

前列腺癌组织中 RECK 的表达及其与 MMP-9 的关系

徐振宇¹, 高建平¹, 孙颖浩^{2*}, 张征宇¹, 葛京平¹, 许传亮², 王林辉²

(1. 南京军区南京总医院泌尿外科, 南京 210002; 2. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**观察前列腺癌组织 RECK 基因及基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达,探讨前列腺癌发生中 RECK 基因的可能作用机制。**方法:**取 20 例前列腺癌及 12 例正常前列腺组织,RT-PCR 及 real-time RT-PCR 检测 RECK 基因表达,RT-PCR 法检测 MMP-9 的表达,Western 印迹法检测 RECK 蛋白表达。**结果:**RT-PCR 及 real-time RT-PCR 检测发现前列腺癌组织 RECK 基因表达明显低于正常组织($P < 0.01$),而 MMP-9 mRNA 表达明显高于正常组织($P < 0.01$)。Western 印迹分析见前列腺癌组织中 RECK 蛋白的表达明显低于正常组织($P < 0.01$)。**结论:**前列腺癌组织中 RECK 基因表达较低,RECK 基因可能通过抑制前列腺组织 MMP-9 表达发挥抑癌作用。

[关键词] 前列腺肿瘤;RECK 基因;基质金属蛋白酶类;肿瘤转移

[中图分类号] R 737.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)04-0396-03

Expression of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs and its relationship with matrix metalloproteinase-9 in prostate carcinoma tissues

XU Zhen-Yu¹, GAO Jian-ping¹, SUN Ying-hao^{2*}, ZHANG Zheng-yu¹, GE Jing-ping¹, XU Chuan-liang², WANG Lin-hui²

(1. Department of Urology, Nanjing General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Nanjing 210002, China; 2. Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the expression of the reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) and matrix metalloproteinase-9(MMP-9) in the prostate carcinoma tissues and to evaluate the role of RECK in the tumorigenesis of prostate carcinoma. **Methods:** Twenty specimens of prostate cancer and 12 specimens of normal prostate were harvested. RT-PCR and real-time RT-PCR were used to determine the expression of RECK mRNA and RT-PCR was used to determine the expression of MMP-9 mRNA in the specimens. Western blotting analysis was used to determine the expression of RECK protein. **Results:** It was found that the expression of RECK mRNA in the prostate carcinoma tissues was lower than that in the normal prostate tissues ($P < 0.01$); MMP-9 expression in the prostate carcinoma tissues was significantly higher than that of the normal prostate tissues ($P < 0.01$). Western blotting analysis showed that the expression of RECK protein in the carcinoma tissues was lower than that in the normal prostate tissue ($P < 0.01$). **Conclusion:** RECK gene expression is lower in the prostate carcinoma tissues; RECK may inhibit the progression and metastasis of cancer through inhibiting MMP-9 expression.

[KEY WORDS] prostatic neoplasms; RECK gene; matrix metalloproteinases; neoplasm metastasis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(4): 396-398]

以往研究^[1]表明,RECK(reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs)基因在肝癌、胰腺癌、乳腺癌中的表达与肿瘤的侵袭力明显呈负相关,RECK 基因表达高的患者其预后往往较好,分析其可能是通过调节基质金属蛋白酶从而起到抑癌作用。然而,RECK 基因与前列腺癌的关系鲜有报道,本研究在前期工作^[2]的基础上,进一步观察前列腺癌组织及正常前列腺组织中 RECK 基因及基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达差异,探讨 RECK 基因在前列腺癌发生、发展过程中可能的作用。

1 材料和方法

1.1 标本来源 前列腺癌组织 20 例,来源于 2000

年 4 月至 2004 年 2 月第二军医大学长海医院行前列腺癌根治手术的切除标本,年龄 56~76 岁,平均(65±8)岁,术后均经病理确诊,均保存有完整的患者临床及病理资料。同期取正常前列腺组织 12 例。所有标本均在离体 30 min 内迅速投入液氮中保存。

