

• 论 著 •

MMP-9 蛋白及 mRNA 在乳腺癌组织中的表达*

刘海霞¹, 聂新民², 杨 军³

(1. 永州市中心医院检验科, 湖南永州 425000; 2. 中南大学湘雅三医院检验科, 湖南长沙 410013; 3. 中南大学湘雅三医院病理科, 湖南长沙 410013)

摘要:目的 研究基质金属蛋白酶-9(MMP-9)蛋白及 mRNA 在乳腺癌中的表达, 探讨其在乳腺癌发生、发展及转移过程中的临床意义。方法 用免疫组化法检测 MMP-9 蛋白在乳腺癌、乳腺良性病变组织中的表达, 用半定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)的方法检测组织中 mRNA 的表达。结果 MMP-9 蛋白在乳腺癌组织中的阳性表达率为 69.6%(39/56), 在乳腺良性病变组织中为 20%(6/30), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。MMP-9 mRNA 在乳腺癌和乳腺良性病变组织中表达水平(灰度比值)分别为 $0.914 2 \pm 0.108 1$ 、 $0.379 4 \pm 0.042 8$, 两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 MMP-9 蛋白及 mRNA 在乳腺癌组织中的表达与淋巴结转移呈正相关, 有可能作为判断乳腺癌浸润转移能力的参考指标之一。

关键词: 乳腺癌; 基质金属蛋白酶-9; 免疫组织化学; 反转录聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.17.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)17-2457-02

Expression of MMP-9 protein and its mRNA in the tissues of breast cancer*

Liu Haixia¹, Nie Xinmin², Yang Jun³

(1. Department of Clinical Laboratory, Central Hospital of Yongzhou City, Yongzhou, Hunan 425000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410013, China; 3. Department of Pathology, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410013, China)

Abstract: Objective To study expression of matrix metalloproteinase-9(MMP-9) protein and its mRNA in breast cancer and evaluate its significance in the occurrence, development and metastasis of breast cancer. Methods The protein expression of MMP-9 breast cancer were detected by using immunohistochemistry and the expression of mRNA were detected by reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) Results The positive rate of MMP-9 protein expression in 56 cases of breast cancer was 69.6%(39/56), while in benign breast diseases was 20%(6/30), which were significantly different($P < 0.05$). The levels of MMP-9 mRNA were significantly higher in the patients with breast cancer than those in benign breast diseases($P < 0.05$), which were $0.914 2 \pm 0.108 1$ and $0.379 4 \pm 0.0428$ respectively. Conclusion The MMP-9 protein and mRNA expression in human breast cancers are positively correlated with the stage and lymph node metastasis. Expression of MMP-9 could be used as an indicator for the ability of invasion and metastasis of breast cancer.

Key words: breast cancer; matrix metalloproteinase-9; immunohistochemistry; reverse transcription polymerase chain reaction

乳腺癌是我国女性目前最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率每年都在增加^[1]。乳腺癌患者死亡的原因主要在于癌细胞发生了转移的同时还侵袭了身体的其他器官^[2-3]。基质金属蛋白酶-9(MMP-9)属于基质金属蛋白酶家族的明胶酶类,能够降解细胞外基质(ECM),在肿瘤细胞生长、分化、侵袭、转移、调节肿瘤血管生成及免疫监视中起到重要作用,因此与多种肿瘤的发生和发展密切相关,本研究采用不同方法检测 MMP-9 在乳腺癌中的表达,旨在探讨 MMP-9 表达的临床意义。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 收集 2010 年 1 月至 2012 年 12 月湘雅三医院乳腺癌手术切除的组织标本 56 例,患者术前未接受过放疗和化疗。经两名病理医师审阅均为原发性乳腺浸润性导管癌,其中有淋巴结转移者 34 例(60.7%),无淋巴结转移者 22 例(39.3%)。同时随机选取同期在湘雅三医院病理确诊为乳腺纤维腺瘤的患者 30 例,收集乳腺纤维瘤组织标本 30 例。标本投入液氮中速冻,然后置于-70℃的冰箱保存备用。

