

文章编号:1005-6947(2007)01-0069-04

· 基础研究 ·

乳腺癌和纤维瘤中 RECK-mRNA 和 MMP9-mRNA 的表达差异及意义

霍志军¹, 陈道瑾¹, 李小荣¹, 唐利立², 吴唯¹

(1. 中南大学湘雅三医院 普外二科, 湖南 长沙 410013; 2. 中南大学湘雅医院 乳腺外科, 湖南 长沙 410008)

摘要:目的 探讨 RECK-mRNA 和 MMP9-mRNA 在乳腺良、恶性肿瘤中的表达和意义。方法 抽取乳腺肿瘤组织总 RNA, 采用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 39 例乳腺癌和 14 例乳腺纤维腺瘤组织中 RECK-mRNA 和 MMP9-mRNA 的表达, 分析其关系。结果 乳腺癌组织 RECK mRNA (与内参比值)为 0.625 ± 0.199 , 较纤维瘤组织的 0.778 ± 0.278 明显降低 ($P < 0.05$), MMP-9 mRNA 在癌中为 1.342 ± 0.168 , 比纤维瘤的 0.790 ± 0.157 明显升高 ($P < 0.01$)。结论 RECK 作为一种抑癌基因, 在乳腺良恶性肿瘤中表达呈负相关, 可抑制 MMP-9 的表达, 从而抑制乳腺癌的发生和转移。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(1): 69-72]

关键词: 乳腺肿瘤/病理学; RECK 基因; 基质金属蛋白酶-9; 基因表达

中图分类号: R737.9; R73-3

文献标识码: A

The expression of the RECK mRNA and MMP-9 mRNA in the breast cancer and fibroadenoma tissues

HUO Zhi-jun¹, CHEN Dao-jin¹, LI Xiao-rong¹, TANG Li-li², WU Wei¹

(1. the Second Department of General Surgery, the Third Xiangya Hospital, Central-South University, Changsha 410013, China; 2. Department of Breast Surgery, Xiangya hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: Objective To investigate the expression level of RECK -mRNA and MMP-9-mRNA in breast cancer (BC) and fibroadenoma tissues and its significance. **Methods** The mRNA level of tissues of 39 cases of breast cancer and 14 cases of fibroadenoma was measured by RT-PCR technique and its correlation was analyzed. **Results** The mRNA level of RECK gene in breast cancer tissues was markedly lower than that in fibroadenoma tissues, while the MMP-9 level was higher in BC tissues. **Conclusions** RECK is a tumor suppressor gene, the expression in benign and malignant breast tissues is a negative relationship. BECK can inhibit the expression of MMP-9 and thus, inhibit the growth and metastasis of breast cancer.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(1): 69-72]

Key words: Breast Neoplasms/Pathol; Gene, RECK; MMP-9; Gene Expression

CLC number: R737.9; R73-3

Document code: A

RECK 基因是 1998 年发现的肿瘤抑制基因, 系由 v-Ki-ras 基因转染到小鼠的纤维原细胞 (NIH3 T3) 而克隆到的 cDNA 表达中分离所得, 其定位于染色体 9p12-13。RECK 的 cDNA 编码 GPI(糖基磷脂酰肌醇)锚定的糖蛋白, 相对分

子质量为 110 kD。研究^[1]表明 RECK 蛋白可以抑制 MMP-9 分泌及其酶解活性而发挥作用。RECK 抑制 MMPs 的分子机制尚未明了。本文在 mRNA 水平研究 RECK 基因和 MMP-9 在乳腺癌中的表达及与乳腺癌其他病理因素的关系和意义。

1 材料和方法

1.1 病例分组及一般资料

1.1.1 乳腺癌组 39 例, 为湘雅三医院 2005 年 9 月—2006 年 5 月间手术治疗的原发性乳腺癌女

收稿日期:2006-09-05; 修订日期:2006-12-15。

作者简介:霍志军,男,山东夏津人,中南大学湘雅三医院住院医师,主要从事乳腺癌转移机制及治疗方面的研究。

通讯作者:霍志军 E-mail:hzy197610@163.com。

性患者,年龄 26~75 岁,中位年龄 48.4 岁。术前均未化疗。已绝经者 17 例,未绝经者 22 例。按乳腺癌国际 TNM 临床分期: I 期 3 例, II 期 27 例, III 期 9 例。腋窝淋巴结转移阴性 15 例,腋窝淋巴结转移阳性 24 例。

