

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2001.02.03

肝素酶基因表达与肺癌转移活性的初步研究

赵坡 钟梅 宋欣 吕亚利 王殿军 顾峥 陈乐真

【摘要】 目的 探讨肝素酶基因表达与肺癌转移的关系。方法 应用肝素酶基因引物、逆转录聚合酶链反应技术(RT-PCR)检测肺巨细胞癌株和 56 例原发肺癌及正常肺组织中肝素酶基因表达。结果 低转移和高转移的肺巨细胞癌株均为肝素酶基因表达阳性,已有淋巴结转移的肺癌阳性率为 80%(20/25)而无淋巴结转移的肺癌阳性率为 6.5%(2/31),两组间差异有显著性($P < 0.001$)。提示伴有淋巴结转移的病例肝素酶基因表达阳性率明显高于不伴转移者。肝素酶基因表达多见于鳞癌($P < 0.05$)和低分化癌($P < 0.01$),亦提示肝素酶基因表达可能与组织学分型及分化程度有关。结论 初步结果显示肝素酶基因表达可能为肺癌细胞获得转移活性的可靠标志之一,其检测可用于辅助判断肺癌患者预后。

【关键词】 肝素酶基因 肺肿瘤 转移

【中图分类号】 R734.2

Expression of heparanase gene and the metastatic activity of lung cancer ZHAO Po, ZHONG Mei, SONG Xin, LU Yali, WANG Dianjun, GU Zhen, CHEN Lezhen. Department of Pathology, Chinese General Hospital of PLA, Beijing 100853, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between the expression of heparanase gene and the metastatic activity of lung cancer. **Methods** Using the primers of heparanase gene, the expression of heparanase gene was detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) in two giant cell lung cancer cell lines with different metastatic activity and 56 primary tumor tissues of lung cancer and normal lung tissues. **Results** Both cell lines and 80% (20/25) of primary tumor tissues of lung cancer with lymph node metastasis showed positive expression of heparanase gene, whereas 6.5% (2/31) primary tumor tissues of lung cancer without lymph node metastasis was positive and the normal lung tissues were all negative. The positive rate for expression of heparanase gene was significantly higher in the tumor tissues with lymph node metastasis than that without lymph node metastasis ($P < 0.001$), higher in squamous cell carcinoma (47.2%, 17/36) than that in adenocarcinoma (20%, 4/20) ($P < 0.05$), and remarkably higher in the poorly differentiated tumors (65%, 13/20) than that in the well-mediate differentiated tumors (22.2%, 8/36) ($P < 0.01$). **Conclusion** The preliminary results suggest that the expression of heparanase gene may be one of the reliable markers for the metastatic activity gained by the lung cancer cells and could be used clinically in predicting the prognosis of patients.

【Key words】 Heparanase gene Lung neoplasm Metastasis

肿瘤转移的两个必需条件为瘤细胞侵犯基底膜、细胞外基质和肿瘤血管生成。硫酸肝素蛋白多糖是细胞外基质的主要成分之一并与其它细胞外基质的主要成分密切协同形成肿瘤细胞转移的重要屏障。肝素酶(heparanase)的作用为降解硫酸肝素蛋白多糖的硫酸肝素侧链,进而破坏其转移屏障的作用。在正常情况下肝素酶主要见于血小板、胎盘滋养叶母细胞和白细胞,在胚胎形态生成期、创伤愈合、组织修复和炎症过程中起着重要的生理功能作用。肿瘤形成和进展过程中,瘤细胞有效地“劫持”了以上正常细胞的功能,并可

能与血管损伤反应时从激活的血小板中释放肝素酶使炎细胞渗出和刺激内皮细胞分裂同样的分子机制来介导侵犯、转移和肿瘤血管生成的过程。最近哺乳类肝素酶基因已在海外成功分离^[1-3],并发现其活性与肿瘤的侵犯和转移关系密切。我们应用肝素酶基因引物和逆转录聚合酶链反应技术对我科既往建立的肺巨细胞癌低转移株和高转移株进行肝素酶基因表达检测,并研究其作为确定肺癌恶性程度即转移潜能可靠标志的价值。

