

· 论 著 ·

## Snail1 和 MMP-1 在非小细胞肺癌表达的临床意义\*

余 红, 叶贤伟, 万自芬, 刘维佳, 李 敏, 张湘燕<sup>△</sup>

(贵州省人民医院呼吸和危重症医学科/贵州省呼吸疾病研究所, 贵阳 550002)

**摘要:**目的 探讨 Snail1 基因和基质金属蛋白酶 1(MMP-1)在非小细胞肺癌(NSCLC)的表达和临床意义。方法 免疫组织化学法及 RT-PCR 法分别检测 NSCLC 组织和正常肺组织 Snail1 蛋白、MMP-1 蛋白的表达,以及 Snail1 mRNA 的表达。结果 NSCLC 组织 Snail1 蛋白和 mRNA 水平以及 MMP-1 蛋白表达均高于正常肺组织( $P=0.000$ ,  $P<0.05$ ,  $P=0.000$ )。Snail1 蛋白和 MMP-1 蛋白表达的增高与肺癌的临床分期和淋巴结转移有关( $P<0.05$ ),但均与组织学类型、病理分化程度无关( $P>0.05$ )。癌组织 Snail1 蛋白的过度表达和 MMP-1 的表达上调相关( $P<0.01$ )。结论 Snail1 和 MMP-1 表达增高是 NSCLC 侵入和转移过程中的频发事件,可能是判断不良预后的有价值指标和抗肿瘤治疗的重要靶点。

**关键词:**癌,非小细胞肺;Snail1;基质金属蛋白酶 1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.28.006

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)28-2919-03

## Expression of Snail1 and MMP-1 increased in human NSCLC\*

Yu Hong, Ye Xianwei, Wan Zifen, Liu Weijia, Li Min, Zhang Xiangyan<sup>△</sup>

(Respiratory and Critical Care Medicine Department, Guizhou Provincial People's Hospital, Respiratory Disease Research Institute in Guizhou Province, Guiyang 550002, China)

**Abstract:** Objective To explore the expression and clinical significance of Snail1 gene and matrix metalloproteinase 1(MMP-1) in human non-small cell lung cancer(NSCLC). **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression of Snail1 and MMP-1 protein in 58 cases of NSCLC and normal lung tissues, respectively. Snail1 mRNA level in lung carcinoma tissues and lung normal tissues of 22 cases was measured by semi-quantitative method of RT-PCR. The relationship between expression of Snail1, MMP-1 and clinical characteristics in patients with NSCLC was analyzed. **Results** Expression levels of Snail1 protein and MMP-1 protein in NSCLC tissues were greater than in normal tissues( $P=0.000$ ). Snail1 mRNA was highly expressed in neoplastic tissues in contrast to its low level of expression in non-neoplastic lung tissues( $P<0.05$ ). The increased Snail1 and MMP-1 protein levels were correlated with poor tumor stage and lymph node metastasis( $P<0.05$ ), but were not correlated with the differentiation level and histological type of tumor( $P>0.05$ ). There was positive correlation between Snail1 protein expression and MMP-1 protein expression in NSCLC tissues( $P<0.01$ ). **Conclusion** The process of invasion and metastasis in NSCLC is characterized by increased expression of Snail1 and MMP-1, they may be useful indicator of poor prognosis in NSCLC and potential target for anti-tumor therapy.

**Key words:** carcinoma, non-small-cell lung; Snail1; matrix metalloproteinase 1

肺癌是最常见的恶性肿瘤,也是肿瘤死亡率中的首要死因。2008 年统计显示,当年新增 1 000 000 例患者,约 850 000 例因此死亡,而总的 5 年生存率不足 15%<sup>[1]</sup>。高的转移和复发率是引起不良预后的主要原因。但肺癌转移调控机制仍是复杂和不清楚的,推测不仅与癌细胞侵袭性表型转化、基底膜屏障破坏有关,而且与基质降解、微环境改变等密切相关。转录因子 Snail1 和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)都被认为可能是其中的重要参与者,因而受到越来越多的关注<sup>[2]</sup>。本文观察 Snail1、基质金属蛋白酶 1(MMP-1)在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的表达及相互关系,分析其在 NSCLC 中临床意义。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择贵州省人民医院 2006~2010 年确诊为原发性支气管肺癌患者手术切除石蜡标本共 36 例,同时收集经临床病理证实为 NSCLC 的新鲜癌样本 22 例。在 58 例中,男 44 例,女 14 例;年龄 48~74 岁,中位年龄 58.2 岁;鳞癌 45 例,腺癌 13 例;高、中分化癌 39 例,低分化或未分化癌 19 例;

