DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.042
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

文章编号:1000-5404(2002)10-1219-03

论著

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

王小毅,任国胜,石 远,汪 毅,姚榛祥 (重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆 400016)

提 要:目的 探讨透明质酸酶(Hyaluronidase,Hyase)与肝素对肿瘤侵袭潜力的影响。方法 通过体外实验测定肿瘤细胞穿透Matrigel(人工基底膜)的潜力。结果 6株表达不同水平Hyase的人乳腺癌细胞侵袭潜力存在明显差异,Hyase高表达细胞株(Hyase>0.1 mU/L)强于Hyase低表达细胞株(Hyase<0.1 mU/L)($P<0.05$);肝素处理后,无论Hyase高表达或低表达细胞株的侵袭潜力均明显降低($P<0.05$),其侵袭潜力与肝素存在量效关系。结论 Hyase与肿瘤侵袭潜力有关,肝素能抑制肿瘤的侵袭。

关键词:透明质酸酶;肝素;人乳腺癌细胞株;Matrigel;侵袭
中图法分类号:R737.9;R973.2;R977.3 文献标识码:A

Effects of heparin on invasive potential of human breast cancer cell lines expressing hyaluronidase at different levels

WANG Xiao-yi, REN Guo-sheng, SHI Yuan, WANG Yi, YAO Zhen-xiang (Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of heparin on invasive potential of human breast cell lines expressing hyalurenidase (Hyase) at different levels. Methods *In vitro* experiments were carried out to determine the capacities of penetrating matrigel of 6 kinds of tumor cells and the effect of heparin at various concentrations respectively. Results The invasive potentials of 6 cell lines expressing different levels of Hyase varied significantly, and the penetrating capacity was significantly stronger in cell lines with higher-level of Hyase expression (Hyase> 0.1 mU/L) than those of lower ones (Hyase< 0.1 mU/L) ($P<0.05$). After heparin treatment, invasive capacity was decreased in all cell lines whether it expressed high or low level of Hyase previously, and the deduction was related to the doses of heparin. Conclusion The invasive capacity of tumor is in association with the expression of Hyase and can be suppressed by heparin.

Key words: hyaluronidase; heparin; human breast cancer cell lines; Matrigel; invasion

肿瘤的侵袭、转移是多因素多步骤连续的过程,其细胞外基质(Extracellular Matrix, ECM)在这一过程中起着重要作用。透明质酸(Hyaluronic Acid, HA)和透明质酸酶(Hyaluronidase, Hyase)是ECM的两种成份,参与了肿瘤的侵袭转移过程。本实验测定6株表达不同Hyase的人乳腺癌细胞株的侵袭潜力,了解Hyase对肿瘤侵袭潜力的影响,同时观察经肝素处理后的乳腺癌细胞株其侵袭潜力的变化。

1 材料与方法

1.1 人乳腺癌细胞株

MCF-7、ZR-75-30、T47D、HBL-100、MDA-MB-435S购于中科院上海生物所细胞库;MDA-MB-231由上海医科大学肿瘤医院沈镇宙老师惠赠(美国马利兰大学癌症中心提供);NIH3T3细胞由第三军医大学病理学研究所提供。Matrigel、Millicell-chamber和24孔板均购于美国BD公司。透明质酸酶标准品(4 U/L)和碱性磷酸酶标记的透明质酸蛋白(HNa-PA)由法国Laboratoire d'Oncologie Moleculaire, Centre H. Becquerel赠送。RPMI1640购于Hyclone公司;小牛血清、肝素钠、胰酶、碳酸氢钠和胰岛素均为国产。

1.2 制备趋化因子

用含10%小牛血清的RPMI1640液培养NIH3T3细胞(200 ml培养瓶),37 ℃,5% CO_2,饱和湿度,当细胞达80%饱和度时用生理盐水洗3次,然后加无血清RPMI1640液6 ml培养24 h后收集上清液,离心,−20 ℃保存备用。

1.3 侵袭性试验

将Matrigel按40 μl/孔均匀地铺在Millicell chamber膜上,成胶30 min后置紫外灯下照射过夜,实验前30 min再次成胶。用含10%小牛血清、2 mmol/L碳酸氢钠和160 U/L胰岛素的RPMI1640培养基培养乳腺癌细胞,常规传代。待细胞达80%饱和度时,消化、计数,取乳腺癌细胞2.0×10^5个(RPMI1640液0.6 ml)接种到成胶的Millicell chamber并将Millicell chamber置于24孔板内。肝素组将肝素按50 U/ml加入RPMI1640中,每个Millicell chamber含肝素30 U。同时在24孔板内加入NIH3T3细胞上清液作为趋化因子、每孔0.6 ml,培养48 h后取出Millicell chamber,用棉签头擦掉Matrigel,PBS液洗3次,95%乙醇固定15 min,HE染色,揭下Millicell chamber膜反贴在载玻片上。对MDA-MB-231细胞分别给予6个不同浓度的肝素处理(0、0.5、5、50、500、5 000 U/ml)观察其侵袭潜力。结果判定:在光镜下(×20)每个滤膜分别计数5个视野的穿膜细胞数,计算平均每个视野的细胞数。

