

· 临床研究 ·

MMP-14 mRNA 在胃腺癌中的表达及意义*

刘爱东¹, 李青², 要瑞莉¹, 闫永刚³

(1. 唐山职业技术学院病理教研室, 河北唐山 063000; 2. 唐山职业技术学院实验中心, 河北唐山 063000; 3. 唐山钢铁集团有限责任公司医院外科, 河北唐山 063000)

摘要:目的 探讨基质金属蛋白酶-14(MMP-14) mRNA 在胃腺癌发生、发展及转移中的作用。方法 以 56 例胃腺癌标本作为观察组, 30 例正常胃黏膜组织作为对照组, 采用实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)技术, 检测 MMP-14 mRNA 的表达及其与胃癌不同临床病理特征之间的关系, 并探讨其预后价值。结果 MMP-14 mRNA 在胃腺癌中的表达明显高于正常胃黏膜组织, MMP-14 mRNA 在胃癌不同浸润深度、不同分化程度、有无淋巴结转移及不同临床分期的表达比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。经生存分析, 胃腺癌中 MMP-14 mRNA 表达与患者预后相关。结论 MMP-14 mRNA 在胃腺癌中高表达, MMP-14 mRNA 在胃腺癌的发生、发展中可能具有重要作用, 术后检测 MMP-14 mRNA 可能对判断胃腺癌的预后具有重要价值。

关键词:胃腺癌; 基质金属蛋白酶 14; 聚合酶链反应; 预后; 临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.05.009

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)05-0439-03

Expression and significance of MMP-14 mRNA in gastric adenocarcinoma*

Liu Aidong¹, Li Qing², Yao Ruili¹, Yan Yonggang³

(1. Department of Pathology, Tangshan Vocational and Technical College, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. Experimental Center, Tangshan Vocational and Technical College, Tangshan, Hebei 063000, China; 3. Department of Surgery, Hospital of Tangshan Iron and Steel Group Co., Ltd., Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To detect the expression of matrix metalloproteinase-14(MMP-14) mRNA, and to investigate its significance on occurrence, development and metastasis of gastric adenocarcinoma. Methods The study included 56 cases of gastric adenocarcinoma as observation group and 30 cases of normal gastric mucosa tissues as control group. We detected the expression of MMP-14 mRNA to investigate and its relation with different clinical characters and prognostic value. Results The expression of MMP-14 mRNA was higher in the observation group than in the control group. The expression of MMP-14 mRNA was correlated with depth, differentiation, lymph node metastasis and clinical stages. The survival analysis showed that the expression of MMP-14 mRNA was correlated with the patient's prognosis. Conclusion The higher-expression of MMP-14 mRNA may promote the occurrence and development of gastric adenocarcinoma. The expression of MMP-14 mRNA may be helpful to predict the prognosis in gastric adenocarcinoma.

Key words: gastric adenocarcinoma; matrix metalloproteinase 14; polymerase chain reaction; prognosis; clinical study

胃腺癌是消化系统中常见的肿瘤, 其发生、发展与多种因素有关, 近年人们更多地研究细胞外基质在肿瘤中的作用^[1]。基质金属蛋白酶-14(matrix metalloproteinase-14, MMP-14)是 MMP 家族的重要成员, 也是最重要的激活 MMP-2 降解细胞外基质的成分, 包括各种胶原、蛋白多糖和糖蛋白等, MMP-14 的高表达在肿瘤进展中具有一定作用^[2]。本实验通过实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测 MMP-14 mRNA 在胃腺癌及正常胃黏膜组织中的表达, 探讨其与肿瘤临床病理特征的关系, 旨在为探讨肿瘤的生物行为提供理论帮助。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本实验采用的标本均为 2005 年 1~12 月收集, 胃腺癌术后立即取材置于液氮冻存, 然后再转入-80℃冰箱中保存备用。病例纳入标准: (1)符合 WHO 分类中胃腺癌的诊断标准, 由病理科专业技术人员经 HE 染色, 并由两位病理主治医师共同阅片明确诊断; (2)术前患者均未进行治疗; (3)临床随访资料完整。观察组 56 例, 其中男 31 例, 女 25 例; 年龄为 39~69 岁, 平均(56.2±7.9)岁。无淋巴结转移者 27