TNM 分期(UICC2009 分期标准): I~II 期 38 例, III~IV 期 20 例;肿瘤直径大于 3 cm 者 38 例,小于或等于 3 cm 者 20 例;有淋巴结转移者 41 例,无淋巴结转移者 17 例。所有病例术前均未放化疗。对照组取自癌旁正常肺组织(距离肿瘤边缘 5 cm 以上)。

**1.2 试剂** 羊抗人 Snail1 多克隆抗体, Santa Cruz 公司;鼠抗人 MMP-1 抗体, PV-9003 山羊超敏二步法免疫组化试剂盒、PV-9000 通用型二步法检测试剂盒,北京中杉生物工程公司; Snail1 和 GAPDH 引物由上海捷瑞生物工程技术有限公司合成;总 RNA 提取试剂盒(Trizol 法)、2 倍 Taq PCR MasterMix、DNA Marker1,天根生化科技有限公司;Revert Aid<sup>TM</sup> First Stand cDNA Synthesis cDNA Kit, Fermentas。

**1.3 免疫组化** 免疫组化采用二步法,按试剂盒说明操作。抗原高压热修复。以细胞核、细胞质或细胞膜出现棕黄色或棕褐色染色为阳性细胞。免疫组化评分采用双盲法,半定量,按染色强度分 0~3 级,0 级:阴性;1 级:弱染色;2 级:中度染色;3 级:强染色。按染色细胞面积分 1~3 级,1 级:≤10%;2 级:11%~

49%; 3 级:  $\geq 50\%$ 。两者乘积分 4 组(0, 1~3, 4~6, 7~9)。0~3 分为阴性, 4 以上为阳性表达(4~6 为弱到中表达, 7~9 为强表达)。已知阳性样本作阳性对照, PBS 代替一抗作阴性对照。

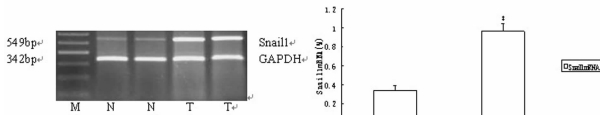
**1.4 RT-PCR 检测癌和癌旁正常组织中 Snail1 mRNA 的表达** Trizol 一步法提取总 RNA 并逆转录成 cDNA。PCR 扩增条件: 95 °C、5 min 预变性, 94 °C、45 s 变性, 58.5 °C、45 s 退火, 70 °C、1 min 延伸, 72 °C、10 min 总延伸, 32 循环。引物: Snail1, 正义链: 5'-AAT GCT CAT CTG GGA CTC TGT-3'; 反义链: 5'-GCC TGG CAC TGG TAC TTC TT-3'; GAPDH, 正义链: 5'-GGG AAA CTG TGG CGT GAT-3'; 反义链: 5'-GTG GTC GTT GAG GGC AAT-3'。反应产物 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 以 GAPDH 为内参照, Quantity One 软件分析 Snail1 扩增产物相对积分光密度值。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS11.5 统计软件进行分析, 定性资料采用  $\chi^2$  检验, 定量资料采用 *t* 检验, 相关性分析采用 Spearman 等级相关性分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Snail1、MMP-1 蛋白在 NSCLC 和正常组织中的表达** 肺癌组织中 Snail1 蛋白阳性表达主要定位在胞核, 部分在胞浆, 阳性表达率为 60.34% (35/58)。在正常组织中未见 Snail1 阳性表达; NSCLC 组织 MMP-1 蛋白阳性表达主要在胞浆, 部分见膜表达, 阳性表达率为 41.38% (24/58)。正常组织仅见 MMP-1 蛋白弱表达, 表达率 6.90% (4/58)。与正常组织相比, Snail1、MMP-1 蛋白在 NSCLC 的阳性表达差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 50.123, P = 0.000; \chi^2 = 18.831, P = 0.000$ ), 见图 2。

