

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.13.012

基质金属蛋白酶和组织金属蛋白酶抑制剂在肾细胞癌组织中的表达 *

杨 亮¹ 乔振奎^{2△} 邴建勇¹ 奚晓龙¹ 朴庆华¹

(1 大庆油田总医院泌尿外科 黑龙江 大庆 163500; 2 哈尔滨医科大学附属第四医院泌尿外科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的: 基质金属蛋白酶及组织金属蛋白酶抑制剂在肾细胞癌转移中占有重要的作用, 研究肾细胞癌组织中 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 和 TIMP-2 的表达情况, 为肾癌转移的治疗提供理论依据。**方法:** 选取 36 例肾细胞癌肾组织标本, 从相同的肾细胞癌组织及癌旁肾组织获得对照样本, 均进行根治性肾切除手术切除。肿瘤分期按 TNM 分期标准。为了统计评估, 肿瘤 1 期和 2 期为低级, 3 期以上为高级。RT-PCR 检测肿瘤和正常组织中的 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 和 TIMP-2 的表达。**结果:** 不同样本 MMPs 和 TIMPs 表达水平各不相同。肾细胞癌组织中 MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 在肾细胞癌中的表达明显高于正常肾组织 ($P < 0.05$)。在肾细胞癌的肿瘤分期方面, MMP-2 与 MMP-9 和肿瘤的分期显著相关, 随着肿瘤分期的增加, MMP-2 与 MMP-9 的表达明显升高 ($P < 0.05$), 而 TIMP-1 与 TIMP-2 与肿瘤的分期无关。**结论:** 肾细胞癌组织中 TIMP-2、MMP-2、MMP-9、TIMP-1 的 mRNA 表达显著高于正常肾组织, 抑制 MMPs 的表达将成为治疗肾细胞癌转移的新的方向。

关键词: 基质金属蛋白酶; 组织金属蛋白酶抑制剂; 肾细胞癌; 实时定量逆转录聚合酶反应

中图分类号: R737.11 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2014)13-2446-04

Expression of Tissue levels of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Renal cell Carcinoma*

YANG Liang¹, QIAO Zhen-kui^{2△}, BING Jian-yong¹, XI Xiao-long¹, PIAO Qing-hua¹

(1 Department of Urology, Daqing oilfield General Hospital, Daqing, Heilongjiang, 163500, China;

2 Department of Urology, Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases play an important role in renal cell carcinoma. To examine the expression of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in renal tissue samples of renal cell cancer, and To provide a theoretical basis for the treatment of renal cell carcinoma metastasis **Methods:** 36 cases of renal cell carcinoma specimens and normal samples were fully obtained from the same renal cell carcinoma tissue and tumor adjacent renal tissues, those were performed radical resection operation resection of kidney. Tumor staging according to TNM staging. For statistical evaluation, tumor 1 and 2 stage were determined lower grade, tumor 3 and senior stage were determined higher grade. Semi quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect the expression of tumor and normal tissues of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2. **Results:** MMPs and TIMPs expression levels in different samples was different. Mean MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 mRNA expression in the renal cell carcinomas was significantly higher than those in the normal renal tissue ($P < 0.05$). In renal cell cancer staging, MMP-2 and MMP-9 and tumor stage was significantly correlated with the increase of staging of tumor, MMP-2 and MMP-9 mRNA expression increased significantly with the TNM stage of the tumor ($P < 0.05$). **Conclusion:** Mean MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 mRNA expression in the renal cell carcinomas was significantly higher than in the normal renal tissue, the inhibition of MMPs expression will become the treatment of renal cell carcinoma metastatic to the new direction.

Key words: Matrix metalloproteinase; Tissue inhibitor of metalloproteinase; Renal cell carcinoma; RT-PCR

Chinese Library Classification(CLC): R737.11 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)13-2446-04

前言

肾细胞癌(Renal cell cancer, RCC)是泌尿外科的常见肿瘤之一, 约占成人肿瘤的 2.5%, 大约占有原发性恶性肾肿瘤的 85-90%。虽然肾细胞癌的手术效果满意, 33%的 RCC 患者初诊

发生转移或术后出现转移, 放疗、化疗对晚期 RCC 患者效果不佳, 而靶向治疗晚期 RCC 患者取得了肯定的效果。肾细胞癌细胞的侵袭和转移是多种因素共同作用的结果: 蛋白水解、细胞附着、迁移、血管生成、通过屏障、远处扩散和转移^[1]。基底膜的降解是肿瘤发展的一个重要方面, 并调控者肿瘤细胞增殖和迁