1.2 方 法

1.2.1 免疫组化检测乳腺癌中 MMP-9 蛋白的表达 MMP-9 单克隆抗体及 SP 试剂均购于福州迈新公司, MMP-9 单克隆

抗体工作液稀释度为 1:100, AEC 显色,苏木素复染。用 PBS 缓冲液代替一抗作为空白对照。肿瘤细胞胞浆中出现棕黄色或者棕褐色颗粒即为阳性细胞。

1.2.2 半定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测乳腺癌组织 MMP-9 mRNA 的表达 按 Trizol(Invitrogen 公司)试剂盒说明提取组织中总 RNA 后,并参照 MBI 公司逆转录试剂盒具体操作步骤,按说明合成 cDNA。合成的 cDNA 经 PCR 扩增,并对扩增产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳并分析电泳图。

1.3 统计学处理 对所获得的数据应用 SPSS16.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各表达指标的组间差异在进行方差齐性检验后,采用 t 检验或近似 t 检验,计数资料的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 乳腺癌组织及乳腺良性病变组织中 MMP-9 蛋白的表达 免疫组化方法检测 MMP-9 蛋白在乳腺癌组织中的阳性表达率为 69.6%(39/56),阳性染色定位于肿瘤细胞胞浆见图 1、2。MMP-9 与淋巴结转移有关,有淋巴结转移者, MMP-9 表达较高,无淋巴结转移者, MMP-9 表达较低,两组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81072270)。 作者简介:刘海霞,女,副主任技师,主要从事临床检验的研究。

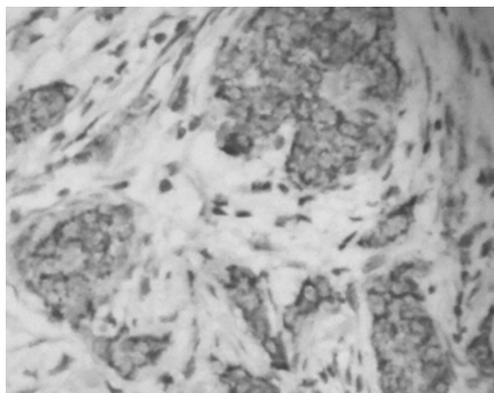


图 1 乳腺癌组织中 MMP-9 阳性表达(×100)

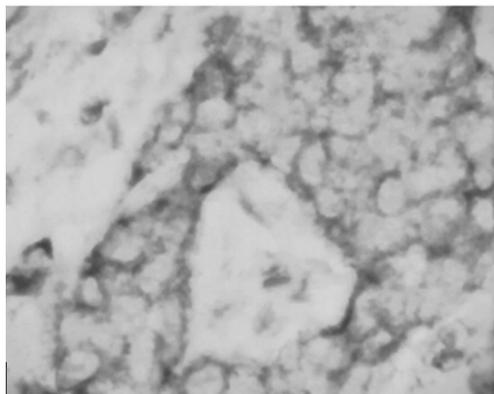
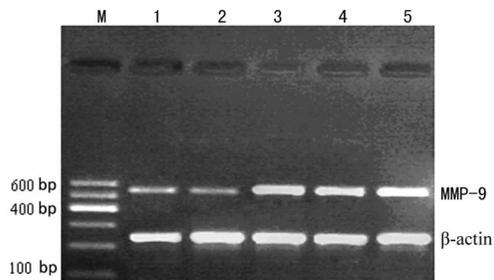


图 2 乳腺癌组织中 MMP-9 阳性表达(×400)

2.2 乳腺癌组织及乳腺良性病变组织中 MMP-9 mRNA 的表达 乳腺癌组织中 MMP-9 mRNA 的表达见图 3,所有组织标本均有 MMP-9 mRNA 的表达,其相对表达量(灰度比值)为 0.914 ± 0.108 1;而乳腺良性病变组织 MMP-9 mRNA 相对表达量为 0.379 ± 0.042 8。乳腺癌组织明显高于乳腺良性病变组织($P < 0.05$)。



M: DNA 标记物;1~2:乳腺纤维腺瘤组织;3~5:乳腺癌组织。

图 3 乳腺癌组织及乳腺纤维腺瘤组织中 MMP-9 mRNA 扩增电泳图

2.3 MMP-9 mRNA 在乳腺癌组织中的表达及其与临床病理特征的关系 MMP-9 在肿瘤组织中的表达与肿瘤分期和淋巴结转移呈正相关($P < 0.05$)。分析发现,MMP-9 蛋白表达高的病例,MMP-9 mRNA 表达也较高。

3 讨 论

基质金属蛋白酶类(MMPs)是与肿瘤侵袭有关的最重要蛋白酶,主要是使 ECM 降解,使 ECM 维持平衡;且在重构组织,肿瘤形成和调控炎症等各种生理与病理中起到重要的作用^[4-5]。其产生来源一般是纤维母细胞、巨噬细胞和肿瘤细胞。MMPs 通过降解 ECM 为肿瘤细胞提供转移的通道^[6];还可加快血管生长速度,使肿瘤细胞的基膜与 ECM 得到降解。MMPs 的存在能促进肿瘤发展、侵袭、转移,尤其是对恶性肿

