论著

文章编号:1000-5404(2008)15-1470-03

HYAL1 基因过表达对乳腺癌细胞迁移能力和血管生成能力及增殖的影响

苏新良,任国胜,王小毅,谭金祥 (重庆医科大学附属第一医院内分泌外科,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨透明质酸酶 HYAL1 基因过表达对人乳腺癌细胞株 MCF-7 和 ZR-75-30 的迁移能力和血管生成能力以及增殖的影响。方法 应用双室联合培养技术,建立体外肿瘤侵袭和血管生成模型,观察过表达 HYAL1 基因对乳腺癌细胞穿透 ECM gel 和诱导血管内皮细胞形成血管能力的影响;应用 MTT 和流式细胞术检测细胞的增殖能力变化。结果 过表达 HYAL1 基因的乳腺癌细胞 MCF-7 和 ZR-75-30(实验组)穿透 ECM 的能力以及诱导血管生成的能力均强于对照组($P<0.05$);但是,过表达 HYAL1 基因的乳腺癌细胞增殖能力与对照组比较没有明显差异($P>0.05$)。结论 过表达 HYAL1 基因能促进人乳腺癌细胞在体外侵袭和诱导血管生成,但是对乳腺癌细胞的增殖没有影响。

关键词:乳腺癌;透明质酸酶;侵袭;血管生成;增殖
中图法分类号:R73-37;R730.23;R737.9 文献标识码:A

Effects of HYAL1 gene overexpression on invasive, angiogenic and proliferative ability of breast cancer cells

SU Xin-liang, REN Guo-sheng, WANG Xiao-yi, TAN Jin-xiang (Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the effects of HYAL1 gene overexpression on invasive, angiogenic and proliferative ability of breast cancer cell lines MCF-7 and ZR-75-30. Methods Double-chamber co-culture technique was applied to construct the invasive model and angiogenic model *in vitro*, which was used to detect the invasive and angiogenic potential of breast cancer cell; MTT and flow cytometry were used to detect the proliferation of breast cancer cells. Results Breast cancer cells overexpressing HYAL1 gene showed stronger invasive potential and angiogenic potential than control cells, but had no significant difference on proliferative potential. Conclusion Overexpression of HYAL1 gene can promote the invasion and angiogenesis of breast cancer cells *in vitro*, but not affect the proliferation.

Key words: breast cancer; hyaluronidase; invasion; angiogenesis; proliferation

透明质酸酶(hyaluronidase, Hyase)又称"扩散因子",与透明质酸(hyaluronic acid,HA)均是细胞外基质(extracellular matrix,ECM)的重要成分,主要包括 6 种亚型,其中以 HYAL1、HYAL2 和 PH-20 最为重要。透明质酸酶降解透明质酸(hyaluronic acid,HA),调节细胞黏附,促进细胞迁移和增殖,从而促进肿瘤的迁移[1,2]。我们在前期工作中发现表达 HYAL1 较高的人乳腺癌细胞株,其迁移能力也较强[3,4]。为了进一步探讨透明质酸酶 HYAL1 基因的表达与乳腺癌细胞的侵袭、诱导血管生成能力和增殖的关系,本研究将 HYAL1 基因导入透明质酸酶低表达的乳腺癌细胞株 MCF-7 和 ZR-75-30 中,观察 HAYL1 基因过表达对乳腺癌细胞侵袭、诱导血管生成能力和增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

稳定转染了 HYAL1 基因的乳腺癌细胞株 MCF-7 和 ZR-75-30(实验组)以及转染空质粒的乳腺癌细胞株 MCF-7 和 ZR-75-30(对照组)由本实验室筛选和培养;NIH3T3 细胞和人脐静脉内皮细胞 ECV-304 为本实验室保存;ECM gel 购自 Sigma 公司;Transwell 小室购自 Millipore 公司;RPMI1640 培养基和小牛血清购自 HyClone 公司。

1.2 侵袭实验

实验观察稳定转染了 HYAL1 基因以及空质粒的乳腺癌细胞株 MCF-7 和 ZR-75-30 穿过 ECM gel 迁移到 Transwell 小室的膜上的细胞数[4]。

1.3 体外血管生成实验

稳定转染了 HYAL1 基因以及空质粒的乳腺癌细胞株

基金项目:国家自然科学基金(30070292)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070292)
作者简介:苏新良,男,四川省仁寿县人,博士研究生,副主任医师,主要从事肿瘤侵袭、转移方面的研究。电话:(023)89011191
收稿日期:2007-11-08;修回日期:2008-03-04

