

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.06.010

· 基础研究 ·

乙酰肝素酶对卵巢癌细胞侵袭和黏附的影响

陈泓¹, 李力², 张玮¹, 王琪¹, 黎丹戎¹ (1. 广西医科大学第一附属医院妇产科, 广西壮族自治区南宁530022; 2. 广西医科大学附属肿瘤医院妇瘤科, 广西壮族自治区南宁, 530021)

[摘要] 目的: 探讨乙酰肝素酶(heparanase, HPSE)在卵巢癌 A2780 细胞侵袭、转移中的作用。方法: 构建携 HPSE 基因真核表达载体 pcDNA3.1-HPSE, 脂质体法将 pcDNA3.1-HPSE 和对照 pcDNA3.1 质粒转染至 A2780 细胞, G418 筛选得稳定细胞株 pcDNA3.1-HPSE-A2780 和 pcDNA3.1-A2780。MTT 法和集落形成实验检测转染后 A2780 细胞的增殖; Matrigel 侵袭、Transwell 小室和黏附实验检测转染后 A2780 细胞的侵袭、迁移和黏附能力。结果: 成功构建 pcDNA3.1-HPSE 载体, 并转入 A2780 细胞。pcDNA3.1-HPSE 转染不影响 A2780 细胞的增殖 ($P > 0.05$), 也不影响 A2780 细胞的迁移能力 ($P > 0.05$)。pcDNA3.1-HPSE 转染促进 A2780 细胞的侵袭 (0.477 ± 0.024 vs 0.250 ± 0.081 , $P = 0.003$), 降低其黏附能力 (0.728 ± 0.089 vs 0.518 ± 0.080 , $P = 0.002$)。结论: HPSE 通过促进肿瘤细胞的侵袭和降低黏附, 在卵巢上皮癌浸润、转移中发挥重要作用。

[关键词] 乙酰肝素酶; 卵巢癌; 侵袭; 迁移; 黏附

[中图分类号] R737.31; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)06-0639-05

Heparanase promotes invasion and adhesion of ovarian carcinoma cells

CHEN Hong¹, LI Li², ZHANG Wei¹, WANG Qi¹, LI Dan-rong¹ (1. Department of Gynecology and Obstetrics, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530022, Guangxizhuang Autonomous Region, China; 2. Department of Gynecology Oncology, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi zhuang Autonomous Region, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the roles of heparanase (HPSE) in the invasion and metastasis of human ovarian carcinoma A2780 cells. **Methods:** pcDNA3.1-HPSE eukaryotic expression vector was constructed. pcDNA3.1-HPSE and empty pcDNA3.1 plasmids were transfected into A2780 cells by Lipofectamine method, and A2780 cells stably expressing pcDNA3.1-HPSE or pcDNA3.1 were selected by G418 (named pcDNA3.1-HPSE-A2780 or pcDNA3.1-A2780 cells). The proliferation of A2780 cells after pcDNA3.1-HPSE transfection was detected by MTT and clone-forming experiment, and the invasion, migration and adhesion capacities of A2780 cells were tested by Matrigel, Transwell and Adhesion assays, respectively. **Results:** The pcDNA3.1-HPSE vector was successfully constructed and transfected into A2780 cells. pcDNA3.1-HPSE transfection had no effect on proliferation and migration of A2780 cells (all $P > 0.05$). pcDNA3.1-HPSE transfection increased invasion (0.477 ± 0.024 vs 0.250 ± 0.081 , $P = 0.003$) and inhibited the adhesion of A2780 cells (0.728 ± 0.089 vs 0.518 ± 0.080 , $P = 0.002$). **Conclusion:** Heparanase plays important roles in ovarian carcinoma by promoting invasion and inhibiting adhesion of tumor cells.

[Key words] heparanase; ovarian carcinoma; invasion; migration; adhesion

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(6): 639-643]

卵巢癌的发病率在女性生殖道恶性肿瘤中位居第3位, 病死率高居首位, 60% ~ 70% 的卵巢癌患者在就诊时病情已为晚期^[1]。在过去的20年中, 虽然手术技术和化疗方案不断进步, 但是卵巢癌患者总体治愈率一直徘徊在30%左右^[2]。乙酰肝素酶(heparanase, HPSE)基因定位于4号染色体q21.3, 是目前已知体内唯一能够降解硫酸乙酰肝素蛋白多聚糖(heparin sulphate proteoglycan, HSPG)的

