

乳腺癌相关透明质酸变化对淋巴内皮细胞紧密连接分子ZO-1分布及细胞增殖的影响

余梦思 刘鹭雯 何怡青 杨翠霞 杜艳 吴曼 张国良 高锋*

(上海交通大学附属第六人民医院中心实验室, 上海 200233)

摘要 该研究旨在探讨乳腺癌来源的透明质酸(hyaluronic acid, HA)分子大小变化对淋巴内皮细胞紧密连接分子ZO-1(zonula occludens-1)分布情况以及细胞增殖的影响。采用免疫组化实验检测8对良性乳腺疾病和乳腺癌患者组织HA的表达水平, 利用酶联免疫吸附实验检测20对正常人与乳腺癌患者血清中透明质酸分解酶(hyaluronidase, Hyase)含量; 通过免疫荧光法、荧光素钠渗透实验、MTT增殖实验和Western blot分别观察HA和寡分子透明质酸(oligosaccharides of Hyaluronic acid, oHA)作用淋巴内皮细胞后ZO-1分布、单层细胞渗透性、细胞增殖以及下游ROCK1/RhoA信号通路变化。结果表明, 与良性乳腺疾病对照组比较, 乳腺癌患者HA表达量明显增加($P<0.01$); 与正常人相比, 乳腺癌患者血清Hyase水平显著升高($P<0.01$), 提示乳腺癌发生时, HA升高伴随其降解酶增多, HA代谢活性增加。HA增强细胞间ZO-1的连接, 对ROCK1/RhoA蛋白表达水平无明显影响; 相反, oHA促使淋巴内皮细胞ZO-1由胞膜向胞浆分布, 导致细胞连接呈褶皱状, 形成细胞间隙, 淋巴管渗透性增加, 上调ROCK1/RhoA蛋白表达水平, 促进淋巴内皮细胞增殖($P<0.01$)。研究提示, oHA可能在乳腺癌淋巴管形态及增殖中发挥重要作用。

关键词 乳腺癌; oHA; 淋巴内皮细胞; ZO-1; 增殖

The Variation of Hyaluronic Acid in Breast Cancer and Its Effect on Tight Junction ZO-1 and Proliferation of Lymphatic Endothelial Cells

Yu Mengsi, Liu Yiwen, He Yiqing, Yang Cuixia, Du Yan, Wu Man, Zhang Guoliang, Gao Feng*

(Department of Central Laboratory, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China)

Abstract This study aimed to investigate the change of hyaluronic acid in breast cancer and further to explore its effect on tight junction ZO-1 distribution and proliferation of lymphatic endothelial cells. Immunohistochemistry and enzyme linked immunosorbent assay were performed to test the expression of hyaluronic acid and serum concentration of hyaluronidase in benign breast disease and breast cancer, normal person and breast cancer, respectively. Immunofluorescence, permeability of sodium fluorescein, MTT and Western blot were applied to investigate the effects of HA and oHA on ZO-1 distribution, permeability of lymphatic endothelial cell monolayers, cell proliferation and the protein expression levels of ROCK1/RhoA. The results showed that the expressions of hyaluronic acid and hyaluronidase in breast cancer were higher than those of benign breast disease and normal person ($P<0.01$), respectively. Hyaluronic acid elevated with hyaluronidase in breast cancer, suggesting that the metabolism of HA was more activity. HA strengthened ZO-1 distribution on the cell membrane and unchanged the protein expression levels of ROCK1/RhoA. On

收稿日期: 2014-10-06 接受日期: 2014-11-26

国家自然科学基金(批准号: 81172027、81272479)和上海市青年科技英才扬帆计划(批准号: 14YF1412200)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-64369181, E-mail: gao3507@126.com

Received: October 6, 2014 Accepted: November 26, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81172027, 81272479) and the Sail Plan of Shanghai Youth Science and Technology Talents (Grant No.14YF1412200)

*Corresponding author. Tel: +86-21-64369181, E-mail: gao3507@126.com

网络出版时间: 2015-01-20 17:10 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150120.1710.005.html>

the contrary, oHA induced ZO-1 distributed from cell membrane to cytoplasm, leading to disrupting the junction between cells, formed the intercellular space, stimulated permeability of cell monolayers, increased the protein expression levels of ROCK1/RhoA, and promoted proliferation of lymphatic endothelial cells ($P < 0.01$). This study indicated that oHA might play an important role in lymphatic morphogenesis and lymphatic endothelial cell proliferation of breast cancer.

