

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.012

· 基础研究 ·

## 肝素酶介导的肝癌细胞与血管内皮细胞黏附及穿内皮迁移

陈晓鹏, 江雯, 张文君, 崔巍 (皖南医学院附属弋矶山医院 肝胆外科, 安徽 芜湖 241001)

**[摘要]** **目的:** 探讨肝素酶(heparanase, HPSE)对肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)细胞与血管内皮细胞黏附及穿内皮迁移的影响。**方法:** 选用正常人脐静脉内皮细胞株 HUVEC-C, 肝 LO-2 细胞, 肝癌 HepG2、BEL-7402 和 HCCLM3 细胞, 用 Real-time PCR 筛选高表达 HPSE 的 HCC 细胞; 设计 4 个 HPSE 基因 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)序列、构建质粒, 并筛选出最优 RNAi 质粒; 用该 RNAi 质粒转染高表达 HPSE 的 HCC 细胞, 同时设空白对照组、阴性对照组和未转染的 HCC 细胞组; 黏附试验观察各组 HCC 细胞与 HUVEC-C 细胞的黏附情况; Transwell 小室法观察 HCC 细胞穿 HUVEC-C 细胞迁移情况; 癌细胞均以 0.25% 玫瑰红染色、光镜下观察; 酶标仪法分别测定脱色后各组细胞 *D* 值并分析比较。**结果:** HCCLM3 细胞 HPSE mRNA 表达水平显著高于肝 LO-2、HepG-2 和 Bel-7402 细胞[ $(5.72 \pm 0.62)$  vs  $(1.05 \pm 0.09)$ 、 $(2.65 \pm 0.31)$  和  $(3.43 \pm 0.58)$ ], 均  $P < 0.01$ ]; 设计的 4 个 HPSE 之 RNAi 载体, 以 siHPSE-3158 对 HPSE 基因表达的抑制效果最佳 ( $P < 0.05$ )。RNAi 组 HCCLM3 细胞与 HUVEC-C 细胞黏附率显著低于空白对照组、阴性对照组和未转染的 HCCLM3 细胞组[ $(0.31 \pm 0.04)$  vs  $(0.46 \pm 0.06)$ 、 $(0.45 \pm 0.05)$  和  $(0.64 \pm 0.09)$ ], 均  $P < 0.01$  ]。RNAi 组 HCCLM3 细胞跨 HUVEC-C 细胞迁移率也显著低于空白对照组、阴性对照组和未转染的 HCCLM3 细胞组[ $(0.28 \pm 0.03)$  vs  $(0.41 \pm 0.04)$ 、 $(0.41 \pm 0.05)$  和  $(0.43 \pm 0.05)$ ], 均  $P < 0.05$  ]。**结论:** HPSE 参与介导 HCC 细胞与血管内皮细胞的黏附及 HCC 细胞跨内皮迁移, 可能是 HCC 微血管捕获、血行转移的重要因素。

**[关键词]** 肝素酶; 肝细胞癌; 血管内皮细胞; 微血管捕获; 黏附; 迁移

**[中图分类号]** R73-37

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2016)05-0656-07

## Heparanase-mediated adhesion with vascular endothelial cell and trans-endothelial migration of hepatocellular carcinoma cells

CHEN Xiaopeng, JIANG Wen, ZHANG Wenjun, CUI Wei (Department of Hepatobiliary Surgery, Yijishan Hospital Affiliated to Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of heparanase (HPSE) on adhesion with vascular endothelial cell and trans-endothelial migration of hepatocellular carcinoma (HCC) cells. **Methods:** Human normal umbilical vein endothelial cell HUVEC-C line, hepatic LO-2 cells, and hepatic carcinoma HepG2, BEL-7402 and HCCLM3 cells were selected to use. HCC cells with high expression of HPSE were screened using Real-time PCR. Four RNA interference (RNAi) sequences of HPSE gene were designed, and the corresponding plasmids were constructed respectively, and the RNAi plasmids with the highest efficiency were screened out, which were transfected into HCC cells with high expression of HPSE. At the same time, blank control (BC) group, negative control (NC) group and untransfected HCC cell group were set up. Adhesion test was used to detect adhesion situation of HCC cell and HUVEC-C cell in each group and Transwell assay was performed to determine the trans-HUVEC-C cell migration of HCC cells. The HCC cells were stained with 0.25% Rose Bengal and observed under inverted microscope. After decolorization, *D* values of the HCC cells in each group were determined and compared using an enzyme-labeled instrument. **Results:** Expression level of HPSE mRNA in the HCCLM3 cells was significantly higher than those in hepatic LO-2, HepG-2 and Bel-7402 cells ( $[5.72 \pm 0.62]$  vs  $[1.05 \pm 0.09]$ ,  $[2.65 \pm 0.31]$  and  $[3.43 \pm 0.58]$ , all  $P < 0.01$ ). Of the designed 4 RNAi plasmids of HPSE, siHPSE-3158 plasmid showed the best inhibitory effect on expression of HPSE gene ( $P < 0.05$ ). The adhesion rate of HCCLM3 cells and HU-

