

半乳糖-3-O-磺酰基转移酶-2 与肿瘤转移关系的研究*

石必枝¹⁾ 耿飞¹⁾ 胡萍¹⁾ 何培洁²⁾ 吴兴中^{1)**}

(¹⁾复旦大学上海医学院生物化学与分子生物学系, 上海 200032; ²⁾复旦大学附属耳鼻喉科医院, 上海 200032)

摘要 半乳糖-3-O-磺酰基转移酶-2 (GP3ST) 是一个新近克隆的磺酰基转移酶, 其生物学功能还不明确. GP3ST 在肿瘤细胞和肿瘤组织中差异性表达, 以及催化所形成的磺酰化糖链与肿瘤转移潜能密切相关, 是首次研究报道. 在高转移潜能的肿瘤细胞中, GP3ST 及其产物的表达明显高于低转移潜能的细胞, 在伴有淋巴结转移的喉癌组织中, GP3ST 的高表达率也明显高于无淋巴结转移的喉癌组织 ($P < 0.05$), 而且在喉癌组织中的表达也明显高于相对应的癌周组织. 利用 RNAi 技术下调肝癌细胞 SMMC7721 中 GP3ST 的表达, 观察到稳定转染 RNAi/GP3ST 的细胞形态发生明显的改变, 由多边形转变为近似梭形, 与 TNF- α 刺激后的 HUVEC 和 sL- 选凝蛋白的黏附能力下降. 进一步研究表明, GP3ST 表达的下降能抑制细胞中的整合蛋白 αV 亚基的表达, 而 $\beta 3$ 亚基表达无改变, 同时在高转移细胞株中 αV 的表达也明显高于低转移细胞株, 与 GP3ST 表达的差异性相一致. 上述结果充分说明 GP3ST 催化合成的糖链可通过调节肿瘤细胞的黏附性和影响整合蛋白 αV 亚基的表达参与肿瘤转移.

关键词 半乳糖-3-O-磺酰基转移酶-2, 磺酰化糖链, 肿瘤转移

学科分类号 Q539

磺酰化的糖复合物在细胞黏附、炎症、肿瘤的转移等许多生物过程中发挥重要的作用^[1]. 现在已知磺酰化的半乳糖残基结构可存在于 O- 连接的分泌型或膜结合型高分子质量黏蛋白的外侧糖链上, 尤其是肠黏膜以及相应的一些肿瘤细胞所合成的黏蛋白的糖链. 有研究表明, 高分泌型的大肠癌细胞具有更强的转移潜能, 如 LS174T-HM7, 其黏蛋白的外侧糖链主要结构就是 3'-sulfo-Le^x 抗原簇^[2], 需要有半乳糖磺酰基转移酶催化合成. 同样可分泌黏蛋白的大肠癌细胞 LS180 和 SW1116 也具有较高半乳糖磺酰基转移酶的活性^[3], 提示磺酰化的半乳糖糖链可能与肿瘤的转移相关.

磺酰化的半乳糖糖链的合成需要在半乳糖磺酰基转移酶的催化下, 将供体上的活性磺酰基转移到 I 型或 II 型糖链外侧的半乳糖基 3' 位羟基上, 形成磺酰化的半乳糖结构, 还可进一步在岩藻糖基转移酶的催化下, 合成 sulfo-Lewis 抗原. 目前半乳糖-3-O-磺酰基转移酶 Gal3ST-2 (GP3ST) 和 Gal3ST-3 已克隆, 其中 Gal3ST-2 分布广泛, 尤其在大肠组织和黏液性腺癌组织^[4], 而 Gal3ST-3 则主要在甲状腺、脑以及肾脏组织中表达, 特别是在甲状腺组织^[5]. 肿瘤细胞与血管内皮细胞的黏附是肿瘤转移过程中非常重要的环节, 而且体外实验表

明, 与 sialyl-Lewis 结构相比, sulfo-Lewis 结构对选凝蛋白 (selectin) 具有更强的结合能力^[6], 但 sulfo-Lewis 在肿瘤细胞中的表达与作用未见报道. 本文观察新近克隆的 GP3ST 在高低转移细胞株和喉癌组织中的表达差异和合成产物磺酰化的糖链差异, 阐明其表达与肿瘤转移的关系, 并且利用 RNAi 技术^[7]探讨 GP3ST 及其磺酰化的糖链在肿瘤转移过程中作用的可能机制.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人高、低转移性巨细胞肺癌细胞株 95D 和 95C 购自北京解放军总医院, 另一对人的高、低转移巨细胞肺癌细胞株 PGBE1 和 PGLH7 来自北京大学健康科学中心病理系^[8], 而人的高、低转移肝癌细胞株 HMCC97H 和 HMCC97L 由复旦大学附属中山医院肝癌研究所提供^[9]. 肝癌细胞 SMMC7721 由本室保存. 喉癌组织及周围组织标本均来自复旦大学附属耳鼻喉科医院 2004 年的喉癌

*国家自然科学基金资助项目(30070183, 30470398).