**2.2 Snail1 mRNA 在 NSCLC 和正常肺组织中的表达** 与正常组织相比, Snail1 mRNA 表达在 NSCLC 组织明显增高 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。



\*:  $P < 0.05$ , 与 N 比较。N: 正常组织, T: NSCLC 组织, M: DNA Marker。

图 2 Snail1 mRNA 在 NSCLC 和正常组织中的表达

**2.3 Snail1 蛋白、MMP-1 蛋白表达与临床病理参数的关系** Snail1 蛋白和 MMP-1 蛋白的表达与 NSCLC 患者的临床分期和淋巴结转移程度明显相关 ( $P < 0.05$ ), 但与肿瘤大小、组织学类型及分化程度无明显关系 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

表 1 Snail1 蛋白、MMP-1 蛋白表达与 NSCLC 临床病理参数的关系

临床病理参数	n	Snail1 蛋白			MMP-1 蛋白		
		阳性(n)	$\chi^2$	P	阳性(n)	$\chi^2$	P
肿瘤直径(cm)							
>3	38	22	0.276	0.599	17	0.512	0.474
≤3	20	13			7		
组织学类型							
鳞癌	45	26	0.553	0.457	16	2.807	0.094
腺癌	13	9			8		
分化程度							
高、中分化	39	25	0.703	0.402	14	1.475	0.225
低分化/未分化	19	10			10		

续表 1 Snail1 蛋白、MMP-1 蛋白表达与 NSCLC 临床病理参数的关系

临床病理参数	n	Snail1 蛋白			MMP-1 蛋白		
		阳性(n)	$\chi^2$	P	阳性(n)	$\chi^2$	P
TNM 分期							
I~II 期	38	18	7.754	0.005	12	4.363	0.037
III~IV 期	20	17			12		
淋巴结转移							
有	41	29	6.307	0.012	21	5.584	0.018
无	17	6			3		

**2.4 Snail1 蛋白与 MMP-1 蛋白表达的相互关系** NSCLC 组织 Snail1 蛋白表达与 MMP-1 蛋白表达呈正相关 ( $r = 0.395, P < 0.01$ )。

## 3 讨论

上皮细胞-间质细胞转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是发育过程中重要机制, 对中胚层和神经脊管的发育起决定性作用。在肿瘤的进展过程中 EMT 再激活, 引发一系列的转移事件。研究表明, Snail1 参与了转移和生存相关 EMT 的调节<sup>[3]</sup>。Snail1 识别靶基因启动子的 E-box 基序的 DNA 结合序列, 下调 E 钙黏蛋白 (E-cadherin) 表达, 改变癌细胞的表型和细胞间黏附, 使其获得更大的侵袭能力, 并诱导基底膜屏障的破坏<sup>[4]</sup>。而且, Snail1 的异常表达也直接与肿瘤干细胞特性的获得有关, 这种肿瘤干细胞具有自我更新能力和分化潜能, 对于肿瘤的形成和发展都是关键和必要的<sup>[5]</sup>。敲除 Snail1 不仅逆转 EMT 的改变, 明显减少转移损害, 也抑制原发肿瘤的生长和增加肿瘤对抗癌疗法的敏感性<sup>[6]</sup>。这些证据都提示, Snail1 的异常表达与人类肿瘤的发病机制密切相关。作者检测了 NSCLC 中 Snail1 基因 mRNA 和蛋白的表达, 并分析它与临床病理参数的关系, 结果显示, Snail1 mRNA 在正常肺组织仅少量表达, 而在 NSCLC 组织其表达较正常组织增高。免疫组织化学法显示, Snail1 蛋白在正常肺组织几乎没有表达。在 NSCLC 组织中, Snail1 蛋白主要表达于肿瘤细胞的胞核, 其表达与正常肺组织相比明显增高。提示 Snail1 基因正常生理状态保持沉默, 仅在肿瘤等病理条件下被再激活而表达。而且, Snail1 蛋白的过度表达明显相关于患者高的肿瘤分期和差的淋巴结转移状态。说明其表达与癌细胞的血管、淋巴侵入有关, Snail1 是相关于肺癌转移潜能和不良预后的指标。与 Hung 等<sup>[7]</sup>的报道一致。作者还发现, 在早期肺癌, Snail1 蛋白部分见胞浆表达, 且以弱阳性表达多见, 而在晚期肺癌, Snail1 蛋白更多是强阳性表达, 且基本定位于胞核, 提示 Snail1 的表达程度和亚细胞定位都与肺癌的临床分期有关。