例, 有淋巴结转移者 29 例(有无淋巴结转移根据术后病理而定)。选取 30 例切缘正常的胃黏膜组织作为对照组, 取材方法同上。观察组与对照组性别构成、年龄等常规指标比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 取新鲜组织 20 mg, 加入 1.5 mL 进口微量离心管(EP)中, 加入 Trizol 试剂 1 mL 混匀, 4℃高速低温离心 15 min, 取上层无色上清(含 RNA), 将其转入 1.5 mL 进口 EP 管中, 加入等体积的冰浴异丙醇, 室温下孵育 20 min, 4℃高速低温离心 10 min, 弃上清后, 可见片状沉淀附着于管壁或于管底, 此沉淀即为总 RNA。按照 1:1 的比例加入预冷的焦碳酸二乙酸(DEPC)处理过的 75%乙醇, 颠倒振荡离心管, 并漩涡振荡样品, 使其沉淀悬浮, 在 4℃, 高速低温环境下离心 5 min。去除上清, 晾干沉淀。用适量的 DEPC 水溶解沉淀, 置于-80℃冰箱中保存。

1.2.2 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性 取 100 mL 1×TBE 电泳缓冲液加入三角瓶中, 再加入 1.2 g 琼脂糖粉末, 加

* 基金项目: 河北省教育厅高等学校科学研究计划课题(Z2011317); 唐山市科学技术研究与发展计划课题(10130269c)。

热至完全溶解,室温冷却,加入 6 μL 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 EB 胶,凝胶固化。向电泳槽中加入电泳缓冲液。每个样本取 2 μL RNA 上样后,以 5 V/cm 电压电泳至溴酚蓝跑出距点样孔约 6~8 cm,检测 RNA 的完整性。

1.2.3 引物合成 引物由上海生物工程技术有限公司设计合成,MMP-14 基因的引物序列,MMP-14 上游:5'-GCT GGC AAT TTG GTG TGC TC-3',下游:5'-TGG TTT GGG TAT GCA CCT TTG G-3',扩增片断长度 251 bp;GAPDH 上游:5'-TCA TTG ACC TCA ACT ACA TG-3',下游:5'-GCA GTG ATG GCT TGG ACT GT-3',扩增片断长度 439 bp。

1.2.4 逆转录反应 以提取组织总 RNA 为模板,按照试剂盒说明书合成 cDNA,并置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存待用。

1.2.5 RT-PCR 扩增并检测目的基因的表达 将合成的引物离心,用适量 DEPC 处理过的水溶解至 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。以合成的 cDNA 为模板,配置 RT-PCR 反应体系。RT-PCR 反应体系进行 35 个循环:94 $^{\circ}\text{C}$ (4 min),94 $^{\circ}\text{C}$ (20 s),60 $^{\circ}\text{C}$ (30 s),72 $^{\circ}\text{C}$ (30 s)。反应结束后,由仪器自动分析结果,记录扩增曲线、溶解曲线、各样本的 Ct 值及超始拷贝数。

1.2.6 结果判定 以 GAPDH 为内参,分别对 MMP-14 的起始拷贝数进行校正,以相对值(相对值=目的基因拷贝数/ β -actin 拷贝数)进行比较,最后结果以相对比值 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示,以小于或等于 4 为阴性,以大于 4 为阳性。

1.3 统计学处理 应用 SAS6.12 软件进行统计分析,组间比较应用 t 检验,生存分析应用单变量 Logrand 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 MMP-14 mRNA 表达比较 MMP-14 mRNA 在观察组中的表达量明显高于对照组($P < 0.05$),见表 1。

表 1 两组 MMP-14 mRNA 表达比较

分组	n	MMP-14 mRNA($\bar{x} \pm s$)	t	P
观察组	56	4.36 \pm 1.63	6.89	0.006 4
对照组	30	2.04 \pm 0.58		

表 2 MMP-14 mRNA 在胃腺癌不同临床病理特征中的表达

临床病理特征	n	MMP-14 mRNA($\bar{x} \pm s$)	t	P
分化程度			4.03	0.039 2
高、中	32	3.96 \pm 1.14		
低	24	4.89 \pm 1.05		
淋巴结转移			5.49	0.010 5
无	27	3.29 \pm 1.06		
有	29	5.36 \pm 1.26		
浸润深度			4.85	0.021 9
未及外膜	31	3.92 \pm 1.18		
外膜及以外	25	4.91 \pm 1.16		
临床分期			6.05	0.006 3
I~II	30	3.38 \pm 0.96		
III~IV	26	5.49 \pm 1.25		