** 通讯联系人.

Tel: 021-54237697, E-mail: xz_wu@shmu.edu.cn

收稿日期: 2005-02-21, 接受日期: 2005-03-28

外科手术标本, 取出后置液氮保存, 经病理确诊.

1.1.2 材料. RPMI1640 购自 Gibco BRL 公司; 产气梭状荚膜杆菌的神经氨酸酶 (唾液酸酶)、 β -actin 抗体均为 Sigma 公司产品; RT-PCR 试剂盒购自 Takara 公司; 生物素标记的凝集素 Bio-MAL II (Maackia amurensis lectin II)、亲和素标记的辣根过氧化物酶(Avidin-HRP) 为 Vector 公司产品; FITC 标记的亲和素(Avidin-FITC) 购自 BioMol 公司; Trizol 试剂购自北京鼎国生物技术有限公司; 可溶性的 L- 选凝蛋白 (sL-selecins) 由本室利用杆状病毒 / 昆虫细胞表达系统生产并纯化浓缩鉴定; RNAi 序列 5' gatcccatg tggctgact tcggtttca agagaagccg aagtgaacc acatttttg gaaa 3' 及其互补序列、引物和测序由上海生工生物技术公司完成.

1.2 方法

1.2.1 RNAi 质粒的构建. 根据本室成功利用 RNAi 作用于核心岩藻糖基转移酶的技术^[10], 选取 GP3ST 的 RNAi 靶向序列 5' atgtggttcgacttcgget 3', 在 Pubmed 经过 Blast, 选取的序列与其他基因无相同部分, 尤其是其同源家族的其他成员基因. 生物合成 64 bp 的发夹结构序列, 连接于经 *Hind* III 和 *Bgl* II 完全酶切的 pSuper 质粒, 经酶切筛选后进一步测序证实连接成功.

1.2.2 免疫荧光染色. 细胞培养于放有载玻片的 6 孔板, 待细胞 12 h 贴壁后取出, PBS 洗 3 次, 新鲜配制的 4% 多聚甲醛室温下固定 20 min, 然后用 PBS 洗 3 次, 加入 10 mU/片过量的神经氨酸酶 37°C 作用 1 h, 可完全去除外侧糖链上连接的唾液酸, 1% BSA 室温封闭 2 h, Bio-MAL II (1: 400) 室温 1 h, PBS 洗 3 次, 再加入 Avidin-FITC (1: 2 000) 室温孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 甘油封片. 在荧光显微镜下拍照并计数 200 个细胞中有绿色荧光的细胞数, 计算百分数.

1.2.3 RT-PCR. 取组织标本约 100 mg 加入 Trizol 1 ml, 电动匀浆 90 s, 或培养的细胞直接加入 Trizol, 抽提总 RNA, 进行 A_{260} 和 A_{280} 的紫外分光光度测定. 各取 2 μ g RNA 按照 Takara 的 RT-PCR 试剂盒提供的操作步骤, 进行逆转录和 PCR 扩增反应. 扩增的引物为: GP3ST, 正向引物 5' AGCA CCGTCTATGTCACCAT 3', 反向引物 5' GAAGT ACTCGGCGATCATGA 3'; β -actin, 正向引物 5' GAGCTACGAGCTGCCTGACG 3', 反向引物 5' CCTAGAAGCATTTCGCGTGG 3'. 反应条件为: 逆转录预变性 65°C 5 min, 再加入逆转录酶 37°C

1 h, 99°C 5 min, 5°C 5 min. PCR 为 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 共 25 个循环. 将反应产物进行 2% 琼脂糖电泳, 应用凝胶成像系统 (Pharmacia Biotech 公司) 拍照后采用 Bandscan 软件测定分析条带的吸光度值.

1.2.4 基因转染. 将消化的 SMMC7721 细胞接种于 6 孔板, 待融合至 80% 时采用 Lipofect2000 转染 SMMC7721 细胞, 步骤按公司提供的方案进行, 转染 3 天后, 在 400 mg/L G418 中进行筛选, 挑选出耐药细胞克隆后, 继续维持在含有 G418 的培养基中, 通过 RT-PCR 和 Lectin blot 鉴定所需要的阳性克隆.

1.2.5 蛋白质印迹. 收集培养的细胞, 用 PBS 洗涤 3 次, 用 1×SDS 上样缓冲液裂解细胞, 样品置于沸水浴中放置 10 min. 应用改良 Lowery 法测定蛋白质浓度, 取 100 μ g 蛋白质进行 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE). 电泳完毕后, 用湿式转移电泳的方法将分离的蛋白质转移到 PVDF 膜上 (冰浴中 300 mA 2 h). 1% BSA 室温封闭 2 h, 加一抗 4°C 过夜, 1×TBST 洗膜 3 次后, 加二抗室温孵育 2 h, 1×TBST 洗膜 3 次后, 加 ECL 化学试剂, 暗室压片曝光显影. 采用 Bandscan 软件测定条带的灰度值.