细胞间黏附和蛋白酶活性的改变都是影响癌细胞转移和生物学特性的重要事件。本研究进一步分析了 MMP-1 在 NSCLC 中的表达情况, 以及它与 Snail1 之间的相互关系。MMP-1 即间质胶原酶, 由于能特异地降解肺的主要结构胶原 I 型胶原, 因此, 对于正常肺结构的维持和多种破坏性肺疾病病理过程的调节有重要意义<sup>[8]</sup>。MMP-1 正常仅有少量结构性表达, 病理状态下, 增加的 MMP-1 参与了肿瘤进展的多个环节。MMP-1 不仅大量酶解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 组件, 破坏转移屏障和细胞生存微环境; 新近的研究还提示, MMP-1 也作用于非胶原底物, 激活细胞因子、生长因子、趋化因子等, 参与调节肿瘤细胞的生长、免疫逃避、炎症反应, 促进了肿瘤的发生和转移<sup>[9]</sup>。累积的证据表明, 增加的 MMP-

1 与包括肺癌在内的多种人类肿瘤的发生、发展及生存率相关<sup>[10-11]</sup>。而且, MMP-1 基因多态性被证实是与肺癌的发生和进展有关的危险因素<sup>[12]</sup>。本研究结果显示, 正常肺组织 MMP-1 蛋白仅少量弱阳性表达, 而在 NSCLC 组织中表达明显增多。MMP-1 的过度表达与差的临床分期和淋巴结转移状态相关。这显然提示, MMP-1 参与了 NSCLC 的侵入转移过程, 并且与预后有关, 与以往的研究一致。

最近有研究发现, Snail1 可能通过上调肿瘤细胞 MMPs 的表达和活性, 促进肿瘤的侵入和转移。相关报道见于肝细胞癌(MMP-1, -2, -7)<sup>[13]</sup>, 乳腺癌(MT1-MMP, MT2-MMP)<sup>[14]</sup>, 卵巢癌和 NSCLC(MMP-2, -9)<sup>[6, 15]</sup>。这种诱导表达可能与 Snail1 增强 MMPs 启动子活性有关。而特异的小干扰或反义核酸技术抑制 Snail1 可减少癌细胞 MMPs 蛋白表达和肿瘤的生长及基底膜浸润。NSCLC 中 Snail1 与 MMP-1 关系的研究鲜见报道, 本研究发现, 在 NSCLC 组织中, MMP-1 蛋白的表达水平随 Snail1 蛋白的增加而上调, 二者显著正相关。推测异常活化的 Snail1 基因可能通过上调 MMP-1 的表达, 促进癌细胞的转移, 加速病变的恶化。直接的证据有待进一步的研究。

总之, Snail1 和 MMP-1 在 NSCLC 中过度表达, 且均与肿瘤的临床分期和淋巴结转移程度有关。可能是评价转移潜能和预后的有用指标。研究 Snail1 在肺癌的调控机制并对其异常表达针对性地干预, 有望调控其相关的下游分子事件, 提供安全有效的治疗靶点。

#### 参考文献:

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2008, 58(1): 71-96.

[2] Xiao DK, He JX. Epithelial mesenchymal transition and lung cancer[J]. *J Thorac Dis*, 2010, 2(2): 154-159.

[3] Argast GM, Krueger JS, Thomson S, et al. Inducible expression of TGF $\beta$ , snail and Zeb1 recapitulates EMT in vitro and in vivo in a NSCLC model[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2011, 28(7): 593-614.

