

透明质酸合酶-2 在癌相关成纤维细胞促进舌癌细胞侵袭中的作用

张子文,张宇,王东苗,江宏兵*

(南京医科大学口腔医学院,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:检测透明质酸合酶 2 (hyaluronan synthase 2, HAS2) 在正常成纤维细胞(normal zone fibroblasts, NFs)及癌相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)中的表达,并探讨其在 CAFs 介导的舌鳞癌细胞系 Cal27 侵袭行为中的作用。方法:分别从同一舌癌患者手术切除标本的癌组织及癌旁组织获取 CAFs 和 NFs。免疫细胞化学、Western blot 法鉴定细胞表型。实时定量 RT-PCR 及 Western blot 检测透明质酸合酶在两种细胞中的表达。利用 Transwell 小室共培养模型,观察 CAFs 及 NFs 对舌癌细胞系 Cal27 侵袭能力的影响。利用 siRNA 抑制 CAFs 中的 HAS2,并分析其对 Cal27 侵袭能力的影响。结果: α -SMA 表达于 CAFs, NFs 中几乎无表达。Cal27 在 CAFs 组中的侵袭力显著高于 NFs 组及空白对照组($P < 0.01$)。实时定量 RT-PCR 结果显示 HAS2 在 CAFs 中的表达是 NFs 的 7 倍($P < 0.01$),蛋白水平则为 NFs 的 3 倍($P < 0.01$);Cal27 在 HAS2 干扰组的侵袭力显著低于 CAFs 组及无关序列组($P < 0.01$)。结论:CAFs 具有促进舌癌细胞侵袭能力的作用,高表达 HAS2 可能是其作用机制之一,抑制肿瘤微环境中 CAFs 的 HAS2 功能可能是一条新的抗肿瘤侵袭转移的途径。

[关键词] 透明质酸合酶 2;癌相关成纤维细胞;舌癌;侵袭

[中图分类号] R739.86

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)02-153-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20140206

Effects of hyaluronan synthase 2 on invasiveness of tongue cancer cells mediated by cancer-associated fibroblasts

Zhang Ziwen, Zhang Yu, Wang Dongmiao, Jiang Hongbing*

(Institute of Stomatology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the level of hyaluronan synthase 2 (HAS2) expressed in normal zone fibroblasts (NFs) and cancer-associated fibroblasts (CAF), as well as its impact on squamous cancer cells of the tongue. **Methods:** CAFs and NFs were received from carcinoma and para-carcinoma tissue of the same tongue cancer patient, respectively. The cell phenotype was verified by immunocytochemistry and Western blot. The invasiveness of Cal27 in NFs, CAFs and control group was compared by transwell chamber assay. The expression of HAS in fibroblasts was measured by Western blot and real-time RT-PCR. HAS2 was knocked down by siRNA, and the invasiveness of Cal27 in HAS2-interferenced group and control group was surveyed by transwell chamber assay. **Results:** α -SMA was expressed in CAFs but not NFs. Cal27 had highest invasiveness in CAFs group in comparison with NFs group or control group ($P < 0.01$). The level of HAS2 expression was 6 times higher in CAFs than that in NFs determined by real-time RT-PCR ($P < 0.01$) and 2 times higher determined by Western blot. The invasiveness of Cal27 was largely inhibited by down-regulation of HAS2 in CAFs in contrast to control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** CAFs promoted the invasiveness of oral tumor cells mostly by higher level of HAS2 in vitro, and inhibition of HAS2 in CAFs may be a new therapy for anti-tumor invasion and metastasis.

[Key words] hyaluronan synthase 2; cancer-associated fibroblasts; tongue cancer; invasion

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(02): 153-158]

哺乳动物中存在 3 种催化透明质酸合成的同工酶 (HAS1, HAS2, HAS3), 它们都是细胞膜整合蛋白, 结构上有 50%~71% 的同源性。其中 HAS1, 2 合

[基金项目] 江苏高校优势学科建设工程资助项目

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: jhb@njmu.edu.cn

成高分子量透明质酸 (hyaluronan, HA), 而 HAS3 合成低分子量的 HA。HAS2 在组织中分布广泛, 在胚胎和心脏发生及其后的细胞迁移分化中有重要作用^[1]。HAS2 能够促进肿瘤细胞的增殖, 激活形成血管的信号通路, 从而促进肿瘤的发生发展^[2-3], 但

