

MMP-14 与 EMMPRIN 在口腔鳞状细胞癌中的表达及临床意义

陶 治 张令达

摘要 目的 探讨基质金属蛋白酶-14(MMP-14)和细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(EMMPrin)在口腔鳞状细胞癌(OSCC)中的表达及其临床意义,并对二者的相关性进行分析。方法 应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术对43例手术切除的OSCC组织及11例口腔正常组织(NOT)中的MMP-14及EMMPrin mRNA的表达进行检测。结果 MMP-14及EMMPrin mRNA在OSCC组中的表达均高于NOT组($P < 0.05$)。在有淋巴结转移组的表达均高于无淋巴结转移组($P < 0.05$),两者的表达均与肿瘤的病理分期、分化程度及淋巴结转移有关,与患者的性别和年龄无关。相关性分析显示MMP-14及EMMPrin mRNA之间呈正相关($r = 0.801, P < 0.01$)。结论 MMP-14和EMMPrin基因的异常表达与OSCC的发生、发展和转移密切相关,联合检测MMP-14和EMMPrin mRNA的表达状况可以为评价OSCC恶性程度及患者预后提供参考。

关键词 口腔鳞状细胞癌; 逆转录-聚合酶链反应; 基质金属蛋白酶-14; 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子

中图分类号 R 739.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)01-0081-04

口腔癌是头颈部最常见的恶性肿瘤之一,其中口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是口腔颌面部最为常见的恶性肿瘤,占口腔颌面部恶性肿瘤的80%以上^[1-2],且近年来发病率呈上升趋势,目前对其发生、发展机制已有了进一步的认识,但患者术后复发及转移的风险程度在治疗前仍未能进行较好的判定。研究^[3-4]表明基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)与肿瘤的浸润、转移密切相关,其中基质金属蛋白酶-14(matrix metalloproteinase 14, MMP-14)在多种肿瘤中都有表达,而细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPrin)对各种MMPs都有一定的诱导作用。该研究采用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)技术对OSCC组织及口腔正常组织(normal oral tissue, NOT)中MMP-14及EMM-

PRIN mRNA的表达进行检测,探讨两者在OSCC发生、发展中的作用及关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源 选取2011年10月~2013年2月在安徽医科大学第一附属医院口腔颌面外科行手术治疗,并经病理组织学检查确诊的OSCC患者的新鲜组织标本43例作为OSCC组,其中男25例,女18例,年龄43~79岁,平均年龄54岁;发生淋巴结转移者16例,未发生淋巴结转移者27例;参照1997年WHO病理学标准分级:高分化22例,中低分化21例;按国际抗癌联盟(UICC 2002)口腔癌TNM分类分期:I~II期24例,III~IV期19例。所有OSCC病例均为首次确诊,有完整的临床及病理资料,无其他恶性肿瘤史且无家族肿瘤史,术前均无放化疗及其他抗肿瘤治疗。另选11例行阻生齿拔除术或牙槽嵴修整术患者的口腔正常新鲜组织标本(无肿瘤病史)为阴性对照组(NOT组),其中7例取自阻生齿拔除患者,4例取自牙槽嵴修整患者。所有标本都是术中取材后立即置于液氮中,然后移至-80℃超低温冰箱中贮存备用。

1.2 主要试剂及仪器 TRIzol试剂、逆转录试剂盒(美国Fermentas公司);PCR试剂和Taq DNA聚合酶(美国Fermentas公司);琼脂糖凝胶(英国OXOID公司);DNA Marker(美国Fermentas公司);溴化己啶(10 mg/ml)(美国Sigma公司)。2720型PCR仪器(美国ABI公司);DYY-6B型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂);TGL-18R冷冻离心机、TGL-16H冷冻离心机(黑马仪器公司);GSM凝胶图像分析管理系统(3.0)(美国SIM公司);JY2002型和FA2004型电子天平(上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 提取总RNA并逆转录成cDNA 用TRIzol提取总RNA,溶于80 μl DEPC水中,用逆转录试剂盒逆转录,操作按试剂盒说明书进行,取出最后的反应液,即为cDNA。加入DEPC水80 μl,-20℃保存。

