

[文章编号] 1000-1182(2006)01-0007-04

· 基础研究 ·

基质金属蛋白酶-2活性与成釉细胞瘤增殖生长关系的研究

张彬¹, 黄洪章¹, 陶谦², 刘习强¹, 魏菁¹

(1.中山大学附属第二医院 口腔颌面外科, 广东 广州 510120;

2.中山大学光华口腔医院 口腔颌面外科, 广东 广州 510055)

[摘要] 目的 探讨基质金属蛋白酶-2(MMP-2)活性与成釉细胞瘤增殖生长的关系及其在成釉细胞瘤侵袭中的作用。方法 通过MMP-2抑制剂Ro31-9790抑制MMP-2活性进行干预处理,采用成釉细胞瘤细胞原代培养、瘤组织块裸鼠肾包膜下移植、MTT、流式细胞术、瘤体积测量和组织学检查等方法,观察MMP-2活性与成釉细胞瘤增殖生长的关系。结果 实验各组之间在同一时间点的细胞增殖活性均无显著性差异($P>0.05$)。G0/G1、G2/M期细胞比率以及凋亡细胞比率不随Ro31-9790浓度增加而增加,S期细胞比率也不随Ro31-9790浓度增加而减少。Ro31-9790治疗组瘤体积明显小于对照组($P<0.05$),瘤体积增加也明显少于对照组($P<0.01$)。结论 Ro31-9790对成釉细胞瘤细胞的体外增殖活性无影响,但可抑制体内移植瘤的生长,MMP-2活性与成釉细胞瘤细胞的增殖活性无关,但与成釉细胞瘤的生长密切相关,可能是成釉细胞瘤局部侵袭的机制之一。

[关键词] 成釉细胞瘤; 基质金属蛋白酶; 细胞增殖

[中图分类号] R739.8 **[文献标识码]** A

Association of Matrix Metalloproteinase-2 Activity with Cell Proliferation and Growth in Ameloblastoma
ZHANG Bin¹, HUANG Hong-zhang¹, TAO Qian², LIU Xi-qiang¹, WEI Jing¹. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Guanghua College of Stomatology, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510055, China)

[Abstract] Objective To investigate the relationship between matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity and cell proliferation, growth and invasion of ameloblastoma. Methods The cells and xenograft of ameloblastoma were treated with MMP-2 inhibitor Ro31-9790 and the effects of Ro31-9790 on the cell proliferation and growth of ameloblastoma were observed. Primary culture in vitro, subcapsular kidney xenograft in vivo, MTT assay, flow cytometry, neoplastic volume measurement and histochemistry were employed to study the effects of cell proliferation and growth produced by Ro31-9790. Results There was no significant difference in cell proliferation at same interval among several groups ($P>0.05$). The ratio of G0/G1 stage, G2/M stage and apoptotic cells didn't increase following increased Ro31-9790, and the ratio of S stage cells also didn't reduce following increased Ro31-9790. The tumor volume and its increase in treatment group were significant less than those in control group. Conclusion Ro31-9790 does not influence proliferation of ameloblastoma cells in vitro, but it can effectively inhibit the ameloblastoma growth in vivo. MMP-2 activity has no relationship to proliferation of ameloblastoma cells, but it can contribute to the ameloblastoma growth and may be a reason of invasion in ameloblastoma.

[Key words] ameloblastoma; matrix metalloproteinase; cell proliferation

成釉细胞瘤(ameloblastoma, AM)是口腔颌面部较常见的具有局部侵袭性的良性颌骨肿瘤,临床上

易复发,可恶变,生物学行为独特。目前认为,肿瘤的增殖生长与侵袭密切相关。肿瘤生长过程中需要降解破坏周围正常组织及细胞外基质,同时肿瘤细胞快速增殖也需要新生肿瘤血管的形成提供营养,这些过程均需多种蛋白水解酶的参与。基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)具有降解细胞外基质和参与血管形成的调节等作

[收稿日期] 2005-02-21; [修回日期] 2005-05-16

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30471896); 广东省自然科学基金资助项目(04300340)

