

基质金属蛋白酶及其抑制剂与口腔鳞癌 颈淋巴结转移的关系

刘 刚 李金荣 李祖兵 陈新民

摘要 目的:探讨基质金属蛋白酶-2,9(MMP-2,9)和基质金属蛋白酶抑制剂-1,2(TIM P-1,2)在口腔鳞癌中的表达形式以及其活性与颈淋巴结转移的关系。方法:应用原位杂交法(in situ hybridization,ISH)检测30例口腔鳞癌组织,口腔鳞癌转移细胞系 GNM 和人舌鳞癌细胞系 TSCCa MMP-2,9和 TIM P-1,2的表达;应用胶质酶谱法(zomography)分析上述标本 MMP-2,9的活性以及应用体外侵袭实验检测两细胞系侵袭力的差异。结果:MMP-2,9和 TIM P-1,2 mRNA在肿瘤细胞和间质细胞均有表达;有转移鳞癌组织 MMP-2,9,以及 TIM P-1,2阳性率均高于无转移患者($P < 0.05$),GNM MMP-2,9阳性率高于 TSCCa;MMP-2,9活性在转移组明显高于未转移组($P < 0.05$);GNM条件培养上清液中 MMP-2,9活性以及体外侵袭力均高于 TSCCa。结论:MMP-2,9在口腔鳞癌转移中有重要作用,TIM P-1,2表达上升可能是肿瘤细胞与间质相互作用的结果。

关键词 口腔鳞癌 转移 基质金属蛋白酶 基质金属蛋白酶抑制剂

The Effects of MMPs and TIMPs on the Metastasis of Oral Squamous Cell Carcinoma to Neck Lymph Nodes

Liu Gang, Li Jinrong, Li Zubing, et al

College of Stomatology, Wuhan University

Abstract

Objective: This study is aim at investigating the relationship between the expression and activity of MMP-2,9, TIMP-1,2 and the metastasis of oral squamous cell carcinoma to neck lymph node. **Methods:** The expression of MMP-2,9, TIMP-1,2 in 30 oral squamous cell carcinoma, two oral squamous cell carcinoma cell lines GNM and TSCCa was detected by in situ hubridization; Zomography was performed to determined the activity of MMP-2,9 in cancer tissue and conditioned medium of GNM and TSCCa; Ability of invasion of GNM and TSCCa was measured with in vitro invasion assays. **Results:** Both tumor cells and stroma expressed both MMP-2,9 and TIMP-1,2; It was found that MMP-2,9, TIMP-1,2 had a higher expression in patients with neck lymph node metastasis than those without metastasis ($P < 0.05$), positive percentage of MMP-2,9 in GNM was higher than that in TSCCa; The MMP-2,9 in node-positive patients was more active than in node-negative ones ($P < 0.05$); GNM had more active MMP-2,9 and higher invasive potential than TSCCa. **Conclusion:** MMP-2,9 may play an important role in metastasis of oral squamous cell carcinoma; Elevation of TIMP-1,2 is likely to be the result of interaction of tumor and stroma.

Key words: oral squamous cell carcinoma metastasis matrix metalloproteinases tissue inhibitor of MMPs

侵袭和转移是恶性肿瘤的主要生物学特征之一。癌细胞要形成转移灶首先必须穿越基底膜(basement membrane, BM)及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)屏障, BM和ECM成份的降解依赖癌细

胞分泌和诱导间质细胞分泌一系列蛋白水解酶来完成。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是其中最重要的一类。它的活性受到体内天然抑制剂(tissue inhibitions of MMPs, TIMPs)的调节。许多研究^{1,2}表明MMPs和TIMPs之间的平衡破坏是BM和ECM降解的主要原因,但MMPs和TIMPs的表达形式及其活性与转移的关系还远未达

本课题为湖北省自然科学基金资助项目(编号 95129)

作者单位:430079 武汉大学口腔医学院

成共识,另外,MMPs及TIMPs在口腔鳞癌淋巴结转移中起的作用还极少见报道。本文研究的目的在于探讨口腔鳞癌中MMP-2,9及TIMP-1,2的表达形式及其活性与颈淋巴结转移的关系。

1 材料和方法

1.1 研究对象

30例口腔鳞癌标本来自1997年4月至1998年11月湖北医科大学口腔医学院手术患者,其中男性21例,女性9例,年龄29~65岁,平均年龄48.6岁。口腔鳞癌转移癌细胞系GNM及TSCCa均由湖北医科大学口腔医学院建立,两细胞系分别来源于两口腔鳞癌患者,细胞常规培养在RPMI+15%小牛血清的培养液中。