[4] Mikami S, Katsube K, Oya M, et al. Expression of Snail and Slug in renal cell carcinoma: E-cadherin repressor Snail is associated with cancer invasion and prognosis[J]. *Lab Invest*, 2011, 91(10): 1443-1458.

[5] Dang H, Ding W, Emerson D, et al. Snail1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and tumor initiating stem cell characteristics [J]. *BMC Cancer*, 2011, 19(3): 396-

398.

[6] Jin H, Yu Y, Zhang T, et al. Snail is critical for tumor growth and metastasis of ovarian carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(9): 2102-2111.

[7] Hung JJ, Yang MH, Hsu HS, et al. Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha, TWIST1 and Snail expression in resectable non-small cell lung cancer [J]. *Thorax*, 2009, 64(12): 1082-1089.

[8] Elkington P, Shiomi T, Breen R, et al. MMP-1 drives immunopathology in human tuber culosis and transgenic mice [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(5): 1827-1833.

[9] Rucci N, Sanità P, Angelucci A. Roles of metalloproteases in metastatic niche [J]. *Curr Mol Med*, 2011, 11(8): 609-622.

[10] Sauter W, Rosenberger A, Beckmann L, et al. Matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) is associated with early onset lung cancer [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008, 17(10): 1127-1135.

[11] Boström P, Söderström M, Vahlberg T, et al. MMP-1 expression has an independent prognostic value in breast cancer [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11(3): 348-352.

[12] Liu L, Wu J, Wu C, et al. A functional polymorphism (-1607 1G $\rightarrow$ 2G) in the matrix metalloproteinase-1 promoter is associated with development and progression of lung cancer [J]. *Cancer*, 2011, 117(22): 5172-5181.

[13] Miyoshi A, Kitajima Y, Sumi K, et al. Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Br J Cancer*, 2004, 90(6): 1265-1273.

[14] Ota I, Li XY, Hua YX, et al. Induction of a MT1-MMP and MT2-MMP-dependent basement membrane transmigration program in cancer cells by Snail1 [J]. *PNAS*, 2009, 106(48): 20318-20323.

[15] Choudhary R, Li H, Winn RA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits transformed growth of non-small cell lung cancer cells through selective suppression of Snail [J]. *Neoplasia*, 2010, 12(3): 224-234.

(收稿日期: 2012-02-09 修回日期: 2012-04-22)

(上接第 2918 页)

[11] 陈海生, 谢翠贤, 刘超, 等. 胸腔镜辅助微创单支冠状动脉旁路移植术 8 例 [J]. *岭南心血管病杂志*, 2008, 14(2): 131-133.

[12] Araji OA, Gutierrez-Martin MA, Miranda M, et al. Video-assisted cardioscopy for removal of primary left ventricular fibroma [J]. *Interact Cardio Vasc Thorac Surg*, 2010, 10(2): 344-345.

[13] Atallah J, Fynn-Thompson F, Cecchin F, et al. Video-assisted thoracoscopic cardiac denervation: a potential novel therapeutic option for children with intractable ventricular arrhythmias [J]. *Ann Thorac Surg*, 2008, 86(5): 1620-1625.

[14] 程云阁, 王跃军, 顾剑民, 等. 全胸腔镜下二尖瓣置换术的

临床经验总结 [J]. *岭南心血管病杂志*, 2007, 12(5): 321-323.

[15] Murzi M, Kallushi E, Solinas M, et al. Video-assisted right atrial surgery with a single two-stage femoral venous cannula [J]. *Interact Cardio Vasc Thorac Surg*, 2009, 9(1): 9-10.

[16] 陈海生, 肖明第, 程云阁, 等. 胸腔镜辅助微创二尖瓣置换术 [J]. *中华胸心血管外科杂志*, 2005, 21(2): 72-74.

[17] Modi P, Rodriguez E, Chitwood WR Jr. Robot-assisted cardiac surgery [J]. *Interact Cardio Vasc Thorac Surg*, 2009, 9(3): 500-505.

(收稿日期: 2012-03-09 修回日期: 2012-04-22)