Lectin blot 是首先收集细胞, PBS 洗涤 3 次, 需要加 125 mU/ml 神经氨酸酶, 37°C 充分作用 1 h 后再裂解细胞, 蛋白质定量电泳, 后面的过程与蛋白质印迹一致, 一抗为 Bio-MAL II (1:400), 二抗为 Avidin-HRP (1:1000).

1.2.6 人的脐静脉内皮细胞黏附实验. 将人的脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 以 1×10^4 /孔接种于 96 孔板, 37°C, 5% CO₂ 的条件下孵育培养至完全融合, 加入 10 μ g/L 的 TNF- α 刺激细胞合成并在表面表达 E- 选凝蛋白, 4 h 后加入待测 (1×10^5 /孔) 细胞于 HUVEC 表面, 分别在 30 min、1 h 和 2 h 后, 将未黏附的细胞用 PBS 轻轻洗掉, 发生黏附的细胞用 4% 的多聚甲醛固定, 高倍镜下随机计数 5 个视野中黏附到内皮细胞上的肿瘤细胞数, 计算黏附百分比^[11].

1.2.7 细胞与人 sL- 选凝蛋白的黏附实验. 将自制的 sL- 选凝蛋白用 PBS 稀释为 5 mg/L 包被 96 孔板 (100 μ l/孔), 以 300 mg/L 的多聚赖氨酸包被 4 个孔做最大黏附对照, 另 4 孔用 1% BSA 包被做最小黏附对照. 放置在 4°C 16 h 后 1% BSA 室温封闭 1 h, PBS 洗 2 次, 加入 2.5 mmol/L EDTA 消化的

待测细胞(2×10^4 /孔), 分别在培养箱里孵育 15 min、30 min、45 min 和 1 h 后, 用 PBS 洗涤 2 次, 去除未黏附的细胞, MTT 染色, 用酶标仪在 490 nm 波长下测定各孔的 A 值。

1.2.8 数据处理. 以上的实验数据均为平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$), 实验重复 3 次, 结果经卡方检验, $P < 0.05$ 被认为有显著性差异, 具有实际意义。

2 结 果

2.1 GP3ST 在高低转移细胞株中的差异性表达

95D 与 95C、PGBE1 与 PGLH7、MHCC97H 与 MHCC97L 分别为 3 对高低转移细胞株, 前 4 个为肺癌细胞株, 后 2 个为肝癌细胞株, 经 RT-PCR 可以明显看出, 在高转移性细胞株 95D、PGBE1 和 MHCC97H 中, GP3ST 的表达明显高于同系的低转移细胞 95C、PGLH7 和 MHCC97L (图 1a)。通过 Bandscan 灰度扫描与内参 β -actin 校正后, 高低转移细胞中 GP3ST 的差异表达更加明显 (图 1b)。同时还检测了 Gal3ST-3 的表达, 显示均无表达, 说明磺酰化的半乳糖基结构产物仅由 GP3ST 催化

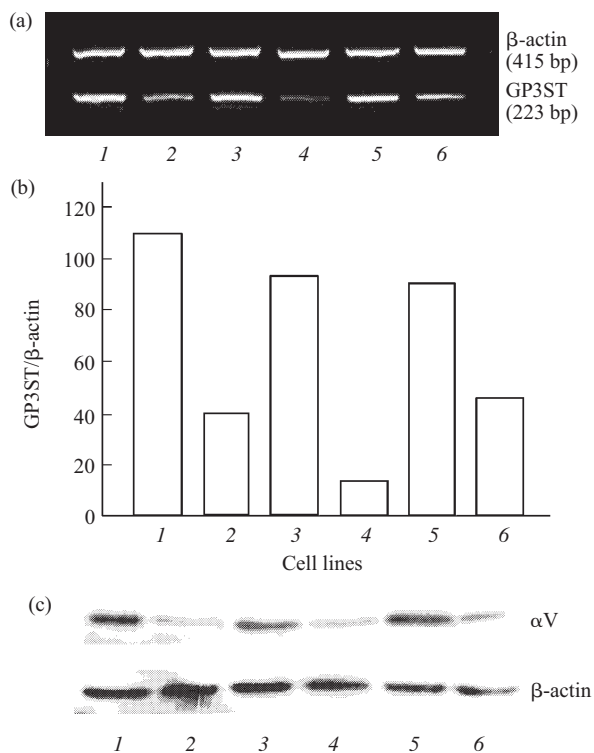


Fig.1 Differential expression of GP3ST and integrin subunit αV in various metastatic cancer cells

(a) The mRNA levels of GP3ST detected by RT-PCR. (b) The relative amount of GP3ST mRNA levels. (c) Western blot analysis of integrin subunit αV expression in various metastatic cancer cells. 1: 95D; 2: 95C; 3: PGBE1; 4: PGLH7; 5: MHCC97H; 6: MHCC97L.