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81272412)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81272412)

**[作者简介]** 陈晓鹏(1967-), 男, 安徽枞阳人, 教授, 主要从事肝胆外科临床与基础研究, E-mail: drcxp@qq.com

**[通信作者]** 陈晓鹏(CHEN Xiaopeng, corresponding author), E-mail: drcxp@qq.com

VEC-C cells in RNAi group was significantly lower than those in BC, NC and untransfected HCCLM3 cell groups ( [ 0.31 ± 0.04 ] vs [ 0.46 ± 0.06 ], [ 0.45 ± 0.05 ] and [ 0.64 ± 0.09 ], all  $P < 0.01$  ). The trans-HUVEC-C cell migration rate of HCCLM3 cell in RNAi group was also significantly lower than those in BC, NC and untransfected HCCLM3 cell group ( [ 0.284 ± 0.029 ] vs [ 0.41 ± 0.04 ], [ 0.41 ± 0.05 ] and [ 0.43 ± 0.05 ], all  $P < 0.05$  ). **Conclusion:** HPSE might be involved in mediating the adhesion of HCC cells and vascular endothelial cells as well as trans - endothelial cells migration, which could be a key factor in invasion into microvessel and hematogenous metastasis of HCC cells. [ **Key words** ] heparanase; hepatocellular carcinoma; vascular endothelial cell; capillary capture; adhesion; migration

[ Chin J Cancer Biother, 2016, 23(5): 656-662. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.012 ]

原发性肝癌是常见的恶性肿瘤之一,其中肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占90%,在我国其死亡率仅次于胃癌和食管癌<sup>[1]</sup>。HCC以肝内血行转移即肝门静脉播散为主要转移途径<sup>[2-5]</sup>。HCC细胞与肝门静脉血管内皮细胞黏附、并穿过内皮细胞基底膜(basement membrane, BM)侵入血管是肿瘤转移的关键环节。HCC患者一旦发生肝内转移,预后极差。因此,深入探明其具体作用机制,确立HCC细胞微血管捕获和跨内皮迁移的新靶点,具有重要意义。肝素酶(heparanase, HPSE)是一种特殊的基质降解酶,在大部分恶性肿瘤包括HCC细胞中呈不同程度表达<sup>[6-9]</sup>。研究<sup>[6,10-12]</sup>表明,HPSE通过降解硫酸乙酰肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPGs),与其他蛋白水解酶协同破坏、降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和BM屏障,而促进癌细胞侵袭和转移。但HPSE是否参与HCC细胞与血管内皮细胞的黏附而被微血管捕获及进一步跨内皮迁移,目前还缺乏直接的证据<sup>[13-14]</sup>。本研究利用RNAi抑制高表达HPSE的HCC细胞,体外进行细胞黏附和穿内皮迁移试验,旨在探讨HPSE对HCC细胞与血管内皮细胞黏附及跨内皮迁移的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株、主要试剂及仪器

人正常脐静脉内皮细胞株HUVEC-C,肝LO-2细胞、肝癌HepG2细胞和BEL-7402细胞购自上海中科院细胞库;人高转移性肝癌HCCLM3细胞购自复旦大学中山医院。含有HPSE RNAi序列的重组大肠杆菌(siHPSE-504、siHPSE-683、siHPSE-852、siHPSE-3158)及不含HPSE RNAi序列的阴性对照(negative control, NC)质粒由上海吉凯基因化学技术公司构建并鉴定(表1)。Markers、dNTP、各种引物为上海生工公司产品。Lipofectamine™ 2000转染试剂盒、10%胎牛血清、RPIM 1640培养基为GIBCO公司产品。TR-