1.3.2 扩增及电泳 以2 μl逆转录产物作为模

2013-09-27 接收

作者单位:安徽医科大学第一附属医院口腔颌面外科,合肥 230022

作者简介:陶 治,女,硕士研究生;

张令达,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: zhanglingda1020@sina.com

板选用 PCR 扩增试剂在 PCR 仪上进行 PCR 扩增, 以 β -actin 为内参。MMP-14 和 EMMPRIN 及内参 β -actin 引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司运用 Primer Premier 5.0 软件设计并合成, 见表 1。在 PCR 仪中, MMP-14 的扩增条件为: 95 ℃ 5 min, 94 ℃ 45 s, 55 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 共 35 个循环。EMMPRIN 的扩增条件: 95 ℃ 5 min, 94 ℃ 45 s, 55 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 共 35 个循环。内参照 β -actin 的 PCR 扩增条件为: 95 ℃ 5 min, 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 共 30 个循环。反应结束后, 取适量 PCR 反应产物于 2% 的琼脂糖凝胶上电泳(120 V, 40 min), EB 染色。用数字化凝胶成像系统半定量分析电泳条带的灰度值并采集图像, 结果以目的条带与内参条带的灰度值比值表示。每个样本重复 3 次。

表 1 MMP-14、EMMPRIN 及内参 β -actin 引物序列和片段长度

基因片段	引物序列(5'-3')	片段大小 (bp)
MMP-14	上游 CCGATCTGGTGTCCAGACA	594
	下游 AACCTGACTCACCCCCATA	
EMMPRIN	上游 GCGGTTGGAGGGTGTACGC	401
	下游 CCCCTCGTTGATGTTCT	
β -actin	上游 GCCGAGGACTTTGATTGCAC	307
	下游 ACCAAAAGCCTCATACATCTCA	

1.4 统计学处理 使用 Epidata3.1 进行数据录入, 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析, 采用 χ^2 检验分析 MMP-14 及 EMMPRIN mRNA 在 OSCC 组织中的表达差异, 两种指标之间的表达相关性采用 Spearman 秩相关系数检验。

2 结果

2.1 两组中 MMP-14、EMMPRIN mRNA 的表达 半定量分析结果显示, NOT 组中 MMP-14 和 EMMPRIN mRNA 相对表达量分别为 (0.017 ± 0.030) 和 (0.017 ± 0.038), OSCC 组中 MMP-14 和 EMMPRIN mRNA 的相对表达量分别为 (0.112 ± 0.069) 和 (0.163 ± 0.084), OSCC 组显著高于 NOT 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1。MMP-14 及 EMMPRIN mRNA 在 OSCC 组中的阳性表达率均高于其在 NOT 组中的阳性表达率 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.2 MMP-14、EMMPRIN mRNA 表达与 OSCC 患者临床病理参数的关系 MMP-14 和 EMMPRIN 的 mRNA 表达在 OSCC 患者年龄、性别参数方面的

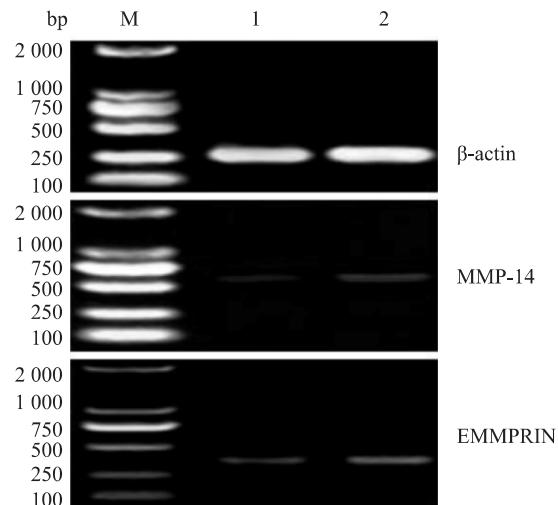


图 1 MMP-14 及 EMMPRIN mRNA RT-PCR 产物电泳结果

M: DL2000 Marker; 1: NOT 组; 2: OSCC 组

表 2 MMP-14 和 EMMPRIN mRNA 在 OSCC 组及 NOT 组中的阳性表达率 [$n(%)$]