Keywords breast cancer; oHA; lymphatic endothelial cell; ZO-1; proliferation

淋巴管转移作为乳腺癌远处传播的重要途径之一,是肿瘤发生发展以及预后的重要环节,严重影响着患者的生存率^[1]。但是,其具体机制至今尚未阐明。透明质酸(hyaluronic acid, HA)是以N-乙酰氨基葡萄糖和葡萄糖醛双糖单位为基质合成的线性聚合物,是细胞外基质重要组成之一,发挥重要生物学作用^[2]。在头颈癌、前列腺癌、成肾细胞瘤等肿瘤环境下,组织HA表达增多,透明质酸分解酶(hyaluronidase, Hyase)活性升高,提示肿瘤环境下,HA经Hyase消化的降解产物寡分子透明质酸(oligosaccharides of Hyaluronic acid, oHA)含量升高。而乳腺癌中oHA含量如何变化,至今不详。既往研究显示,oHA能够破坏血管内皮细胞连接,对淋巴管内皮细胞是否有相同作用,至今未见报道。紧密连接蛋白(zonula occludens-1, ZO-1)是淋巴内皮细胞连接的重要分子,与黏附连接等共同调控细胞完整性,具有抑制细胞运动、调控渗透性等功能^[3]。ZO-1在oHA调控淋巴内皮细胞连接中是否发挥作用,值得更进一步探索。大量研究表明,oHA与肿瘤生长、侵袭及血管新生等密切相关^[4]。在血管发芽的过程中,细胞间连接松散,呈现紊乱无序状态,导致血管内皮细胞增殖、迁移^[5]。oHA在促进淋巴内皮细胞增殖的同时,是否打开淋巴内皮细胞间隙,相关研究甚少。因此,本研究旨在探索乳腺癌中HA分子大小可能的变化,探讨其对淋巴管内皮细胞ZO-1分布、单层淋巴内皮细胞渗透性及下游信号变化的影响,并对其促进淋巴内皮细胞增殖进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 组织标本与细胞系

本研究的组织标本来自上海交通大学附属第六人民医院,为乳腺外科住院治疗的经手术切除的乳腺组织标本,向所有患者告知手术获益和风险,并得到患者签署的知情同意书。乳腺癌患者血清来自复旦大学附属肿瘤医院。小鼠淋巴管内皮细胞系SVEC4-10购于美国模式培养物集存库。

1.2 主要试剂与设备

细胞培养液DMEM购自美国Invitrogen公司;新生牛血清购自上海洛神生物技术有限公司;HA、荧光素钠(Na-F)购自美国Sigma公司。oHA按本实验室前期制备方法获得。生物素-HABP购自德国Merk公司;链酶亲和素-过氧化物酶复合物购自武汉博士德生物有限公司;兔抗小鼠ZO-1抗体购自美国Invitrogen公司;Alexa Fluor 488标记山羊抗兔IgG抗体购自上海碧云天生物技术有限公司;抗小鼠GAPDH抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG、山羊抗兔IgG均购自杭州联科生物技术有限公司;兔抗小鼠ROCK1抗体、兔抗小鼠RhoA抗体均购自美国CST公司。Transwell迁移小室购自美国Corning公司;Image Quant LAS 400超灵敏化学发光成像仪购自瑞典GEHC公司;正置荧光显微镜Ni-E、激光共聚焦显微镜A1购自日本尼康公司;MAQ4450震荡器购自美国Thermo Scientific公司;Labsystems Wellscan Mk3 酶标仪购自芬兰Labsystems公司;ALLEGAX-15R离心机购自美国Beckman Coulter公司。