[作者简介] 张彬(1965-),男,江苏人,副教授,博士

[通讯作者] 张彬, Tel: 020-81332471

用,是在此过程中起重要作用的一种金属蛋白酶^[1-2]。目前有关MMP-2活性与成釉细胞瘤增殖生长关系的研究未见报道。本研究利用MMP-2活性抑制的方法研究MMP-2活性改变对成釉细胞瘤体内外增殖生长的影响,探讨MMP-2活性与成釉细胞瘤增殖生长的关系及其在成釉细胞瘤侵袭中的作用。

1 材料和方法

1.1 成釉细胞瘤组织来源

成釉细胞瘤组织来源于1例33岁男性患者位于右颞下凹的成釉细胞瘤,该患者曾因右下颌骨成釉细胞瘤在外院两次手术后复发而入院。术后病理切片由2名病理医师读片,病理报告均证实为丛状型成釉细胞瘤。流式细胞术证实MMP-2蛋白高表达。

1.2 体外细胞实验

1.2.1 细胞培养、鉴定 取上述成釉细胞瘤新鲜组织进行原代培养及纯化^[3],选取第2代成釉细胞瘤细胞进行实验。另外,以MMP-2低表达的成釉细胞瘤原代培养第2代细胞作为对照组(流式细胞仪检测)。LsAB免疫组化法鉴定细胞上皮来源(CK阳性,Vm阴性)后,备用。

1.2.2 MMP-2抑制剂处理和分组 MMP-2抑制剂采用Ro31-9790,可有效抑制MMP-2的活性^[4],由美国Roche公司惠赠。实验细胞培养时按培养液中加至不同浓度的Ro31-9790分为3组,即R5组(5 mg/L)、R10组(10 mg/L)和R0组(0 mg/L)。对照组细胞培养时按培养液中加至不同浓度的Ro31-9790分为2组,即RD10组(10 mg/L)和RD0组(0 mg/L)。

1.2.3 MTT法测定细胞增殖活力 5组成釉细胞瘤细胞均培养7 d,在培养的第1、3、5、7天行细胞增殖活性检测。

1.2.4 细胞DNA含量的双参数流式细胞仪检测 实验3组成釉细胞瘤细胞经Ro31-9790处理3 d后,行双参数流式细胞仪检测。基本步骤如下:收集培养的成釉细胞瘤单细胞悬液,细胞数不少于每毫升 1×10^6 个,70%乙醇固定,PBS漂洗后离心。常规碘化丙啶一步法染色,进行流式细胞仪 flow cytometry,

FCM)细胞周期分析,以人淋巴细胞作为内参考标准,变异系数小于5%。以下列公式计算增殖指数(proliferous index, PI)。

$$PI = \frac{(S+G2/M) - (G0/G1+S+G2/M)}{(S+G2/M)} \times 100\%$$

1.3 体内动物实验

1.3.1 实验动物及分组 BALB/c- nu/nu裸鼠10只,由中山大学实验动物中心提供和饲养,雌雄不限,鼠龄5周,体重18—22 g,饲养于恒温(25—27℃)、恒湿(45%—50%),符合SPF (specific- pathogen free)条件的裸鼠室内。笼具、垫料、饮水和食料均经灭菌处理后,按标准方式给予。裸鼠自由活动,自由进食。10只裸鼠分成2组,每组分别为5只。治疗组行Ro31-9790腹腔注射每天50 mg/kg,对照组每天行同样剂量的二甲基亚砷腹腔内注射,共30 d。

1.3.2 实验方法 新鲜无菌瘤体组织经过剪碎、漂洗后,约1 mm×1 mm×1 mm小组织块放入含10%胎牛血清的DMEM中,在4℃、90 min内,运送到实验动物中心备用。取水合氯醛麻醉的裸鼠,俯卧位固定,于背部平行于脊柱处作一小切口,将肾脏钩出体外,暴露肾包膜的近中线部位,将准备好的无菌瘤体组织以套管针作裸鼠双肾包膜下移植。移植完成后将小鼠置于解剖显微镜下,微测器测量移植物的两个相互垂直的直径。按公式 $V = \frac{1}{6} \times \text{长径} \times \text{短径}^2$ 计算体积。然后将肾脏送回,皮肤切口予以缝合。肾包膜下移植实验结束后第5天处死小鼠,再次测量肿瘤块的长径和短径,计算体积。瘤体组织常规切片,苏木精-伊红染色。