合成(结果未显示). 凝集素 MAL II 可与外侧半乳糖 3-O 位上唾液酸化和磺酰化的半乳糖基相结合, 经过量的神经氨酸酶作用后, MAL II 结合的即为磺酰化的半乳糖基糖链^[9]. 以生物素偶联的 -MAL II 凝集素、亲和素标记的 -FITC 的免疫荧光结果也显示, 在高转移细胞中绿色荧光明显强于低转移细胞, 在 95D、PGBE1 和 MHCC97H(高转移细胞)中的荧光阳性率分别为 78%、56%和 70%, 而在 95C、PGLH7 和 MHCC97L(低转移细胞)中仅为 35%、18%和 32%。

2.2 GP3ST 在喉癌组织及癌周组织中的差异性表达

我们选取无淋巴结转移的喉癌标本 31 例, 伴有局部淋巴结转移的 11 例, 另外还有癌周围组织做对照的不伴或伴有淋巴结转移的各 4 例, 上述肿瘤均无远处转移, 病理诊断均为鳞癌. 经过半定量 RT-PCR 测定, 结果显示, 组织中均有 GP3ST 的表达, 以 β -actin 为参照, 通过 Bandscan 计算出比值, 高于或等于所有肿瘤组织平均值的为高表达, 低于为低表达. 统计后发现, 在伴有淋巴结转移的喉癌组织中, GP3ST 的高表达率为 72.7%, 明显高于无淋巴结转移的喉癌组织 (38.7%), 具有显著性差异 ($P < 0.05$). 另外, 8 例病人的癌组织及癌周组织相比较, 癌组织中 GP3ST 的表达均无一例外地高于癌旁组织. 病理类型分化程度越差, GP3ST 的表达成上升趋势, 但无显著性差异 (表 1), 与肿瘤发生部位也无相关性 ($P > 0.05$).

2.3 SMMC7721 细胞转染 RNAi/GP3ST 质粒后 GP3ST 表达下降的鉴定

根据我室已成功的 RNAi 技术^[10]经验, 按其类似要求选取 GP3ST 特异性的靶点序列, 设计 64 bp 的发夹序列, 成功构建能表达靶向作用于 GP3ST 发夹结构的质粒, 转染 SMMC7721 细胞 (经预实验得知 GP3ST 表达较高), G418 筛选出耐药克隆, 通过 RT-PCR 鉴定出 RNAi 效果最明显也就是 GP3ST 表达最低的两个克隆 11 和 12, 转染空载对照的为克隆 Mocka 和 Mockd, 进一步通过 Lectin blot 分析 GP3ST 催化合成产物的量来确定 RNAi 的效果(图 2)。

2.4 RNAi 靶向作用 GP3ST 后细胞形态及生物学行为的改变

RNAi/GP3ST 稳定转染的细胞和对照细胞相比, 形态发生了明显的变化. 对照细胞基本与未转染时相似, 呈多边形, 与培养瓶底面黏附牢固, 而

转染 RNAi/GP3ST 质粒的细胞黏附相对较松弛，细胞变为偏梭形，有少数细胞变为明显的梭状(图 3)，而细胞的生长状况未见明显影响. 通过琼脂滴法检测细胞迁移能力，发现在 24 h 和 48 h 后

RNAi/GP3ST 细胞与 Mock 细胞无明显的差别，说明 GP3ST 表达的下降不影响 SMMC7721 细胞的迁移能力 (结果未显示).

Table 1 The expression of GP3ST in cancer tissue samples from larynx cancer patients and the clinicopathological background of patients enrolled

		mRNA of Gal3ST-2		Total cases	Percentage of high (%)	χ^2 test <i>P</i> value
		high	low			
Metastasis	No	12	19	31	38.70	$P < 0.05$
	Have	8	3	11	72.70	
Pathological type	Focal hyperplasia and cancerization	1	3	4	25.00	$P > 0.05$
	Squamous carcinoma Grade I	7	9	16	43.75	
	Squamous carcinoma Grade II	10	10	20	50.00	
	Squamous carcinoma Grade III	1	0	1	100.00	
	Verrucous carcinoma	1	0	1	100.00	
Location	Glottic carcinoma	7	13	20	35.00	$P > 0.05$
	Subglottic carcinoma	8	7	15	53.30	
	Transglottic carcinoma	2	1	3	66.67	
	Hypopharyngeal carcinoma	3	1	4	75.00	

