

透明质酸合成酶 2 在肾癌中的表达及临床意义*

刘军¹ 王博涵¹ 卢鹏¹ 丰水强¹ 许盛飞¹ 余斌¹ 杨为民¹

[摘要] 目的:研究透明质酸合成酶 2 在肾癌中的表达,并探讨其潜在的临床意义。方法:运用实时定量聚合酶链反应(qPCR)方法检测五种肾癌细胞(ACHN、Caki-1、OS-RC-2、786-O、SN12PM6)透明质酸合成酶三种亚型(HAS1、HAS2、HAS3) mRNA 的表达,运用 Western blot 方法进一步检测 mRNA 表达含量高的 HAS 亚型在五种肾癌细胞系及肾透明细胞癌(ccRCC)组织中的蛋白表达。结果:在五种肾癌细胞系中 HAS2mRNA 表达水平平均明显高于正常肾小管上皮细胞(HK-2),其中在肾癌 SN12PM6 细胞系中表达水平最高(均 $P < 0.05$),HAS1mRNA 的表达水平平均明显低于正常肾小管上皮细胞(均 $P > 0.05$),而 HAS3mRNA 表达水平除肾癌 Caki-1 细胞系外均低于正常肾小管上皮细胞($P > 0.05$)。在五种肾癌细胞系中 HAS2 蛋白均明显表达,而正常肾小管上皮细胞无明显表达。在肾透明细胞癌组织中 HAS2 蛋白表达也明显高于相应癌旁组织。结论:透明质酸合成酶 2 在多种肾癌细胞系和肾透明细胞癌组织中均明显表达,提示透明质酸合成酶 2 可能在肾癌尤其在肾透明细胞癌发生发展过程中起着至关重要的某种作用,并可能成为新的肾透明细胞癌分子标志物。

[关键词] 肾癌;透明质酸;透明质酸合成酶 2

[中图分类号] R737.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-1420(2013)02-0093-03

Expression and Clinical Significance of Hyaluronan Synthase 2(HAS2) in Renal Carcinoma

LIU Jun WANG Bohan LU Peng FENG Shuiqiang
XU Shengfei YU Xiao YANG Weimin

(¹Department of Urology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030, China)

Corresponding author: YU Xiao, E-mail: yujiuhu@gmail.com

Abstract Objective: To study the expression of HAS2 in renal carcinoma and discuss the potential clinical significance. **Method:** qPCR was applied to detect the expression of HAS1 mRNA, HAS2 mRNA and HAS3 mRNA in five ccRCC cell lines (ACHN, Caki-1, OS-RC-2, 786-O, SN12PM6) and human renal proximal tubular cell line (HK-2 cells). Additionally, Western blot was taken to examine the expression of the increased HAS protein in above renal cancer cells and ccRCC tissues. **Result:** HAS2 mRNA expression was obviously higher in the five ccRCC cell lines than that in the HK-2 cells, especially in the SN12PM6 cells ($P < 0.05$). HAS1 mRNA expression reduced distinctly in the five ccRCC cell lines compared with the HK-2 cells ($P > 0.05$). The expression of HAS3 mRNA was also lower in the renal cancer cell lines than that in the HK-2 cells except Caki-1 cells ($P > 0.05$). The expression of HAS2 protein significantly increased in the five ccRCC cell lines. In addition, the expression of HAS2 protein was significant higher in the ccRCC tissue than those in the normal tissue ($P < 0.05$). **Conclusion:** Hyaluronan synthase 2 was detected to highly express in the five ccRCC cell lines and ccRCC tissue, which shows that hyaluronan synthase 2 may play a crucial role in the development of renal carcinoma especially in ccRCC and may serve as a potential molecular marker for clear renal cell carcinoma.