* 基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(J2511228)

作者简介: 杨亮(1980-), 男, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 泌尿系肿瘤

△ 通讯作者: 乔振奎, E-mail: qiaozenkui1978@126.com

(收稿日期: 2013-08-12 接受日期: 2013-09-11)

移^[2],并通过入侵基底膜远处转移^[3]。基底膜基质的降解与基质金属蛋白酶(MMPs)活动密切相关,并与基质金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)共同作用。基质金属蛋白酶包括胶原酶、明胶酶、基质酶、基质金属蛋白酶(MMPs)^[4]。在MMPs中,MMP-2和MMP-9已与癌转移关系最为密切,其降解的IV型胶原蛋白,导致血管基底膜的降解^[5];TIMPs是肿瘤侵袭、转移的负性调节因子。目前已经发现多种在肾细胞癌表达的MMPs和TIMPs。在本研究中,我们用RT-PCR研究MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2的表达,并找出其与肾细胞癌以及TNM分期的相关性,以期肾癌转移的治疗提供理论依据。

1 实验材料

1.1 标本来源

36例肾细胞癌组织样本(男25例,女11例),样本从相同的肾细胞癌组织及癌旁肾组织获得,均进行根治性肾切除术切除。肿瘤分期按TNM分期标准。为了统计评估,肿瘤1期和2期为低级,3期以上为高级。肿瘤和癌旁组织样本在手术切除后液氮中快速冷冻,并立即并存储在-80℃提取RNA。患者年龄28-84岁,平均为61.3±13.5岁。所有病例经大庆油田总医院医学伦理委员会批准,并征得家属同意。

1.2 试剂及仪器

引物设计按引物常规要求设计,为跨目的基因内含子、含两个外显子部分碱基的序列,并经blastn基因库搜索(南京金斯瑞生物科技有限公司合成),RT-PCR反应仪为美国ABI 7700(PE公司)。

表1 RT-PCR检测相关基因的引物序列
Table 1 Primer sequences for detection of related cytokines

Cytokines	Sequences	Length (bp)
β-actin	5'AAGATGACCCAGATCATGTTTGAG3'	648
	5'AGGAGGAGCAATGATCTTGATCTT3'	
MMP-2	5'ACCTGGATGCCGTCGTGGAC3'	448
	5'TGTGGCAGCACCAGGGCAGC3'	
MMP-9	5'CGCTGGGCTTAGATCATTC3'	460
	5'TTGTGCGCGATAAGGAAGG3'	
TIMP-1	5'GGGCTTCACCAAGACCTA3'	280
	5'GAAGAAAGATGGGAGTGGG3'	
TIMP-2	5'CCAAAGCGGTCACTGAGA3'	421
	5'TGGTGCCCGTTGATGTTTC3'	

Trizol、5× Strand buffer、0.1M DTT、SSTR II (上海史瑞克生物科技有限公司),OligodT由上海生物工程公司合成,M-MLV逆转录酶(上海亨代生物仪器有限公司),含β-actin基因上、下游引物和VIC标记探针的20× Human GAPDH、2× PCR master mix、dNTPs(美国PE公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本的获取 无菌手术切除新鲜癌组织、癌旁组织约0.2 cm×0.2 cm×0.2 cm大,用生理盐水冲洗2~3遍,采用Eppendorf管收集,-80℃冻存备用。

1.3.2 总RNA的提取 采用异硫氰酸胍一步法提取。剪碎标

本,按100 mg/500 μL GIT变性液比例混匀,另加2 mM醋酸钠、水饱和酚和氯仿,分别为50 μL、500 μL、100 μL;先混匀,1200 rpm离心10 min,加相同剂量异丙醇,-20℃留置1h。4℃1200 rpm离心10 min,弃上清液。再加100 μL GIT变性液方法同上混匀、离心、弃上清液;用75%酒精冲洗一次,加1 ml无水酒精,-70℃保存备用。

1.3.3 逆转录反应 5~10 μg组织总RNA加入5× buffer 4 μL,0.1 mol/L DTT 2 μL,M-MLV 1 μL(200U),4× dNTP (10 mmol/L,每种)1 μL,下游引物 P20.5 μL(50 pmol/L),总反应体积20 μL。37℃条件下放置1h,充分反应,95℃高温下灭活M-MLV 10 min。