Izol、逆转录试剂盒购自Fermentas公司。限制性内切酶Bgl II和Sal I、T4 DNA ligase为MBI公司产品。PCR纯化、质粒小量抽提试剂盒为Axygen公司产品。胰蛋白酶、酵母提取物为Oxoid公司产品。EvaGreen qPCR Master Mix为Bio-Rad公司产品。PVDF膜为Millipore公司产品。ECL Plus发光试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天公司。兔抗人HPSE多克隆抗体为Abcam公司产品,兔抗人3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体及二抗为Bioworld公司产品。玫瑰红(Rose Bengal)染料购自Sigma公司。

Real-time PCR扩增仪为BIO-RAD公司产品,倒置显微镜为OLYMPUS公司产品,荧光显微镜为Nikon公司产品,GloMax系列酶标仪(发光检测仪)为Promega公司产品,Transwell小室购自美国Corning Costar公司。

表1 RNAi序列编码

Tab.1 Sequence coding of RNA interference

Name	Direction	Sequence coding
siHPSE-504	Forward	5'-CCAGGAUAAUUGCAAUAUUTT-3'
	Reverse	5'-AUAUUUGCAAUAUCCUGGTT-3'
siHPSE-683	Forward	5'-GCUCUGUAGAUGUGCUAUATT-3'
	Reverse	5'-UAUAGCACAUUCACAGAGCTT-3'
siHPSE-852	Forward	5'-GUCGCAGUUAGGAGAAGAUUTT-3'
	Reverse	5'-AUCUUCUCCUACUGCGACTT-3'
siHPSE-3158	Forward	5'-GGCGAGGAGAUUCUGUAAATT-3'
	Reverse	5'-UUUACAGAAUCUCCUCGCCTT-3'
Negative control	Insertion sequence	TTCTCCGAACGTGTCACGT

### 1.2 Real-time PCR法检测HCC细胞HPSE mRNA表达

上述HCC细胞和正常肝细胞复苏后用含有10%

胎牛血清的 RPIM 1640 培养液于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱饱和湿度培养。根据 GenBank 人 *HPSE* 基因登陆号 (NM\_006665.5), 设计并合成 PCR 引物 (表 2)。用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, PCR

扩增。以 *GAPDH* 为内参, Real-time PCR 法检测 HCC 细胞 *HPSE* mRNA 表达, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算均值作为相对表达量。实验重复 3 次。选择 *HPSE* mRNA 表达最高的 HCCLM3 细胞进行后续实验。

表 2 引物序列

Tab. 2 Primer sequence

Gene	Direction	Sequence coding	Length of amplification( bp )
<i>HPSE</i>	Forward	5'-GCACAAACACTGACAATCCAAG-3'	101
	Reverse	5'-AAAAGGATAGGGTAACCGCAA-3'	
<i>GAPDH</i>	Forward	5'-GTGGTCTCCTCTGACTTCAACA-3'	136
	Reverse	5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	

### 1.3 Real-time qPCR 及 Western blotting 法筛选 RNAi 质粒

将重组大肠杆菌于室温迅速融化、摇菌, 按说明书抽提质粒。取对数生长期的 HCCLM3 细胞, 0.25% 的胰酶消化, 含 10% 胎牛血清的 DMEM (高糖) 培养基终止消化, 调整细胞密度至  $6 \times 10^5$  个/ml, 每孔 1 ml 重新接种于 12 孔板后继续培养。待细胞密度至 80% 左右时开始按说明书行质粒转染, 并设空白对照组 (仅加转染试剂) 和阴性对照组 (用阴性对照质粒)。48 h 后荧光显微镜观察, 收集细胞, 分别用 Real-time qPCR 及 Western blotting 法检测转染细胞 *HPSE* 表达。Real-time qPCR 检测方法与引物同 1.2。蛋白检测, 先裂解细胞, 提取细胞总蛋白, BCA 方法检测蛋白质浓度。每种样品取等量蛋白质经 10% SDS-PAGE 转膜, 封闭, 分别与一抗和二抗孵育。采用凝胶成像分析系统测定 *D* 值。相对表达量以各组电泳条带与对应内参光密度值之比来表示。实验重复 3 次。选取干扰效果最佳的 RNAi 质粒 siHPSE-3158 用于后续实验。