1.1.2 乳腺纤维瘤组 14 例,为同期手术治疗的乳腺纤维瘤女性患者。年龄 19~41 岁,中位年龄为 30.5 岁。

所有病例术后均经病理检查证实诊断。每例标本取材后迅速投入液氮中速冻,然后置于 -70°C 的冰箱保存备用。

1.2 检测项目及方法

1.2.1 RECK-mRNA 与 MMP-9mRNA 的检测

(1) 组织总 RNA 提取 Trizol 为 Invitrogen 公司产品,按操作说明书步骤提取每例标本的总 RNA 后,在 Gene Amp 扩增仪上进行 RT-PCR。根据紫外可见分光光度计测得各管总 RNA 浓度,OD 值大于等于 1.8 者为理想,浓度在 $800\sim 1400\mu\text{g}/\text{mL}$,各取 $4\mu\text{L}$ 总体积的 RNA 逆转录成 cDNA。逆转录条件:加无核酸酶水至反应体系 $20\mu\text{L}$, 42°C 1h, 70°C 变性 10min,反应完毕后取出,冰上放置 5min,将生成的 cDNA 置于 -20°C 保存。分别取一定量的 cDNA 进行 PCR 扩增。(扩增目的基因和内参照基因时候所加引物,cDNA 模板量均一致。在两个 EP 管内进行,但为同一温度和 $10\mu\text{L}$ 反应体系),加引物(上下游混合后) $1\mu\text{L}$,模板 $1.2\mu\text{L}$,余按说明操作。(2) 引物设计及合成 Primer 5 设计引物 RECK 以及内参照 β -actin 基因的引物序列, MMP-9 的引物序列查文献获得。引物由上海生工生物有限公司合成。RECK 基因引物(产物 337bp): $5'$ -TGCTCTACCCGCCTTTGCC- $3'$ (上游), $5'$ -GATCTTGGACCTGGTCACACGC- $3'$ (下游)。MMP-9 基因引物(产物 350bp): $5'$ -GACTCG-GTCTTTGAGGAGCC- $3'$ (上游), $5'$ -GAACT-CACGCGCCAGTAGAA- $3'$ (下游)。

β -actin 基因引物(产物 540bp) $5'$ -GGACCT-GACTGACTACCTC- $3'$ (上游), $5'$ -TCATACTCCT-GCTTGCTG- $3'$ (下游)(3) PCR 条件:RECK 基因的 PCR 条件为 95°C , 3min, 94°C , 45s, 退火 61°C , 40s; 延伸: 72°C , 1min, 然后 4°C 保存反应产物。MMP-9 基因的 PCR 反应条件:为 95°C , 3min, 94°C , 45s, 退火 56°C , 40s; 延伸 72°C ,

1min。内参照 β -actin 的 PCR 反应条件随目的基因同时进行,扩增循环均为 35 个循环。扩增结束后,用微量移液器取目的基因 PCR 产物和内参照基因的 PCR 产物各 $4\mu\text{L}$ 与载样液混匀后(按 4:1),分别加入各孔。2% 琼脂糖凝胶电泳检测并照像保存。各目的基因扩增重复 3 次,取均值。凝胶电泳分析仪处理,用平均吸光度乘以条带面积的值表示总的吸光度值代表各基因 mRNA 量。将目的基因与 β -actin 基因的电泳条带的平均光密度和面积乘积的相对比值(目的基因/ β -actin)作为目的基因的相对表达量。

1.2.2 组织雌激素、孕激素受体及 Cerb-b2 受体检测 所取组织在我院病理科作 HE 染色后,继采用免疫组化 SP 三步法测 ER, PR, Cerb-b2 状况。一抗 ER, PR, Cerb-b2, 免疫组化 SP 试剂盒、浓缩型 DAB 试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司。ER, PR 一抗工作浓度均为 1:50, Cerb-b2 工作浓度 1:100。ER, PR 结果判断:以胞核着色判断为阳性,随机选择 5 个高倍视野,计数 500 个以上细胞。根据阳性细胞数及细胞染色强度进行半定量。无阳性细胞,计 0 分;阳性细胞数 1%~30%,计 1 分;31%~70% 计 2 分;71%~100% 计 3 分。再根据阳性着色强度依次计 1, 2, 3 分(浅棕色为 1 分,棕黄色为 2 分,深棕色为 3 分),每张切片进行两项分数累计,0 分为阴性,1~2 分为(+),3~4 分为(++),5~6 分为(+++)。