1 材料与方法

1.1 样本及 RNA 提取 本研究采用既往建立的肺巨细胞癌低转移株 95-C 和高转移株 95-D^[4,5],56 例原发

肺癌新鲜组织取自我院 1999 年 12 月至 2000 年 7 月外科手术标本,其中鳞癌 36 例,腺癌 20 例;已有淋巴结转移的肺癌为 25 例(18 例鳞癌,7 例腺癌)。未转移的乳腺癌细胞株 MCF-7 和 5 例正常肺组织分别作为阴性和正常对照,1 例已转移的直肠癌和 1 例横纹肌肉瘤为阳性对照。瘤细胞株样本经 10% 胎牛血清、RPMI1640 培养基培养后收获,新鲜组织样本匀浆后采用 Trizo(Gibco)总 RNA 分离试剂盒分离总 RNA,紫外分光光度计测定后取 0.2 μ g 总 RNA 进行逆转录 PCR。

1.2 逆转录 PCR 肝素酶基因引物序列^[1]:HPU-355 5'-TTCGATCCCAAGAAGGAATCAAC-3' 和 HPL-229 5'-GTAGTGATGCCATGTAAGTGAATC-3'[由宝生物工程(大连)有限公司合成],TaKaRa 一步法 RNA PCR 试剂盒(AMV)购自宝生物工程(大连)有限公司。为防止样本中 DNA 污染,仅取常规 PCR 呈阴性反应的样本总 RNA 0.2 μ g 进入 25 μ l 检测体系。50 $^{\circ}$ C 30 分钟逆转录反应后 94 $^{\circ}$ C 2 分钟变性;继而进入 94 $^{\circ}$ C 30 秒,60 $^{\circ}$ C 30 秒,72 $^{\circ}$ C 1 分钟循环,循环次数为 30 次,取 10 ml 反应产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭紫外灯下染色观察并照相。为保证模板及试剂质量,采用甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 G3PDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)作为内对照。

1.3 统计学处理 结果采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 肝素酶基因逆转录 PCR 结果 肺巨细胞癌低转移株和高转移株总 RNA 经肝素酶基因引物,逆转录 PCR 扩增,2% 琼脂糖凝胶电泳、紫外透射灯光下均呈现一 585 bp 阳性荧光条带,高转移株肝素酶基因产物的荧光强度明显强于低转移株(Leica QTM-970 图像分析仪扫描凝胶图像条带,将灰度值转换为积分光密度值 IOD,两者分别为 235.28 和 65.58)。未转移的乳腺癌细胞株 MCF-7 和 5 例正常肺组织均呈阴性,56 例原发肺癌中 22 例呈阳性,其中已有淋巴结转移的肿瘤阳性率为 80%(20/25),而无转移的肿瘤阳性率为 6.5%(2/31),两组间差异有显著性($P < 0.001$)。提示伴有淋巴结转移的病例肝素酶基因表达阳性率明显高于未转移者(图 1)。

2.2 肝素酶基因表达与肺癌组织学分型、分化程度的关系 36 例鳞癌病例中,17 例(47.2%)肝素酶基因表达阳性,20 例腺癌病例中,4 例(20%)肝素酶基因表达阳性,组间差异有显著性($P < 0.05$)。36 例高、中分化