在肿瘤微环境中的作用少见研究报道。

肿瘤的转移首先需要肿瘤细胞获得局部侵袭的能力,已有充分的研究表明,癌相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)作为肿瘤基质中的主要细胞,在肿瘤侵袭及转移的过程中发挥着重要作用,具有促进肿瘤细胞增殖、干细胞化、上皮间质转化(EMT),及肿瘤细胞的侵袭转移能力^[4-6]。然而,CAF_s影响肿瘤细胞生物学行为的具体机制仍未完全阐明。HA是组织器官间质中的重要细胞外基质大分子,主要由间质成纤维细胞合成,具有储存生物活性分子、维持组织内稳态的功能,在肿瘤发生发展过程中的生物学作用已引起国内外学者的关注^[7-8]。舌癌是最常见的口腔癌,侵袭转移是影响其预后的最重要因素,HAS在舌癌CAF_s中是否具有调节癌细胞侵袭能力的作用尚未见报道。

本研究在体外分离培养舌癌CAF_s前提下,与NF_s对比,观察CAF_s对舌癌细胞侵袭能力的影响,在此基础上检测CAF_s中HAS的表达,并通过HAS2干扰方法,观察抑制HAS2后的CAF_s对舌癌细胞侵袭能力的影响,为进一步利用抑制HAS2手段治疗舌癌提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM、DMEM/F12培养液(Gibco公司,美国),南美胎牛血清(Hyclone公司,美国),siRNA(Sigma公司,美国),lipofectamine 2000(Invitrogen公司,美国), α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、HAS2(Abcam公司,英国),vimentin(CST公司,美国), β -actin、HRP标记山羊抗兔IgG,HRP标记山羊抗小鼠IgG(南京巴傲德公司),DAB显色液(北京中杉金桥),HRP化学发光底物、8 μ m孔径小室(Millipore公司,美国),鼠胶原基质胶(BD公司,美国),TRIzol(Ambion公司,美国),Primescript逆转录试剂盒、实时定量PCR试剂盒(TaKaRa公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

组织块取自南京医科大学附属口腔医院患者,术中及术后病理显示舌鳞状细胞癌。从舌癌组织及阴性切缘处分别剪下5 mm \times 5 mm组织块,按组织块贴壁法培养原代细胞。差异消化法去除上皮细胞,保留成纤维细胞。NF_s和CAF_s培养在DMEM,舌鳞癌细胞系Cal27(上海第九人民医院馈赠,ATCC公司,美国)培养在DMEM/F12培养液里。培养时均加

入10%FBS。对于利用siRNA抑制CAF_s中HAS2的表达,选择Lipo2000作为载体,按照说明书转染CAF_s 48 h,分别得到无关序列干扰组,HAS2干扰组。引物购自美国Sigma公司,序列如下:NM_005328, siRNA:5'-CCAGUAUCAFUUUFFUUUAdTdT-3', Control siRNA:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'。

1.2.2 Western blot

蛋白裂解液提取细胞总蛋白,10%聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,一抗 α -SMA(1:800) β -actin(1:3 000)室温孵育1 h,4 $^{\circ}$ C过夜。PBST洗脱未结合的一抗。二抗(1:10 000)室温孵育1 h,PBST洗脱未结合的二抗。加入发光液LAS4000mini成像系统检测。Image J软件收集分析条带灰度值。

1.2.3 免疫细胞化学

细胞接种在1 cm \times 1 cm无菌玻片上,4%多聚甲醛室温固定30 min,0.3% H_2O_2 处理15 min,0.2% Triton X-100冰上处理30 min。正常山羊血清37 $^{\circ}$ C入湿盒孵育1 h,一抗 α -SMA、vimentin(1:100),4 $^{\circ}$ C过夜。PBS洗脱未结合的一抗。滴加HRP标记的二抗,室温孵育1 h。PBS洗脱未结合的二抗。DAB显色液作用10 min,苏木素复染,光学显微镜下观察。