组别	MMP-14 mRNA		EMMPRIN mRNA	
	+	-	+	-
OSCC	32(74.42)	11(25.58)*	35(81.40)	8(18.60)*
NOT	3(27.27)	8(72.73)	2(18.18)	9(81.82)

与 NOT 组比较: * $P < 0.05$

差异无统计学意义,但在伴有淋巴结转移的 OSCC 组织中的表达均显著高于无淋巴结转移的 OSCC 组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Ⅲ~Ⅳ期 OSCC 患者病变组织中 MMP-14 和 EMMPRIN 的 mRNA 表达均高于 I~Ⅱ期 OSCC 组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 中低分化的 OSCC 组织中 MMP-14 和 EMMPRIN 的 mRNA 表达均高于高分化的 OSCC 组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

2.3 MMP-14 和 EMMPRIN 在 OSCC 组织中表达的相关性 经 Spearman 秩相关系数检验结果表明, 在 OSCC 中 MMP-14 和 EMMPRIN mRNA 之间呈正相关 ($r = 0.801, P < 0.01$), 随着 EMMPRIN 表达的增强, MMP-14 的表达也相应增强。

3 讨论

恶性肿瘤的主要生物学特征是浸润和转移, 是影响预后的重要因素, 肿瘤细胞突破基底膜 (basement membrane, BM) 和降解细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM) 是恶性肿瘤转移的关键步骤。正常情况下, ECM 处于不断生长和不断降解的动态平衡中, ECM 的降解依靠蛋白水解酶, 而 MMPs 是目前已知的蛋白水解酶中较为重要的一类, 这是一组

表3 MMP-14、EMMPRIN mRNA 在 OSCC 组织中的表达与临床病理的关系($\bar{x} \pm s$)

项目	n	MMP-14 mRNA	P 值	EMMPRIN mRNA	P 值
性别					
男	25	0.100 ± 0.072	0.084	0.165 ± 0.080	0.490
女	18	0.128 ± 0.062		0.159 ± 0.091	
年龄(岁)					
<54	15	0.105 ± 0.080	0.085	0.151 ± 0.098	0.119
≥54	28	0.116 ± 0.064		0.169 ± 0.077	
分期					
I ~ II	24	0.095 ± 0.076	0.000	0.139 ± 0.096	0.002
III ~ IV	19	0.134 ± 0.052		0.192 ± 0.056	
淋巴结转移					
无	27	0.101 ± 0.075	0.005	0.147 ± 0.093	0.022
有	16	0.130 ± 0.054		0.190 ± 0.060	
分化程度					
高分化	22	0.095 ± 0.075	0.008	0.143 ± 0.094	0.049
中低分化	21	0.131 ± 0.058		0.183 ± 0.069	