1.2 RT-PCR 检测 RECK 基因及 MMP-9 mRNA 的表达 用 TRIzol 一步法抽提总 RNA,并用 1%琼

[基金项目] 国家自然科学基金(30225046)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30225046)。

[作者简介] 徐振宇,博士,主治医师。

* Corresponding author. E-mail: sunyinghao@medmail.com.cn

脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的质量。引物设计参照国际互联网 cDNA 文库,由上海生工生物工程公司合成。RECK(477 bp):5'-CCT CAG TGA GCA CAG TTC AGA-3' (上游), 5'-GCA GCA CAC ACA CTG CTG TA-3' (下游);MMP-9: (505 bp):5'-GGG ACG GCA ATG CTG ATG-3' (上游),5'-AGG GCG AGG ACC ATA GAG G-3' (下游);GAPDH(346 bp):5'-CCC ATC ACC ATC TTC CAG-3' (上游), 5'-CAG TCT TCT GGG TGG CAG T-3' (下游)。PCR 条件:起始:94℃,5 min;变性:94℃,30 s;退火:55℃,30 s;循环 30 次;延伸:72℃,1 min。2%琼脂糖凝胶电泳后,采用生物图像分析仪检测密度。

1.3 Real-time PCR 法检测组织中 RECK 基因 mRNA 的表达 RECK 基因引物由 TaKaRa 公司合成,RECK 基因:5'-CCG TCG GAG TCC TCT CAG AG-3' (上游), 5'-GCA CAT AAT GGG CAA CAA GCA-3' (下游), FAM:5'-CCG TCG CCG AGT GTG CTT CTG TCA-3'; GAPDH 基因引物由上海基康公司合成,GAPDH 基因:5'-CCA TCA ATG ACC CCT TCA TTC-3' (上游), 5'-CAT GGG TGG AAT CAT ATT GG-3' (下游), FAM:5'-CCT CAA CTA CAT GGT TTA C-3'。反应体系:25 μ l 体系包括:H₂O 16.1 μ l,10 \times buffer 2.5 μ l,MgCl₂ 3 μ l,dNTP 0.5 μ l,引物(+) 0.5 μ l,引物(-) 0.5 μ l,探针 0.5 μ l,匹基公司 Taq 酶 0.4 μ l,cDNA 1 μ l。反应条件:92℃、2 min,92℃、15 s,60℃、1 min,40 个循环后,40℃、5 s。数据分析由 LightCycler™ 分析软件自动进行,靶基因相对量由以下公式算出:靶基因 = $2^{-\Delta\Delta CT}$,其中 $\Delta\Delta CT$ 为靶基因的 CT 值与同一标本的管家基因 CT 值的差值。

1.4 Western 印迹法检测组织中 RECK 蛋白表达 应用 RIPA 裂解液裂解组织,应用分光光度计测定总蛋白浓度 SDS-PAGE 凝胶电泳(90 V,2 h),电转仪电转(300 mA,1.5 h,4℃)。将硝酸纤维素薄膜与适当稀释的第一抗体(1:250)室温下反应 2 h,再与适当稀释(1:50)的辣根过氧化物酶标记的二抗室温下反应 1 h,加入 DAB 底物溶液,显色 5~10 min,出现棕色带者为阳性,用自来水冲洗以终止反应。

1.5 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用成组 *t* 检验,用统计软件 SPSS11.0 进行统计分析, $P < 0.05$ 认为有统计学差异。

2 结果

2.1 癌组织及正常组织中 RECK 基因的表达 RT-PCR检测(图 1),癌组织 RECK 基因表达量为 0.44 ± 0.10 ,明显低于正常组织(1.17 ± 0.13 , $P < 0.01$),而 Real-time RT-PCR 检测结果类似(0.38 ± 0.07 vs 1.25 ± 0.11 , $P < 0.01$)。结果均显示癌组织中 RECK 基因表达低于正常组织($P < 0.01$)。