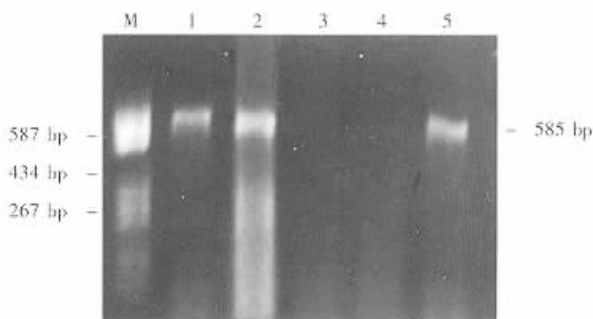


图 1 肺癌肝素酶基因 mRNA 表达的 RT-PCR 结果

Fig 1 Expression of heparanase gene mRNA in lung cancer

1:低转移肺癌细胞株 95-C;2:高转移肺癌细胞株 95-D;3、4:分别为正常肺组织和未转移的肺癌组织;5:已转移的肺癌组织。转移性肺癌肝素酶基因表达阳性,而未转移的肺癌和正常肺肝素酶基因表达阴性。1 and 2: low(95-C) and high(95-D) metastatic human giant cell lung cancer cell lines; 3 and 4: Normal lung and non-metastatic lung cancer tissues; 5: Lung cancer tissue with lymph node metastasis.

癌中,8 例(22.2%)肝素酶基因表达阳性,20 例低分化癌中,13 例(65%)肝素酶基因表达阳性,两组间差异有显著性($P < 0.01$)。

3 讨论

哺乳类肝素酶最近由国外成功克隆分离^[1-3]并被发现于乳腺癌、大肠癌、肝癌、前列腺癌和淋巴瘤等多种肿瘤中表达。肝素酶主要通过降解硫酸肝素来破坏基底膜和细胞外基质中的硫酸肝素蛋白多糖屏障,故被认为是肿瘤恶性侵犯和转移的重要标志。其作用机制可能为:①破坏基底膜和细胞外基质;②释放激活的生长因子,如碱性纤维母细胞生长因子,该因子可诱导血管内皮细胞、纤维母细胞以及肿瘤细胞的增生和迁移;③释放激活的尿激酶纤维蛋白溶酶原激活子和组织纤维蛋白溶酶原激活子,产生纤维蛋白溶酶,后者亦可释放活化的、与硫酸肝素结合的碱性纤维母细胞生长因子和激活某些基质金属蛋白酶以产生协同的降解基质和进一步的阳性反馈作用;④肿瘤细胞可由以上作用机制产生侵犯和血管内参与外渗作用而达到转移。

我们的研究结果显示正常肺组织、未转移的乳腺癌细胞株 MCF-7 肝素酶基因均为阴性,肺癌低转移株 95-C 和高转移株 95-D 均表达阳性,伴有淋巴结转移的病例肝素酶基因表达阳性率明显高于未转移者,这提示肝素酶基因表达可能成为判断肿瘤转移的有益指标,值得进一步深入研究。本研究结果中肝素酶基因表达多见于鳞癌和低分化癌,亦提示肝素酶基因表达

可能与组织学分型及分化程度有关。

参 考 文 献

- 1 Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, et al. Mammalian heparanase: Gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, 1999, 5(7):793-802.
- 2 Hulett MD, Freeman C, Handorf BJ, et al. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nature Medicine*, 1999, 5(7):803-809.
- 3 Eccles SA. Heparanase: Breaking down barriers in tumors. *Nature*

Medicine, 1999, 5(7):735-736.

- 4 陈乐真, 黄靖香, 游联壁, 等. 人肺巨细胞癌细胞系(PLA-801)的建立和生物特性. *中华肿瘤杂志*, 1983, 5(6):409-412.
- 5 陆应麟, 黄靖香, 李向红, 等. 人肺巨细胞癌母细胞系及其克隆化细胞株(A, C, D, E)裸鼠皮下种植后自发转移特性的研究. *中华肿瘤杂志*, 1989, 11(1):3-7.
- 6 Kosir MA, Wang W, Zukowski KL, et al. Degradation of basement membrane by prostate tumor heparanase. *J Surg Res*, 1999, 81(1):42-47.

(收稿 2000-07-07 修回 2000-09-14)

(本文编辑 张世雯)