1.3.4 PCR反应 在20 μL RT反应产物中,加入10× buffer 10 μL,25 mmol/L MgCl₂ 8 μL,4× dNTP 1 μL,上游引物 P10.5 μL(50 pmol/L),100 μL液体石蜡,95℃高温下5 min,加入Taq DNA聚合酶2 μL(1U/μL)。循环条件:①MMP-2、β-actin:94℃ 30 sec,62℃ 30 sec,72℃ 30 sec,30个循环,72℃延长5 min。②MMP-9、TIMP-1、TIMP-2:94℃ 1 min,56℃ 30 sec,72℃ 1 min,30个循环,72℃延长5 min。

1.3.5 琼脂糖凝胶电泳及CT值测定 采用1.5%琼脂糖凝胶固定PCR产物后电泳,电泳条件:75V恒压,时间20~30 min。拍照后输入美国Kodak凝胶分析系统,参照物为β-actin。按照预定条件,进行荧光定量检测。

1.4 统计学处理

应用SPSS 17.0统计软件进行数据分析,结果以均值±标准差表示。MMP-2、MMP-9、TIMP-1和TIMP-2在肾细胞癌组织与正常组织之间的表达以及与分期之间的关系采用t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾癌组织与正常肾组织MMPS与TIMPS的表达情况

不同样本MMPs和TIMPs表达水平各不相同。MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2的mRNA表达如图1所示。肾细胞癌组织MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 mRNA的表达明显高于正常肾组织(P<0.05)。见表2。

表2 正常肾组织与肾细胞癌组织MMPS与TIMPS的表达(̄x±s)

Table 2 Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases (̄x±s)

	Tumor tissue	Normal tissue	P value
MMP-2	0.734±0.064	0.334±0.045	<0.05
MMP-9	0.723±0.085	0.223±0.010	<0.05
TIMP-1	0.376±0.046	0.136±0.019	<0.05
TIMP-2	0.377±0.016	0.242±0.015	<0.05

2.2 肾细胞癌组织中MMPS、TIMPS与肿瘤分期的关系

在肾细胞癌的肿瘤分期方面,MMP-2与MMP-9和肿瘤的分期显著相关,随着肿瘤分期的增加,MMP-2与MMP-9的表达明显升高(P<0.05),而TIMP-1与TIMP-2与肿瘤的分期无关。见表3。

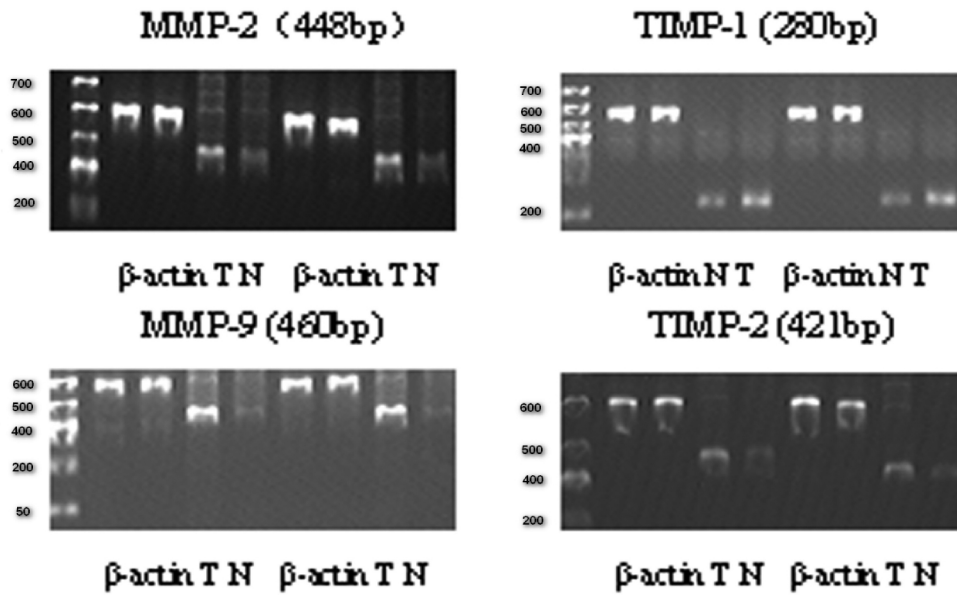


图 1 RT-PCR 检测 MMPs 与 TIMPs 的结果

Fig. 1 Results of MMPs and TIMPs by RT-PCR

表 3 MMPs 与 TIMPs 的表达与肿瘤分期的关系($\bar{x} \pm s$)Table 3 Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) by tumor stage($\bar{x} \pm s$)