1.4 Hyase测定

乳腺癌细胞株Hyase的测定采用酶联吸附测定法(Enzyme-linked sorbent assay, ELISA)[1]。

1.5 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用t检验。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070292)
作者简介:王小毅(1971—),男,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事肿瘤侵袭、转移机制方面的研究。电话:(023)69012281
收稿日期:2001-12-27;修回日期:2002-06-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

表达不同水平 Hyase 的人乳腺癌细胞株其侵袭潜力存在明显差异，Hyase 高表达细胞株(Hyase＞ 0. 1 mU/L)较 Hyase 低表达细胞株(Hyase＜ 0. 1 mU/L)明显增强(P＜ 0. 05)，见图 1、2。Hyase 与肿瘤侵袭潜力相关。经肝素处理后，无论 Hyase 高表达或低表达细胞株其侵袭潜力均明显降低(P＜ 0. 05)，见图 3、4 表 1，且肿瘤细胞侵袭潜力与肝素存在量效关系，当肝素浓度达到 5 000 U/ml 时未见肿瘤细胞穿透 matrigel，见表 2。

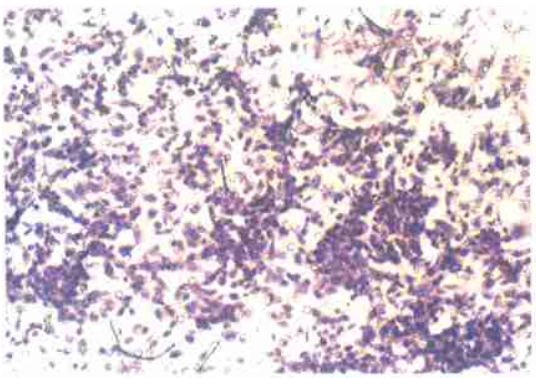


图 1 **Hyase 高表达癌细胞株 MDA-MB-231 的侵袭表现** (HE × 100)

Fig 1 Invasion of high hyase-expressing MDA-MB-231 cells (HE × 100)

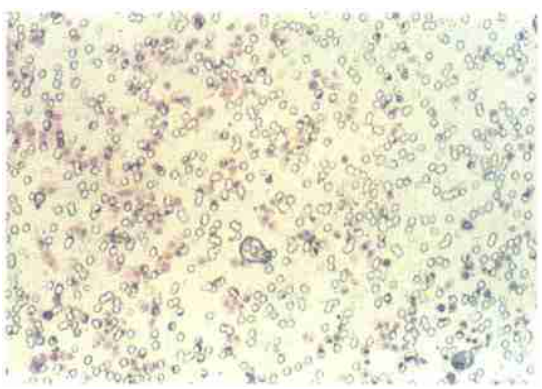


图 2 **Hyase 低表达癌细胞株 ZR-75-30 的侵袭表现** (HE× 100)

Fig 2 Invasion of low hyase-expressing ZR-75-30 cells (HE× 100)

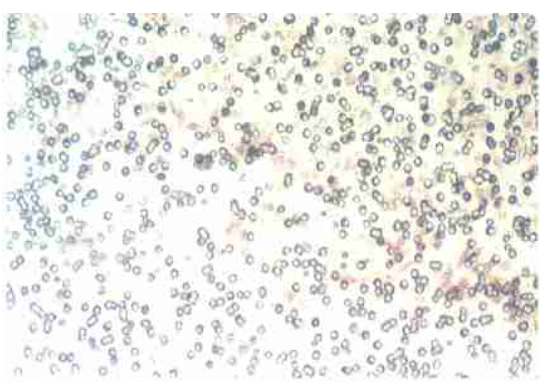


图 3 **加肝素 50 U/ml 后癌细胞株 MDA-MB-231 的侵袭表现** (HE× 100)

Fig 3 Invasion of MDA-MB-231 cells treated with 50 U/ml heparine (HE × 100)

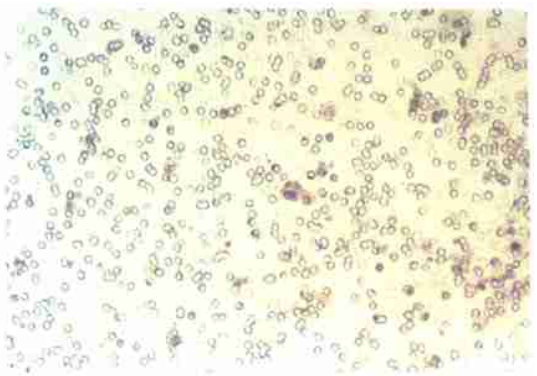


图 4 **加肝素 50 U/ml 后癌细胞株 ZR-75-30 的侵袭表现** (HE × 100)