[基金项目] 广西科技厅广西自然科学基金资助项目(No. 2010GXNSFA013142)。Project Supported by the Guangxi Natural Science Foundation of Science and Technology Bureau in Guangxizhuang Autonomous Region (No. 2010GXNSFA013142)

[作者简介] 陈泓(1971-), 女, 上海市人, 硕士, 主要从事妇科肿瘤研究。E-mail: chen hong200502@yahoo.com.cn

[通信作者] 李力(LI Li, corresponding author), E-mail: lili@gxmu.net.cn

β -D-葡萄糖醛酸内切酶,可识别并切断 HSPG 的多糖侧链-硫酸肝素链(heparan sulfate, HS),破坏细胞外基质稳定性^[3],并释放结合在细胞外基质和基底膜上的多种生长因子和酶(如 bFGF、PDGF、VEGF 等)^[4]。已有研究^[5]证实,HPSE 在肿瘤浸润转移过程中起着极其重要的作用。本课题旨在进一步探讨 HPSE 在卵巢癌 A2780 细胞转移过程中的作用,为卵巢癌的诊断和治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

卵巢癌细胞系 A2780、SKOV3 和 HO-8910 购于上海细胞生物所,由本实验室保存。HO-8910pm 为由本实验室构建的耐卡铂卵巢癌细胞系,SKOV3-SB 为耐顺铂卵巢癌细胞系。Lipofectamine™ 2 000 购于美国 Invitrogen 公司,Transwell 小室购于美国 Corning Costar 公司,兔抗鼠 HPSE 蛋白多克隆抗体购于 Santa Cruz 公司,GAPDH 购于上海康成生物公司,化学底物发光系统购于美国 Pierce 公司,TRIzol 试剂盒购于 Invitrogen 公司。逆转录试剂盒购于 MBI Fermentas 公司,质粒提取试剂盒购于 Omega Bio-tek 公司,表达载体 pcDNA3.1 购于 Invitrogen 公司,pEGFP-N1 购于 Clontech 公司。大肠杆菌 DH-5 α 由本实验室保存。

1.2 pcDNA3.1-HPSE 真核表达质粒的构建

根据 Genebank 上人类 HPSE mRNA (NM_006665)序列设计引物,引物序列如下:正义为 5'-CCGCTCGAGATGCTGTGCGCTCGAAG-3',反义 5'-CCGGAATTCATTTTCAGATGCAAGCAG-3'。TRIzol 一步法提取卵巢浆液性乳头状腺癌组织总 RNA,RT-PCR 法扩增全长 HPSE cDNA。PCR 产物行 1% 琼脂糖电泳,回收并纯化 PCR 产物。内切酶 Xho I 和 EcoR I 分别酶切 PCR 产物和 pcDNA3.1, T4 DNA 连接酶的作用下连接,然后转化感受态大肠杆菌,涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板,37 °C 培养过夜。挑选单克隆细菌,37 °C 继续振荡培养过夜,扩增阳性细菌,质粒提取试剂盒提取质粒 pcDNA3.1-HPSE。Bgl II 酶切鉴定 pcDNA3.1-HPSE,酶切阳性质粒送测序验证。

1.3 RT-PCR 法检测卵巢癌细胞中 HPSE mRNA 的表达

采用 RT-PCR 方法,PCR 条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 30 s,67 °C 30 s,72 °C 2 min 1 个循环;94 °C 30 s,64 °C 30 s,72 °C 2 min 1 个循环;94 °C 30 s,61 °C 30 s,72 °C 2 min 1 个循环;94 °C 30 s,

58 °C 30 s,72 °C 2 min 1 个循环;94 °C 30 s,57 °C 30 s,72 °C 2 min 30 个循环;72 °C 10 min。扩增产物 1% 琼脂糖电泳,如在 1 600 bp 处出现条带即为 HPSE mRNA。

1.4 pcDNA3.1-HPSE-A2780 细胞的建立

A2780 细胞按 1×10^5 /孔接种 24 孔板,待细胞汇合达到 80% 时, Lipofectamine™ 2 000 法转染 pcDNA3.1-HPSE 和 pcDNA3.1 质粒,培养 48 h 后加入 700 μ g/ml 的 G418 培养液。有限稀释法挑选 G418 筛选后阳性单克隆细胞(即 pcDNA3.1-HPSE-A2780 或 pcDNA3.1-A2780 细胞),并传代培养。