1.3 免疫组化法观察良性乳腺疾病和乳腺癌组织透明质酸表达

冰冻切片于70 °C恒温箱烘干,丙酮固定10 min,无水乙醇冲洗干净,PBS漂洗2次,0.3%过氧化氢孵育10 min,0.5% BSA封闭30 min,生物素-HABP室温孵育过夜,PBS-吐温浸泡2次,每次40 min,加入链酶亲和素-过氧化物酶复合物室温30min,PBS-吐温冲洗2次,每次3 min,滴加适量二氨基联苯胺显色,PBS冲洗2次,苏木素复染3 min,返蓝,透明,封片,正置显微镜观察。

1.4 酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定血清中Hyase含量

HA溶解于0.1 mol/L碳酸氢钠,终浓度为200 µg/mL,包被96孔板后,PBS冲洗3次,加入正常人和乳腺癌患者血清,37 °C孵育16 h后,洗去被降解的HA,用生物素-HABP检测剩余的HA。通过生物素-亲和素检测系统,在405 nm波长,测定吸光度,绘制标准曲线,

将蛋白浓度标准化为以U/mL为单位的Hyase浓度。

1.5 免疫荧光法观察HA、oHA处理SVEC4-10前后ZO-1分布变化

将对数生长期的SVEC4-10细胞以 1×10^5 /孔接种于24孔板, 37 °C、5% CO₂培养箱培养48 h。设置空白对照组、10 μg/mL oHA组、10 μg/mL HA组, 孵育30 min。冰甲醇固定10 min, 5% Triton溶液处理3 min, PBS洗3次, 1% BSA封闭30 min, 兔抗小鼠ZO-1抗体(1:100) 4 °C孵育过夜。PBS洗3次, 加入Alexa Fluor 488标记山羊抗兔IgG抗体室温孵育1 h, 激光共聚焦显微镜观察、成像。

1.6 荧光素钠(sodium fluorescein, Na-F)渗透实验观察oHA对SVEC4-10渗透性的影响

将对数生长期的SVEC4-10细胞以 1.3×10^5 /孔接种于Transwell迁移小室, 在37 °C、5% CO₂培养箱培养24 h。小室下层加入0.6 mL DMEM, 上层细胞用无血清DMEM洗2次, 分别加入0.2 mL的DMEM(空白对照组), 10 μg/mL oHA连同100 μg/mL Na-F。于不同的时间点(30, 60, 90, 120, 150 min)分别从小室下层吸取50 μL溶液, 使用多功能酶标仪测定荧光强度[Ex(λ) 460±10 nm; Em(λ) 515±10 nm]。

1.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测oHA处理SVEC4-10细胞后下游信号通路蛋白ROCK1/RhoA的表达

将对数生长期的SVEC4-10细胞以 6×10^5 /孔接种于6孔板, 37 °C、5% CO₂培养箱培养48 h。设置无处理组、10 μg/mL oHA组、10 μg/mL nHA组, 2 h后弃去上清, 收集细胞蛋白, 每孔加入60 μL细胞裂解液, 冰上孵育30 min, 4 °C 12 000 r/min离心5 min

后收集上清, BCA法测定样品中蛋白浓度。进行8%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 将蛋白转移至PVDF上; 室温下, 5%脱脂牛奶封闭液摇床封闭1 h, 兔抗小鼠ROCK1抗体、兔抗小鼠RhoA抗体、抗GAPDH抗体(1:1 000) 4 °C孵育过夜。用1×TBST溶液漂洗3次, 每次5 min, 分别在辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG、山羊抗小鼠IgG中室温摇床孵育1 h, 1×TBST溶液漂洗3次, 每次5 min。加ECL发光液, Image Quant LAS 400 mini超灵敏化学发光成像仪曝光显影。本实验重复3次。

1.8 四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)检测oHA处理SVEC4-10后细胞的生长情况

将对数生长期的SVEC4-10细胞以 3×10^4 /孔接种于96孔板, 置于37 °C、5% CO₂培养箱培养。48 h后, 更换培养液, 设置无处理组和10 μg/mL oHA组(实验组), 继续培养48 h, 每个浓度设置5个复孔; 检测时, 每孔加入5 mg/mL MTT溶液100 μL, 继续培养4 h; 3 000 r/min离心10 min, 弃去上清, 每孔加入DMSO 100 μL, 震荡10 min, 待结晶完全溶解后, 酶标仪测定570 nm波长处的D值。

