

胰腺癌中 MMP-26 mRNA 和蛋白的表达及其临床意义

吴年付, 汤志刚, 陈 炯, 黄 强, 李建生, 许戈良, 蔡重阳, 陈江波

摘要 目的 检测基质金属蛋白酶-26 (MMP-26) 在人胰腺癌中的表达并探讨其在胰腺癌进展中的作用及意义。方法

通过免疫组化方法、逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 和蛋白质印记 (Western blot) 分别检测 MMP-26 基因和蛋白在胰腺癌、癌旁正常组织中的表达, 并探讨其与胰腺癌临床病理特征之间的关系。结果 免疫组化显示 MMP-26 蛋白在胰腺癌中的阳性表达率 (72%) 比癌旁正常组织中 (6%) 明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 其高表达与胰腺癌的分化程度、TNM 分期以及淋巴结转移有关 ($P < 0.05$)。RT-PCR 检测胰腺癌组织及癌旁正常组织各 10 例, 有 7 例 (70%) 胰腺癌组织 MMP-26 mRNA 的表达高于癌旁正常组织。Western blot 法检测胰腺癌组织及癌旁正常组织各 7 例, 发现有 5 例 (71.4%) 胰腺癌组织 MMP-26 蛋白的表达高于癌旁正常组织。结论 MMP-26 的表达与胰腺癌的分化程度、TNM 分期以及淋巴结转移均有相关性, 有可能成为胰腺癌早期诊断的一个生物标志物及临床治疗的新靶点。

关键词 胰腺癌; MMP-26; 蛋白表达

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)07-0981-04

胰腺癌是恶性程度最高的肿瘤之一, 严重的危害人类身心健康, 浸润和转移是胰腺癌早期最重要的生物学特性, 与其他肿瘤相比, 胰腺癌转移早且恶性程度高是导致患者失去手术机会和 5 年生存率极差的关键原因所在。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 在胰腺癌浸润转移过程中发挥重要作用, 其家族成员之一 MMP-26 与胰腺癌的关系国内外罕有研究。该研究检测其在人胰腺癌中的表达并探讨其在胰腺癌进展中的作用及意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2008 年 1 月 ~ 2012 年 12 月期间在安徽医科大学附属省立医院胆胰外科行手术

切除并经病理证实的胰腺癌及配对癌旁正常组织各 50 例。其中男 29 例、女 21 例; 年龄 37 ~ 76 (56.78 ± 8.62) 岁; 胰头癌 39 例, 胰体尾癌 11 例; 高分化 12 例, 中、低分化 38 例; TNM 分期 I ~ II 期 32 例, III ~ IV 期 18 例; 有淋巴结转移 33 例, 无淋巴结转移 17 例。患者术前均未行放疗或化疗并且临床资料完整。

1.2 主要试剂 TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒 (MBI Fermentas 美国格伦伯尼 MD 公司); RIPA 细胞裂解液 (美国 Sigma Aldrich 公司); PVDF 膜 (美国 Millipore 公司); 一抗 (美国 Santa Cruz 公司); 二抗和 SP 免疫组织化学染色试剂盒及 DAB 染色试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 RT-PCR 检测 利用 TRIzol 试剂分别于胰腺癌组织及癌旁正常组织中提取总 RNA 分为两组: 胰腺癌组和癌旁正常组; 依照逆转录试剂盒说明书提取出总 RNA 作为逆转录模板生成 cDNA。取 cDNA 模板加入 PCR 反应体系进行 PCR 反应。以 GAPDH 作为内参照, 上游引物序列: 5'-GG-GAAACTGTGGCGTGAT-3', 下游: 5'-GTGTCGTT-GAGGGCAAT-3', 产物大小 342 bp; MMP-26 引物序列上游为: 5'-GGGACTTTGTTGAGGGCTAT-3', 下游为: 5'-CTGGCGAGATGGAGGTGT-3', 产物大小 198 bp; PCR 扩增条件为: 94 °C 预变性 3 min 后 94 °C 变性 45 s, 53 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 总共 35 个循环后, 再 72 °C 延伸 5 min, PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳。