1.5 Western blotting 检测各组 A2780 细胞中 HPSE 蛋白的表达

采用美国 Pierce 公司提供的试剂盒,裂解细胞获得细胞总蛋白,用 SDS-PAGE 分离蛋白并电泳转移到硝酸纤维膜上,依次加入一抗(兔抗鼠 HPSE 多克隆抗体)和二抗(辣根酶标记兔抗羊 IgG),孵育后显色,结果采用 Bandscan 5.0 凝胶图像软件分析。

1.6 各组 A2780 细胞增殖能力的检测

将 HPSE-pcDNA3.1-A2780 和 pcDNA3.1-A2780 细胞制成单个细胞悬液,接种至 96 孔板,37 °C 培养 24 h 后,每天任意挑选 3 个孔,每孔加入 MTT 溶液 20 μ l,37 °C 孵育 4 h,加入 DMSO 150 μ l,酶联免疫检测仪测定各孔的光密度值(D),绘制细胞生长曲线^[4]。实验重复 3 次。

将各组细胞用 0.25% 胰酶消化后制成单个细胞悬液,按照每孔 50、100、200 个细胞的密度接种于 24 孔板(每种密度做 3 个复孔),轻轻晃动孔板,使细胞分布均匀。37 °C 培养 5~7 d,后用 PBS 洗涤、甲醇固定、姬姆萨染色。以群集 15~50 个细胞作为一个集落,显微镜下计数集落数。将 3 个复孔的结果分别计算后取平均值^[5]。

1.7 Matrigel 侵袭法检测各组 A2780 细胞体外侵袭能力

首先在 Transwell 小室上室的滤膜上铺 Matrigel,用 50 μ l 含 5 μ g FN 的 PBS 处理 Transwell 小室的聚碳酸酯膜(8 μ m 孔径)下表面,室温下过夜干燥;将 HPSE-pcDNA3.1-A2780 和 pcDNA3.1-A2780 细胞悬液分别加入上室,37 °C 培养 20~24 h。弃去培养基,轻轻擦去 Matrigel 和上室内未迁移细胞,用 90% 酒精常温固定膜 30 min,0.1% 结晶紫常温染色 10 min,FBS 清洗 3 遍,33% 冰醋酸脱色,酶标仪检测 D_{560} 值。实验重复 3 次。

1.8 Transwell 法检测各组 A2780 细胞体外迁移能力

HPSE-pcDNA3.1-A2780 和 pcDNA3.1-A2780 细

胞悬液分别加入铺有 Matrigel 的上室,37 ℃ 培养 20 ~ 24 h 后,弃去培养基,轻轻擦去 Matrigel 和上室内未迁移细胞,用 90% 酒精常温固定膜 30 min,0.1% 结晶紫常温染色 10 min,FBS 清洗 3 遍,33% 冰醋酸脱色,酶标仪检测 D_{560} 值。实验重复 3 次。

1.9 黏附实验检测各组 A2780 细胞黏附能力

采用 24 孔 Transwell 小室(孔径 8 μm),孔板用 FN 进行预处理,使用前 1% BSA 封闭结合位点,加入 HPSE-pcDNA3.1-A2780 和 pcDNA3.1-A2780 细胞悬液,37 ℃ 培养 60、90 min 后,洗去未黏附的细胞。每组重复 5 次。

1.10 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS10.0 软件进行数据的分析,组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢癌组织 HPSE 扩增产物电泳鉴定结果

卵巢癌组织中 HPSE 的 PCR 结果(图 1)显示,扩增产物为 1 636 bp,符合预期 HPSE cDNA 全长。因此,成功从卵巢癌组织中扩增出 HPSE 全长基因。

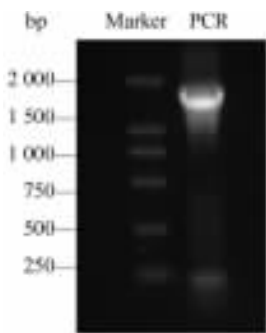


图 1 卵巢癌组织 HPSE 扩增产物电泳结果
Fig.1 Gel electrophoresis of PCR products of HPSE in ovarian carcinoma tissues