Key words renal carcinoma; hyaluronan acid; hyaluronan synthase 2

肾癌是泌尿系统中最常见恶性肿瘤之一,目前发病机制还尚不清楚。据文献报道透明质酸及透明质酸合成酶与肿瘤的发生、发展有一定的关系,可成为肿瘤治疗的潜在靶点^[1]。近年来研究表明透明质酸与透明质酸合成酶与膀胱癌关系甚为密切,可作为膀胱癌的标记物之一,同时可预测膀胱癌的进展与预后^[2,3],但其是否与肾癌发生发展有

关系,目前国内外报道较少。我们通过研究透明质酸合成酶三种亚型在五种肾癌细胞株及人肾透明细胞癌组织中的 mRNA 及蛋白的表达,进一步研究其在肾癌中的表达情况,并探讨其潜在的临床意义。

1 资料与方法

1.1 材料

肾癌细胞株(ACHN、Caki-1、OS-RC-2、786-O、SN12PM6)和人肾小管上皮细胞(HK-2)由本实验室提供。20 例配对组织标本为我科手术切除的后经病理证实的肾透明细胞癌组织和距肿瘤 2 cm 的正常肾组织。鼠抗人 HAS2 单克隆抗体

*基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(编号 81000292)

¹华中科技大学同济医学院附属同济医院泌尿外科(武汉, 430030)

通信作者:余斌, E-mail: yujiuhu@gmail.com

(Santa Cruz 公司), 兔抗人 GAPDH 单克隆抗体购于丁香园公司。碱性磷酸酶标记的兔抗鼠二抗和鼠抗兔二抗均购于启动子生物公司。碱性磷酸酶显色试剂盒购于启动子生物公司。逆转录及 qPCR 试剂盒购于 TakaRa 大连宝生物公司。引物合成由武汉友明生物公司完成。

1.2 细胞培养

用含 10% 胎牛血清(杭州四季青公司)的 DMEM 培养液(武汉博士德公司)在 37℃、5% CO₂ 的培养箱内培养, 以 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 的混合液消化传代。

1.3 RNA 及蛋白提取

细胞长满至 80%~90% 后用 4℃ 预冷的磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01 mol/L, pH 7.2)漂洗 2 次, 取出一部分细胞悬液按照细胞 TRIzol 提取试剂盒步骤提取总 RNA, 余下细胞悬液经离心后收集细胞沉淀, 加入含有 PMSF 的 NP40 裂解液, 旋涡混匀器充分混匀, 冰上静置 30 min, 然后于 4℃、12 000 g 离心 10~15 min, 提取上清总蛋白。留取 10~20 μl 上清液采用 BCA 法测定蛋白浓度, 其余上清加入 Loading buffer 后在沸水中煮沸 5 min 变性。

1.4 逆转录(cDNA 合成)

将上提取的细胞总 RNA 采用 Nandrop 2000 测定 RNA 浓度, 然后按照逆转录试剂盒(TakaRa)说明书步骤进行逆转录, 其条件如下: 37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃ 终止。逆转录所得的 cDNA 保存于 -20℃ 冰箱。

1.5 qPCR

按照 qPCR 试剂盒进行 mRNA 合成。反应体系 25 μl: ddH₂O 9 μl、CDNA 模板 2 μl、Rox Reference DyeII(50×) 0.5 μl(避光条件下)、上下引物各 0.5 μl、Tag 酶(2×) 12.5 μl(避光条件下)。后将八联管放入 Mix3000pTM 中进行 qPCR。反应条件如下: 第一步 95℃ 30 s, 第二步 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 第三步 95℃ 1 min, 60℃ 30 s, 95℃ 30 s。设置 3 个副孔。HAS1、HAS2、HAS3 的上下游引物序列分别为: HAS1 5'-GGTGGGGACGTGCG-GATC-3' 5'-ATGCAGGATACACAGTGAAG-TAG-3'; HAS2 5'-TGAACAAAACAGTTGC-CCTTT-3' 5'-TTCCCATCTATGACCATGACAA-3'; HAS3 5'-CTCTACTCCCTCCTC-TATATGTC-3' 5'-AACTGCCACCCAGATGGA-3'。

1.6 Western-blot

细胞蛋白按每孔 50 μg 上样, 组织蛋白按 100 μg 上样, 10% 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE) 100 V 电压下分离, 再用 200 mA 恒流将凝胶上的蛋白转至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉将膜封闭 1 h 后, 加入一抗(鼠抗人 HAS2 单克隆抗体, 稀释度为 1:

100; 兔抗人 GAPDH 单克隆抗体, 稀释度为 1:500。4℃ 孵育过夜, TBST 充分漂洗(10 min×3 次)后加碱性磷酸酶标记的二抗(兔抗鼠 IgG, 稀释度为 1:2 000; 鼠抗兔 IgG, 稀释度为 1:2 000)孵育 1 h, TBST 再次充分漂洗, 最后用碱性磷酸酶显色试剂盒显色。