### 1.4 黏附试验检测 HCCLM3 细胞黏附率

调整 HUVEC-C 细胞密度至  $5 \times 10^5$  个/ml, 每孔 200  $\mu$ l 加入 96 孔板。胰酶消化转染 72 h 的 HCCLM3 细胞, 重悬并调整细胞密度为  $2.5 \times 10^5$  个/ml, 在上述含有 HUVEC-C 细胞的 96 孔板中, 依次每孔加入 200  $\mu$ l 的 HCC 细胞 (即每孔细胞  $5 \times 10^4$  个), 并设 BC 组、NC 组和未转染的 HCCLM3 细胞组 (亦未加任何试剂); 另设一组单纯 HUVEC-C 细胞, 不加 HCCLM3 细胞进行黏附, 而用等量无血清 DMEM 替代; 每组 5 个复孔。将 96 孔板 37 °C 孵育 15 min, 取出, PBS 洗去未黏附的 HCCLM3 细胞 2

次。每孔加入 0.25% 玫瑰红染液 100  $\mu$ l, 室温 5 min 后吸出染液, 再清洗一遍; 加脱色液 220  $\mu$ l (95% 乙醇和 PBS 以 1:1 配制), 室温 30 min; 依次吸取各孔染液 200  $\mu$ l 加到另一 96 孔板, 酶标仪 570 nm 波长下测定 *D* 值。显微镜观察、拍照。细胞黏附并玫瑰红染色后, HCCLM3 细胞摄取染料较多, 染色较深, 细胞浆呈红色; HUVEC-C 细胞摄取染料较少, 染色较浅。根据染色程度可初步反映肝癌细胞黏附情况。分别用各组 *D* 值减去单纯 HUVEC-C 细胞组 *D* 值, 以排除内皮细胞自身黏附的影响, 差值间接反映 HCCLM3 细胞与内皮细胞的黏附率。实验重复 3 次。

### 1.5 Transwell 小室检测 HCCLM3 细胞迁移率

将浓度  $5 \times 10^5$  个/ml 的 HUVEC-C 细胞加入 Transwell 小室上室 (聚碳酸酯膜孔径为 8.0  $\mu$ m), 每孔 200  $\mu$ l, 至细胞长成致密单层。调整转染 72 h 的 HCCLM3 细胞密度为  $6 \times 10^5$  个/ml, 依次加入上室, 每孔 200  $\mu$ l (即每孔细胞  $1.2 \times 10^5$  个); 下室均加入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基。同样设 BC 组、NC 组、未转染的 HCCLM3 细胞组和单纯 HUVEC-C 细胞组, 每组 3 个复孔。将 Transwell 小室于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下培养 24 h。取出 Transwell 板, 吸净各孔培养基; 无菌棉签拭去上室细胞; 下室加入 0.25% 玫瑰红染液 400  $\mu$ l, 室温 5 min 后吸出染液, 清洗 3 遍吸尽, 再加脱色液 400  $\mu$ l (配制同上), 室温静置 30 min。依次吸取脱色液 200  $\mu$ l 到另一 96 孔板, 酶标仪 570 nm 波长下测定各孔的 *D* 值。聚碳酸酯膜显微镜观察、拍照。根据下室细胞染色程度可初步判断 HCC 细胞跨内皮迁移情况。分别用各组 *D* 值减去单纯 HUVEC-C 细胞组 *D* 值, 以排除

内皮细胞本身迁移入下室的影响, 差值间接反映 HCC 细胞迁移率。实验重复 3 次。

### 1.6 统计学处理

采用 SigmaStat 3.5 软件, 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用方差分析和  $q$  检验, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HCCLM3 细胞中 HPSE mRNA 高表达

Real-time PCR 检测结果(图 1)表明, HPSE 基因在 HepG2、BEL-7402 和 HCCLM3 三种肝癌细胞中均有不同程度表达升高 ( $F = 54.922$ ,  $P < 0.01$ ), 其中以 HCCLM3 细胞表达最高 ( $P < 0.01$ )。据此, 选取 HPSE 表达最高的 HCCLM3 细胞用于后续研究。

### 2.2 RNAi 抑制 HCCLM3 细胞 HPSE 的表达

4 种干扰质粒转染 HCCLM3 细胞, 48 h 后均可见明亮绿色荧光, 细胞轮廓清晰, 效果满意(图 2)。计数转染效率在 25% ~ 35% 之间。qPCR 检测结果(图 3)发现, RNAi 质粒转染后, 各组 HPSE mRNA 表