2.2 pcDNA3.1-HPSE 质粒酶切和测序鉴定结果

pcDNA3.1 质粒长度为 5 500 bp,HPSE 长度为 1 632 bp,pcDNA3.1-HPSE 质粒长度为 7 136 bp。pcDNA3.1-HPSE 质粒在 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切后电泳,结果可见 1 632 bp 和 5 500 bp 左右两条条带(图 2)。pcDNA3.1-HPSE 质粒 DNA 质粒送北京诺赛基因组研究中心有限公司测序,结果与 Gene Bank 上公布的 HPSE 序列一致。

2.3 卵巢癌细胞中 HPSE 基因的表达

RT-PCR 结果(图 3)显示,卵巢癌 A2780 细胞

和 SKOV3-SB 细胞均无 HPSE 基因表达,HO-8910、HO-8910pm、及 SKOV3-KB、SKOV3 细胞均检测到有 HPSE 基因表达。因此本研究选择无 HPSE 基因表达的 A2780 细胞作为研究对象,可以更直观研究 HPSE 基因功能。

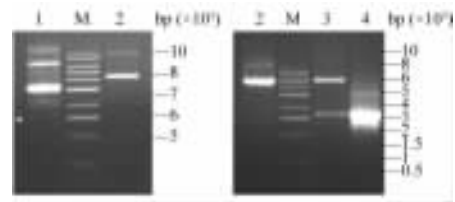


图 2 pcDNA3.1-HPSE 质粒酶切和 PCR 鉴定
Fig.2 Identification of pcDNA3.1-HPSE plasmid by restriction enzyme digestion and PCR
M: Marker; 1: pcDNA3.1-HPSE; 2: pcDNA3.1; 3: HPSE; 4: pcDNA3.1-HPSE digested by *Xho* I and *Eco*R I

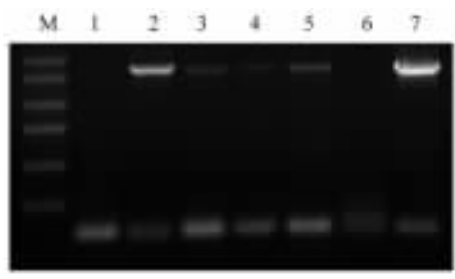


图 3 不同卵巢癌细胞中 HPSE 基因的表达情况
Fig.3 HPSE gene expression in different ovarian carcinoma cell lines

M: Marker; 1: A2780 cells; 2: HO-8910 cells; 3,4: HO-8910pm cells; 5: SKOV3-KB cells; 6: SKOV3-SB cells; 7: SKOV3 cells

2.4 pcDNA3.1-HPSE 转染对 A2780 细胞 HPSE 蛋白表达的影响

pcDNA3.1-HPSE 转染前 A2780 细胞中 HPSE 蛋白表达为阴性,pcDNA3.1-HPSE 转染后 A2780 细胞阳性表达 HPSE 蛋白,而转染 pcDNA3.1 质粒的 A2780 细胞不表达 HPSE 蛋白(图 4)。

2.5 pcDNA3.1-HPSE 转染对 A2780 细胞生长的影响

pcDNA3.1-HPSE-A2780 组细胞的集落形成率为 $(31.3 \pm 0.7)\%$,pcDNA3.1-A2780 组细胞为 $(26.1 \pm 16.4)\%$,差异无统计学意义($P = 0.422$)。pcDNA3.1-HPSE-A2780 和 pcDNA3.1-A2780 细胞生长曲线相比较,差异也无统计学意义($P = 0.312$,图 5)。因此,pcDNA3.1-HPSE 转染不影响 A2780 细胞的生长。

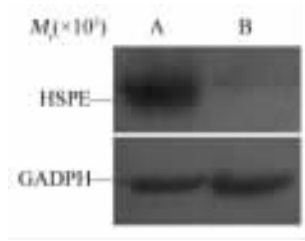


图 4 pcDNA3.1-HPSE 转染前(B)后(A) A2780 细胞 HPSE 蛋白的表达

Fig. 4 HPSE protein expression in A2780 cells before(B) and after(A) pcDNA3.1-HPSE transfection

2.6 pcDNA3.1-HPSE 转染对 A2780 细胞侵袭、迁移和黏附的影响

从表 1 可见, pcDNA3.1-HPSE-A2780 细胞的体外侵袭能力明显强于 pcDNA3.1-A2780 细胞($P = 0.003$), 而黏附能力明显低于 pcDNA3.1-HPSE-