1.7 统计学方法

采用 SPASS 软件进行数据分析, 以 $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qPCR

在五种肾癌细胞株中 HAS2 mRNA 表达水平明显高于正常肾小管上皮细胞, 其中在肾癌细胞株 SN12PM6 中表达含量最高, 其差异均有统计学意义($P < 0.05$), 而 HAS1 mRNA 表达水平明显低于正常肾小管上皮细胞(均 $P > 0.05$), HAS3 mRNA 表达水平除肾癌细胞株 Caki-1 外也均低于正常肾小管上皮细胞($P > 0.05$)(图 1)。

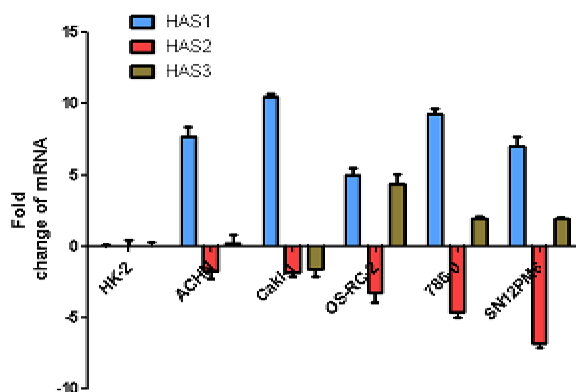


图 1 qPCR 检测 HAS1、HAS2、HAS3 mRNA 在五种肾癌细胞株及 HK-2 细胞中的表达

2.2 Western-blot

在五种肾癌细胞株中透明质酸合成酶 2 蛋白也均明显表达, 其中在肾癌细胞系 SN12PM6 中表达含量最高, 而正常肾小管上皮细胞无明显表达(图 2)。在肾透明细胞癌组织中透明质酸合成酶 2 的表达也明显高于相应癌旁组织(图 3)。

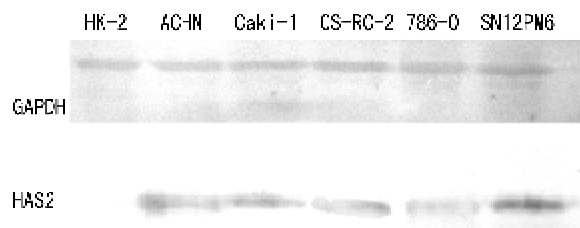
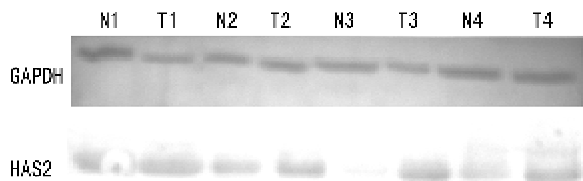


图 2 Western-blot 检测 HAS2 蛋白在五种肾癌细胞株及 HK-2 细胞中的表达



N 代表癌旁组织, T 代表癌组织

图3 Western-blot 检测 HAS2 蛋白在部分配对 ccRCC 组织/癌旁组织中的表达

3 讨论

透明质酸(Hyaluronic acid, HA)是细胞外基质含量最多、所占体积最大的组分之一,近年来研究表明 HA 与肿瘤的生长、浸润和转移有密切关系^[4]。而 HA 主要由透明质酸合成酶(HAS)催化合成,在人类 HAS 主要分为 HAS1、HAS2、HAS3 三种亚型,每种亚型催化合成不同分子量的 HA,例如 HAS1 和 HAS2 合成相对大分子量的 HA($2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$),而 HAS3 则合成相对分子量小的 HA($1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$)^[5]。有研究表明在结肠癌及前列腺癌中 HAS3 的高表达增加了其生长及侵袭能力,而 HAS1 和 HAS2 的表达增加了肿瘤细胞向恶性转化及促进了肿瘤生长的能力^[6,7]。