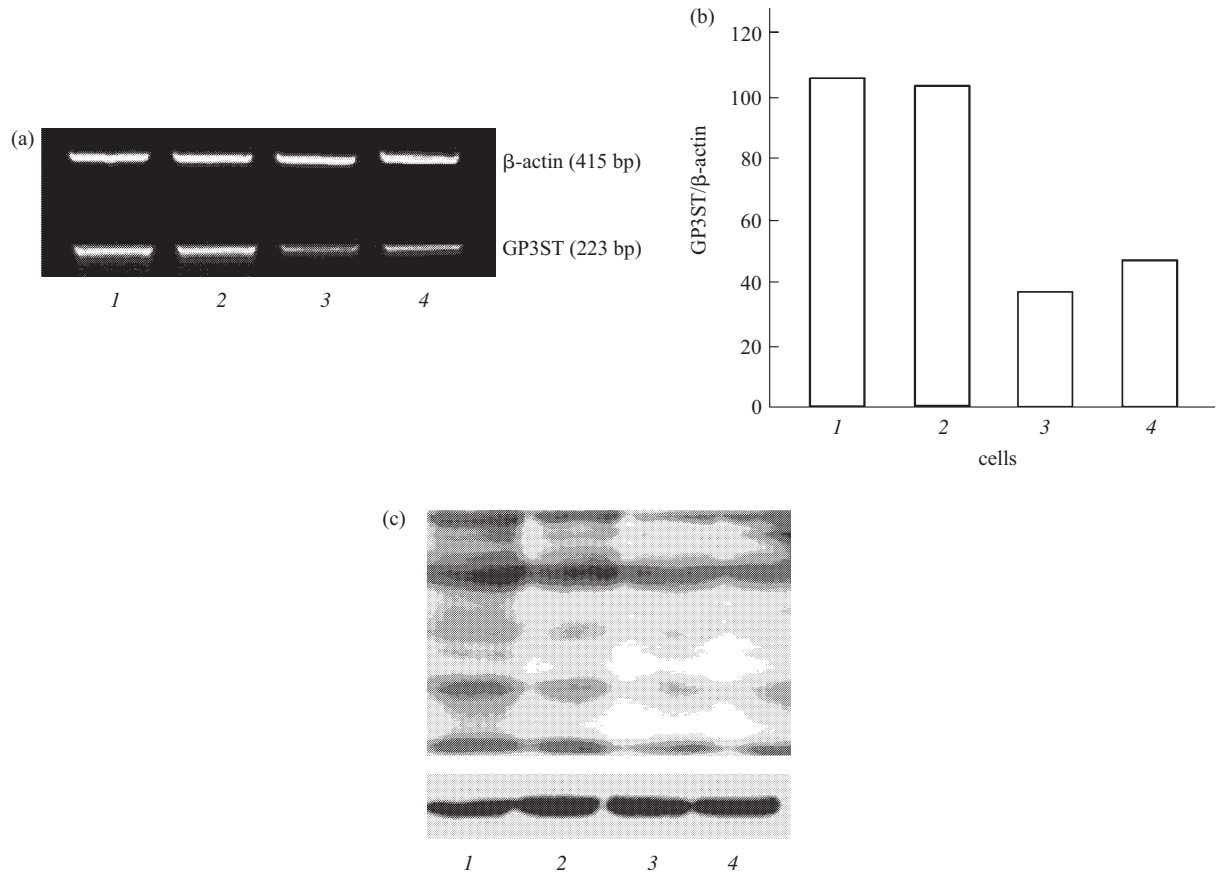


Fig.2 Apparent decrease of GP3ST expression in transfected SMCC7721 with RNAi/GP3ST

(a) Detection of GP3ST expression by RT-PCR. (b) The relative amount of GP3ST mRNA levels. (c) The decreased expression sulfated glycan detected by Lectin blot with Bio-MAL II . 1: Mocka; 2: Mockd; 3: Ghp11; 4: Ghp12.

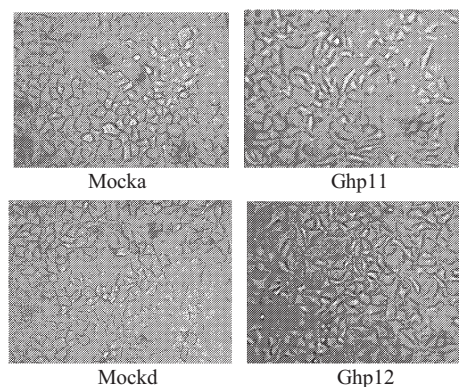


Fig.3 Morphologic alteration of RNAi/GP3ST transfected SMMC7721 cells

2.5 在 GP3ST 表达下降的细胞中整合素 αV 亚基表达的改变

整合蛋白在肿瘤转移和侵袭过程中发挥重要的作用. 本室以前的研究发现, GP3ST 同家族的脑苷脂磺酰基转移酶(cerebroside sulfotransferase: CST)的高表达可通过调节整合蛋白的表达促进肿瘤的转移^[12~14], 免疫沉淀结果表明, 其机制主要是使 $\alpha V\beta 3$ 的表达明显升高, 而 GP3ST 是否也会通过影响 αV 的表达来调节肿瘤细胞的转移潜能. 通过 RT-PCR 和蛋白质印迹, 结果发现转染 RNAi/GP3ST 细胞中 αV 的表达明显降低, 而 $\beta 3$ 的表达无改变(图 4), 而且在高转移潜能的细胞中 αV 的表达明显高于低转移潜能细胞(图 1c), 与 GP3ST 表达的差异性相一致. 文献已报道 αV 的表达可促进肿瘤细胞在裸鼠中的种植转移^[15,16], 这些