1.2.4 RNA提取及实时定量PCR

按照常规方法,利用TRIzol提取RNA,逆转录成cDNA。参照文献^[9],引物由上海生工公司合成。引物序列:HAS1:F:5' -GGAATAACCTCTTGCAGCAGTT-TC-3',R:5' -GCCGGTCATCCCCAAAAG-3'; HAS2:5' -TCGCAACACGTAACGCAAT-3',R:5' -ACTTCTCTTTTTCCACCCCATTT-3'; HAS3:5' -AACAA-GTACGACTCATGGATTTTCCT-3',R:5' -GCCCGCTC-CACGTTGA-3'; GAPDH:F:5' -CCCATGTTTCGTCAT-GGGTGT-3',R:5' TGGTCATGAGTCCTTCCACGATA-3'。ABI PRISM 7300PCR系统扩增产物,读取Ct值,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算实验组相对于对照组基因表达的差异。

1.2.5 Transwell小室侵袭实验

1×10^5 个NF_s、CAF_s、无关序列及HAS2干扰CAF_s接种至24孔板内,24 h后将含有基质胶(1:9)的8 μ m孔径上室插入。于上室接种 5×10^4 个Cal27,上室无血清DMEM,下室10%血清DMEM完全培养基,37 $^{\circ}$ C共培养24 h取出小室。4%多聚甲醛室温固定30 min,用棉签小心擦去基质胶,结晶紫染色15 min,PBS洗去背景显微镜下观察计算滤膜下层细胞数。

1.3 统计学方法

所有实验独立重复 3 次, 所得数据采用 SPSS17.0 统计软件分析。两组间比较采用 *t* 检验; 3 组及以上采用单因素方差分析检验方法, 组内两两比较采用 SNK-*q* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

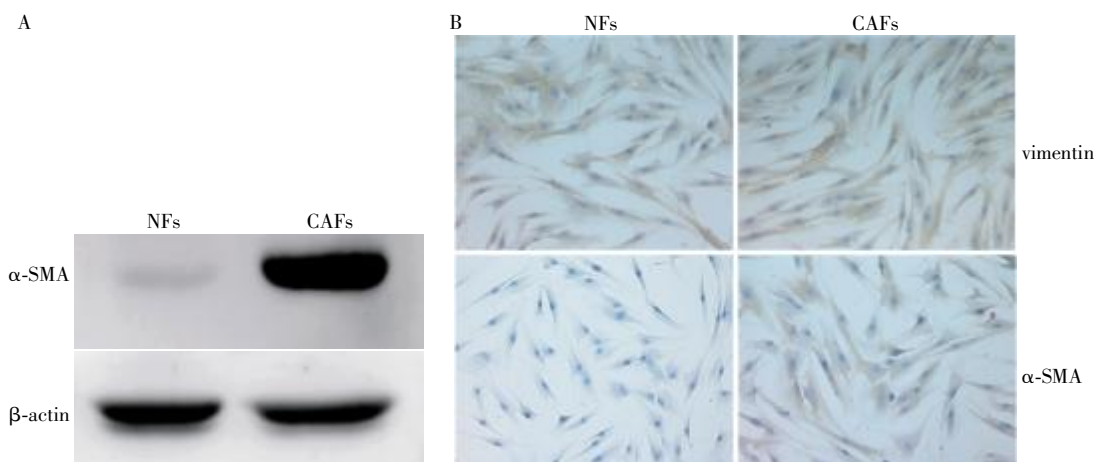
2 结果

2.1 CAFs 和 NFs 的表型鉴定

取纯化后的第 2 代成纤维细胞, Western blot 及

免疫细胞化学鉴定细胞表型。 α -SMA 是目前广泛采用的 CAFs 表型标记, Western blot 结果表明, CAFs 中在约 42 000 处检测到明显条带, 而 NFs 中几乎检测不到 α -SMA 表达(图 1A)。细胞爬片 DAB 染色显示 α -SMA 定位于细胞质(棕色), 仅 CAFs 中阳性染色, 细胞核苏木素染色呈蓝色。而间质标记物 vimentin 在所有的 CAFs 及 NFs 细胞浆中表达(图 1B), 说明获取的两种细胞均来自于间叶组织, 排除上皮细胞。

