来进行整合素 $\alpha_v\beta_3$ 显像动物实验提供了理论依据。由于脉络膜黑色素瘤的治疗已经从早期单纯摘除眼球发展到采用多种治疗方法以保留视力,如果在进一步的临床前及临床实验中能够证实整合素 $\alpha_v\beta_3$ 分子影像鉴别诊断的有效性,将为脉络膜黑色素瘤的治疗及预后提供新的检测手段。

致谢:感谢首都医科大学附属北京同仁医院眼科研究所赠送 OCM-1 细胞株

参考文献(References)

- [1] Parul S, Abhishek S. Choroidal melanoma [J]. Oman J Ophthalmol, 2012, 5(1): 3-9
- [2] 魏文斌. 进一步提高我国脉络膜黑色素瘤的诊断治疗水平[J]. 中华眼底病杂志, 2006, 22: 147-149
Wei Wen-bin. More efforts should be made to improve the level of diagnosis and treatment of choroidal melanoma [J]. Chinese Journal Of Ocular Fundus Diseases, 2006, 22: 147-149
- [3] Blanco G. Diagnosis and treatment of orbital invasion in uveal melanoma[J]. Can J Ophthalmol, 2004, 39(4):388-396
- [4] Shields JA, Shields CL, De Potter P, et al. Diagnosis and treatment of uveal melanoma[J]. Semin Oncol, 1996, 23(6): 763-767
- [5] Pereira PR, Odashiro AN, Lim LA, et al. Current and emerging treatment options for uveal melanoma [J]. Clin Ophthalmol, 2013, 7: 1669-1682
- [6] Varner JA, Cheres DA, Cheres DA. Integrins and cancer [J]. Curr Opin Cell Biol, 1996, 8(5): 724-730
- [7] Hood JD, Cheres DA. Role of integrins in cell invasion and migration [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(2): 91-100
- [8] Ruoslahti E, Pierschbacher MD. Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal[J]. Cell, 1986, 44(5): 517-518
- [9] Smith JW, Cheres DA. Integrin (alpha v beta 3)-ligand interaction. Identification of a heterodimeric RGD binding site on the vitronectin receptor[J]. J Biol Chem, 1990, 265(4): 2168-2172
- [10] Shi J, Wang L, Kim YS, et al. ^{99m}TcO (MAG2-3G3-dimer): a new integrin $\alpha_v\beta_3$ -targeted SPECT radiotracer with high tumor uptake and favorable Pharmacokinetics [J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2009, 36(11): 1874-1884
- [11] Liu S, Liu Z, Chen K, et al. ^{18}F -labeled galacto and PEGylated RGD dimers for PET imaging of $\alpha_v\beta_3$ integrin expression [J]. Mol Imaging Biol, 2010, 12(5): 530-538
- [12] Aung W, Jin ZH, Furukawa T, et al. Micro-Positron Emission Tomography/Contrast-Enhanced Computed Tomography Imaging of Orthotopic Pancreatic Tumor-Bearing Mice Using the $\alpha_v\beta_3$ Integrin Tracer ^{64}Cu -Labeled Cyclam-RAFT-c(-RGDfK)-4[J]. Mol Imaging, 2013, 12(6): 376-387
- [13] Dijkgraaf I, Terry SY, McBride WJ, et al. Imaging integrin alpha-v-beta-3 expression in tumors with an ^{18}F -labeled dimeric RGD peptide[J]. Contrast Media Mol Imaging, 2013, 8(3): 238-245
- [14] Fromowitz FB, Viola MV, Chao S, et al. Ras P21 expression in the progression of breast cancer[J]. Humen Pathol, 1987, 18: 1268-1275
- [15] 王峰, 任凌, 李眉, 等. 喉和鼻咽鳞状细胞癌整合素 $\alpha_v\beta_3$ 放射性核素显像实验研究 [J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2012, 32(2): 143-147
Wang Feng, Ren Ling, Li Mei, et al. Radionuclide imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ in nude mice with laryngeal and nasopharyngeal squamous cell carcinoma [J]. Chinese Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2012, 32(2): 143-147
- [16] Gehlsen KR, Davis GE, Sriramara P. Integrin expression in human melanoma cells with differing invasive and metastatic properties[J]. Clin Exp Metastasis, 1992, 10(2): 111-120
- [17] Liapis H, Flath A, Kitazawa S. Integrin alpha V beta 3 expression by bone-residing breast cancer metastases[J]. Diagn Mol Pathol, 1996, 5 (2): 127-135
- [18] Gladson CL. Expression of integrin alpha v beta 3 in small blood vessels of glioblastoma tumors [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1996, 55(11):1143-1149
- [19] Zhu ZH, Miao WB, Li QW, et al. ^{99m}Tc -3PRGD2 for integrin receptor imaging of lung cancer: a multicenter study [J]. J Nucl Med, 2012, 53(5): 716-722
- [20] Ma Q, Ji B, Jia B, et al. Differential diagnosis of solitary pulmonary nodules using ^{99m}Tc -3P4-RGD2 scintigraphy [J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2011, 38: 2145-2152
- [21] Axelsson R, Bach-Gansmo T, Castell-Conesa J, et al. An open-label, multi-center, phase 2a study to assess the feasibility of imaging metastases in late-stage cancer patients with the $\alpha_v\beta_3$ -selective angiogenesis imaging agent ^{99m}Tc -NC100692[J]. Acta Radiol, 2010, 51: 40-46