目前较多文献也报道了 HA 及 HAS 与泌尿系肿瘤特别是与膀胱癌有密切关系,其可促进肿瘤生长、浸润和血管生成,可作为膀胱癌标记物之一。Roozbeh 等^[8]在多种膀胱癌细胞系及膀胱癌组织中检测出 HAS1 及相应的 HA 高表达,并研究表明 HAS1 可作为膀胱癌复发及进展的预测因子,随后通过实验进一步表明 HAS1 是通过与 HA 表面膜受体 CD44 特异性结合来调节膀胱癌生长、侵袭和血管生成。既然 HA 及 HAS 与人类多种肿瘤有密切关系,那么是否与肾癌也有关联呢。为此,我们本研究的目的是通过细胞和组织水平两个方面验证 HAS 是否在肾癌中表达,并且探索哪种 HAS 亚型可能在肾癌中起着更为重要的作用。

首先,从转录水平,我们选择了五种肾癌细胞系进行研究,通过 qPCR 检测了 HAS 三种亚型 mRNA 的表达,结果与正常肾小管上皮细胞比较发现,在肾癌细胞系中 HAS1 及 HAS3 mRNA 均明显表达下调($P > 0.05$),而 HAS2 mRNA 表达水平均明显高于正常肾小管上皮细胞($P < 0.05$)。其次,从蛋白水平,我们进一步通过检测 HAS2 蛋白在细胞系中的表达,我们也发现其也明显表达于五种肾癌细胞系中,而正常肾小管上皮细胞无明显表达。因此我们推测 HAS2 可能在肾癌细胞中为优势亚型。为验证我们的推测,我们进一步收集 20 例手术切除后并经病理证实的肾透明细胞癌组织及癌旁组织进行检测其中 HAS2 的蛋白表达,结果也表明癌组织中 HAS2 表达均明显高于癌旁组织。因

此从细胞和组织水平结果我们初步推测 HAS2 可能在肾癌发生发展中起着更为关键的作用。

HAS2 为合成大分子量的 HA,有研究表明 HAS2 表达增加了随后肿瘤细胞的转移和促进肿瘤生长,其机制可能为 HAS2 基因过度表达诱导激活了 HA 特异性细胞表面受体 CD44,进而 HAS2 合成的 HA 与 CD44 特异性结合,从而激活了 MAPK 等信号通路,从而促进肿瘤发生发展^[7,9]。由于 HAS 及 HA 在肾癌中的研究国内外报道较少,因此其在肾癌中的生物学行为尚不清楚,还需进一步研究。

总之,通过我们初步研究表明 HAS2 在肾癌特别是在肾透明细胞癌中明显表达,我们推测其可能在肾癌特别是肾透明细胞癌中扮演着某种重要的角色,至于扮演何种角色目前还不清楚。为此,我们下一步将进一步通过细胞实验来探讨 HAS2 在肾癌发生发展中的生物学行为,另外通过大样本临床组织标本来探讨 HAS2 与肾癌临床分级、分期及预后等是否存在相关性,我们希望为肾癌的基因治疗提供一个新的靶点,以及为肾癌诊断及预后寻找出新的分子标记物。

【参考文献】

- 1 Adamia S, Maxwell C A, Pilarski L M. Hyaluronan and hyaluronan synthases: potential therapeutic targets in cancer[J]. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 2005, 5: 3-14.
- 2 Kramer M W, Escudero D O, Lokeshwar S D, et al. Association of hyaluronic acid family members (HAS1, HAS2, and HYAL-1) with bladder cancer diagnosis and prognosis[J]. *Cancer*, 2011, 117: 1197-1209.
- 3 Eissa S, Kassim S K, Labib R A, et al. Detection of bladder carcinoma by combined testing of urine for hyaluronidase and cytokeratin 20 RNAs [J]. *Cancer*, 2005, 103: 1356-1362.
- 4 Itano N, Atsumi F, Sawai T, et al. Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99: 3609-3614.
- 5 Itano N, Sawai T, Yoshida M, et al. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 25085-25092.
- 6 Liu N, Gao F, Han Z, et al. Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of TSU prostate cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 5207-5214.
- 7 Itano N, Sawai T, Atsumi F, et al. Selective expression and functional characteristics of three mammalian hyaluronan synthases in oncogenic malignant transformation[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 18679-18687.
- 8 Golshani R, Lopez L, Estrella V, et al. Hyaluronic acid synthase-1 expression regulates bladder cancer growth, invasion, and angiogenesis through CD44[J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 483-491.
- 9 Bourguignon L Y, Zhu H, Shao L, et al. CD44 interaction with tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 1829-1838.

(收稿日期:2012-05-17)