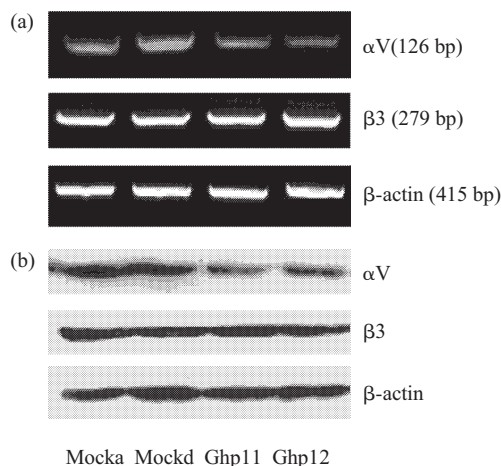


Fig.4 The alteration of αV and $\beta 3$ expression in transfected SMMC7721 cells

(a) The alteration of αV and $\beta 3$ mRNA levels detected by RT-PCR. (b) Western blot analysis of αV and $\beta 3$ expression.

进一步说明 GP3ST 与 CST 的作用相似, 可影响 αV 的表达.

2.6 细胞中 GP3ST 表达的下降低对细胞黏附性的影响

在肿瘤转移过程中, 肿瘤细胞与血管内皮细胞之间的黏附是关键性的一步. 现已明确血管内皮细胞上表达的 E- 选凝蛋白, 可与肿瘤细胞上的唾液酸化 Lewis 抗原相互识别、结合并介导内皮细胞和肿瘤细胞之间的黏附, 使肿瘤细胞可在转移处停留种植. 另外, L- 选凝蛋白也参与肿瘤的转移过程, 与 P- 选凝蛋白协同作用参与肿瘤转移^[17,18]. 本实验结果表明, 与对照细胞相比, RNAi/GP3ST 转染细胞无论是与 TNF- α 刺激的 HUVEC 还是与 sL- 选凝蛋白的黏附能力都明显下降(图 5).

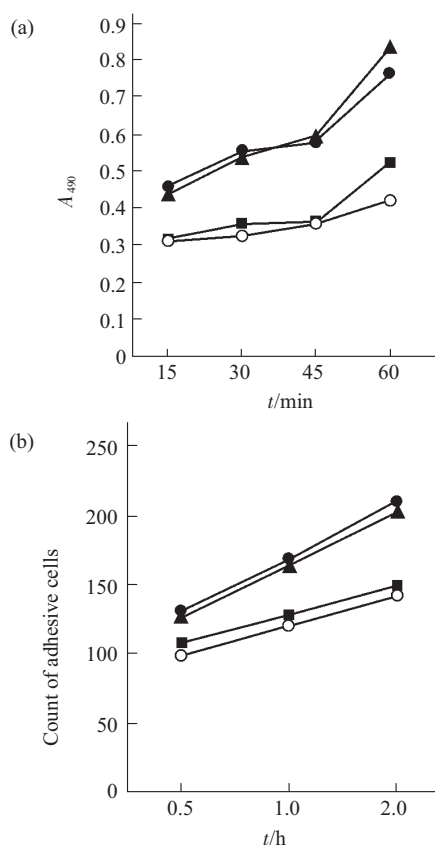


Fig.5 The decreased adhesion ability of transfected cells to sL-selectin and TNF- α induced HUVEC

(a) The adhesion to sL-selectin. (b) The adhesion to HUVEC induced by TNF- α . ●—●: Mocka; ▲—▲: Mockd; ■—■: Ghp11; ○—○: Ghp12.