达均明显下降 ( $F = 32.98$ ,  $P < 0.001$ ), 以 siHPSE-3158 组 HPSE 下降最多 ( $P < 0.05$ ) (图 3 A)。HPSE 蛋白表达与 HPSE mRNA 相似 ( $F = 39.639$ ,  $P < 0.01$ ), 亦以 siHPSE-3158 组 HPSE 下降最多 ( $P < 0.05$ )。据此, 选取 siHPSE-3158 行后续实验。

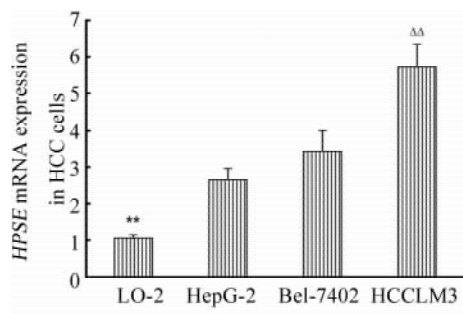


图 1 3 种肝癌细胞中 HPSE mRNA 的表达水平(Real-time qPCR 法)

Fig. 1 Expression levels of HPSE mRNA in hepatocellular carcinoma cells(Real-time qPCR)

\*\*  $P < 0.01$  vs HepG2 or Bel-7402 or HCCLM3 group;  
 $\Delta\Delta P < 0.01$  vs HepG2 or Bel-7402 group

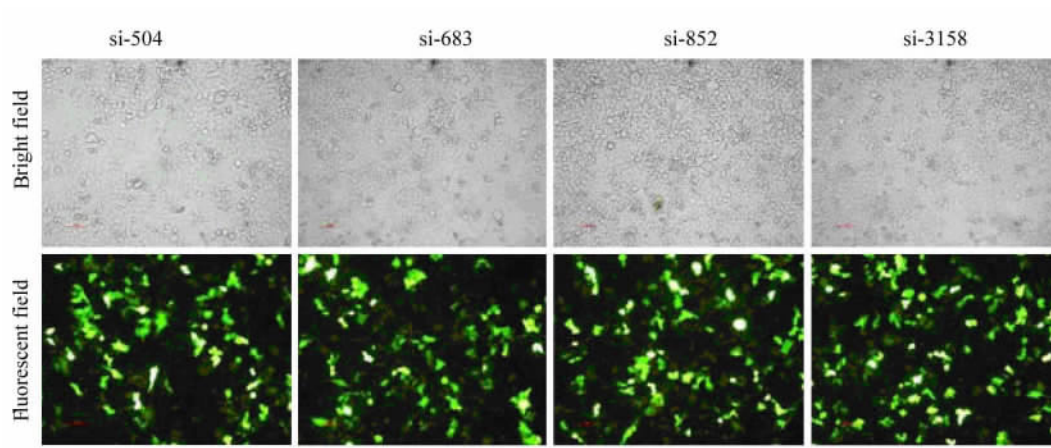


图 2 四种质粒转染肝癌 HCCLM3 细胞荧光图(×100)

Fig. 2 Photofluorograms of HCCLM3 cells transfected with 4 kinds of plasmid (×100)

### 2.3 RNAi 降低 HCCLM3 细胞与内皮细胞的黏附能力

细胞黏附并玫瑰红染色后, RNAi 组细胞染色最浅, 提示其黏附细胞数最少; 未转染的 HCCLM3 细胞组染色最深, 黏附细胞数最多(图 4A-D)。进一步测定  $D$  值显示各组黏附率差异具有统计学意义 ( $F = 14.90$ ,  $P < 0.01$ ); RNAi 组 HCCLM3 细胞与内皮细胞之间的黏附率显著低于未转染的 HCCLM3 细胞组 [ $(0.31 \pm 0.04)$  vs  $(0.64 \pm 0.09)$ ,  $q = 9.421$ ,  $P < 0.01$ ]; 空白对照组和阴性对照组黏附率