MCF-7 和 ZR-75-30 用含 10% 小牛血清的 1640 培养基，37 ℃，5% CO_2 培养。取对数生长期的细胞按 2.0×10^5/孔接种到 6 孔板中。将 ECM gel 均匀地铺在 Transwell 小室的膜上，40 μl/孔，37 ℃成胶 30 min。血管内皮细胞 ECV-304 用含 10% 小牛血清的 1640 培养基，37℃、5% CO_2 培养致对数期，取 2.0×10^5 接种到成胶的 Transwell 小室中，将小室放置于已经接种乳腺癌细胞的 6 孔板中，培养 72 h 后用光学显微镜观察血管形成情况，并计数 100 倍光镜下管腔数目。

1.4　MTT 检测细胞增殖

稳定转染了 HYAL1 基因以及空质粒的乳腺癌细胞株 MCF-7 和 ZR-75-30 用含 10% 小牛血清的 1640 培养基，37 ℃、5% CO_2 培养。取对数生长期的细胞制成 $1\times10^5\ ml^{-1}$ 的细胞悬液，接种到 96 孔板中，200 μl/孔。培养 24 h 后，每孔加入 5 mg/ml的 MTT 20 μl，继续孵育 4 h。加入二甲亚砜 200 μl/孔，振荡混匀后在 490 nm 处测定吸光度值[D(490)]。

1.5　流式细胞术检测细胞周期

稳定转染了 HYAL1 基因以及空质粒的乳腺癌细胞株 MCF-7 和 ZR-75-30 培养至对数生长期，离心收集细胞，细胞经 PBS 洗涤后，用 70% 冰乙醇固定，经 PI 染色后用流式细胞仪分析细胞周期。

1.6　统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件，两样本均数比较采用 t 检验。

2　结果

2.1　HYAL1 基因过表达对乳腺癌细胞诱导血管生成能力的影响

受到肿瘤细胞的诱导，ECV-304 细胞逐渐伸长，彼此连接成条索状和网状结构，形成不同大小和形状的管腔样结构（图 1）。管腔计数结果显示过表达 HYAL1 基因的 MCF-7 细胞（实验组）的管腔数（48.2 ± 4.6）明显高于 MCF-7 细胞对照组（24.4 ± 3.0）（$P<0.05$）；同样，过表达 HYAL1 基因的 ZR-75-30 细胞（实验组）的管腔数（42.6 ± 3.6）明显高于 ZR-75-30 细胞对照组（22.6 ± 2.6）（$P<0.05$）。

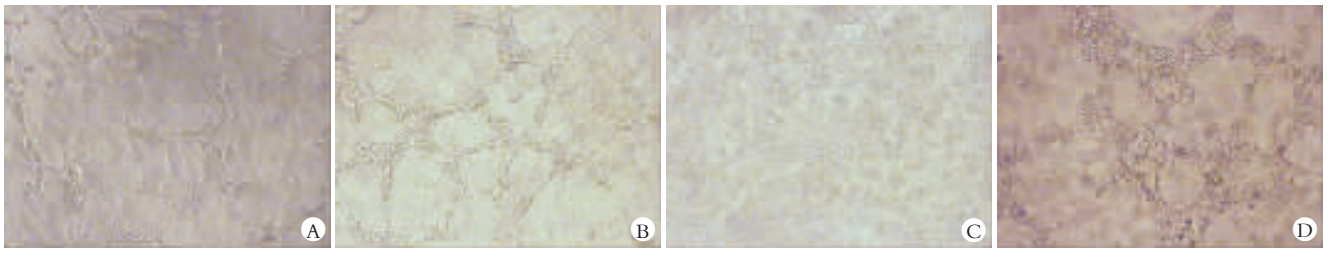
2.2　HYAL1 基因过表达对乳腺癌细胞增殖和细胞周期的影响

MTT 结果显示：过表达 HYAL1 基因的 MCF-7 和 ZR-75-30 细胞（实验组）的 D(490) 值[分别为（1.83 ± 0.23）、（1.68 ± 0.03）]与转染空载的 MCF-7 和 ZR-75-30 细胞（对照组）的 D(490) 值[分别为（1.66 ± 0.20）、（1.54 ± 0.28）]均无统计学差异（$P>0.05$）。流式细胞术检测细胞周期的结果显示：与 MCF-7和 ZR-75-30 细胞对照组相比，MCF-7 和 ZR-75-30 实验组的细胞周期均没有明显差异（$P>0.05$），见图 2。