1.3.2 Western blot 检测 于两组中分别取 50 mg 组织置于裂解液中匀浆, 15 000 r/min 离心 15 min 并收集上清液, 测定总蛋白的浓度。分别取两组样本上样量 50 μl, 充分变性后上样至 SDS-PAGE 胶加样孔内电泳, PVDF 转膜, 脱脂奶粉封闭, 加入适当稀释的一抗, 室温抚育 2 h, 充分洗涤; 然后再加入 1:10 000 稀释的二抗, 室温孵育 1 h; 洗涤、DAB 显色、暗室中胶片曝光、显影、定影后观察。

1.3.3 免疫组化检测 两组标本均经 10% 福尔马

2014-02-24 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81272740)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院普通外科, 合肥 230001

作者简介: 吴年付, 男, 硕士研究生;

汤志刚, 男, 博士, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: tzg7031@163.com

林固定,常规石蜡包埋 4 μm 连续切片,常规脱蜡、水化,微波抗原修复后滴加 3% H₂O₂,山羊血清封闭;滴加 1:200 的一抗稀释液在 4℃ 过夜,随后加入二抗增强剂及 HBP 标记的二抗,显微镜下滴加 DAB 溶液显色,适当把握染色浓度,苏木精复染;常规脱水、透明并封片,显微镜下观察并拍照分析。实验中阴性对照则采用 PBS 替代一抗并行苏木精-伊红染色。结果判定方法如下,按阳性细胞百分比评分:随机选取 5 个高倍视野(×400),每个视野计数 100 个细胞,高于 60% 计 3 分,31%~60% 计 2 分,11%~30% 计 1 分,低于 10% 计 0 分;按染色强度评分:未着色计 0 分,淡黄色计 1 分,黄色计 2 分,棕黄色计 3 分,由同一位病理科医师完成,每张切片 2 项得分之和 >3 分即认定为阳性表达。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 进行统计分析,用 χ^2 检验进行比较。

2 结果

2.1 胰腺癌、癌旁正常组织中 MMP-26 的 mRNA 表达差异 采用 RT-PCR 方法分别检测胰腺癌组织及癌旁正常组织各 10 例 MMP-26 mRNA 的表达,发现 7 例(70%) 胰腺癌组 MMP-26 mRNA 的表达明显高于癌旁正常组,癌旁正常组少量表达或无表达,见图 1。

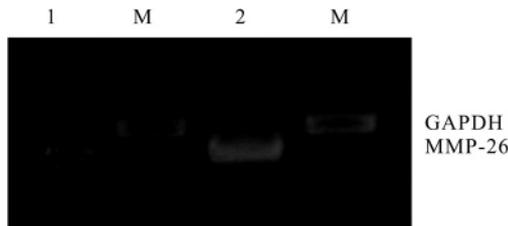


图1 RT-PCR 检测 MMP-26 mRNA 在胰腺癌和癌旁正常组织中的表达水平
M: 内参 GAPDH; 1: 癌旁正常组; 2: 胰腺癌组

2.2 胰腺癌、癌旁正常组织中 MMP-26 蛋白的表达差异

2.2.1 Western blot 检测 MMP-26 蛋白水平 与 RT-PCR 结果相一致,分别检测胰腺癌组织及癌旁正常组织各 7 例 MMP-26 蛋白的表达,发现有 5 例(71.4%) 胰腺癌组 MMP-26 蛋白的表达明显高于癌旁正常组,癌旁正常组表达水平均较低,见图 2。

2.2.2 免疫组化检测 MMP-26 蛋白水平 共检测 50 例胰腺癌组织及相应癌旁组织,结果显示胰腺癌

组 MMP-26 阳性表达的有 36 例(72%),癌旁正常组阳性表达的有 6 例(12%),差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