较未转染的 HCCLM3 细胞组有所降低 ( $P < 0.01$ ), 但高于 RNAi 组 ( $P < 0.05$ ) (图 4E)。

### 2.4 RNAi 降低 HCCLM3 细胞穿内皮迁移能力

迁移试验下室细胞染色后, RNAi 组细胞染色最浅, 迁移细胞数最少; 未转染的 HCCLM3 细胞组染色最深, 迁移细胞数最多(图 5A-D)。进一步测定下室脱色液  $D$  值显示, RNAi 组 HCCLM3 细胞显著低于其余各组 [ $(0.28 \pm 0.03)$  vs  $(0.41 \pm 0.04)$ ,  $(0.41 \pm 0.04)$  和  $(0.43 \pm 0.05)$ ,  $F = 7.000$ , 均  $P < 0.05$ ] (图 5E)。

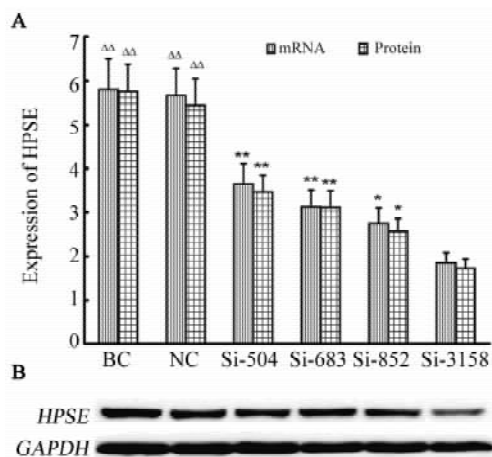


图3 4种RNAi质粒对HCCLM3细胞HPSE表达的影响  
Fig. 3 Effect of 4 kinds of RNAi plasmids on HPSE expressions in HCCLM3 cells

A: HPSE mRNA and protein expressions in HCCLM3 cells;  
B: Western blotting; BC: Blank control groups; NC: Negative control group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs si-3158 group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs siHPSE-504 or siHPSE-683, siHPSE-852 or siHPSE-3158 groups

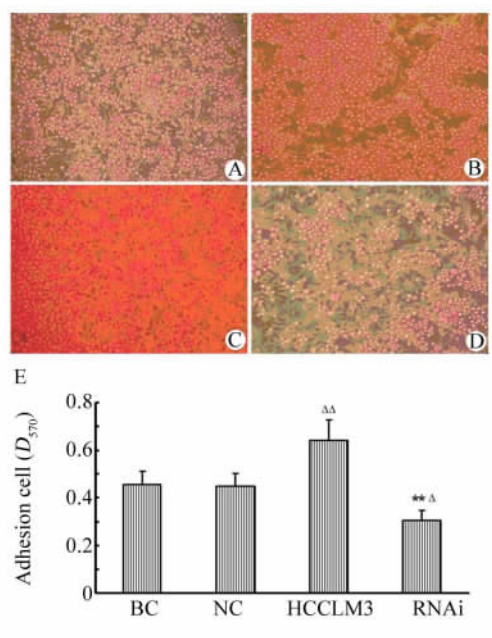


图4 RNA干扰HPSE降低HCCLM3细胞与血管内皮细胞的黏附能力

Fig. 4 RNA interference decreases adhesion ability of HCCLM3 cells to vascular endothelial cells

A: Cell adhesion of BC group (×200); B: NC group (×200);  
C: HCCLM3 cell group (×200); D: RNAi (siHPSE-3158) group (×200); E: Optical density of all groups;  
\*\*  $P < 0.01$  vs HCCLM3 cell group;  
 $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs BC and NC groups

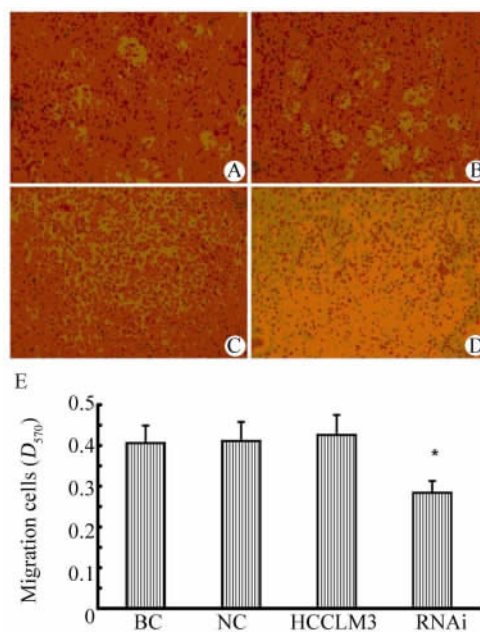


图5 RNAi降低HCCLM3细胞跨内皮细胞迁移能力  
Fig. 5 RNA interference decreases trans-endothelial migration ability of HCCLM3 cells