1.4 统计学处理

所有数据处理均采用SPSS10.0软件包在微机上进行。计量资料采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 细胞增殖活性

各组在7 d内不同时相细胞增殖活性的检测结果见表1。在同一时间点,实验的R0、R5和R10 3组之间细胞增殖活性均无显著性差异($P > 0.05$);对照的RD0和RD10组之间也未见显著性差异($P > 0.05$)。

表 1 各组成釉细胞瘤细胞增殖活性检测的光密度值 ($A_{492 \text{ nm}}$)

Tab 1 The optical densit of cell proliferation assay in 7 days in ameloblastoma cell ($A_{492 \text{ nm}}$)

时间	分 组				
	R0	R5	R10	RD0	RD10
第 1 天	0.244 ±0.017	0.232 ±0.041	0.250 ±0.061	0.236 ±0.034	0.253 ±0.067
第 3 天	0.272 ±0.058	0.234 ±0.049	0.312 ±0.085	0.266 ±0.057	0.277 ±0.028
第 5 天	0.684 ±0.071	0.610 ±0.024	0.580 ±0.075	0.652 ±0.097	0.607 ±0.029
第 7 天	0.720 ±0.072	0.642 ±0.087	0.681 ±0.068	0.641 ±0.090	0.680 ±0.081

2.2 细胞周期分析

在Ro31-9790处理的成釉细胞瘤细胞，未见G0/G1、G2/M期细胞比率随抑制剂浓度增加而增加，S期细胞比率也没有随抑制剂浓度增加而减少(表2)。另外Ro31-9790处理细胞的凋亡细胞比率没有随抑制剂浓度的增加而增加，增殖指数也没有随抑制剂浓度增加而增加。

表2 实验各组成釉细胞瘤细胞周期的分析(%)

Tab 2 Cell cycle assay by FCM in ameloblastoma cell(%)

分组	细胞周期各时相比率			凋亡细胞比率	增殖指数
	G0/G1	G2/M	S		
R0	89.44	8.45	2.11	0.95	10.56
R5	80.08	11.31	8.61	12.61	19.92
R10	89.99	8.79	1.22	0.12	11.01

2.3 MMP-2抑制剂对肾包膜下移植瘤生长的影响

镜下可见，治疗组肿瘤细胞排列相对稀疏，间质成分较多，玻璃样变多见(图1)。对照组肿瘤细胞排列较紧密，间质成分及玻璃样变相对较少(图2)。

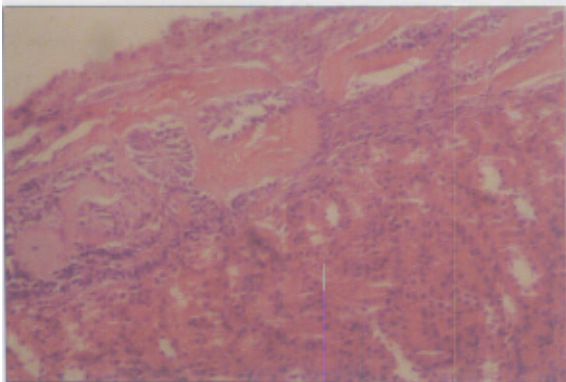


图1 治疗组，成釉细胞瘤肾包膜下移植瘤 HE ×100

Fig 1 Micrographs of subcapsular kidney xenograft ameloblastoma in treatment group HE ×100

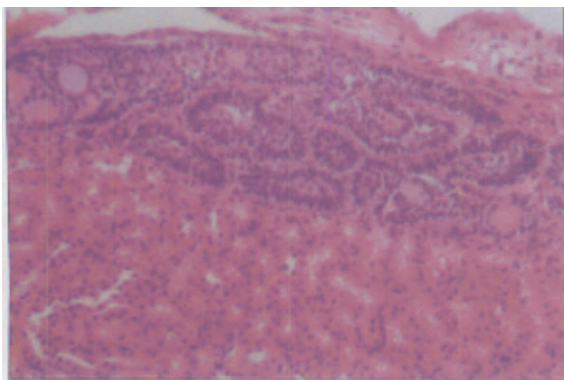


图2 对照组，成釉细胞瘤肾包膜下移植瘤 HE ×100

Fig 2 Micrographs of subcapsular kidney xenograft ameloblastoma in control group HE ×100