瘤起到重要的作用。MMP-9 是 MMPs 家族中最重要的酶类,MMP-9 的表达能在乳腺上皮组织中检测出来^[7],并且能将 ECM 与基膜降解,进而使癌细胞能进入其他组织,使其运动能力增强^[8]。本研究显示,MMP-9 蛋白在乳腺癌组织中阳性表达率高于乳腺良性病变组织($P < 0.05$);无淋巴结转移组 MMP-9 蛋白阳性表达率明显低于淋巴结转移组($P < 0.05$),说明 MMP-9 的表达与淋巴结转移相关,与国内学者钟华等^[9]在胃癌中的研究结果一致。

本实验还采用半定量 RT-PCR 法检测 MMP-9 mRNA 的水平,结果发现 MMP-9 mRNA 的平均表达水平与淋巴结转移显著相关,有淋巴结转移组高于无转移组($P < 0.05$);而国内学者王福玲等^[10]研究表明 MMP-9 mRNA 在卵巢癌组织中均有较高表达,在正常卵巢组织中均低表达,且与淋巴结转移相关,本实验与该报道的结果具有一致性。

综上所述,MMP-9 在乳腺癌中的表达量可将乳腺癌中淋巴结发生转移的情况反映出来;还能用于乳腺癌发生、侵袭和转移情况的监测;在治疗乳腺癌时,以 MMP-9 作为靶点,可使乳腺癌细胞的侵袭与转移能力降低。另外,有研究发现利用某些化学制剂或分子生物学技术能增强基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)的活性或降低 MMP-9 的活性,可在一定程度上抑制肿瘤细胞的浸润和转移^[11-12],这为今后进一步研究提供了指导方向。

参考文献

- [1] Northington L, Martin T, Walker JT, et al. Integrated community education model: breast health awareness to impact late-stage breast Cancer[J]. Clin J Oncol Nurs, 2011, 15(4): 387-392.
- [2] Giuliano AE, Hawes D, Ballman KV, et al. Association of occult metastases in sentinel lymph nodes and bone marrow with survival among women with Early-Stage invasive breast Cancer[J]. JAMA, 2011, 306(4): 385-393.
- [3] Cheng XY, Hung MC. Breast Cancer brain metastases[J]. Cancer Metastasis Rev, 2007, 26(3/4): 635-643.
- [4] Ketelhuth DF, Bäck M. The role of matrix metalloproteinases in atherothrombosis[J]. Curr Atheroscler Rep, 2011, 13(2): 162-169.
- [5] Li X, Wu JF. Recent developments in patent anti-cancer agents targeting the matrix metalloproteinases (MMPs) [J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2010, 5(2): 109-141.
- [6] Bisson C, Blacher S, Polette M, et al. Restricted expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase by myofibroblasts adjacent to human breast Cancer cells[J]. Int J Cancer, 2003, 105(1): 7-13.
- [7] Akkoc A, Inan S, Sonmez G. Matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and steroid receptor expressions in feline mammary tumors[J]. Biotech Histochem, 2012, 87(4): 312-319.
- [8] Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in Cancer progression and their pharmacological targeting[J]. FEBS J, 2011, 278(1): 16-27.
- [9] 钟华, 廖爱军, 刘迪群. MMP-2、MMP-9 与胃癌侵袭、转移的关系[J]. 实用临床医学, 2012, 13(2): 3-4.
- [10] 王福玲, 娄艳辉, 杨兴升, 等. EGFR 及 MMP-9 在上皮性卵巢癌组织中的表达及其与预后的关系[J]. 现代妇产科进展, 2011, 20(9): 689-692.
- [11] Liu J, Yang YF, Fu XL, et al. Significance of TIMP-1 and nm-23 expressions in HER-2-positive breast Cancer[J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2012, 34(8): 600-604.
- [12] 刘琦, 李刚, 曹培成, 等. MMP-2、MMP-9、TIMP-1 和 TIMP-2 在脑胶质瘤中的表达及临床意义[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2011, 3(2): 86-89.