A: Cell migration of BC group (×200); B: NC group (×200);  
C: HCCLM3 cell group (×200); D: RNAi group (×200);  
E: Optical density of all groups; \*  $P < 0.05$  vs BC, NC and HCCLM3 cell groups

### 3 讨论

原发性肝癌的转移途径主要是肝内血行转移即肝门静脉播散,其中肝癌细胞黏附血管内皮细胞,被微血管捕获并侵入血管是一个重要环节。鉴于HPSE基质降解和促转移特性,笔者推测:HPSE可影响肝癌细胞与血管内皮细胞黏附及随后的跨内皮细胞迁移,但还需进一步研究证实。为此,本课题设计体外实验探寻HPSE介导微血管捕获、侵入血管的细胞学证据。

本研究选择HPSE表达相对水平最高的HCCLM3细胞,设计4条针对HPSE基因不同位点的RNAi序列,将其分别转入HCCLM3细胞,经Real-time PCR和Western blotting检测显示各组肝癌细胞中HPSE表达均有不同程度下降,其中siHPSE-3158质粒干扰效率最高而用于后续实验。

肝癌细胞与血管内皮细胞的黏附是微血管捕获的先决条件。本研究将人血管内皮细胞接种于96孔板长成致密单层,以模拟血管内膜;然后加入经RNAi的HCCLM3细胞共培养,并行玫瑰红染色、测

定D值。结果发现, RNAi 组癌细胞与内皮细胞的黏附显著减少, 黏附率明显下降, 由此推测 HPSE 能够促进 HCC 细胞与血管内皮细胞的黏附。其机制可能为: (1) HPSE 可降解 ECM 和 BM 之硫酸乙酰肝素糖蛋白( heparan sulfate proteoglycan, HSPG ), 破坏血管内皮“屏障”使内膜裸露, 为癌细胞黏附提供“场地”<sup>[6,12-15]</sup>; (2) HPSE 还参与调控多条信号通路, 间接促进其与 ECM 和 BM 黏附<sup>[14-15]</sup>。HPSE 除降解 HSPG 外, 还可表现为一种非酶活性而激活或增强多个信号通路, 如 p38 丝裂原活化蛋白激酶( p38 mitogen activated protein kinases, p38MAPK )、Akt、Src、Rac、VEGF 和 EGFR 通路, 并通过与 HSPG 相互作用, 促进细胞黏附。(3) 癌细胞可激活血小板分泌 HPSE 和多种黏附分子, 如 P-选择素<sup>[16]</sup>和血小板膜糖蛋白 GP II b/ III a<sup>[17]</sup>等, 促进癌细胞黏附血管内皮细胞。本研究还发现, 空白对照组与阴性对照组 HCCLM3 细胞与内皮细胞的黏附率亦较未污染的 HCC 细胞降低, 但高于 RNAi 组, 推测脂质体 Lipofectamine™ 2000 可能具有毒性作用、影响癌细胞生物学行为<sup>[18]</sup>, 从而降低其与内皮细胞的黏附率, 但具体作用机制有待深入研究。

HCC 细胞黏附血管内皮后还必须侵出血管, 方能形成实质性转移。本研究将血管内皮细胞先接种于 Transwell 小室上室长成致密单层, 然后再加入经 RNAi 的 HCCLM3 细胞, 观察迁移入下室并染色的 HCC 细胞, 以模拟癌细胞侵出血管过程。结果表明 RNAi 组 HCCLM3 细胞跨内皮细胞迁入小室下层细胞数明显低于其余各组, D 值也显著下降, 提示 HPSE 介导 HCC 细胞跨内皮细胞迁移、增强癌细胞的侵袭力。其机制可能为: HPSE 降解其底物 HSPG, 破坏了 BM 和 ECM 的稳定性和完整性, 使得癌细胞获得侵出血管内膜的“突破口”<sup>[6,12]</sup>, HSPG 降解后释放于细胞表面的硫酸肝素可促进癌细胞迁移和血管生成<sup>[19-21]</sup>; HPSE 参与调节多条癌细胞生长的信号通路<sup>[17,22]</sup>。通过 p38MAPK、Akt、Src、VEGF 和 EGFR 通路的激活, 促进下游蛋白活化, 从而增强肿瘤细胞的恶性行为或迁移能力; 此外, 蛋白多糖降解后产物可参与激活硫酸乙酰肝素的受体 CD44v3, 促使肿瘤细胞变形, 诱导跨血管迁移运动, 从而增强癌细胞本身的迁移能力<sup>[23]</sup>。