3 讨 论

磺酰化的糖链可存在于许多生物大分子上, 包括糖蛋白、蛋白多糖、糖脂以及多聚糖, 参与许多重要的生理活动过程, 包括细菌的黏附、炎症反

应、肿瘤的转移、凝血等,主要是通过影响细胞表面分子的黏附^[1].其中磺酰化的半乳糖基既可存在于O型糖链,也可存在于N型糖链,由半乳糖磺酰基转移酶催化合成,其家族成员目前已克隆了4个,各有不同的特点^[9].虽然有体外研究表明磺酰化的Lewis比唾液酸化的Lewis对E-选凝蛋白具有更强的结合能力,可能是E-选凝蛋白和L-选凝蛋白更有效结合配体^[20],而且在肿瘤转移过程中,肿瘤细胞表面唾液酸化的Lewis抗原与血管内皮细胞E-选凝蛋白的黏附,对肿瘤细胞在远处转移灶的种植起着非常关键的作用,但磺酰化的糖链在这个肿瘤转移过程中的作用未见报道.我们的研究揭示了GP3ST表达与肿瘤的转移潜能存在相关性,因为发现在高转移潜能的肿瘤细胞中,半乳糖磺酰基转移酶中Gal3ST-2(或GP3ST)的表达明显高于低转移潜能的细胞.我们通过免疫荧光也观察到在高转移潜能的肿瘤细胞中磺酰化的半乳糖链也较高,与GP3ST表达上调结果相一致.但Gal3ST-3未见表达,说明这些磺酰化糖链的改变仅由GP3ST表达异常所引起的.另外,在有局部淋巴结转移的喉癌组织中GP3ST的高表达比例明显高于无转移的癌组织,经检验 $P < 0.05$,具有显著性差异,进一步在体内表明GP3ST表达上调与肿瘤的转移潜能紧密相关,磺酰化的糖链在肿瘤转移过程中尤其是在黏附这一环节可能起着比唾液酸化的糖链更重要的作用.

为了进一步探讨磺酰化的半乳糖链在肿瘤转移中作用机制,我们选取较高表达GP3ST的肝癌细胞SMMC7721,参考以往成功利用RNAi下调核心岩藻糖的经验^[10],选取GP3ST特异靶向性序列,成功构建RNAi/GP3ST质粒,稳定转染,筛选出下调作用比较明显的两个克隆,发现转染RNAi/GP3ST的细胞与培养器皿的附着能力减弱,细胞形态由多边形变为近似梭形,与TNF- α 刺激的HUVEC和sL-选凝蛋白的黏附能力明显下降,说明肿瘤细胞表面的磺酰化糖链减少以后细胞的黏附能力下降,这种黏附能力的改变与肿瘤转移潜能的高低密切相关.另外,肿瘤细胞上的糖链与血管内皮细胞的识别黏附往往可诱导整合蛋白的表达共同协调发挥作用,最终导致肿瘤细胞能在远处种植转移,其中整合蛋白 $\alpha V\beta 3$ 在肿瘤转移过程中起着非常重要的作用.我们的结果显示在GP3ST表达下降的细胞中, αV 亚基的表达也下调,而 $\beta 3$ 亚基的表达无明显改变,这与我们实验室研究的同家族

CST(脑苷脂磺酰基转移酶)的作用相类似,只不过CST催化形成的是磺酰化的糖脂^[13,14],而GP3ST催化形成的是磺酰化的糖蛋白.同时我们观察到 αV 的表达在高转移潜能的细胞中也明显高于低转移潜能的细胞,与GP3ST的差异表达相一致,进一步说明GP3ST还可通过产物影响整合蛋白 αV 的表达来参与肿瘤转移.GP3ST催化形成的产物是一系列的糖蛋白,种类多,调节过程复杂,对于具体的作用底物和详细的调节机制尚需通过免疫沉淀等方法进一步研究阐明.

参 考 文 献

- 1 Koichi H, Naoyuki T. Sulfotransferases and sulfated oligosaccharides. *Med Res Rev*, 2002, **22** (6): 637-654
- 2 Calliope C, Jean-Michel W, Jerome L, *et al.* Sulfated Lewis X determinants as a major structural motif in glycans from LS174T-HM7 human colon carcinoma mucin. *J Biol Chem*, 1997, **272** (51): 31957-31968
- 3 Chandrasekaran E V, Jain R K, Rhodes J M, *et al.* Characterization of distinct Gal:3-O-sulfotransferase activities in human tumor epithelial cell lines and of calf lymph node GlcNAc: 6-O-sulfotransferase activity. *Glycoconj J*, 1999, **16**: 523-536
- 4 Koichi H, Masayuki T, Souichi K, *et al.* Molecular cloning and characterization of a human β -Gal-3-sulfotransferase that acts on both type 1 and type 2 (Galb1-3/1-4GlcNAc-R) oligosaccharides. *J Biol Chem*, 2001, **276** (2): 267-274
- 5 Atsushi S, Nobuyoshi H, Masami S, *et al.* Molecular cloning and expression of a novel human b-Gal-3-O-sulfotransferase that acts preferentially on N-acetylglucosamine in N- and O-glycans. *J Biol Chem*, 2001, **276** (26): 24388-24395
- 6 Yuen C T, BezouBkaf K, O'Brien J, *et al.* Sulfated blood group Lewis a. *J Biol Chem*, 1994, **269** (3): 1595-1598
- 7 Hannon G J. RNA interference. *Nature*, 2002, **418** (6894): 244-251
- 8 Bai X M, Brown J R, Varki A, *et al.* Enhanced 3-O-sulfation of galactose in Asn-linked glycans and *Maackia amurensis* lectin binding in a new Chinese hamster ovary cell line. *Glycobiology*, 2001, **11** (8): 21-632
- 9 Tian J, Tang Z Y, Ye S L, *et al.* New human hepatocellular carcinoma (HCC) cell line with highly metastasis potential (MHCC97) and its expression of the factors associated with metastasis. *Br J Cancer*, 1999, **81** (5): 814-821
- 10 Geng F, Shi B, Yuan Y F, *et al.* The expression of core fucosylated E-cadherin in cancer cells and lung cancer patients: prognostic implications. *Cell Res*, 2004, **14** (5): 423-233
- 11 Charles J. Pera Dimitroff P, Dall'Olio F, *et al.* Cell surface N-acetylneuraminic acid a2,3-galactoside-dependent intercellular adhesion of human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **256** (3): 631-636
- 12 张 力, 吴兴中. 4-氨基苯酚维甲酰胺对肝癌和恶性黑色素瘤细胞的抑制作用. *实验生物学报*, 2003, **36** (6): 421-427