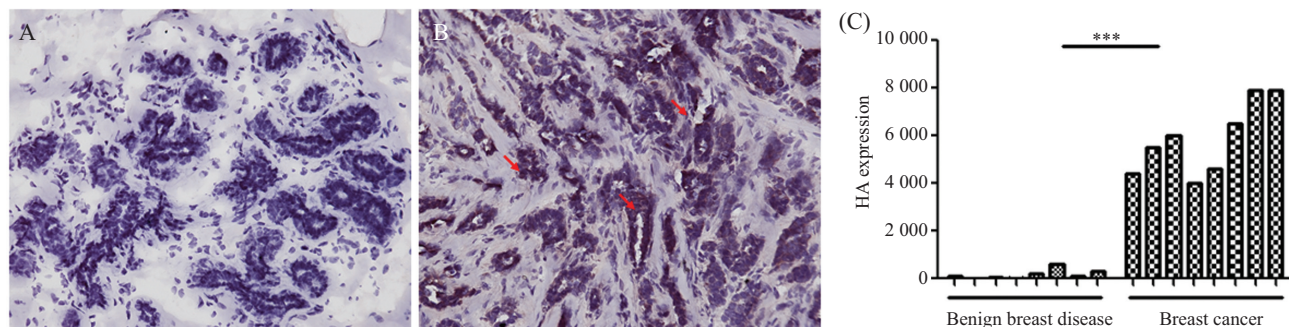
1.9 统计分析

采用SPSS 13.0软件进行数据处理, 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两独立样本采用t检验分析比较实验组和对照组之间的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 良性乳腺疾病与乳腺癌组织HA表达水平

本研究初步采用免疫组化方法检测8对良性乳腺疾病及乳腺癌组织HA表达情况, 结果显示, 乳腺癌组

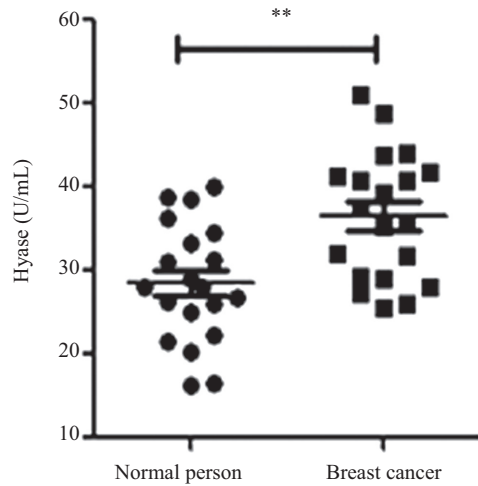


A: 良性乳腺疾病组织HA表达量(20×); B: 乳腺癌组织HA表达量(20×), 红色箭头所指即HA; C: 良性乳腺疾病与乳腺癌组织HA表达量比较。*** $P < 0.001$, 与良性乳腺疾病组HA表达量比较。

A: the expression of hyaluronic acid in benign breast disease tissue (20×); B: the expression of hyaluronic acid in breast cancer tissue (20×), the red arrow indicated HA; C: comparison of the expression of hyaluronic acid in benign breast disease and breast cancer. *** $P < 0.001$ compared with the expression of HA in benign breast disease.

图1 良性乳腺疾病及乳腺癌组织HA表达量

Fig.1 The expression of hyaluronic acid in benign breast disease and breast cancer



** $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ 。

图2 Hyase在正常人与乳腺癌患者血清中的表达差异

Fig.2 The different expressions of serum Hyase in normal person and breast cancer

织中HA表达明显高于良性乳腺疾病, 差异有统计学意义($P < 0.001$, 图1)。

2.2 乳腺癌患者血清Hyase水平

为了进一步研究乳腺癌HA可能存在的分子大小变化, 本研究通过ELISA方法分别检测20对正常人和乳腺癌患者血清Hyase含量, 经两独立样本 t

表1 正常人和乳腺癌患者血清中Hyase水平

Table 1 The serum concentrations of hyaluronidase in normal person and breast cancer