2.2 CAFs 促进舌癌细胞的侵袭能力



A: Western blot 结果; B: 免疫细胞化学 DAB 染色显示间叶组织标记 vimentin 两型成纤维细胞均表达, 而 α -SMA 仅特异表达于 CAFs。

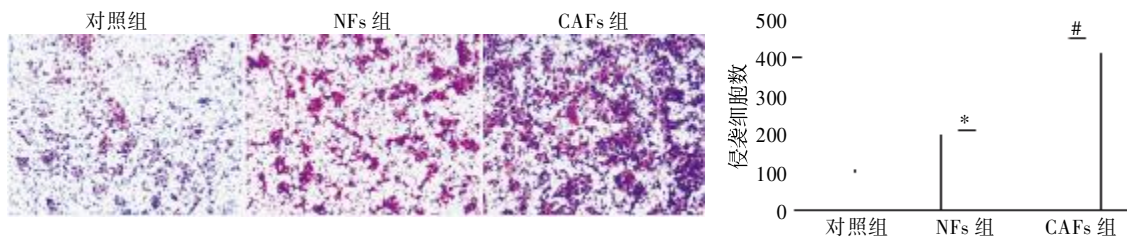
图 1 Western blot 及免疫细胞化学鉴定细胞表型

Figure 1 Two types of fibroblasts were verified by Western blot and immunocytochemistry

本实验考察取自舌体组织的 NFs 和 CAFs 对舌癌细胞系 Cal27 侵袭的影响, 模拟体内口腔癌细胞局部侵袭。利用 Transwell 小室模型, 发现相比于空

白对照组和 NFs 组, CAFs 组能够显著促进舌癌细胞系 Cal27 穿过基质胶(图 2)。

2.3 HAS2 在 CAFs 中高表达



100 倍镜下随机选取 6 个视野拍照并计数。与对照组比, $*P < 0.01$ ($n = 6$); 与 NFs 组比, $*P < 0.01$ 。

图 2 CAFs 具有更强能力促进肿瘤细胞侵袭

Figure 2 Stronger effects of CAFs on promotion of cancer cells invading

通过实时定量 RT-PCR 比较了 HAS1, 2, 3 在 NFs 和 CAFs 中的表达情况, 结果发现只有 HAS2 在两种成纤维细胞中的表达具有显著差异 ($P < 0.01$), 且 CAFs 的表达量是 NFs 的 7 倍多(图 3A)。Western blot 进一步验证了这种差异(图 3B)。

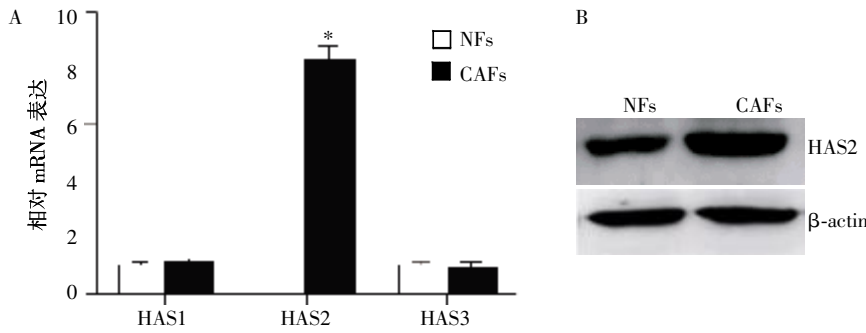
2.4 siRNA 敲减 CAFs 中的 HAS2 表达

为了探讨 CAFs 高表达 HAS2 是否是其促进肿

瘤细胞侵袭的原因之一, 本实验设计 HAS2 siRNA, 转染 CAFs 48 h 后提取总 RNA 和总蛋白。检测结果显示干扰组 HAS2 的表达受到显著抑制(图 4)。说明成功得到了 HAS2 敲减的 CAFs。