Cerb-b2 染色结果判断标准:以细胞膜呈棕色为染色阳性;视野内 $>10\%$ 癌细胞者为(+)~(++),染色连续,环绕整个胞膜,为(+++),无棕色为阴性。

1.3 统计学处理

数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计处理用 SPSS12.0.1 软件分析,两组样本间均数比较采用独立样本 T 检验,三组样本间均数比较时,采用方差分析(ANOVA)的 F 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 RECK-mRNA 的表达

RECK-mRNA 在乳腺癌中表达率为 82.0% (32/39);32 例中平均表达水平为 0.625 ± 0.199 。

纤维瘤中, RECK-mRNA 表达率为 100% (14/14), 平均表达水平为 0.778 ± 0.278 。(不表达标准是:模板连续 3 次 PCR, 内参基因扩增出条带, 而 RECK 基因无目的条带。) RECK 基因在乳腺癌中表达明显下调 ($P = 0.037$) (图 1) (表 1)。

2.2 MMP-9mRNA 的表达

纤维瘤中 MMP-9mRNA 均有表达, 平均水平 0.790 ± 0.157 。在乳腺癌中亦都有表达, 平均表达水平升高, 为 1.342 ± 0.168 ($P < 0.01$)

(表 1)(图 2)。

表 1 乳腺良恶性组织中 RECK, MMP-9 表达

组织	n(例数)	RECK/ β -actin	MMP-9/ β -actin
乳腺癌	39	0.625 ± 0.199 (32/39)	1.342 ± 0.168 (39/39)
纤维瘤	14	0.778 ± 0.278	0.790 ± 0.157
P 值		<0.05	<0.01

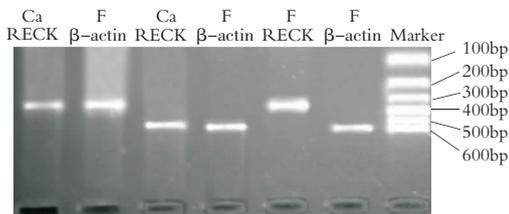


图 1 癌组织和乳腺纤维瘤中 RECK-mRNA 及 β -actin-mRNA 表达 F: 纤维瘤; Ca: 乳腺癌

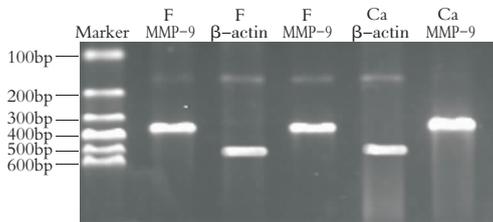


图 2 乳腺癌和纤维瘤中 MMP-9mRNA 及 β -actin-mRNA 的 PCR 图像 F: 纤维瘤; Ca: 乳腺癌

2.3 RECK-mRNA 在乳腺癌中与各病理参数的关系

RECK-mRNA 的表达与乳腺癌的临床分期、患者年龄淋巴结转移、雌激素和孕激素受体、Cerb-b2 受体均无相关性 (均 $P > 0.05$) (表 2)。

2.4 MMP-9mRNA 在乳腺癌中与各病理参数的关系

MMP-9mRNA 的表达水平与乳腺癌的淋巴结转移、临床分期存在显著的相关性 ($P < 0.05$)。但与年龄、雌激素、孕激素受体状况以及 cerbB-2 受体状况无明显相关 ($P > 0.05$) (表 2)。