A2780 细胞($P = 0.002$), 但两者迁移能力的差异无统计学意义($P = 0.618$)。

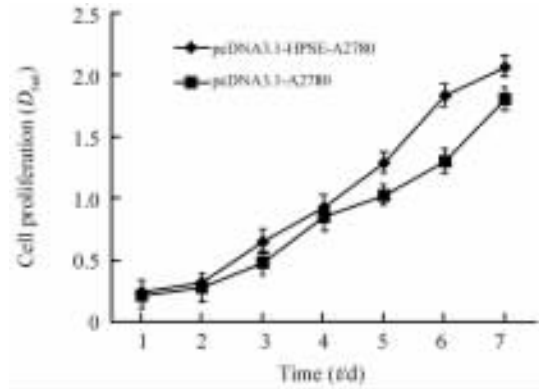


图 5 pcDNA3.1-HPSE 转染对 A2780 细胞生长的影响
Fig. 5 Effect of pcDNA3.1-HPSE transfection on growth of A2780 cells

表 1 pcDNA3.1-HPSE 转染对 A2780 细胞侵袭、迁移和黏附的影响(D_{560})

Tab. 1 Effect of pcDNA3.1-HPSE transfection on invasion, migration and adhesion of A2780 cells(D_{560})

Group	Invasion	Migration	Adhesion
pcDNA3.1-HPSE-A2780	0.477 ± 0.024	1.101 ± 0.156	0.518 ± 0.080
pcDNA3.1-A2780	0.250 ± 0.081	1.051 ± 0.124	0.728 ± 0.089
<i>P</i>	0.003	0.618	0.002

3 讨论

肿瘤转移是卵巢癌最重要的生物学特性,也是卵巢癌患者死亡的首要原因^[6]。肿瘤转移的过程较复杂,但是基本步骤基本相似,即不断重复进行的黏附-迁移-黏附。在这一过程中肿瘤细胞的迁移是一个关键因素^[7]。

HPSE 是一种 β -内源性葡萄糖醛酸酶,具有糖基水解酶 A 家族特性,其作用的底物 HSPG 普遍存在于脊柱动物和非脊柱动物的细胞外基质(ECM)和细胞表面。HSPG 参与多种生理病理活动^[8],具有稳定 ECM,限制细胞迁移、黏附和选择性分子筛作用^[9];HSPG 还是构成血管壁的成分。HPSE 作为体内目前为止唯一能够降解 HSPG 的酶,通过切断细胞外基质中结合在乙酰肝素蛋白聚糖上的侧链,破坏细胞外基质和基底膜;与此同时,结合在细胞外基质和基底膜上的多种生长因子和酶(如 bFGF、PDGF、VEGF 等)由于膜结构的破坏也释放到微环

境中,促进毛细血管生成,诱导肿瘤细胞的阿米巴运动,肿瘤细胞渗出基底膜,进入微循环,开始迁移的征程^[10]。

本研究发现,稳定转染 pcDNA3.1-HPSE 的 A2780 细胞与空载体转染的 A2780 细胞的生长曲线几近重合,这与已有研究结果并不一致^[11],这可能与采用的检测的方法和细胞株不同有关。pcDNA3.1-HPSE 转染也不影响 A2780 细胞的克隆形成率。说明 HPSE 不影响 A2780 细胞的增殖,这与 HPSE 基因本身的生物学功能一致^[12]。

本研究发现, pcDNA3.1-HPSE 质粒转染后, A2780 细胞黏附能力明显下降($P < 0.05$)。其机制可能是 HPSE 在降解基底膜后,释放并激活尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator, uPA)与组织型纤溶酶原激活物(tPA),激活 ECM 中的蛋白酶级联反应。活化的 uPA 激活细胞表面的纤溶酶原,使其转化为纤溶酶,降解肿瘤 ECM;同时尿激酶型纤溶酶原激活物受体(uroki-

nase-type plasminogen activator receptor, uPA-R) 将 uPA 限制并固定在肿瘤细胞表面, 增强 uPA-R 与细胞表面玻璃结合蛋白(vitronectin, VN)、整合素受体蛋白(integrin)的亲合力, 促进 VN、整合素受体在肿瘤局部黏附、聚集^[13]。整合素受体将信号从细胞外传到细胞内, 激活细胞内的蛋白激酶, 促进细胞分裂及迁移。因此, HPSE 使卵巢癌细胞黏附能力的下降, 与基底膜降解产生的蛋白酶级联反应有关^[14]。