3　讨论

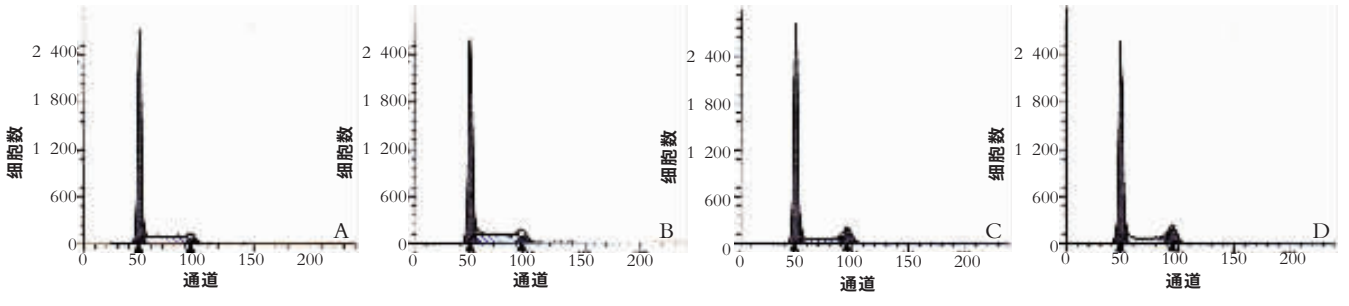
肿瘤细胞的侵袭和转移涉及肿瘤细胞与基膜和 ECM 的黏附、降解和穿透移行等 3 个基本过程。Hyase 和 HA 是 ECM 的 2 种重要成分，在肿瘤侵袭及转移过程中起着重要作用，其中透明质酸 HYAL1 的作用尤为重要。众多研究表明，前列腺癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌等恶性肿瘤的发生和恶化均伴随着 HYAL1 的升高[5-7]。谭金祥等[8]研究发现，利用 siRNA 沉默 HYAL1 基因的表达后，乳腺癌细胞的迁移能力明显下降[8]。

本课题组前期研究表明，乳腺癌细胞株 MCF-7 和 ZR-75-30 的 HYAL1 基因呈低表达，同时其迁移能力和诱导血管生成能力也较其他细胞弱。由此我们初步认为 HYAL1 基因表达与乳腺癌细胞的迁移能力和诱导血管生成能力有着密切关系[4]。为了进一步证明这



A：MCF-7 对照组；B：MCF-7 实验组；C：ZR-75-30 对照组；D：ZR-75-30 实验组

图 1　乳腺癌细胞 MCF-7 和 ZR-75-30 诱导血管生成能力变化　（瑞氏染色 ×100）



A：MCF-7 对照组；B：MCF-7 实验组；C：ZR-75-30 对照组；D：ZR-75-30 实验组

图 2　HYAL1 基因过表达对乳腺癌细胞 MCF-7 和 ZR-75-30 细胞周期的影响

一点，我们将携有 HYAL1 基因的真核表达载体转染到乳腺癌细胞株 MCF-7 和 ZR-75-30 中，筛选出了过表达 HYAL1 基因的乳腺癌细胞 MCF-7 和 ZR-75-30 细胞。然后观察其迁移能力和诱导血管生成能力的变化。实验结果表明，与转染空载体的 MCF-7 和 ZR-75-30 细胞相比，过表达 HYAL1 基因（转染重组载体）的MCF-7 和 ZR-75-30 细胞的迁移能力和诱导血管生成潜力明显增强。我们的实验进一步证明了 HYAL1 基因与乳腺癌的侵袭和诱导血管生成有着密切关系，HYAL1 基因高表达能够促进乳腺癌细胞侵袭和诱导血管生成，增加其恶性程度。