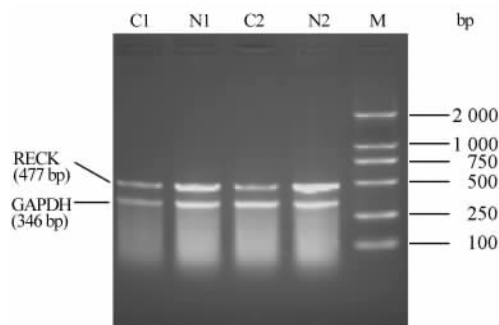


图 1 癌组织及正常组织中 RECK 基因的表达(RT-PCR)

Fig 1 Expression of RECK gene in prostate carcinoma and normal prostate tissues(RT-PCR)

M: Marker;C: Carcinoma tissues; N: Normal prostate tissues

2.2 癌组织及正常组织中 MMP-9 基因的表达 RT-PCR(图 2)结果表明,癌组织 MMP-9 基因表达量(0.46 ± 0.10)明显高于正常组织(0.22 ± 0.04 , $P < 0.01$)。

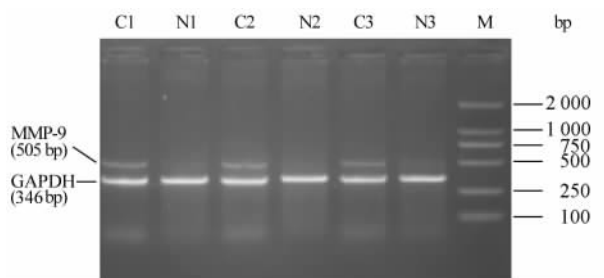


图 2 癌组织及正常组织中 MMP-9 的表达(RT-PCR)

Fig 2 Expression of MMP-9 in prostate carcinoma tissue and normal prostate tissues(RT-PCR)

M: Marker;C: Carcinoma tissues; N: Normal prostate tissues

2.3 癌组织及正常组织中 RECK 蛋白的表达 Western印迹(图 3)结果表明,癌组织 RECK 蛋白表达量为 29.3 ± 6.64 ,明显低于正常组织(89.3 ± 10.57 , $P < 0.01$)。

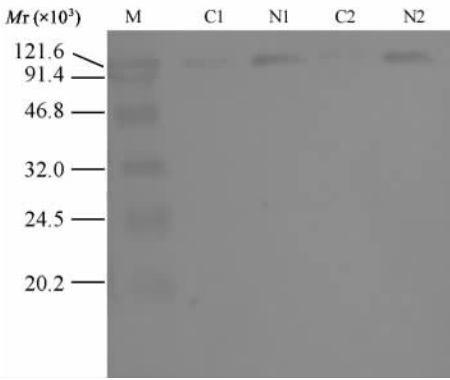


图3 RECK蛋白在肿瘤及正常组织中的表达
Fig 3 Expression of RECK protein in prostate carcinoma tissues and normal prostate tissues

M: Marker; C: Carcinoma tissues; N: Normal prostate tissues

3 讨论

RECK 基因是近来发现的一种新的基因^[1],其定位于 9p13-p12,编码 971 个氨基酸的膜表面糖蛋白,其相对分子量为 110×10^3 ^[1]。研究^[3-4]表明 RECK 基因在多种正常人体组织及细胞株中均有表达,但在肿瘤组织中低表达或不表达,分析其可能具有肿瘤抑制作用,但其具体作用机制尚不明确。

目前研究^[5-6]认为 RECK 基因在转录后水平抑制至少 3 种 MMP(MMP-2、MMP-9、MT1-MMP)的表达,进而抑制肿瘤血管的形成及转移。Takahashi 等^[5]发现,正常人纤维细胞系 MRC-5 中 RECK 基因高表达,而在纤维肉瘤转化的细胞系 HT1080 中,RECK 基因表达很低。进一步研究^[6]发现将 RECK 基因转移到肿瘤细胞(如 HT1080 纤维肉瘤细胞株或 B16 黑色素瘤细胞株)后,其侵袭及转移能力明显受到抑制。研究结果均提示 RECK 基因可能是一种抑癌基因,对肿瘤侵袭及转移具有明显的负向调控作用。