	Low stage	Advanced stage	P value
MMP-2	0.734 $\pm$ 0.064	0.334 $\pm$ 0.045	<0.05
MMP-9	0.723 $\pm$ 0.085	0.223 $\pm$ 0.010	<0.05
TIMP-1	0.376 $\pm$ 0.046	0.136 $\pm$ 0.019	<0.05
TIMP-2	0.377 $\pm$ 0.016	0.242 $\pm$ 0.015	<0.05

3 讨论

肿瘤的生长,侵袭和转移是复杂的过程,细胞外基质成分(ECM)和基底膜的降解是在此过程中的关键步骤之一。许多先前公布的实验和临床研究结果显示,基质金属蛋白酶在这一过程中发挥了重要作用。本次研究中,肾细胞癌组织 MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 mRNA 的表达明显高于正常肾组织($P < 0.05$)。随着肿瘤的 TNM 分期的增加,MMP-2、MMP-9 mRNA 的表达明显增加。

研究表明,MMP-2 和 MMP-9 消化基底膜Ⅳ型胶原的作用机制是血管浸润和转移一个重要过程^[5-6]。由于 MMP-2 具有降解基底膜的作用,其已被确定为肿瘤进展和预后的一个潜在标记。Gohji K 等^[7]报道血清中 MMP2 的升高提示了尿路上皮癌患者疾病恶化和预后不良。Kugler 等^[8]应用 PCR 检测 17 例肾细胞癌组织中 MMP2、MMP9、TIMP1 和 TIMP2 的表达,结果显示基因的表达增加与肿瘤分期之间关系密切。在其他肿瘤研究中也得到了类似的结果,体内和体外实验表明,MMP 水平与直肠癌侵袭与转移密切相关。Sier 等^[9]研究表明,胃癌组织基质金属蛋白酶 MMP-2 和 MMP-9 的表达增加,MMP-2 的活性越高胃癌患者预后越差。MMP-9 的作用与 MMP-2 类似,但 MMP-9 降解基底膜的活性是 MMP-2 的 25 倍,MMP-9 在肿瘤转移方面的标记作用比 MMP-2 更强^[10-11]。此外,通过免疫组化检测 MMP-9 的表达,结果显示其与肾细胞癌预后显著相关^[12]。

但也有研究表明 MMP-9 mRNA 表达与肝细胞癌患者的预后无显著相关关系。MMP-9 预测和评估转移性肾细胞癌(MRCC)值得进一步研究^[13]。本次研究显示,MMP-2 和 MMP-9 在肾细胞癌 mRNA 的表达明显高于正常肾组织($P < 0.05$),MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 表达增加与肿瘤的 TNM 分期显著相关,这与在其他肿瘤的研究结果相似^[8-9]。

在肿瘤的侵袭过程中,基质金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)发挥了抗侵袭和抗转移的作用。动物实验证实 TIMPs 是肿瘤侵袭、转移的负性调节因子^[14]。但是,通过临床样本的检测,显示肿瘤组织 TIMP mRNA 的表达明显增高。在不同类型的肿瘤的研究中,如结肠癌、胃癌、胰腺癌等,MMPs 和 TIMPs 表达的增加与肿瘤细胞的侵袭转移呈正相关^[15-20]。另外,通过免疫组化检测 TIMP-1 和 TIMP-2 的表达,显示其与肾细胞癌预后显著相关^[12]。本次研究显示,肾细胞癌组织中 TIMP-1 和 TIMP-2 mRNA 的表达明显高于正常肾组织($P < 0.05$)。

总之,肾细胞癌中 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 和 TIMP-2 mRNA 的表达明显高于正常肾组织($P < 0.05$)。随着肿瘤的 TNM 分期的增加,MMP-2 和 MMP-9 表达与 mRNA 表达明显增加。虽然肾细胞癌的手术效果满意,33%的 RCC 患者初诊发生转移或术后出现转移,故早期的诊断以及治疗有重要的临床意义。虽然上述因子的检测用于肾细胞癌的早期临床诊断尚需进一步研究,但为肾癌转移的治疗提供了新的思路。MMPs 与 TIMPs 在肾细胞癌患者外周血中的表达情况目前尚不明确,仍

需继续研究。

参考文献(References)