表 2 乳腺癌中 RECK, MMP-9mRNA 与临床病理因子的关系

乳腺癌	n	RECK/ β -actin	P 值	MMP-9/ β -actin	P 值
	39	RECK32 例阳性		39 例	
临床分期					
I	3	0.486 ± 0.109		0.936 ± 0.136	
II	27	0.606 ± 0.196	$F = 0.78$	1.172 ± 0.420	$F = 12.092$
III	9	0.648 ± 0.179	$P = 0.468$	1.746 ± 0.563	$P = 0.000$
淋巴结转移					
(-)	15	0.583 ± 0.128	0.63	1.088 ± 0.456	0.036
(+)	24	0.616 ± 0.216		1.472 ± 0.579	
年龄级					
≤ 50 岁	23	0.603 ± 0.202	0.841	1.270 ± 0.468	0.350
> 50 岁	16	0.616 ± 0.144		1.431 ± 0.631	
雌激素受体					
(-)	16	0.615 ± 0.230	0.776	1.283 ± 0.476	0.701
(+ ~ + + +)	23	0.595 ± 0.151		1.354 ± 0.623	
孕激素受体					
(-)	21	0.624 ± 0.228	0.515	1.259 ± 0.433	0.436
(+) ~ (+ + +)	18	0.580 ± 0.128		1.402 ± 0.688	
Cerb-b2					
(-)	22	0.634 ± 0.206	0.234	1.235 ± 0.511	0.260
(+) ~ (+ + +)	17	0.553 ± 0.158		1.442 ± 0.617	

3 讨论

MMPs 是一族锌离子依赖性蛋白水解酶,目前发现有 23 种,它们是参与细胞外基质代谢的主要酶类,在肿瘤侵袭转移的过程中,此类蛋白酶(尤其以 MMP-2, MMP-9)起了非常重要的作用。MMPs 可降解细胞外基质 (ECM) 而形成肿瘤细胞转移的通道^[2]。RECK 基因是一 MMP 抑制剂,与较早研究的 MMP 抑制剂 TIMP 有所不同^[3],它在转录后水平至少能抑制 MMP-2, MMP-9 和 MT1-MMP 等 3 种 MMP^[4]。RECK 基因在多种正常人体组织及细胞株中多有表达,但在肿瘤组织中均低表达或不表达^[5]。本实验表明:RECK 基因在乳腺癌中表达明显下调,但与分期,淋巴结状况,年龄,雌,孕激素受体状况以及 Cerb-b2 受体状况无明显关系。

RECK 基因抑制 MMP 的具体作用机制尚不明了。其在癌转移中扮演的角色,是可抑制肿瘤新生血管的形成和癌转移^[6]。在 RECK 表达缺乏的情况下,过度的 MMP 活性使 ECM 过多的降解,引起血管结构完整性减弱;这样反过来又延缓早期脉管网络的成熟。在有较高 RECK 表达时,MMP 的活性减弱到一定程度,ECM 重塑减弱,先期发生的血管形成毛细血管萌芽和产生新血管的能力被抑制。因此,RECK 和 MMP 活性的大小和空间模式对于新生血管成熟是至关重要的^[6]。

乳腺癌的主要威胁在于侵袭和转移,RECK 作为抑癌基因对肿瘤侵袭及转移具有负向调控作用。有些原癌基因可通过抑制 RECK 表达而促进肿瘤细胞侵袭转移,例如在 HER-2/neu 过表达的 B104-1-1 细胞,RECK 的表达受到抑制,侵袭能力增加^[7]。因此可以推测能够上调癌细胞中

的 RECK 表达的药物或非人工化合物可能成为阻止肿瘤转移的潜在物质。或者通过基因治疗,使 RECK 低表达或者不表达的癌细胞中的 RECK 正常表达,亦可抑制肿瘤的侵袭转移,从而为乳腺癌的治疗开辟一个新的重要途径。

参考文献:

- [1] Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, et al. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95 (22): 13221 - 13226.
- [2] Bisson C, Blacher S, Polette M, et al. Restricted expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase by myoblasts adjacent to human breast cancer cells [J]. Int j cancer, 2003, 105 (1) 7 - 13.
- [3] 申培红,张云汉,李惠翔. MMP-2 和 TIMP-2 蛋白在乳腺癌组织中的表达及其与肿瘤转移的关系 [J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13 (5): 375 - 377.
- [4] Rhee JS, Coussens LM. RECKing MMP function: implications for cancer development [J]. Trends cell boil, 2002, 12 (5): 209 - 211.
- [5] Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, et al. Regulation of matrix metal proteinase - 9 and inhibition of tumor invasion by the membrane anchored glycoprotein RECK [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95 (22): 13221 - 13226.
- [6] Oh J, Takahashi R, Kondo S, et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis [J]. Cell 2001, 107 (6): 789 - 800.
- [7] Hsu MC, Chang HC, Hung WC, et al. HER-2/neu represses the metastasis suppressor RECK via ERK and Sp transcription factors to promote cell invasion [J]. J Biol Chem, 2006, 281 (8): 4718 - 4725.