Ro31-9790对裸鼠肾包膜下成釉细胞瘤移植瘤生长的影响见表3,由表3可见,肿瘤移植体积在治疗

组与对照组无显著性差异($P>0.05$)。实验结束时, Ro31-9790治疗组瘤体积明显小于对照组($P<0.05$), 瘤体积增加也明显少于对照组($P<0.01$), 抑制率为69.9%。

表3 Ro31-9790对裸鼠肾包膜下成釉细胞瘤移植瘤生长的影响 $\text{mm}^3, \bar{x} \pm s$

Tab 3 Growth effects of Ro31-9790 on subcapsular kidney xenograft of ameloblastoma in nude mice ($\text{mm}^3, \bar{x} \pm s$)

分组	移植瘤体积	取材瘤体积	瘤体积增加
对照组	0.676 \pm 0.137	0.884 \pm 0.154	0.209 \pm 0.02
治疗组	0.686 \pm 0.122	0.747 \pm 0.130*	0.063 \pm 0.016**

注:治疗组与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$

3 讨论

一般认为,增殖活性是肿瘤侵袭的基础和前提。细胞增殖导致肿瘤细胞增多,组织内部产生扩张性压力,有利于肿瘤细胞向压力低的方向侵袭。本研究对成釉细胞瘤细胞增殖活性研究发现,在MMP-2活性抑制的情况下,体外培养成釉细胞瘤细胞生长良好,与正常培养的成釉细胞瘤细胞相似。与上述形态学研究结果相似,对体外细胞5—7 d培养检测发现,在MMP-2高表达的实验各组及MMP-2低表达的对照各组之间,MMP-2活性抑制对成釉细胞瘤细胞的增殖活性均无显著性影响。以上结果说明,一方面MMP-2活性与成釉细胞瘤细胞的增殖活性无关,另一方面MMP-2活性抑制剂Ro31-9790对成釉细胞瘤细胞的增殖活力无抑制作用。这与许多研究的结果相一致^[5-6]。

肿瘤细胞的增殖同样要经过细胞分裂的各个时相,即细胞周期。在细胞周期中,G0/G1、G2/M及S期是重要调控点,其中,G0/G1是细胞向S期过渡的阶段,G2/M是S期细胞完成了遗传物质的复制准备进入有丝分裂期的阶段,S期则是细胞遗传物质合成阶段。G0/G1期阻滞将使细胞进入S期减少,G2/M期阻滞可减少细胞进入M期,而S期减少将导致遗传物质的合成减少,这些情况的发生均可抑制肿瘤的增殖。本研究显示,MMP-2活性的抑制没有引起G0/G1、G2/M期细胞及凋亡细胞比率随抑制剂浓度增加而增加,S期细胞比率及增殖指数也没有随抑制剂浓度增加而减少,进一步说明MMP-2活性与成釉细胞瘤细胞的增殖活性无关。

肿瘤生长过程中需要降解破坏周围正常组织及细胞外基质,同时肿瘤细胞快速增殖也需要新生肿瘤血管的形成来提供营养,这些过程均需要多种蛋白水解酶的参与。MMP-2具有降解细胞外基质和参

与血管形成的调节等作用,是在此过程中起着重要作用的一种金属蛋白酶。研究证实^[6], MMP-2抑制剂可抑制体内肿瘤的生长。本研究发现, MMP-2抑制剂Ro31-9790治疗的移植瘤体积明显小于对照组,瘤体积的增加也明显少于对照组,说明Ro31-9790对成釉细胞瘤移植瘤的生长具有抑制作用, MMP-2活性与成釉细胞瘤的体内生长有关,继而也可能是成釉细胞瘤体内侵袭的机制之一。同时笔者注意到,体外研究显示, Ro31-9790对体外培养的成釉细胞瘤细胞本身的增殖活性无影响,因此推测, Ro31-9790对成釉细胞瘤移植瘤生长的抑制不是通过抑制成釉细胞瘤细胞增殖活性所致,主要与瘤体内MMP-2活性的抑制有关。肿瘤相关基质是一个不断重塑的动态结构, MMP-2抑制剂通过抑制其活性,封闭细胞外基质的降解通路,增加间质连接组织的合成。而肿瘤间质形成的增加可生理性地减少肿瘤细胞营养的获取,减慢肿瘤的生长。这在其他研究中也得到了证实^[7],如MMP-2抑制剂的无功能异构体不影响异种移植瘤的生长。本研究中也观察到, Ro31-9790实验组肿瘤细胞的排列相对稀疏,间质成分较多,玻璃变性多见,而对照组肿瘤细胞则排列较紧密,间质成分和玻璃变性相对较少,与正常未经处理的成釉细胞瘤移植瘤结果相似^[8]。因此笔者认为, Ro31-9790是通过抑制MMP-2的生物活性从而间接抑制成釉细胞瘤的体内生长,这可能是MMP-2活性与成釉细胞瘤体内生长有关的机制之一。