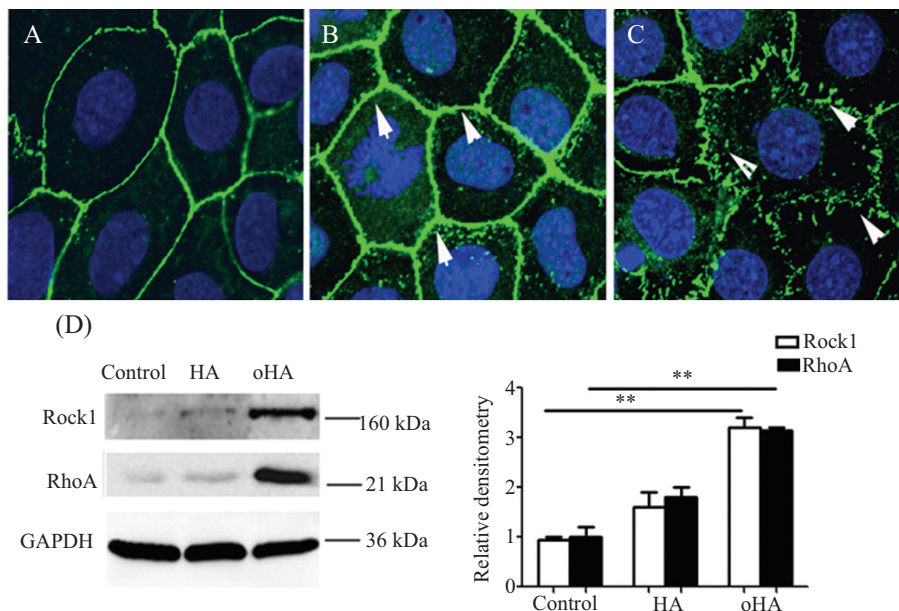
组别	例数	透明质酸分解酶(U/mL)	P 值
Group	Number of cases	Hyase (U/mL)	P value
Control	20	28.51±7.08	0.002**
Breast cancer	20	36.47±7.64	

经两独立样本 t 检验, ** $P < 0.01$, 乳腺癌患者血清Hyase与正常人比较。 ** $P < 0.01$, the serum concentration of hyaluronidase in breast cancer compared with normal person by two independent sample t test.

检验分析, 结果显示, 乳腺癌患者血清Hyase表达水平明显高于正常对照组(图2), 差异有统计学意义($P < 0.01$, 表1)。

2.3 HA与oHA对SVEC4-10细胞ZO-1分布及下游信号通路的影响

为了探讨HA、oHA对淋巴内皮细胞间紧密连接分子ZO-1分布影响, 通过免疫荧光观察显示, 与空白对照组相比(图3A), 10 $\mu\text{g/mL}$ oHA组细胞间连接呈褶皱状, ZO-1在细胞膜上分布不规则, 细胞间出现小缝隙(图3C), 而10 $\mu\text{g/mL}$ HA组细胞间连接加强(图3B)。同时, Western blot检测结果显示, oHA处理后, SVEC4-10细胞ROCK1/RhoA信号通路蛋白表达水平增高, HA处理后无明显变化(图3D)。

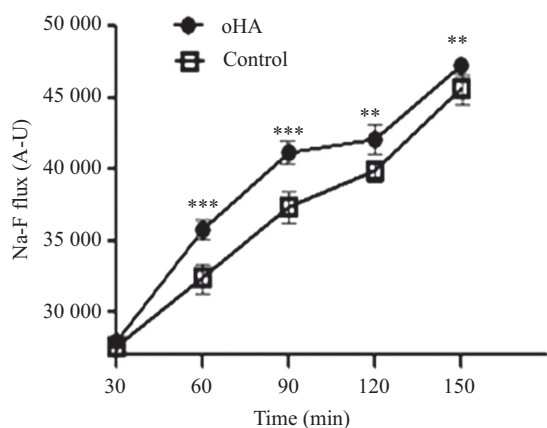


A: 空白对照组(40 \times); B: 10 $\mu\text{g/mL}$ HA组(40 \times), 白色箭头所指为细胞间连接紧密; C: 10 $\mu\text{g/mL}$ oHA组(40 \times), 白色箭头所指为细胞间形成缝隙; D: 10 $\mu\text{g/mL}$ HA、oHA对ROCK1、RhoA蛋白表达水平的影响。 ** $P < 0.01$ 。