2.5 敲减 CAFs 中 HAS2 表达, 明显抑制其诱导的舌癌细胞侵袭能力

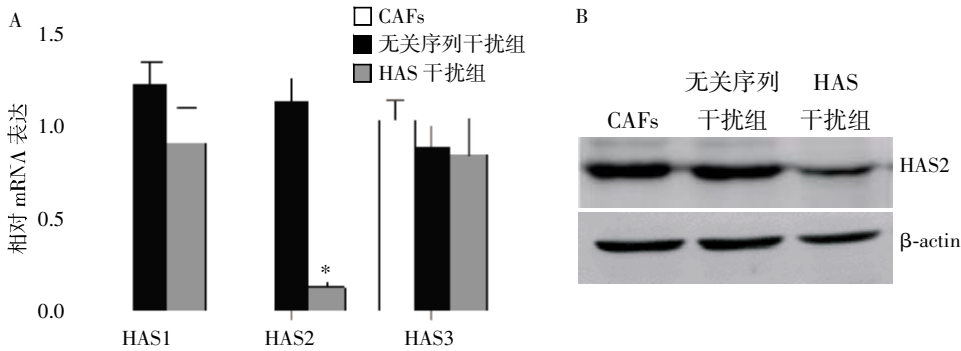
为了观察 CAFs 中 HAS2 敲减后对舌癌细胞侵



A:实时定量 RT-PCR 比较 NFs 和 CAFs 中 HAS1,2,3 转录水平的差异,与 NFs 组比,* $P < 0.01$ ($n = 3$);B:Western blot 比较 NFs 和 CAFs 中 HAS2 蛋白水平的差异。

图 3 HAS2 高表达于 CAFs

Figure 3 CAFs expressed higher level of HAS2



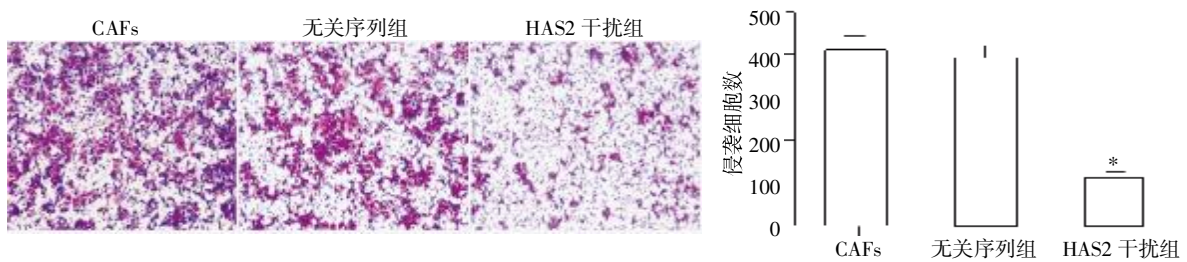
A: 利用 Lipo2000 将含有无关序列及 HAS2 干扰序列的 siRNA 转染入 CAFs, 并与未转染组转录水平比较 HAS1,2,3 的表达, 结果显示 HAS2 干扰效率在 80% 以上, 而 HAS1,3 表达不受影响, 说明干扰序列的特异性, 与 CAFs 组及无关序列干扰组比,* $P < 0.01$ ($n = 3$);B: 蛋白水平检测 CAFs 组、无关序列干扰组和 HAS2 干扰组 HAS2 的表达。

图 4 利用 siRNA 敲减 HAS2

Figure 4 HAS2 in CAFs was knocked down by siRNA

袭能力的影响,采用 Transwell 小室模型,比较正常 CAFs 组、无关序列转染 CAFs 组和转入特异 HAS2 干扰序列的 CAFs 组对 Cal27 侵袭的影响。结果显

示 HAS2 干扰组中穿过基质胶移动至滤膜下层的肿瘤细胞明显减少(图 5),反向证实了 CAFs 中 HAS2 对肿瘤细胞侵袭的促进作用。



与 CAFs 组及与无关序列组比,* $P < 0.01$ ($n = 6$)。

图 5 CAFs 中 HAS2 抑制后对肿瘤细胞侵袭的影响

Figure 5 Invading ability of oral cancer cells was largely inhibited by reduction of HAS2 in CAFs

3 讨论

作为肿瘤微环境中的主要基质细胞,CAFs 对肿瘤细胞生物学行为的影响一直是一个热点问题,本实验证实,与 NFs 相比 CAFs 具有促进舌癌细胞侵

袭能力的作用;就目前已知的 3 种 HAS,本研究检测了他们在 NFs 和 CAFs 中的表达。结果显示, HAS2 在舌癌 CAFs 中明显高表达,提示舌癌 CAFs 可能通过 HAS2 介导其促进舌癌细胞的侵袭能力,通过 HAS2 干扰技术进一步证实了这一推测。研究