- [1] Fidler IJ. Critical determinants of metastasis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2002, 12(2):89-96
- [2] Hwang TL, Lee LY, Wang CC, et al. Claudin-4 expression is associated with tumor invasion, MMP-2 and MMP-9 expression in gastric cancer[J]. *Exp Ther Med*, 2010, 1(5):789-797
- [3] Friedl P, Locker J, Sahai E, et al. Classifying collective cancer cell invasion[J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(8):777-783
- [4] Nair SA, Jagadeeshan S, Indu R, et al. How intact is the basement membrane? Role of MMPs [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 749: 215-232
- [5] Pal S, Ganguly KK, Moulik S, et al. Modulation of MMPs by cell surface integrin receptor $\alpha 5 \beta 1$ [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2012, 12(7):726-732
- [6] Moore CS, Crocker SJ. An alternate perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology[J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(1):12-16
- [7] Gohji K, Fujimoto N, Komiyama T, et al. Evaluation of serum levels of matrix metalloproteinase-2 and -3 as new predictors of recurrence in patients with urothelial carcinoma[J]. *Cancer* 1996, 78(11):2379-2387
- [8] Kugler A, Hemmerlein B, Thelen P, et al. Expression of metalloproteinase 2 and 9 and their inhibitors in renal cell carcinoma [J]. *J Urol*, 1998, 160(5):1914-1918
- [9] Sier CF, Kubben FJ, Ganesh S, et al. Tissue levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are related to the overall survival of patients with gastric carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 1996, 74 (3):413-417
- [10] Yasumitsu H, Miyazaki K, Umenishi F, et al. Comparison of extracellular matrix-degrading activities between 64-kDa and 90-kDa gelatinases purified in inhibitor-free forms from human schwannomacells[J]. *J Biochem*, 1992, 111(1):74-80
- [11] Yamagata S, Tanaka R, Ito Y, et al. Gelatinases of murine metastatic tumor cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 158 (1): 228-234
- [12] Kallakury BV, Karikhalli S, Haholu A, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(10):3113-3119
- [13] Perez-Gracia JL, Prior C, Guillén-Grima F, et al. Identification of TNF- α and MMP-9 as potential baseline predictive serum markers of sunitinib activity in patients with renal cell carcinoma using a human cytokine array [J]. *Br J Cancer*, 2009, 101 (11): 1876-1883
- [14] Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion[J]. *Semin Cancer Biol*, 2010, 20(3):161-168
- [15] Nomura H, Fujimoto N, Seiki M, et al. Enhanced production of matrix metalloproteinases and activation of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) in human gastric carcinomas [J]. *Int J Cancer*, 1996, 69(1):9-16
- [16] Zeng ZS, Cohen AM, Zhang ZF, et al. Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastases [J]. *Clin Cancer Res*, 1995, 1(18): 899-906
- [17] Murnane MJ, Cai J, Shuja S, et al. Active MMP-2 effectively identifies the presence of colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125 (12):2893-2902
- [18] Akers WJ, Xu B, Lee H, et al. Detection of MMP-2 and MMP-9 activity in vivo with a triple-helical peptide optical probe [J]. *Bioconjug Chem*, 2012, 23(3):656-663
- [19] Kemik O, Kemik AS, Sümer A, et al. Levels of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 in gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(16):2109-2112
- [20] Rojiani MV, Alidina J, Esposito N, et al. Expression of MMP-2 correlates with increased angiogenesis in CNS metastasis of lung carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2010, 3(8):775-781
- [11] Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW. Microglia: intrinsic immunoeffector cell of the brain[J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 1995, 20 (3): 269-287
- [12] Gabriel C, Justicia C, Camins A, et al. Activation of nuclear factor kappaB in the rat brain after transient focal ischemia [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999, 65(1): 61-69
- [13] Suzuki S, Tanaka K, Nogawa S, et al. Phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) after focal cerebral ischemia in rats [J]. *Exp Neurol*, 2001, 170(1): 63-71
- [14] Subang MC, Richardson PM. Neuroscience. Nuclear power for axonal growth[J]. *Science*, 2009, 326(5950):238-239
- [15] Kaushik DK, Mukhopadhyay R, Kumawat KL, et al. Therapeutic targeting of Kruppel-like factor 4 abrogates microglial activation[J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9:57
- [16] 李国章. 和厚朴酚的药理作用[J]. *亚太传统医药*, 2012, 8(1):162-163
- Li Guo-zhang. Progress of Pharmacologic Action Research on Honokiol[J]. *Asia-Pacific Traditional Medicine*, 2012, 8(1):162-163

(上接第 2436 页)