A: control group (40 \times); B: 10 $\mu\text{g/mL}$ of hyaluronic acid group (40 \times), the white arrow indicated intercellular tightened junction; C: 10 $\mu\text{g/mL}$ of oligosaccharides of hyaluronic acid group (40 \times), the white arrow indicated the intercellular gap formation; D: the effect of 10 $\mu\text{g/mL}$ HA and oHA on the protein expression levels of ROCK1 and RhoA. ** $P < 0.01$ 。

图3 HA与oHA对SVEC4-10细胞ZO-1分布及ROCK1/RhoA蛋白表达水平的影响

Fig.3 Effect of HA and oHA on ZO-1 distribution and the protein expression levels of ROCK1/RhoA in SVEC4-10 cells



** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组比较。

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group.

图4 oHA对SVEC4-10单层细胞渗透性的影响

Fig.4 Effects of oHA on the permeability of SVEC4-10 monolayers

2.4 oHA对SVEC4-10单层细胞渗透性的影响

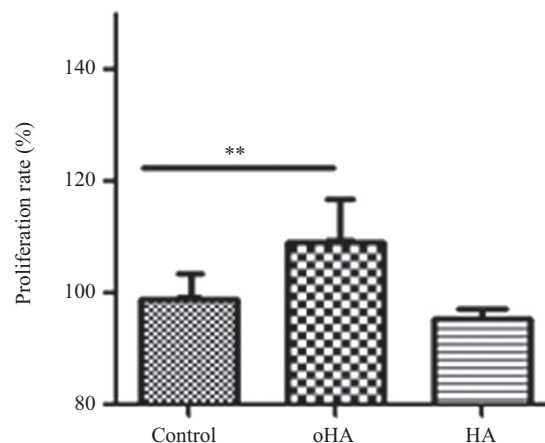
如上所述, oHA打开细胞间连接形成小缝隙, 这一现象提示, oHA可能通过打开细胞间连接从而提高单层淋巴内皮细胞渗透性。因此, 本研究采用Transwell小室检测10 $\mu\text{g/mL}$ oHA刺激单层SVEC4-10细胞后, 由小室上层进入下室的Na-F量。结果显示, 相对于空白对照组, oHA显著提高了NA-F通过单层细胞的渗透性, 差异具有统计学意义($P < 0.01$ 、 $P < 0.001$, 图4)。

2.5 HA与oHA对SVEC4-10细胞增殖的影响

根据本实验室前期研究发现, 10 $\mu\text{g/mL}$ oHA可促进人脐静脉内皮细胞增殖, 而200 $\mu\text{g/mL}$ HA抑制其增殖^[6], 因此, 本研究选用10 $\mu\text{g/mL}$ HA与oHA初步研究其对SVEC4-10细胞增殖的影响。结果显示, oHA促进SVEC4-10细胞增殖, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$, 图5)。

3 讨论

既往研究报道显示, 淋巴管新生是影响乳腺癌转移的重要因素^[7], 但淋巴管新生机制尚未阐明。大量的临床和实验数据表明, 许多肿瘤如乳腺癌、卵巢癌、胃肠癌等高水平表达HA, 往往恶性度高, 预后不良, 患者生存率低^[8]。乳腺癌中HA累积与转移、预后及疾病进展成正相关^[9]。Tan等^[10]检测乳腺组织及细胞中Hyase的表达水平, 发现均高于正常乳腺组织及细胞。乳腺癌等肿瘤病理过程中, HA含量升高, Hyase活性也增强, 提示其可能将增高的HA分解为