结构相近、功能复杂的蛋白水解酶,因其需要锌离子等金属离子作为辅助因子而得名,几乎可以降解 ECM 的所有成分和其他一些底物^[5]。在肿瘤细胞介导的 ECM 降解中,MMPs 起关键作用,因此,MMPs 在肿瘤的浸润、转移中的作用近年来备受关注。MMP-14 又称为膜型基质金属蛋白酶 1 (membrane-type 1 matrix metalloproteinase,MT1-MMP),是 MMPs 家族的新成员,属于 I 型穿膜蛋白,它的最大特点是质膜锚定结构域的存在^[6~7],因此 MMP-14 蛋白在细胞内被激活后,在细胞表面表达。有研究^[8]表明,MMP-14 可以介导 MMP-2 酶原的激活,与 MMP-2 协同参与了多种肿瘤的侵袭和转移过程。另外活性 MMP-14 蛋白自身可以通过降解 BM 或 ECM,使肿瘤细胞穿透 BM,促进侵袭和转移,还可以通过诱导肿瘤新生血管生成,促进肿瘤进一步生长,为肿瘤细胞人体内循环系统实现转移提供条件^[9]。本研究结果表明 MMP-14 的表达与 OSCC 的病理分期、分化程度及淋巴结转移有关,提示 MMP-14 可能在 OSCC 的发生发展、浸润转移中起重要作用,这与郭玉娥 等^[7]在宫颈鳞癌中的研究是一致的,张欣 等^[10]对食管鳞癌的研究也得出了类似的结论。

EMMPRIN 是免疫球蛋白超家族成员,是一种广泛存在于细胞表面的糖蛋白,因纯化的该蛋白可刺激人成纤维细胞分泌基质金属蛋白酶而得名。人类的 EMMPRIN 基因位于 19q13.3 染色体上,其 mRNA 长度大约 117 kb,相对分子质量约 58 000^[11]。EMMPRIN 在正常组织中表达有限,但在多种肿瘤组织中通常呈高表达,而且其表达水平

与肿瘤的浸润转移关系密切。目前有研究^[12]显示,EMMPRIN 可直接刺激血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF) 的生成,促进肿瘤内新生血管的形成,还可通过刺激间质细胞及肿瘤细胞本身分泌 MMPs,从而促进恶性肿瘤的侵袭和转移^[4,13]。本研究中,EMMPRIN 在 OSCC 组中的表达明显高于 NOT 组,并且有淋巴结转移组的表达明显高于无淋巴结转移组。在有淋巴结转移者,原发病灶 EMMPRIN 表达显著高于无淋巴结转移者的原发病灶,显示这部分病例具有高侵袭性特点,提示 EMMPRIN 可能在 OSCC 的侵袭及转移过程中发挥重要作用,这与赵丽 等^[14]实验结果一致。另外,EMMPRIN 的高表达与 OSCC 的病理分期相关,说明 EMMPRIN 在 OSCC 侵袭、转移中发挥重要的作用,可能与 OSCC 的预后相关。笔者推测 EMMPRIN 在 OSCC 中的表达越高,患者预后可能越差,这与黄志权 等^[15]对舌鳞状细胞癌的研究结果相一致。本研究对 OSCC 组织中的 MMP-14 和 EMMPRIN 的表达进行了相关性分析,初步证实两者呈正相关,提示 OSCC 组织中的 MMP-14 一部分可能由肿瘤细胞自分泌产生,另一部分可能由 EMMPRIN 诱导 OSCC 组织合成和分泌而产生。

综上所述,MMP-14 和 EMMPRIN 在 OSCC 中的高表达均与肿瘤的病理分期、分化程度及淋巴结转移有关,与患者的年龄、性别无关,提示两者均参与 OSCC 的浸润及转移。由于两者的表达呈正相关,两者的表达强度均随癌组织分化程度的降低而升高,说明 MMP-14 和 EMMPRIN 在 OSCC 的发生、发展中具有协同作用,进一步导致肿瘤的侵袭及转移。据此可以认为联合检测 EMMPRIN 及 MMP-14 mRNA 的表达状况可能有助于判断 OSCC 的恶性程度及患者预后转归,值得进一步研究。

参考文献

- [1] Cooper J S ,Porter K ,Mallin K ,et al. National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update [J]. Head Neck 2009, 31(6): 748~58.
- [2] 邱蔚六. 口腔颌面外科学 [M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 274.
- [3] Taylo P M ,Woodfield R J ,Hodgkin M N ,et al. Breast cancer cell-derived EMMPRIN stimulates fibroblast MMP2 release through a phospholipase A(2) and 5-lipoxygenase catalyzed pathway [J]. Oncogene 2002, 21(37): 5765~72.
- [4] Gabison E E ,Hoang-Xuan T ,Mauviel A ,et al. EMMPRIN/CD147 an MMP modulator in cancer, development and tissue repair [J]. Biochimie 2005, 87(3~4): 361~8.