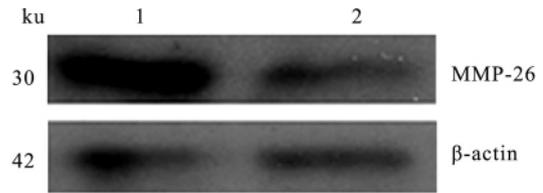


图2 Western blot 检测 MMP-26 在胰腺癌和癌旁正常组织中的表达水平
1: 胰腺癌组; 2: 癌旁正常组

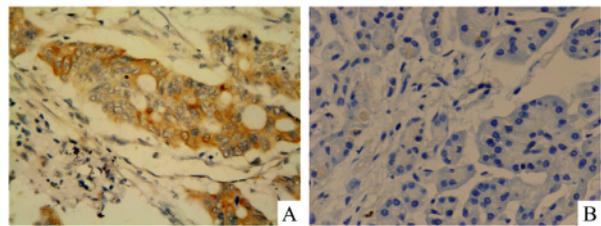


图3 免疫组化法检测 MMP-26 在胰腺癌及癌旁正常组织中的表达 IHC ×400
A: 胰腺癌组; B: 癌旁正常组

2.3 MMP-26 的表达与胰腺癌临床病理参数之间的关系 进一步分析免疫组化实验结果显示: MMP-26 的表达与胰腺癌的分化程度、TNM 分期以及淋巴结转移存在密切相关性。即分化程度越低、TNM 分期越晚以及有淋巴结转移者 MMP-26 表达阳性率越高。但与患者性别、年龄、肿瘤大小、部位以及是否存在神经侵犯等因素之间无明显相关性。见表 1。

3 讨论

胰腺癌恶性程度高、浸润和转移早,因此当发现时多数已是晚期,因此其预后情况较差,存活率也极低。细胞外基质和基底膜的降解是恶性肿瘤包括胰腺癌发生浸润、转移的关键环节, MMPs 在此环节中扮演着主要角色。

MMPs 是一类锌离子依赖的蛋白水解酶家族,目前已发现有 20 余种成员,参与多种肿瘤的发生发展以及浸润转移过程。MMP-26 又称为基质溶解因子-2,是 MMP 家族的一名新成员,其基因定位于 11 号染色体短臂上的 15.3 基因座,其编码的蛋白由 261 个氨基酸残基组成,大小为 30 ku。是 MMPs 家族中迄今为止发现的最短的 MMP 蛋白,仅包含一

表1 MMP-26 的表达与胰腺癌患者临床病理特征之间的关系(n)

项目	n	MMP-26 表达阳性	χ^2 值	P 值
年龄(岁)				
<60	15	10	0.302	0.582
≥60	35	26		
性别				
女	21	16	0.315	0.574
男	29	20		
肿瘤大小(mm)				
<20	24	17	0.031	0.860
≥20	26	19		
部位				
胰头	38	29	1.463	0.226
胰体尾	12	7		
分化程度				
高	13	5	9.802	0.002
中-低	37	31		
淋巴结转移				
有转移	33	29	9.933	0.002
无转移	17	7		
神经侵犯				
有	27	21	0.972	0.324
无	23	15		
TNM 分期				
I ~ II	18	8	8.565	0.003
III ~ IV	32	28		

个信号序列、一个端功能前区和一个催化区,这种特殊结构在某种程度上跟其独特的酶激活机制、转录调节机制以及在生理及病理学过程中的特殊作用有关。MMP-26 能降解细胞外基质的多种成分,这提示 MMP-26 可能在肿瘤的进展及其血管生成过程中发挥重要作用^[1-3]。