1.2 口腔鳞癌组织及癌细胞系MMP-2,9,TIMP-1,2 cDNA探针原位杂交

口腔鳞癌标本冰冻切片(5 μm);两细胞系消化形成单细胞悬液,离心,PBS洗两次,涂片,空气自然干燥;将切片和涂片置于4%多聚甲醛液中固定30 min,PBS洗10 min ×2次,0.2 mol/L HCl 10 min,0.3% TritonX-100 15 min,0.2%甘氨酸 PBS洗10 min ×2次,1 μg/ml 蛋白酶K消化30 min,4%多聚甲醛5 min,PBS2 ×5 min,4 ×SSC含50%去离子甲酰胺37 预杂交20 min,将地高辛标记之MMP-2,9,TIMP-1,2 cDNA探针(北京医科大学病理系提供)预变性后分别加入杂交液中,42 杂交15 h后,于2 ×SSC,1 ×SSC,0.1 ×SSC中分别洗涤2 ×15 min,2 ×15 min,2 ×30min,利用抗地高辛单抗及免疫组化SABC试剂盒(均购自武汉博士得公司)检测阳性信号,DAB显色。以省略探针的杂交反应作为阴性对照。

杂交结果评判:在高倍镜下按肿瘤细胞和间质细胞胞浆内棕黄色着色强度和着色细胞的百分数来评分。0无染色;1着色细胞少于20%,着色弱;2着色细胞多于20%,着色弱或着色细胞少于20%,着色强;3着色细胞多于20%,着色强。0和1认为是(-),2和3为(+);涂片计数阳性细胞百分数。

1.3 鳞癌组织及癌细胞培养上清液中MMP-2,9的胶原酶谱分析³

癌组织于样品缓冲液中匀浆(每毫克组织5 μl 缓冲液,每个样品取10 μl)以及两细胞系条件培养液各5 μl于含有1 mg/ml的明胶底物的聚丙烯酰胺凝胶中电泳,泳毕,置于孵育液中孵育24 h激活MMP-2,9,0.1%考马斯亮蓝染色,脱色至合适,凝胶蓝色背景中的透亮带面积代表MMP-2,9的相对活性,利用IBAS2000型图像分析仪测量各样品的透亮带面积。

1.4 GNM及TSCCa细胞系体外侵袭能力的比较

Boyden小室下室为NIH3T3细胞培养上清,作为趋化因

子,上下室间隔预铺了人工基底膜胶(Matrigel)的硝化纤维滤膜,将两细胞各2 ×10⁵个细胞加入上室,于37 5%CO₂条件下培养过夜,收集穿过Matrigel进入下室的癌细胞并计数,重复3次。

1.5 统计方法

采用四格表确切概率法,²检验和t检验。

2 结 果

2.1 MMP-2,9及TIMP-1,2基因原位杂交阳性结果

MMP-2,9及TIMP-1,2基因原位杂交阳性反应均位于细胞浆,呈棕黄色着色,癌巢中肿瘤细胞及肿瘤间质细胞均见阳性表达(图1,2);MMP-2,9表达形式相似,肿瘤细胞阳性表达比率较高而间质细胞较少,TIMP-1,2间质细胞阳性表达较肿瘤细胞高;30例标本MMP-2,9,TIMP-1,2表达阳性率均高于无转移组(P<0.05)(表1);MMP-2和TIMP-2以及MMP-9和TIMP-1的表达结果关系密切。GNM细胞MMP-2,9阳性率分别为23%及85%,而TSCCa MMP-2,9阳性率分别为77%和0,两细胞系TIMP-1,2均只见微弱表达。

表1 口腔鳞癌组织MMP-2,9,TIMP-1,2表达与转移的关系

	无转移组		有转移组	
	+	-	+	-
MMP-2	7	14	7	2*
MMP-9	9	12	6	3*
TIMP-1	9	12	6	3*
TIMP-2	8	13	9	1*

* 转移组和非转移组比较 P<0.05

2.2 胶原酶谱法结果

所有肿瘤标本均可见72 kD和92 kD两条透亮带(图3),分别为MMP-2和MMP-9。图像分析表明:转移组MMP-2,9的平均面积为21.3 cm²和8.1 cm²,而无转移组两者分别为14.3 cm²和3.9 cm²,转移组MMP-2,9活性高于未转移组(P<0.05),两组MMP-2活性均高于MMP-9。GNM,MMP-2,9面积为32.4 cm²和11.5 cm²,而TSCCa分别为23.4 cm²和0。