- Zhang L, Wu X Z. *Acta Biologicae Experimentalis Sinica*, 2003, **36** (6): 421~427
- 13 Wu X Z, Honke K, Zhang Y L, *et al.* Lactosylsulfatide expression in hepatocellular carcinoma cells enhances cell adhesion to vitronectin and intrahepatic metastasis in nude mice. *Int J Cancer*, 2004, **110** (4): 504~510
- 14 吴兴中, 石必枝, 胡 萍. 脑苷脂磺酰基化对肝癌细胞整合素表达的影响. 第五届医学生物化学与分子生物学学术会议文摘, 西安, 2004
- Wu X Z, Shi B Z, Hu P. The effect of sulfated lactosyl ceramide on integrin expression in hepatocarcinoma cells. Abstract for Fifth Symposium on Medical Biochemistry and Molecular Biology, Xi'an, 2004
- 15 Mohit T, Zhou Z, Timar J, *et al.* Multiple roles for platelet GP II b/III a and $\alpha v \beta 3$ Integrins in tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Res*, 2002, **62** (10): 2824~2833
- 16 Brooks P C, Montgomery A M P, Rosenfeld M, *et al.* Integrin $\alpha V \beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*, **79** (7): 1157~1164
- 17 Borsig L, Wong R, Feramisco J, *et al.* Heparin and cancer revisited: Mechanistic connections involving platelets P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (6): 3352~3357
- 18 Borsig L, Wong R, Hynes R O, *et al.* Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (4): 2193~2198
- 19 Chandrasekaran E V, Lakshman S S, Chawda R, *et al.* Identification of physiologically relevant substrates for cloned Gal: 3-O-Sulfotransferases (Gal3STs). *J Biol Chem*, 2004, **279** (11): 10032~10041
- 20 Galustian C, Lubineau A, le Narvoret C, *et al.* L-selectin interactions with novel mono- and multisulfated Lewis^x sequences in comparison with the potent ligand 3'-sulfated Lewis. *J Biol Chem*, 1999, **274** (26): 18213~18217

Correlation Between The Expression of Gal: 3-O-sulfotransferase-2 and Metastasis Potentials of Cancer Cells*

SHI Bi-Zhi¹⁾, GENG Fei¹⁾, HU Ping¹⁾, HE Pei-Jie²⁾, WU Xing-Zhong^{1)**}

¹⁾Department of Biochemistry, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China;

²⁾Department of Otolaryngology, EENT Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract The Gal: 3-O-sulfotransferase-2 (GP3ST) was a newly cloned sulfotransferase and its biological significance remained unknown. The expression levels in different metastatic potential tumor cells and larynx cancer tissues were investigated. A significantly higher expression level of GP3ST and sulfated glycoconjugates were observed in highly metastatic cancer cells and larynx cancer tissues with lymph node metastasis than those in lowly metastatic cancer cells and ones without metastasis ($P < 0.05$, $n = 42$). GP3ST expression was further suppressed by targeted RNAi technology in hepatocarcinoma cells SMMC7721. It was found that the morphology of SMMC7721 cells transfected with RNAi-GP3ST was changed from polygon to shuttle shape and the adhesion ability to HUVEC induced by TNF- α and sL-selectin was significantly decreased. Furthermore, the decreased expression of GP3ST could lead to expression inhibition of integrin subunit αV , but didn't affect the expression of integrin subunit $\beta 3$ by Western blot analysis and RT-PCR. The result of higher αV expression in high metastatic cells than in low metastatic cells was consistent with the differential expression of GP3ST. Taken together the results suggested that the expression of GP3ST may be involved in tumor metastasis process by regulation of adhesion ability and expression of integrin αV .

Key words Gal:3-O-sulfotransferase-2, sulfated glycan, tumor metastasis

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30070183, 30470398). and Key Subject Foundation of Shanghai Municipal Education Committee (B9808010)

**Corresponding author. Tel: 86-21-54237697, E-mail: xz_wu@shmu.edu.cn

Received: February 21, 2005 Accepted: March 28, 2005