近年来有很多研究^[4-8]显示 MMP-26 在肺癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌以及淋巴瘤中的表达高于其正常组织,然而, MMP-26 在胰腺及胰腺癌中的表达情况国内外还罕见报道。该研究通过免疫组化方法检测 50 例胰腺癌及配对癌旁正常组织中 MMP-26 蛋白的表达发现 50 例胰腺癌组织中有 36 例(72%)呈阳性表达,明显高于癌旁正常组(12%),这与 Bister et al^[9]的研究结果较为一致,同时通过 RT-PCR 法分别检测 10 例胰腺癌组织及配对癌旁组织中 MMP-26 mRNA 水平发现,有 7 例(70%)胰腺癌组 MMP-26 mRNA 的表达明显高于癌旁正常组,癌旁正常组织中少量表达,有的甚至未发现表达。进一步利用 Western blot 法检测其中 7 例胰腺癌及配对癌旁组织发现,有 5 例(71.4%) MMP-26 蛋白在胰腺癌中的表达高于癌旁正常组织。该研究结果表明无论是从基因还是蛋白水平上, MMP-26

与胰腺癌的发病均有关,免疫组化统计分析结果还显示, MMP-26 蛋白的表达在胰腺癌的 III ~ IV 期中的表达水平明显高于 I ~ II 期,在胰腺癌早期的表达显著低于晚期,在淋巴结转移者中的表达率明显高于无转移者,差异均有统计学意义,这表明 MMP-26 在胰腺癌的恶性进展及远处转移的过程中可能发挥重要作用。

本研究是从较浅层面上观察 MMP-26 在胰腺癌中的高表达状态,其促进肿瘤细胞侵袭和转移的潜在机制目前尚不清楚,需进一步的体外细胞学研究、动物实验及大样本的临床试验加以探索。总之, MMP-26 在胰腺癌的恶性进展及远处转移的过程中扮演着重要角色,并可能成为胰腺癌早期诊断的一个生物标志物以及临床治疗的新靶点。

参考文献

- [1] Park H, Turk B E, Gerbera F E, et al. Peptide substrate specificities and protein cleavage sites of human endometase/matrixlysin-2/matrix metalloproteinase-26 [J]. J Boil Chem, 2002, 277(38): 35168-75.
- [2] Li W, Savinov A Y, Rozanov D V, et al. Matrix metalloproteinase-26 is associated with estrogen-dependent malignancies and targets alpha1-antitrypsin serpin [J]. Cancer Res, 2004, 64(23): 8657-65.
- [3] Park H I, Jin Y, Hurst D R, et al. The intermediate S1' pocket of the endometase/matrixlysin-2 active site revealed by enzyme inhibition kinetic studies, protein sequence analyses, and homology modeling [J]. J Biol Chem, 2003, 278(51): 51646-53.
- [4] Li L, Mei T H, Zhou X D, et al. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase (MMP)-26 protein in non-small cell lung cancer [J]. Ai Zheng, 2009, 28(1): 60-3.
- [5] Gutschalk C M, Yanamandra A K, Linde N, et al. GM-CSF enhances tumor invasion by elevated MMP-2, -9, and -26 expression [J]. Cancer Med, 2013, 2(2): 117-29.
- [6] Yang H, Wang Y, Li Y, et al. Roles of matrix metalloproteinase-26 in the growth, invasion and angiogenesis of breast cancer [J]. Oncol Lett, 2012, 4(4): 832-6.
- [7] 冯永怀, 吴柳松, 苏俊, 等. MMP-26、TIMP-4 和 MMP-9 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的表达及意义 [J]. 中国实验血液学杂志, 2013, 21(5): 1167-72.
- [8] Khamis Z I, Zorio D A, Chung L W, et al. The anti-inflammatory role of endometase/matrixlysin-2 in human prostate cancer cells [J]. J Cancer, 2013, 4(4): 296-303.
- [9] Bister V, Skoog T, Virolainen S, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases-21 and -26 and TIMP-4 in pancreatic adenocarcinoma [J]. Mod Pathol, 2007, 20(11): 1128-40.