2.3 GNM及TSCCa细胞穿过Matrigel进入下室情况

GNM及TSCCa细胞穿过Matrigel进入下室数分别为580 ±35.7和343 ±41.6个,前者显著高于

后者 ($P < 0.05$)。



图1 口腔鳞癌组织 MMP-2 mRNA 阳性表达, 主要以肿瘤细胞表达为主 原位杂交 $\times 200$

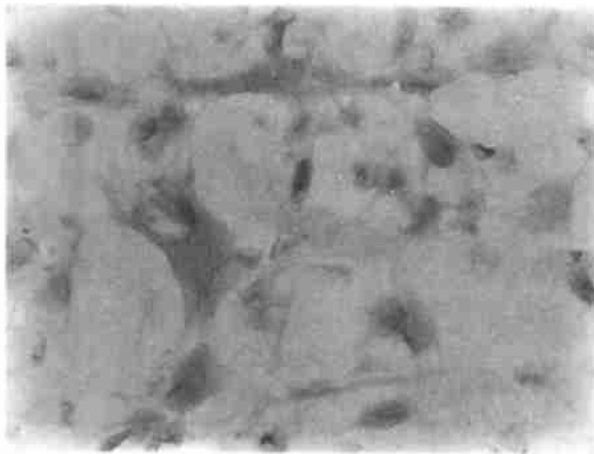


图2 口腔鳞癌组织 TIMP-1 mRNA 阳性表达 原位杂交 $\times 100$

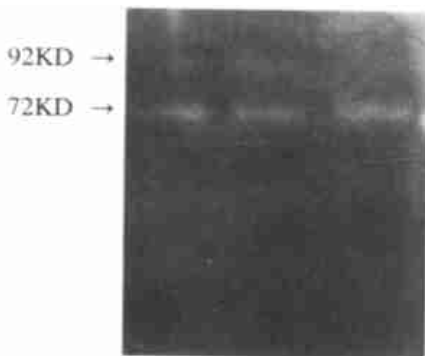


图3 口腔鳞癌组织中 MMP-2,9 蛋白酶电泳结果,胶蓝色背景中可见两条带,根据标准品对照,分别为 72 kD 的 MMP-2 和 92 kD 的 MMP-9

3 讨 论

BM 和 ECM 成份的降解是恶性肿瘤侵袭和转移所必须的步骤。BM 和 ECM 主要由 型胶原,层粘连蛋白和纤连蛋白等构成,它们的降解需要一系列蛋白水解酶来完成。MMPs 是其中最重要的一

类,它是一种锌离子依赖性酶,在许多生理和病理性基质改建中起决定性作用。目前已发现了 14 种 MMPs,其中分子量为 72 kD 的 MMP-2 和 92 kD 的 MMP-9 几乎能降解所有的基底膜成份,被大多数学者认为与肿瘤的侵袭和转移密切相关。Kusukawa 等⁴ 应用免疫组化证实在口腔癌中,有颈淋巴结转移的病例 MMP-2 表达高于无转移患者;Iwata 等⁵ 的实验也表明 MMP-9 表达在有淋巴结转移的乳腺癌病例中远高于无淋巴结转移的患者。笔者利用原位杂交证实,有颈淋巴结转移的口腔鳞癌患者,其 MMP-2,9 mRNA 的表达均高于无转移组,这说明了 MMP-2,9 的确促进了转移的发生;另外,由转移癌建立的癌细胞系 GNM 其 MMP-2,9 mRNA 阳性率也高于由原发灶建立的细胞系 TSCCa,转移癌细胞系中能分泌 MMP-2,9 的细胞较多,这也从另一方面提示 MMP-2,9 在转移中的作用。

MMP-2,9 mRNA 及其蛋白表达上升并不一定意味着转移潜能的增加,因为 MMP-2,9 除了受到转录水平调节外,还受到酶活性激活和其天然抑制剂 TIMP 数量的影响。MMP-2,9 是以酶原形式分泌,需要激活才能真正发挥降解 BM 成份的功能,胶质酶谱分析法可检测到 MMP-2,9 的活性。本实验应用 Zymography 分析表明在有转移口腔鳞癌组织中 MMP-2,9 的活性也是高于无转移组,原因可能是 MMP-2,9 mRNA 表达上升,也可能是激活因子增加所致;两细胞系穿越 Matrigel 时也需依赖 MMP-2,9 的活性,因为 Matrigel 是一种基底膜类似物,GNM MMP-2,9 活性高于 TSCCa 有助于解释 GNM 体外侵袭能力更强的原因。Chirivi 等⁶ 应用人工合成的 MMPs 活性抑制剂处理高转移鼠恶性黑色素瘤 B16-BL6 后,其体内转移能力大大下降,充分说明了 MMP-2,9 活性在转移中的重要性。

TIMP-1,2 分别是 MMP-2,9 的天然抑制剂,很多实验证实,TIMP-1,2 调控 MMP-2,9 的活性而在肿瘤转移中起抑制作用,转染 TIMP-1,2 基因入高转移人胃癌等细胞会降低转移潜能⁷。这样看来,似乎有转移的 TIMP-1,2 的表达可能低于无转移患者,但笔者的实验却表明有转移的病例 TIMP-1,2 mRNA 表达水平均高于无转移患者,好象与 TIMP-1,2 的功能相矛盾。Chambers 等⁸ 指出,在基质降解过程中并不一定会出现那种简单的 TIMPs 下降