Fig 4 Invasion of ZR-75-30 cells after 50 U/ml heparine (HE × 100)

表 1 **Hyase 及肝素对人乳腺癌细胞株侵袭潜力的影响($\bar{x} \pm s$)**

Tab 1 Effects of Hyase and heparin on invasive potential of breast cancer cells($\bar{x} \pm s$)

Cell lines	Hyase-expression level	Hyase (mU/L)	Number of invasive cells ($\bar{x} \pm s$)	
			Without heparin	With hepain
MCF-7	Low	＜0. 010	122. 0±7. 0	24. 4±5. 2
ZR-75-30	Low	＜0. 010	111. 6±3. 4	56. 8±3. 7
T47D	Low	0. 038±0. 002	102. 6±1. 6	35. 6±4. 5
HBL-100	High	0. 205±0. 035	296. 0±8. 6	91. 4±5. 5
MDA-MB-435s	High	0. 145±0. 045	255. 0±8. 3	80. 0±6. 0
MDA-MB-231	High	0. 365±0. 015	376. 2±8. 5	81. 2±3. 9

P＜ 0. 05 High hyase-expression group *vs* Low hyase-expression group; P＜0. 05 With heparin group *vs* Without heparin group

表 2 **不同剂量肝素对 MDA-MB-231 细胞侵袭力的影响($\bar{x} \pm s$)**

Tab 2 Dose-effect of heparin on the invasion potential of MDA-MB-231 cells($\bar{x} \pm s$)

Heparine (U/ml)	0	0. 5	5	50	500	5 000
Number of invasive cells	376. 2±8. 4	170. 2±12 4	113. 4±2. 8	81. 2±3. 9	21. 2±3. 9	0. 0±0. 0

3 讨论

肿瘤的侵袭、转移是多因素多步骤连续的主动过程，其中基质降解酶破坏基底膜的完整性是肿瘤细胞得以局部侵袭及远处转移的关键。Hyase 又称“扩散因子”是一种基质降解酶，一方面它降解 HA 刺激血管生成，同时又能降低细胞间的粘附，使细胞外基质去聚合，促进肿瘤细胞迁移[2]。Madan 等[3,4]发现在乳腺癌及前列腺癌组织中 Hyase 与肿瘤生长、侵袭、转移相关，Hyase 升高伴随着肿瘤侵袭潜能的增强。Vinata 等[5,6]报道，前列腺癌组织中 Hyase 的表达明显高于正常前列腺组织、前列腺良性肿瘤，Hyase 的表达与肿瘤分级及转移潜能明显相关；测定 11 株膀胱癌细胞培养上清液中的 Hyase，发现浸润性癌细胞株 Hyase 的表达比非浸润性癌细胞株高 10 ~ 100 倍。Dacai 等[7]通过 RT-PCR 技术测定黑色素瘤、黑色素瘤转移灶、结肠癌

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

和神经胶质瘤等肿瘤细胞株的 PH-20 mRNA，发现肿瘤细胞株有 Hyase 阳性和阴性之分，只有 Hyase 阳性细胞株才能诱导血管生成；Hyase 抑制剂(Apigenin)能抑制 Hyase 阳性细胞株诱导的新血管生成，并认为肿瘤细胞通过 Hyase 作为“分子破坏者”降解 HA 促进血管生成和肿瘤侵袭。前期实验的也发现人乳腺癌细胞株有 Hyase 高表达和 Hyase 低表达之分，Hyase 的表达与血管内皮生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、组织蛋白酶 D(cath-D)等肿瘤恶性因子呈正相关，与雌激素受体 ER 呈负相关，肝素能降低人乳腺癌细胞株对 Hyase 的表达。Matrigel 是大鼠 ESH 肉瘤细胞外基质提取物，由层粘蛋白(Laminin)、Collagen Ⅳ、硫酸肝磷脂蛋白多糖及整合素(Integrins)等组成，其成份与组织基底膜相似，在 37 ℃时呈胶冻样，可替代组织基底膜[8,9]。本实验用 Matrigel 模拟基底膜观察肿瘤细胞侵袭力，发现 6 株人乳腺癌细胞侵袭潜能存在明显差异，Hyase 高表达细胞株较低表达细胞株明显增强。肝素处理后无论 Hyase 高表达或低表达细胞株其侵袭力均降低且与肝素有量效关系。目前，有关 Hyase 与肿瘤侵袭、转移方面的研究报道并不多，Hyase 特异性抑制剂在肿瘤侵袭、转移及防治方面的作用也还不明确。肝素是一种特异性的葡萄糖胺糖，由多个 N-乙酰基葡萄糖胺和糖醛酸组成，具有抗凝，抑制血小板聚集等作用。Saiki 等[10]认为肝素能与粘附分子 Fibronectin、Laminin 和Ⅳ型胶原等特异性位点结合并抑制肿瘤细胞迁移；郑起等[11]通过体外实验发现肝素具有抑制肿瘤细胞生长，抑制肿瘤侵袭转移和提高宿主生存期的作用。Kuppusamy 等[12]认为肝素虽与 HA 在结构上相似，但肝素不能被 Hyase 降解相反能竞争性地抑制 Hyase 活性。目前还没有发现其它抗凝药物具有抑制肿瘤侵袭作用，肝素的这一作用是否与 Hyase 相关，是否能够通过抑制 Hyase 达到抑制肿瘤的侵袭、转移还有待进一步探索。