表明,肿瘤细胞可通过 HAS2 调节自身的生物学行为,其机制可能在于 HAS2 抑制了基质金属蛋白酶(MMPs)抑制剂 TIMP 活性,间接导致 MMPs 活性增强,使其降解更多的胶原,为肿瘤细胞的迁移提供有利的通道。从而促进了肿瘤细胞的侵袭能力^[9]。

舌癌 CAFs 中高表达 HAS2 对舌癌细胞的侵袭转移具有重要作用。肿瘤细胞侵袭转移涉及复杂的生物学调控机制,不仅需要癌细胞间的脱黏附,而且需要营造一个适于肿瘤细胞迁移的微环境通路。其中,MMPs 不仅可以降解细胞外基质,而且具有降解癌细胞间黏附的能力^[10-11]。通过体外共培养模拟肿瘤微环境模型,本研究初步证实 CAFs 通过高表达 HAS2 介导其促进舌癌细胞的侵袭,但有关微环境中 MMPs 和 TIMPs 的表达水平变化有待进一步深入研究。

舌癌 CAFs 中高表达 HAS2 的另一个重要意义在于:高表达 HAS2 可以合成更多的 HA,重塑有利于癌细胞发生发展的微环境。HA 是一种高分子多糖,具有吸附微环境生物活性大分子的功能,是肿瘤细胞信号调控的“生长因子储库”^[7-8]。尽管目前尚未见报道 CAFs 高表达 HAS2 通过何种分子机制激活肿瘤细胞,但从肿瘤细胞的研究成果可以得到一些提示,Dunn 等^[10]利用反义 HAS2 载体的方法抑制结肠癌细胞中 HAS2 的表达,导致 MMP7 的表达下降,肿瘤细胞的侵袭能力随之下降。在乳腺癌中则深入研究了 HA 相关的合成、降解酶,受体,不同分子量的 HA 与肿瘤的关系,支持 HAS 能够增强肿瘤的侵袭转移^[9,12-13]。因此,在舌癌中,CAFS 高表达 HAS2 促进肿瘤细胞侵袭是否依赖 HA,是否改变一些酶的活性值得深入研究。

目前认为,CAF 们主要是由肿瘤细胞诱导 NFs 而来,因此,CAF 们中高表达 HAS 可能是肿瘤细胞分泌生长因子调控的结果。Willenberg 等^[7]发现在恶性黑色素瘤中 HA 主要来自瘤旁成纤维细胞,且肿瘤细胞通过 PDGF-AA 和 PDGF-CC 控制成纤维细胞 HAS2 的表达,影响 HA 的分泌及自身增殖。一些炎症因子如 TNF- α 、IL1- β 可促进成纤维细胞^[14],生长因子如成纤维细胞生长因子 2(FGF-2)可增强牙周膜韧带细胞 HAS2 的表达^[15]。Li 等^[16]发现在人皮肤成纤维细胞中,PDGF-BB 通过 ERK- MAPK -PI3K 信号通路增强 HAS2 的转录和翻译,使用 ERK 及 PI3K 等激酶的抑制剂可以抑制 HAS2 的表达及 HA 的分泌。这些结果说明,HAS2 受许多生长因子和细胞因子及其下游信号通路调控,但在口腔癌中 CAFs

中的 HAS2 的调节情况还需深入研究。

本研究结果初步证实了 HAS2 在介导舌癌 CAFs 促进癌细胞侵袭能力中具有重要作用,抑制 HAS2 策略对阻断舌癌侵袭转移是一条新的治疗途径,同时,对进一步研究肿瘤微环境奠定了实验基础。

[参考文献]