RECK 基因与胰腺癌、肝癌等肿瘤的研究已有不少报道。Masui 等^[7]发现,RECK 基因在胰腺癌中表达较低,而 RECK 基因高表达患者的长期生存率较长。相关研究还表明,RECK 的表达量与 MMP-2 的激活程度成反比,分析 RECK 基因可能通过抑制 MMP-2 活性从而抑制胰腺癌的侵袭力。Furumoto 等^[8]研究了 RECK 基因的表达与肝癌患者预后的关系,发现 RECK mRNA 表达量高的患者预后较好,且 RECK mRNA 的表达与患者肿瘤侵袭性明显相关,认为 RECK mRNA 可作为一个新型的独立预测肝癌患者生存率的指标,判断肝癌患者预后。

本研究在上述研究及前期工作^[2]的基础上,进一步研究 RECK 基因与前列腺癌之间的关系。以往的研究^[9-10]已证实,MMP 与前列腺癌的发生、侵袭以及转移等过程关系密切,特别是 MMP-2 和 MMP-9 的表达升高与肿瘤远处转移和淋巴结侵袭密切相关。在前列腺癌动物模型(R3327 Dunning 肿瘤)中,应用 MMP 合成抑制剂 Ro 28-2653 可以减小肿瘤的体积,从而延长动物的生存时间^[11]。本研究发现,前列腺癌组织中 RECK mRNA 的表达以及 RECK 蛋白的表达均较正常前列腺组织明显降低($P < 0.01$);而 MMP-9 mRNA 表达水平较正常前列腺组织明显升高($P < 0.01$)。结果表明,前列腺癌的发生以及肿瘤的侵袭和转移可能与 RECK 基因低表达有关,RECK 基因可能通过抑制 MMP-9 的表达发挥抑癌作用。

[参考文献]

- [1] Sternlicht M D, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior[J]. Annu Rev Cell Dev Biol,2001,17:463-516.
- [2] 徐振宇,高建平,孙颖浩,等. 前列腺癌细胞株中 RECK 基因的表达及其与 MMP 的关系[J]. 第二军医大学学报,2005,26:1337-1339.
- [3] Egeblad M, Werb Z. New function for matrix metalloproteinases in cancer progression[J]. Nat Rev Cancer,2002,2:161-174.
- [4] Sternlicht M D, Bergers G. Matrix metalloproteinases as emerging targets in anticancer therapy: status and prospects [J]. Emerg Ther Targets,2000,4:609-633.
- [5] Takahashi C, Sheng Z, Horan T P, et al. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998,95:13221-13226.
- [6] Oh J, Takahashi R, Kondo S, et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis[J]. Cell, 2001,107:789-800.
- [7] Masui T, Doi R, Koshiba T, et al. RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis [J]. Clin Cancer Res,2003,9:1779-1784.
- [8] Furumoto K, Arii S, Mori A, et al. RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. Reverse-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs[J]. Hepatology,2001,33:189-195.
- [9] Wood M, Fudge K, Mohler J L. *In situ* hybridization studies of metalloproteinases 2 and 9 and TIMP-1 and TIMP-2 expression in human prostate cancer[J]. Clin Exp Metastasis,1997,15:246-258.
- [10] Stearns M, Stearns M E. Evidence for increased activated metalloproteinase 2 (MMP-2a) expression associated with human prostate cancer progression[J]. Oncol Res, 1996,8:69-75.
- [11] Mangoldt D, Sinn B, Lein M, et al. The novel synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases Ro 28-2653 induces apoptosis in Dunning tumor cells[J]. Apoptosis, 2002,7:217-220.

[收稿日期] 2006-11-03

[修回日期] 2007-03-02

[本文编辑] 贾泽军