脑胶质瘤组织中 EDNRB 基因甲基化状态及其蛋白表达的意义

成金民¹ 朱立新² 王 斌¹ 邓鹏程¹ 徐培坤¹

摘要 目的 探讨人脑胶质瘤组织中 EDNRB 基因的甲基化状态及其蛋白表达的关系。方法 采用巢式 PCR、亚硫酸氢盐测序 PCR(BSP) 及免疫组织化学技术方法,检测 50 例脑胶质瘤组织标本中 EDNRB 基因启动子区甲基化状态,分析其甲基化水平、蛋白表达和临床资料之间的相关性。结果 脑胶质瘤组织中 EDNRB 基因启动子区甲基化率为 38% (19/50),其中低级别组(I 级~II 级)中 EDNRB 基因甲基化率为 26.5% (9/34),高级别组(III 级~IV 级)EDNRB 基因甲基化率为 62.5% (10/16),两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。而其中甲基化蛋白表达阳性率为 36.8% (7/19),未甲基化的蛋白表达阳性率为 71% (22/31)。结论 组织

中的 EDNRB 基因启动子区 CpG 岛高甲基化与胶质瘤的发病有关,与胶质瘤的病理级别关系密切,而与患者年龄、性别、肿瘤分型无关;基因甲基化率抑制其蛋白表达。

关键词 脑胶质瘤; 内皮素受体 B; 甲基化; 蛋白表达

中图分类号 R 739.1; R 730.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)07-0984-04

脑胶质瘤是神经系统最常见的恶性肿瘤。目前,国内外研究^[1]已经证实部分基因甲基化与胶质瘤密切相关。EDNRB 基因甲基化现象已在多个系统的恶性肿瘤中被陆续检测出,但脑胶质瘤中尚未见 EDNRB 甲基化的报道。该研究采用巢式 PCR 方法和亚硫酸氢盐监测序 PCR(BSP)方法研究脑胶质瘤组织中 EDNRB 基因的甲基化状态,分析其与胶质瘤患者年龄、性别、病理分型、病理级别的关系,了解其在脑胶质瘤发生、发展过程中的作用;并通过免疫组化法研究胶质瘤基因发生甲基化与未发生甲基化情况下各自的蛋白表达情况,以分析基因甲基化与

2014-02-17 接收

基金项目:安徽省卫生厅基金(编号:2010B013)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院¹ 神经外科、² 中心实验室,合肥 230022

作者简介:成金民,男,硕士研究生;

徐培坤,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: xpk5909@163.com

MMP-26 mRNA and protein expression in pancreatic cancer and its clinical significance

Wu Nianfu, Tang Zhigang, Chen Jiong, et al

(Dept of Bile Pancreatic Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To detect MMP-26 expression in human pancreatic cancer and to investigate its role and significance in the progression of pancreatic cancer. **Methods** Immunohistochemistry, RT-PCR and Western blot were used to detect MMP-26 mRNA and protein in pancreatic cancer and adjacent normal tissue, to investigate the relationship between the clinical and pathological features of pancreatic cancer with MMP-26. **Results** The positive expression rate of MMP-26 protein was significantly higher in pancreatic cancer (72%) than in adjacent normal tissues (6%) by immunohistochemical method, difference was considered statistically significant ($P < 0.05$). The high expression of MMP-26 was correlated with pancreatic differentiation, TNM stage and lymph node metastasis. RT-PCR detected 10 cases of pancreatic cancer tissues and adjacent normal tissues respectively, in which 7 cases (70%) were discovered the positive expression of MMP-26 mRNA was significantly unregulated in pancreatic tissue than in adjacent normal tissues. Western blot detected 7 cases of pancreatic cancer tissues and adjacent normal tissues respectively, in which 5 cases (71.4%) were discovered the positive expression of MMP-26 mRNA was significantly higher in pancreatic tissue than in adjacent normal tissue. **Conclusion** The expression of MMP-26 is correlated with pancreatic differentiation, TNM stage and lymph node metastasis, may become a novel biomarker and clinical therapeutic target of pancreatic cancer.

Key words pancreatic cancer; MMP-26; protein expression