** $P < 0.01$, 与对照组比较。

** $P < 0.01$ vs control group.

图5 HA与oHA对SVEC4-10细胞增殖的影响

Fig.5 Effects of HA and oHA on SVEC4-10 cells proliferation

oHA, 使oHA含量升高于正常组织。oHA具有打开血管内皮细胞间连接、促进血管新生的功能, 相反, HA保护血管完整性, 抑制血管新生。而HA与oHA是否参与调控淋巴管内皮细胞间连接及淋巴管新生则少有报道。因此, 探明HA、oHA对淋巴管完整性及淋巴新生的影响, 将对乳腺癌淋巴转移分子机制有重大意义。

本文通过分析8对乳腺癌与良性乳腺疾病组织, 发现HA在乳腺癌组织明显高表达, 与既往报道HA在恶性肿瘤高表达结果相符^[11]。此外, 本研究采用ELISA方法检测20对乳腺癌患者和正常人血清Hyase含量, 发现乳腺癌患者血清Hyase表达水平增高, 提示乳腺癌组织中Hyase含量可能也升高。以上结果表明, 乳腺癌发生时, 组织HA高表达, 同时伴随Hyase含量升高, 可能致使乳腺癌患者血清oHA水平升高。Singleton等^[12]发现, oHA作用血管内皮细胞, 反式激活鞘氨醇-1-磷酸盐受体, 通过活化下游丝/苏氨酸激酶引起细胞骨架改变, 而HA加强血管屏障功能。ZO-1是膜相关鸟苷激酶同源染色体家族成员之一, 与黏附连接蛋白结合并附着在肌动蛋白细胞骨架上, 具有稳定细胞的作用^[13]。ZO-1在成熟淋巴内皮细胞上呈紧密的拉链式分布, 在淋巴内皮细胞形态变化和功能中发挥重要的作用, 可通过调节细胞骨架蛋白来调控细胞间连接纽扣状与拉链状互换现象^[14]。HA与oHA对淋巴内皮细胞紧密连接分子ZO-1分布变化的影响, 尚未见报道。因此, 本课题对HA、oHA调控SVEC4-10细胞ZO-1作用进行研究, 结果表明, oHA破坏SVEC4-10

细胞间完整连接, 细胞连接消失或出现褶皱, 形成间隙, ZO-1由胞膜向胞内分布增多, HA无此现象, 相反促进ZO-1胞膜分布, 提示HA降解为oHA后可破坏淋巴管完整性。为了进一步探讨oHA对单层淋巴内皮细胞渗透性的影响, 本研究通过检测oHA作用单层淋巴内皮细胞后对NA-F通过量的影响, 结果发现, oHA增加NA-F通过量, 提示oHA打开细胞连接, 提高淋巴管渗透性。oHA调节血管内皮细胞骨架重新排列, 破坏血管完整性主要是通过结合HA受体激活下游通路的^[15], 那么oHA调控淋巴内皮细胞紧密连接分子ZO-1改变, 是否通过结合淋巴管内皮细胞HA受体(如LYVE-1等)发挥作用, 仍需要更深入的实验进行研究。

ROCK1/RhoA作为细胞内重要信号转导通路, 与细胞收缩、负向调节细胞黏附、骨架重排、细胞迁移密切相关^[16]。既往研究发现, oHA作用血管内皮细胞后活化ROCK1/RhoA信号通路, 增强血管渗透性。本研究发现, oHA同样通过ROCK1/RhoA提高单层淋巴内皮细胞渗透性。Western blot结果显示, oHA可促进淋巴内皮细胞SVEC4-10细胞ROCK1/RhoA蛋白表达水平升高, HA对ROCK1/RhoA蛋白表达水平无明显影响。这一结果说明, oHA可能通过活化SVEC4-10细胞ROCK1/RhoA信号通路, 进而调节淋巴内皮细胞紧密连接分子。以上结果进一步说明, oHA在调控淋巴管完整性中具有重要作用。有研究显示, oHA能够促进血管内皮细胞增殖, HA抑制增殖。而本研究发现, oHA同样促进SVEC4-10细胞增殖, 因此, 我们推测HA降解为oHA后具有促进淋巴内皮细胞增殖作用, 提示oHA可能参与淋巴管新生。研究报道提示, ZO-1与其核转录因子稳定结合在细胞连接间, 间接抑制了细胞增殖^[17]。本实验发现, oHA作用淋巴内皮细胞后促进淋巴内皮细胞增殖、ZO-1分布改变, 但ZO-1分布变化与增殖是否有着直接关系, 仍有待探索。