目前，透明质酸酶与肿瘤侵袭和转移的关系已经比较明确。但是关于透明质酸酶与肿瘤细胞增殖的关系的研究结果尚存在不同观点[9]。一方面，很多研究表明在一些乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、膀胱癌中可以检测的透明质酸酶的高表达[5－8,10]；另一方面，HYAL1 基因缺失在一些上皮细胞肿瘤中的频繁出现暗示着 HYAL1 基因可能是一种抑癌基因[11]，而且，HYAL1 基因在某些结肠癌、乳腺癌和成纤维细胞中的高表达反而抑制了肿瘤细胞的生长和增殖[12－14]。本研究中，过表达 HYAL1 基因对乳腺癌细胞株 MCF-7 和 ZR-75-30 的增殖和细胞周期没有明显的改变，可能有以下几个原因：一方面，可能是由于 HYAL1 基因对肿瘤细胞增殖存在多方面的影响，各种影响相互牵制；另一方面，本实验中过表达的 HYAL1 基因可能对这 2 株乳腺癌细胞的增殖没有产生影响。这需要我们在以后的实验中进一步研究。

参考文献：

[1] Toole B P. Hyaluronan：from extracellular glue to pericellular cue[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(7)：528－539.

[2] Turley E A, Noble P W, Bourguignon L Y. Signaling properties of hyaluronan receptors[J]. J Biol Chem, 2002, 277(7)：4589－4592.

[3] 王小毅，任国胜，石 远，等. 肝素对透明质酸酶不同表达水平的人乳腺癌细胞侵袭力的影响[J]. 第三军医大学学报，2002，24(10)：1219－1221.

[4] 苏新良，任国胜，王小毅，等. 人乳腺癌细胞株 HYAL1 基因真核表达载体的构建及其在 MCF-7 和 ZR-75-30 细胞中的表达[J]. 第三军医大学学报，2008，30(2)：146－149.

[5] Lokeshwar V B, Rubinowicz D, Schroeder G L, *et al*. Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer[J]. J Biol Chem, 2001, 276(15)：11922－11932.

[6] Auvinen P, Tammi R, Parkkinen J, *et al*. Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival[J]. Am J Pathol, 2000, 156(2)：529－536.

[7] Lokeshwar V B, Cerwinka W H, Lokeshwar B L. HYAL1 hyaluronidase：a molecular determinant of bladder tumor growth and invasion[J]. Cancer Res, 2005, 65(6)：2243－2250.

[8] 谭金祥，王小毅，任国胜，等. siRNA 沉默 HYAL1 基因表达对人乳腺癌细胞侵袭力的影响[J]. 中华普通外科杂志，2006，21(12)：886－888.

[9] Lokeshwar V B, Cerwinka W H, Isoyama T, *et al*. HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer：a tumor promoter and suppressor[J]. Cancer Res, 2005, 65(17)：7782－7789.

[10] Lipponen P, Aaltomaa S, Tammi R, *et al*. High stromal hyaluronan level is associated with poor differentiation and metastasis in prostate cancer[J]. Eur J Cancer, 2001, 37(7)：849－856.

[11] Csoka A B, Frost G I, Heng H H, *et al*. The hyaluronidase gene HYAL1 maps to chromosome 3p21.2-p21.3 in human and 9F1-F2 in mouse, a conserved candidate tumor suppressor locus[J]. Genomics, 1998, 48(1)：63－70.

[12] Jacobson A, Rahmanian M, Rubin K, *et al*. Expression of hyaluronan synthase 2 or hyaluronidase 1 differentially affect the growth rate of transplantable colon carcinoma cell tumors[J]. Int J Cancer, 2002, 102(3)：212－219.

[13] Shuster S, Frost G I, Csoka A B, *et al*. Hyaluronidase reduces human breast cancer xenografts in SCID mice[J]. Int J Cancer, 2002, 102(2)：192－197.

[14] Chang N S, Pratt N, Heath J, *et al*. Hyaluronidase induction of a WW domain-containing oxidoreductase that enhances tumor necrosis factor cytotoxicity[J]. J Biol Chem, 2001, 276(5)：3361－3370.

（编辑 王 红）

《第三军医大学学报》征集 2009 年重点号选题

为了重点反映生物医学领域某些学科的最新研究成果和研究进展，本刊向海内外广大医学专家、作者、读者征集 2009 年 6 期重点号选题。2009 年重点号选题计划将在本刊 2008 年第 17 期刊出。欢迎广大关心、支持学报的专家、作者、读者向我们推荐重点号选题，我们将择优采纳。联系方式：E-mail：aammt.tmmu.com.cn；邮编：400038；地址：重庆市高滩岩《第三军医大学学报》编辑部。

期待您的参与！感谢您的支持！

本刊编辑部

2008 年 7 月 3 日