[参考文献

[1] Hufmann UB, Westphal JR, Van Kraats AA, et al. Expression of integrin $\alpha 5 \beta 3$ correlates with activation of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in human melanoma cells in vitro and in vivo[J]. *Int J Cancer*, 2000, 87(1): 12-19.

[2] Fang J, Shing Y, Wiederschain D, et al. Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(8): 3884-3889.

[3] 陶 谦, 黄洪章, 魏 菁. 成釉细胞瘤的体外培养和增殖动力学研究[J]. *口腔颌面外科杂志*, 2001, 1(4): 306-309. (TAO Qian, HUANG Hong-zhang, WEI Jing, et al. Cell culture in vitro of ameloblastoma and study of cell proliferative ability [J]. *Chinese J Oral Maxillofacial Surgery*, 2001, 1(4): 306-309.)

[4] 黄洪章, 张 彬, 陶 谦, 等. MMP-2抑制剂对成釉细胞瘤细胞体外侵袭的影响[J]. *中国口腔颌面外科杂志*, 2004, 2(4): 266-269. (HUANG Hong-zhang, ZHANG Bin, TAO Qian, et al. Effects of matrix metalloproteinase-2 inhibitor on the invasion of ameloblastoma cells in vitro[J]. *China J Oral Maxillofacial Surgery*, 2004, 2(4): 266-269.)

[5] Eccles SA, Box GM, Court WJ, et al. Control of lymphatic and hematogenous metastasis of a rat mammary carcinoma by the matrix metalloproteinase inhibitor Batimastat (BB94)[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(12): 2815-2822.

[6] 卜 文, 汤钊猷, 刘康达, 等. 基质金属蛋白酶抑制剂BB-94对肝癌生长和侵袭转移的影响及其机理研究[J]. *中华实验外科杂志*, 1999, 16(3): 268-269. (BU Wen, TANG Zhao-you, LIU Kang-da, et al. Effects of matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 on the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma and their mechanisms[J]. *Chin J Exp Surg*, 1999, 16(3): 268-269.)

[7] Davies B, Brown PD, East N, et al. A synthetic matrix metalloproteinase inhibitor decreases tumor burden and prolongs survival of mice bearing human ovarian carcinoma xenografts[J]. *Cancer Res*, 1993, 53(9): 2087-2091.

[8] 张 彬, 黄洪章, 陶 谦, 等. 人成釉细胞瘤裸鼠移植瘤的建立及其生物学特性研究[J]. *中国口腔颌面外科杂志*, 2004, 2(4): 270-273. (ZHANG Bin, HUANG Hong-zhang, TAO Qian, et al. Establishment and biological behavior of human ameloblastoma xenograft in nude mice[J]. *China J Oral Maxillofacial Surgery*, 2004, 2(4): 270-273.)

(本文编辑 汤亚玲)

《华西口腔医学杂志》被美国化学文摘(CA)数据库收录

美国化学文摘数据库(chemical abstracts),简称CA数据库,创刊于1907年,由美国化学文摘服务社(CAS)编辑出版。每年收录文献量50万,是涉及学科领域最广、收集文献类型最全、提供检索途径最多、部卷也最为庞大的一部著名的世界性检索工具。《华西口腔医学杂志》自2005年8月起被CA数据库收录,是目前被其收录的少数中文口腔专业期刊之一。