2.2 MMP-14 mRNA 在胃腺癌不同临床病理特征中的表达 MMP-14 mRNA 在胃腺癌不同浸润深度、不同分化程度、有无淋巴结转移及不同临床分期中的表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 MMP-14 mRNA 的表达与胃腺癌患者生存的关系 本组患者随访时间为 12~60 个月,MMP-14 mRNA 阳性组及阴性组生存率曲线见图 1,经检验,胃腺癌中 MMP-14 mRNA 表达与患者预后相关($\chi^2 = 10.266 2, P = 0.001 4$)。即 MMP-14 mRNA 高表达的患者预后差。

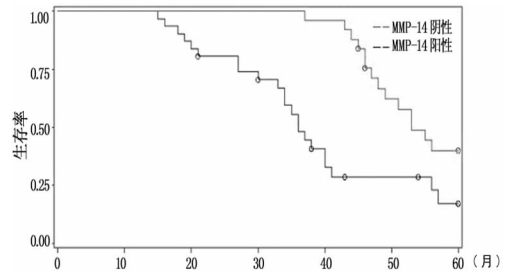


图 1 MMP-14 mRNA 表达与胃癌预后的关系

3 讨论

MMP 家族是一组锌离子依赖性内切酶^[3-4],与细胞外基质的降解和肿瘤的新生血管形成密切相关^[5-6]。MMP-14 作为 MMP 家族的重要成员,具有前肽区、信号肽区、催化区、铰链区和类血红素蛋白结合区 5 个功能区域,能够在细胞表面活化 MMP-2 等重要因子^[7-8]。有研究显示 MMP-14 也与肿瘤的血管新生有密切关系^[9]。胃腺癌的侵袭和转移与基膜的黏附和细胞外基质的降解有关。MMP-14 是肿瘤细胞中产生的重要物质,其作用于周围的间质细胞,诱导间质细胞产生 MMP-14 原酶,该酶激活后被肿瘤细胞摄取到细胞膜表面^[10]。激活的 MMP-14 不仅可以激活 MMP-2 降解周围的基质,而且自身也可以发挥降解细胞外基质的作用^[11]。还有观点认为,MMP-14 可以降解 I、II、IV 型胶原和纤维连接蛋白(FN),参与包括基膜在内的细胞外基质的降解过程^[8]。而细胞外基质和基底膜是肿瘤生长和扩散的屏障,肿瘤细胞依靠 MMP 降解细胞外基质,进而促进浸润和转移^[12-13]。

本实验应用的 RT-PCR 技术,具有准确性和特异性,没有电泳后的处理,可以有效避免误差。实验结果显示,MMP-14 mRNA 在胃腺癌中的表达明显高于正常胃黏膜组织,提示 MMP-14 在 mRNA 水平上参与了肿瘤的发生。实验结果还显示,MMP-14 mRNA 与胃腺癌的浸润深度、分化程度、临床分期及淋巴结转移密切相关,提示 MMP-14 mRNA 可能参与了肿瘤分化生长过程,MMP-14 促进侵袭与转移的作用不仅表现在细胞表面的激活作用,还可以表现出不依赖于 MMP-2 的细胞外基质的蛋白水解酶的作用。有观点显示,MMP-14 在进行细胞外降解的同时,还参与了肿瘤新生血管的生成作用,而且还可以通过肿瘤血管向宿主输出大量的恶性肿瘤细胞,引起肿瘤持续生长并发生浸润及远处转移^[14-15]。本组生存分析显示,MMP-14 mRNA 的表达与胃腺癌患者的预后密切相关,即 MMP-14 mRNA 表达越高,胃腺癌患者生存时间越短,提示对胃癌手术后立即对新鲜组织进行 MMP-14 mRNA 表达的检测,对判断预后具有重要价值,也为临床合理进行治疗提供理论支持。

综上所述,MMP-14 mRNA 的高表达参与了胃腺癌的发

生发展,临床检测 MMP-14 mRNA 的表达对判断预后具有重要价值,临床中可以积极应用。

参考文献:

- [1] Atkinson JM, Pennington CJ, Martin SW, et al. Membrane type matrix metalloproteinases (MMPs) show differential expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) compared to normal lung; correlation of MMP-14 mRNA expression and proteolytic activity[J]. *Eur J Cancer*, 2007, 43(11):1764-1771.
- [2] Moss NM, Liu Y, Johnson JJ, et al. Epidermal growth factor receptor-mediated membrane type 1 matrix metalloproteinase endocytosis regulates the transition between invasive versus expansive growth of ovarian carcinoma cells in three-dimensional collagen[J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(6):809-820.
- [3] 李斌,陈武科,陈鹏,等. 乳腺癌中 MTA1、MMP-9 表达与临床病理研究[J]. *重庆医学*, 2010, 39(12):1552-1554.
- [4] 刘爱东,庞久玲,刘士生. 胃癌中基质金属蛋白酶-9 和 CD105 表达关系的研究[J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(4):886-887.
- [5] Laudański P, Swiatecka J, Kozłowski L, et al. Increased serum level of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP/MMP-14) in patients with breast cancer[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2010, 48(1):101-103.
- [6] Zhang H, Liu M, Sun Y, et al. MMP-14 can serve as a prognostic marker in patients with supraglottic cancer[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2009, 266(9):1427-1434.
- [7] Littlepage LE, Sternlicht MD, Rougier N, et al. Matrix metalloproteinases contribute distinct roles in neuroendocrine prostate carcinogenesis, metastasis, and angiogenesis progression[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(6):2224-2234.
- [8] Suojanen J, Salo T, Koivunen E, et al. A novel and selective membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) inhibitor reduces cancer cell motility and tumor growth[J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(24):2362-2370.
- [9] Hawinkels LJ, Kuiper P, Wiercinska E, et al. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(10):4141-4142.
- [10] 郑德志,陈林,肖颖彬,等. CTGF 和 MT1-MMP 在容量超负荷导致心室间质重塑中的表达[J]. *重庆医学*, 2009, 38(16):1995-1999.
- [11] 姚文裕,林鹏,王军业,等. MMP-14 在乳腺癌中的表达及临床意义[J]. *肿瘤防治研究*, 2005, 32(5):268-270.
- [12] 刘冬玲,李娜萍. MMP-14、VEGF、E-cadherin 与子宫颈癌生物学行为的相关性研究[J]. *华中科技大学学报:医学版*, 2006, 35(6):774-777.
- [13] Suojanen J, Salo T, Koivunen E, et al. A novel and selective membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) inhibitor reduces cancer cell motility and tumor growth[J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(24):2362-2370.
- [14] 汪多平,曹骥,赵荫农,等. RECK 及 MMP-14 在肝细胞肝癌组织中的表达及其临床意义[J]. *中国肿瘤临床*, 2007, 34(10):558-561.
- [15] Adley BP, Gleason KJ, Yang XJ, et al. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) in epithelial ovarian cancer: high level expression in clear cell carcinoma[J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 112(2):319-324.
- (收稿日期:2011-01-05 修回日期:2011-10-09)
-
- (上接第 438 页)
- [9] Schummer W, Schummer C, Rose N, et al. Mechanical complications and malpositions of central venous cannulations by experienced operators. A prospective study of 1794 catheterizations in critically ill patients[J]. *Intensive Care Med*, 2007, 33(6):1055-1059.
- [10] Hayashi Y, Uchida O, Takaki O, et al. Internal jugular vein catheterization in infants undergoing cardiovascular surgery: an analysis of the factors influencing successful catheterization[J]. *Anesth Analg*, 1992, 74(5):688-693.
- [11] Lu WH, Huang TC, Pan JY, et al. A potentially fatal complication during subclavian vein catheterization in an infant with congenital heart disease-puncture to pulmonary artery directly: a case report[J]. *J Clin Anesth*, 2008, 20(3):225-227.
- [12] Sznajder JI, Zvebil FR, Bitterman H, et al. Central vein catheterization. Failure and complication rates by three percutaneous approaches[J]. *Arch Intern Med*, 1986, 146(2):259-261.
- [13] Dolcourt JL, Bose CL. Percutaneous insertion of silastic central venous catheters in newborn infants[J]. *Pediatrics*, 1982, 70(3):484-486.
- [14] Johnson EM, Saltzman DA, Suh G, et al. Complications and risks of central venous catheter placement in children[J]. *Surgery*, 1998, 124(5):911-916.
- [15] Eichelberger MR, Rous PG, Hoelzer DJ, et al. Percutaneous subclavian venous catheters in neonates and children[J]. *J Pediatr Surg*, 1981, 16(4 Suppl 1):547-553.
- [16] Bagwell CE, Salzbeg AM, Sonnino RE, et al. Potentially lethal complications of central venous catheter placement[J]. *J Pediatr Surg*, 2000, 35(5):709-713.
- (收稿日期:2011-03-09 修回日期:2011-07-12)