- [1] Spicer AP. Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family [J]. *J Bio Chem*,1998,273(4): 1923-1932
- [2] Kobayashi N, Miyoshi S, Mikami T, et al. Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization [J]. *Cancer Res*,2010,70 (18):7073-7083
- [3] Simpson MA. Concurrent expression of hyaluronan biosynthetic and processing enzymes promotes growth and vascularization of prostate tumors in mice [J]. *Am J Pathol*, 2006,169(1):247-257
- [4] Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, et al. Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness [J]. *Cancer Res*,2010,70 (17):6945-6956
- [5] Karagiannis GS, Poutahidis T, Erdman SE, et al. Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue [J]. *Mol Cancer Res*,2012,10(11):1403-1418
- [6] Zhang Y, Tang H, Cai J, et al. Ovarian cancer-associated fibroblasts contribute to epithelial ovarian carcinoma metastasis by promoting angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor cell invasion [J]. *Cancer Lett*,2011,303(1): 47-55
- [7] Willenberg A, Saalbach A, Simon JC, et al. Melanoma cells control HA synthesis in peritumoral fibroblasts via PDGF-AA and PDGF-CC: impact on melanoma cell proliferation [J]. *J Invest Dermatol*,2012,132(2):385-393
- [8] Pedron S, Becka E, Harley BA. Regulation of glioma cell phenotype in 3D matrices by hyaluronic acid [J]. *Biomaterials*,2013,34(30):7408-7417
- [9] Bernert B, Porsch H, Heldin P. Hyaluronan synthase 2 (HAS2) promotes breast cancer cell invasion by suppression of tissue metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP-1) [J]. *J Biol Chem*,2011,286(49):42349-42359
- [10] Dunn KM, Lee PK, Wilson CM, et al. Inhibition of hyaluronan synthases decreases matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) expression and activity [J]. *Surgery*,2009,145(3):322-329

[11] Owens P, Polikowsky H, Pickup MW, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate mammary fibroblasts to promote mammary carcinoma cell invasion [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e67533

[12] Urakawa H, Nishida Y, Knudson W, et al. Therapeutic potential of hyaluronan oligosaccharides for bone metastasis of breast cancer [J]. J Orthop Res, 2012, 30(4): 662-672

[13] Li Y, Li L, Brown TJ, et al. Silencing of hyaluronan synthase 2 suppresses the malignant phenotype of invasive breast cancer cells [J]. Int J Cancer, 2007, 120(12): 2557-2567

[14] Campo GM, Avenoso A, Campo S, et al. TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-1beta modulate hyaluronan synthase expression in human skin fibroblasts; synergistic effect by concomitant treatment with FeSO₄ plus ascorbate [J]. Mol Cell Biochem, 2006, 292(1-2): 169-178

[15] Shimabukuro Y, Terashima H, Takedachi M, et al. Fibroblast growth factor-2 stimulates directed migration of periodontal ligament cells via PI3K/AKT signaling and CD44/hyaluronan interaction [J]. J Cell Physiol, 2011, 226(3): 809-821

[16] Li L, Asteriou T, Bernert B, et al. Growth factor regulation of hyaluronan synthesis and degradation in human dermal fibroblasts; importance of hyaluronan for the mitogenic response of PDGF-BB [J]. Biochem J, 2007, 404(2): 327-336

[收稿日期] 2013-07-30

科技出版物中数字的用法

1. 凡是可以用阿拉伯数字且很得体的地方, 均应使用阿拉伯数字。
2. 日期和时刻的表示。需注意年份不能简写, 如 1997 年不能写成 97 年。
3. 计量或计数单位前的数字应采用阿拉伯数字; 多位阿拉伯数字不能拆开转行; 小数点前或后超过 4 位数(含 4 位)的应从小数点起向左或向右每 3 位空出适当间隙, 不用千分撇“,”; 数值的有效数字应全部写出, 如“1.50、1.75、2.00”, 不能写成“1.5、1.75、2”。
4. 参数与偏差范围的表示:
 - (1) 数值范围: 5~10; 注意 $3 \times 10^3 \sim 8 \times 10^3$, 不能写成 $3 \sim 8 \times 10^3$;
 - (2) 百分数范围: 20%~30%, 不能写成 20~30%;
 - (3) 具有相同单位的量值范围: 1.5~3.6 mA 不必写成 1.5 mA~3.6 mA;
 - (4) 偏差范围: $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 不写成 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $(85 \pm 2)\%$ 不能写成 $85 \pm 2\%$;
5. 附带尺寸单位的量值相乘写为: 50 cm×80 cm×100 cm, 不能写成 50×80×100 cm, 或 50×80×100 cm³。

(本刊编辑: 接雅俐)