本研究采用 Transwell 小室和 Matrigel 胶模拟天然基底膜结构, 研究 HPSE 对 A2780 细胞的侵袭和迁移功能的影响。结果发现, 转染 pcDNA3.1-HPSE 质粒后, A2780 细胞的侵袭能力明显提高 ($P = 0.003$), 而迁移能力未受影响 ($P = 0.618$), 这与 HPSE 在肿瘤浸润、转移中所起的作用相吻合。HPSE 在肿瘤浸润、转移中作用分为直接作用与间接作用, 其直接作用是识别 HSPG 的多糖侧链 - 硫酸肝素链的特异结构, 切断 ECM 中结合在乙酰肝素蛋白聚糖上的侧链, 降解乙酰肝素, 破坏 ECM 和基底膜^[15], 这可能是 HPSE 增强卵巢癌细胞的侵袭能力, 对迁移能力无影响的主要原因。

综上所述, 体外实验研究表明, HPSE 能够增强卵巢癌细胞的侵袭能力, 对卵巢癌细胞的增殖和转移能力均无影响。

[参 考 文 献]

- [1] Armstrong DK. Relapsed ovarian cancer: Challenges and management strategies for a chronic disease [J]. *Oncologist*, 2002, 7 (Suppl 5): 20-28.
- [2] Bast RC Jr, Hennessy B, Mills GB. The biology of ovarian cancer: New opportunities for translation [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(6): 415-428.
- [3] Hulett MD, Freeman C, Hamdorf BJ, Baker RT, Harris MJ, Parish CR. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis [J]. *Nat Med*, 1999, 5(7): 803-809.
- [4] Roy M, Marchetti D. Cell surface heparan sulfate released by heparanase promotes melanoma cell migration and angiogenesis [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 106(2): 200-209.
- [5] Paschos KA, Canovas D, Bird NC. Enzymatic function of multiple origins regulates the progression of colorectal cancer and the development of metastases [J]. *Hippokratia*, 2009, 13(1): 23-31.
- [6] Vergara D, Merlot B, Lucot JP, Collinet P, Vinatier D, Fournier I, et al. Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer [J]. *Cancer Lett*, 2010, 291(1): 59-66.
- [7] Blechschmidt K, Kremmer E, Hollweck R, Mylonas I, Höfler H, Kremer M, et al. The E-cadherin repressor snail plays a role in tumor progression of endometrioid adenocarcinomas [J]. *Diagn Mol Pathol*, 2007, 16(4): 222-228.
- [8] Patel VN, Knox SM, Likar KM, Lathrop CA, Hossain R, Eftekhari S, et al. Heparanase cleavage of perlecan heparan sulfate modulates FGF10 activity during *ex vivo* submandibular gland branching morphogenesis [J]. *Development*, 2007, 34(23): 4177-4186.
- [9] Raman K, Kuberan B. Chemical tumor biology of heparan sulfate proteoglycans [J]. *Curr Chem Biol*, 2010, 4(1): 20-31.
- [10] 崔红梅, 王海琳. HPSE 在妇科肿瘤中的研究进展 [J]. *国外医学妇产科学分册*, 2005, 32(6): 371-373.
- [11] 刘玉, 辛小燕, 严瑞兰. HPSE 基因表达对人卵巢癌细胞系侵袭转移能力的影响 [J]. *陕西医学杂志*, 2006, 35(2): 134-137.
- [12] Davidson B, Shafat I, Risberg B, Ilan N, Trope' CG, Vlodavsky I, et al. Heparanase expression correlates with poor survival in metastatic ovarian carcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 104(2): 311-319.
- [13] Ateeq B, Unterberger A, Szyf M, Rabbani SA. Pharmacological inhibition of DNA methylation induces proinvasive and prometastatic genes *in vitro* and *in vivo* [J]. *Neoplasia*, 2008, 10(3): 266-278.
- [14] Zetser A, Bashenko Y, Miao HQ, Vlodavsky I, Ilan N. Heparanase affects adhesive and tumorigenic potential of human glioma cells [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(10): 7733-7741.
- [15] Edovitsky E, Elkin M, Zcharia E, Peretz T, Vlodavsky I. Heparanase gene silencing, tumor invasiveness, angiogenesis, and metastasis [J]. *Natl Cancer Inst*, 2004, 96(16): 1219-1230.

[收稿日期] 2010-08-22

[修回日期] 2010-09-30

[本文编辑] 王莹

欢迎登陆我刊网站 www.biother.org