一定困难,因此未能在根尖周疾病的治疗中广泛应用。今后如能将其制成可直接放入根管的剂型,进一步提高药物有效作用时间,将为根管治疗提供一种全新的治疗方法。

3.2 内毒素的降解机制

细菌内毒素脂多糖 (bacterial endotoxin lipopolysaccharides, LPS) 由多糖和类脂 A 两大部分组成,类脂 A (lipid A) 是 LPS 的内毒素活性中心,而类脂 A 的脂肪酸是内毒素的毒性基础,若其结构被水解,类脂 A 即失去多种毒性⁴。内毒素的化学降解主要有酸和碱的水解、酰化、酯化、羟基化和氧化还原作用。甲醛甲酚为强还原剂和蛋白凝固剂,可通过皂化反应和加成作用破坏脂肪酸,这种对蛋白质和脂类的双重破坏作用可能是其降解内毒素的基础⁵。樟脑酚亦是酚醛类药物,作用机制与甲醛甲酚基本相同⁴。甲硝唑是 WHO 规定的专性抗厌氧菌首选药物,作用机制主要是抑制杀灭革兰氏阴性

细菌,使内毒素的产生源泉中断,对内毒素有无直接降解作用尚无报道。

参考文献

- 1 Horiba N, Maekawa YM, Abe YH, et al. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1991, 71 (4) :492 ~ 495
- 2 Magnusson BO. Therapeutic pulpotomies in primary molars with the formocresol technique. *Acta Odontol Scand*, 1978, 36 (3) : 157 ~ 165
- 3 薛毅,史俊南,许丽华,等. 甲醛甲酚半抗原性分析. *现代口腔医学杂志*, 1990, 4 (增刊) :245 ~ 246
- 4 荫俊,史俊南,胡冠财,等. 根管药物对细菌内毒素、解毒作用的研究. *实用口腔医学杂志*, 1990, 6 (增刊) :240 ~ 241
- 5 Niwa M, Milner KC, Ribi E. Alteration of physical chemical and biological properties of endotoxin by treatment with mild alkali. *J Bacteriol*, 1969, 97 (3) :1069 ~ 1077

(1999-09-13 收稿, 2001-03-15 修回)

(本文编辑 王 晴)

(上接第 218 页)

而 MMPs 活性上升的现象, TIMP-1, 2 的高表达可能是 MMP-2, 9 表达上升诱导的结果。本实验应用 ISH 发现 TIMP-1, 2 多由肿瘤间质细胞产生。这提示了基质降解过程是肿瘤细胞和间质细胞相互作用的结果。另外, GNM 和 TSCCa TIMP-1, 2 仅有微弱表达也能说明一定问题。

MMPs 活性增高是导致 BM 和 ECM 降解的主要原因,因此,寻找高效特异的 MMPs 活性抑制剂会成为转移抑制研究的一个热点。

参考文献

- 1 Sutinen M, Kainulainen T, Hurskainen T, et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 and -2) and their inhibitors (TIMP-1, -2 and -3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis. *Br J Cancer*, 1998, 77 (12) :2239 ~ 2245
- 2 Ko BK, Cho HR, Choi DW, et al. Reduced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase in nodal metastasis of stomach cancer. *J Korean Med Sci*, 1998, 13 (3) :286 ~ 290
- 3 Tokuraku M, Sato H, Murakami S, et al. Activation of the precursor of gelatinase A/72kD type collagenase/MMP-2 in lung

carcinoma correlates with the expression of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) and with lymph node metastasis. *Int J Cancer*, 1995, 64 (5) :355 ~ 359

- 4 Kusakawa J, Sasaguri Y, Shima I, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 related to lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol*, 1993, 99 (1) :18 ~ 23
- 5 Iwata H, Kobayashi S, Okada H, et al. Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human breast carcinoma. *Jpn J Cancer Res*, 1996, 87 (6) :602 ~ 610
- 6 Chirivi RGS, Garofalo A, Crimmin MJ, et al. Inhibition of the metastatic spread and growth of B16-BL6 murin melanoma by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Int J Cancer*, 1994, 58 (3) :460 ~ 464
- 7 Watanabe M, Takahashi Y, Ohta T, et al. Inhibition of metastasis in human gastric cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 1 gene in nude mice. *Cancer*, 1996, 77 (8 suppl) :1676 ~ 1680
- 8 Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 1997, 89 (17) :1260 ~ 1270

(2000-04-12 收稿, 2001-04-13 修回)

(本文编辑 王 晴)