综上所述, HA与Hyase在乳腺癌中表达水平同时升高, 可能预示乳腺癌oHA含量也增多, oHA随后可能通过活化ROCK1/RhoA信号通路诱导淋巴内皮细胞ZO-1胞浆内化, 破坏淋巴内皮细胞间连接从而提高淋巴管渗透性。另外, oHA促进淋巴内皮细胞增殖, 提示乳腺癌oHA含量增多破坏淋巴内皮细胞完整性, 同时促进淋巴管新生。而oHA通过何种受体介导ZO-1变化及ZO-1变化如何影响淋巴内皮细

胞增殖, 有待更进一步的研究。

参考文献 (References)

- Ran S, Volk L, Hall K, Flister MJ. Lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer. *Pathophysiology* 2010; 17(4): 229-51.
- Slevin M, Krupinski J, Gaffney J, Matou S, West D, Delisser H, *et al.* Hyaseuronan-mediated angiogenesis in vascular disease: Uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathway. *Matrix Biol* 2007; 26(1): 58-68.
- Raleigh DR, Boe DM, Yu D, Weber CR, Marchiando AM, Bradford EM, *et al.* Occludin S408 phosphorylation regulates tight junction protein interactions and barrier function. *J Cell Biol* 2011; 193(3): 565-82.
- Wheeler-Jones CP, Farrar CE, Pitsillides AA. Targeting Hyaseuronan of the endothelial glycocalyx for therapeutic intervention. *Curr Opin Investig Drugs* 2010; 11(9): 997-1006.
- Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: Happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(4): 261-70.
- Mo W, Yang C, Liu Y, He Y, Wang Y, Gao F. The influence of hyaluronic acid on vascular endothelial cell proliferation and the relationship with ezrin/merlin expression. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2011; 43(12): 930-9.
- de Boer M, van Dijck JA, Bult P, Tjan-Heijnen VC. Breast cancer prognosis and occult lymph node metastases, isolated tumor cells, and micrometastases. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102(6): 410-25.
- Fuchs K, Hippe A, Schmaus A, Homey B, Sleeman JP, Orian-Rousseau V. Opposing effects of high- and low-molecular weight Hyaseuronan on CXCL12-induced CXCR4 signaling depend on CD44. *Cell Death Dis* 2013; 4(10): e819.
- Heldin P, Asu K, Olofsson B, Porsch H, Kozlova I, Kahata K. Deregulation of Hyaseuronan synthesis, degradation and binding promotes breast cancer. *J Biochem* 2013; 154(5): 395-408.
- Tan JX, Wang XY, Li HY, Su XL, Wang L, Ran L, *et al.* Hyase1 overexpression is correlated with the malignant behavior of human breast cancer. *Int J Cancer* 2011; 128(6): 1303-15.
- Oskarsson T. Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. *Breast* 2013; 22(2): S66-72.
- Singleton PA, Dudek SM, Ma SF, Garcia JG. Transactivation of sphingosine 1-phosphate receptors is essential for vascular barrier regulation. Novel role for Hyaseuronan and CD44 receptor family. *J Biol Chem* 2006; 281(45): 34381-93.
- Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778(3): 660-9.
- Yao LC, Baluk P, Srinivasan RS, Oliver G, McDonald DM. Plasticity of button-like junctions in the endothelium of airway lymphatics in development and inflammation. *Am J Pathol* 2012; 180(6): 2561-75.
- Lennon FE, Singleton PA. Hyaseuronan regulation of vascular integrity. *Am J Cardiovasc Dis* 2011; (3): 200-13.
- Noma K, Kihara Y, Higashi Y. Striking crosstalk of ROCK signaling with endothelial function. *J Cardiol* 2012; 60(1): 1-6.
- Balda MS, Garrett MD, Matter K. The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol* 2003; 160(3): 423-32.