- [5] 王云炎,侯建全.温端改.膀胱癌组织中 MMP-2 与 TIMP-2 mRNA 的表达及临床意义[J].实用肿瘤学杂志,2010,24(1):29–32.
- [6] Sato H, Takino T, Okada Y. MT-MMP expression and localization in human lung and breast cancers [J]. Nature, 1994, 370(7): 61–5.
- [7] 郭玉娥,杨尧华. MMP-14 在宫颈鳞癌中的表达及临床意义 [J]. 宁夏医科大学学报, 2010, 32(2): 223–6.
- [8] Ueda J, Kajita M, Suenaga N, et al. Sequence-specific silencing of MT1-MMP expression suppresses tumor cell migration and invasion: importance of MT1-MMP as a therapeutic target for invasive tumors [J]. Oncogene, 2003, 22(54): 8716–22.
- [9] 宋继荣,潘月娜,董颖. MMP26、MMP14 蛋白在正常宫颈、宫颈上皮内瘤变及浸润性宫颈鳞癌中的表达及意义 [J]. 黑龙江医药科学, 2011, 34(6): 81–2.
- [10] 张欣,张会超,郭建文,等. Axin 与 MMP-14 在食管鳞癌中的表达及与浸润转移的关系 [J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(11): 1409–11.
- [11] Rosenthal E L, Zhang W, Talbert M, et al. Extracellular matrix metalloprotease inducer-expressing head and neck squamous cell carcinoma cells promote fibroblast-mediated type I collagen degradation *in vitro* [J]. Mol Cancer Res, 2005, 3(4): 195–202.
- [12] Riethdorf S, Reimers N, Assmann V, et al. High incidence of EMM-PRIN expression in human tumors [J]. Int J Cancer, 2006, 119(8): 1800–10.
- [13] Tang Y, Nakada M T, McCabe F, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinase [J]. Cancer Res, 2005, 65(8): 3193–9.
- [14] 赵丽,张令达. EMMPRIN、MMP-7 在口腔鳞状细胞癌中的表达及临床意义 [J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(6): 687–90.
- [15] 黄志权,李海刚,黄洪章,等. 舌鳞癌组织细胞外基质金属蛋白酶诱导因子的表达及其与预后的关系 [J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2010, 8(2): 154–9.

Expression and significance of MMP-14 and EMMPRIN in human oral squamous cell carcinoma

Tao Ye Zhang Lingda

(Dept of Oral and Maxillofacial Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the expression and significance of MMP-14 and EMMPRIN and the correlation between them in oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods** The expression of MMP-14 and EMMPRIN mRNA in 43 cases of OSCC and 11 cases of normal oral tissue were detected by RT-PCR. **Results** The expression of MMP-14 and EMMPRIN mRNA in OSCC was significantly higher than those in normal oral tissue ($P < 0.05$). Compared with those without lymph node metastasis in OSCC, the expression of MMP-14 and EMMPRIN mRNA with lymph node metastasis was significantly higher ($P < 0.05$). Furthermore, the expression of MMP-14 and EMMPRIN was significantly associated with pathological stage and the lymph node metastasis, but neither of them was correlated with sex and age. Correlation analysis showed that MMP-14 expression level was positively related to EMMPRIN level ($r = 0.801, P < 0.01$). **Conclusion** The expression of MMP-14 and EMMPRIN in OSCC is significantly correlated with occurrence, progress and metastasis of OSCC. Therefore, the combination of detecting the expression of MMP-14 and EMMPRIN mRNA may evaluate the degree of malignancy and predict the prognosis of patients with OSCC.

Key words oral squamous cell carcinoma; reverse transcription-polymerase chain reaction; MMP-14; EMMPRIN