参考文献：

[1] Bertrand D, Philippe B, Catherine M, *et al*. Enzyme-linked hyaluronectin: aunique reagent for hyaluronoan assay and tissue location and for hyaluronidase activity detection[J]. Anal Biochem, 1995, 229(1): 35－41.

[2] West D C, Arnold F, Kumar S, *et al*. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid[J]. Science, 1985, 228(4 705): 1 324－1 326.

[3] Madan A K, Yu K, Dhurandhar N, *et al*. Association of hyaluronidase and breast adenocarcimoma invasiveness[J]. Oncol Rep, 1999, 6(3): 607－609.

[4] Madan A K, Pang Y, Wilkiemeyer M B, *et al*. Increased hyaluronidase expression in more aggressive prostate adenocarcinoma[J]. Oncol Rep, 1999, 6(6): 1 431－1 433.

[5] Vinata B L, Marvin J Y, Gullen G, *et al*. Identification of bladder tumor-derived hyaluronidase: Its similarity to HYAL1[J]. Cancer Res, 1999, 59(17): 4 464－4 470.

[6] Vinata B L, Diego R, Grethchen L S, *et al*. Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer[J]. J Biol Chem, 2001, 276(15): 11 922－11 932.

[7] Dacai Liu, Eric Pearlman, Eugenia Diaconu, *et al*. Expression of hyaluronidase by tumor cells induces angiogeneis *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(15): 7 832－7 837.

[8] Bao L, Matsumura Y, Baban D, *et al*. Effects of inoculation site and matrigel on growth and metastasis of human breast cancer cells[J]. Br J Cancer, 1994, 70(2): 228－232.

[9] Mark D S, Paul K, Suzi S, *et al*. The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor[J]. Clin Cancer Res, 1997, 3(11): 1 949－1 958.

[10] Ikuo Saiki, Jun Murata, Motowo Nakajima, *et al*. Inhibition by sulfated chitin derivatives of invasion through extracellular matrix and enzymatic degradation by metastatic melanoma cells[J]. Cancer Res, 1990, 50(12): 3 631－3 637.

[11] 郑　起, 汤钊猷, 薛　琼. 肝素在人肝癌裸鼠转移模型中对肿瘤生长转移的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 1998, 6(3): 151－152.

[12] Kuppusamy U R, Khoo H E, Das N P, *et al*. Structure-activity studies of flavonods as inhibitors of hyaluronidase[J]. Biochem Pharmacol, 1990, 40(2): 397－401.

（编辑　张　宁）

（上接 1213 页）

3　讨论

FcεRIα 链功能性表位位于胞外区，其跨膜区和胞内区因存在空间位阻，不能成为其功能性表位，FcεRI 膜外区α链 179 氨基酸残基，理论上应存在 5～7 个功能性表位，即能被 IgEFc 段所识别，或与抗 FcεRI 自身抗体所结合。经过可及性方案、可塑性方案以及二级结构预测等综合考虑其表位可能位于 N-末端氨基酸残基 5～9, 44～67, 71～79, 119～125, 141～156, 161～168 等组区域或附近。由于该α链上有 7 个潜在的 N-糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr)，可能对表位形成有一定影响。验证其预测结果，采用交叠肽合成方法分析，可达到其精细表位的预测目的。αtk 和αts 两条肽链的表位预测结果表明，两肽链的表位未因 134 位和 160 位的氨基酸替换所致不同，为下一步研究中利用αts 进行表达研究增添了信心。

关键词：IgE 受体；α链；表位；预测
中图法分类号：R392.11　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 孙仁山, 胡川闽, 刘荣卿, 等. 高亲和力 IgE 受体α链 cDNA 的克隆及序列分析[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(2): 123－125.

[2] Kochan J, Pettine L F, Hakimi J, *et al*. Isolation of the gene coding for the alpha subunit of the human high affinity IgE receptor[J]. Nucleic Acid Res, 1988, 16(8): 3 584.

（编辑　张大春）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net