总之, 本研究通过体外实验初步证明 HPSE 可促进肝癌细胞和血管内皮细胞的黏附及跨内皮细胞迁移, 为进一步研究其机制提供了细胞学证据。

致谢: 感谢皖南医学院附属弋矶山医院中心实验室

的吕坤博士和张梦莹、钟民、所起凤、李雪琴老师的大力支持。

## [参考文献]

- [1] 沈建宇, 甘绍举, 胡黎黎, 等. 生物标记物在肝细胞肝癌诊断中的应用 [J]. 医学分子生物学杂志, 2015, 12(1): 50-53. DOI: 10.3870/j.issn.1672-8009.2015.01.011.
- [2] 王健, 孙燕, 崔云龙, 等. 肝癌多中心发生与肝内转移的临床病理学差异研究 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2009, 15(4): 247-250. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-8118.2009.04.003.
- [3] 樊嘉, 史颖弘. 肝癌复发和转移的新理念 [J]. 中华消化外科杂志, 2010, 9(1): 10-11. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2010.01.005.
- [4] TAKIZAWA D, KAKIZAKI S, SOHARA N, et al. Hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombosis: clinical characteristics, prognosis, and patient survival analysis [J/OL]. Dig Dis Sci, 2007, 52(11): 3290-3295 [2016-07-04]. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10620-007-9808-2>. DOI: 10.1007/s10620-007-9808-2.
- [5] HAN K, KIM J H, KO G Y, et al. Treatment of hepatocellular carcinoma with portal venous tumor thrombosis: a comprehensive review [J/OL]. World J Gastroenterol. 2016, 22(1): 407-416 [2016-07-04]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4698503/>. DOI: 10.3748/wjg.v22.i1.407.
- [6] VLODAVSKY I, FRIEDMANN Y, ELKIM M, et al. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis [J]. Nat Med, 1999, 5(7): 793-802 [2016-07-04]. [http://www.nature.com/nm/journal/v5/n7/full/nm0799\\_793.html](http://www.nature.com/nm/journal/v5/n7/full/nm0799_793.html). DOI: 10.1038/10518.
- [7] CHEN G, DANG Y W, LUO D Z, et al. Expression of heparanase in hepatocellular carcinoma has prognostic significance: a tissue microarray study [J/OL]. Oncol Res, 2008, 17(4): 183-189 [2016-07-04]. <http://www.ingentaconnect.com/content/cog/or/2008/00000017/00000004/art00005?token=004e18641b39d6647e442f20672136766a256a4979457c7a6a687627502b333e3568263c2b6db0>. DOI: <http://dx.doi.org/10.3727/096504008785114138>.
- [8] CHEN X P, LIU Y B, RUI J, et al. Heparanase mRNA expression and point mutation in hepatocellular carcinoma [J/OL]. World J Gastroenterol, 2004, 10(19): 2795-2799 [2016-07-04]. <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v10/i19/2795.htm>. DOI: 10.3748/WJG.v10.i19.2795.
- [9] WANG Q, SHEN Y, WANG P, et al. The expression of heparanase mRNA and its clinical significance in hepatocellular carcinoma [J/OL]. J Cancer Res Ther, 2013, 9(2): 250-252 [2016-07-04]. <http://www.cancerjournal.net/article.asp?issn=0973-1482;year=2013;volume=9;issue=2;spage=250;epage=252;aulast=Wang>. DOI: 10.4103/0973-1482.113377.
- [10] ZHENG L D, JIANG G S, MEI H, et al. Small RNA interference-mediated gene silencing of heparanase abolishes the invasion, metastasis and angiogenesis of gastric cancer cells [J/OL]. BMC Cancer, 2010, 10: 33-33 [2016-07-04]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2834619/>. DOI: 10.1186/1471-2407-

