

· 专题报道 ·

膀胱癌组织中 MMP-2、MMP-9、VEGF 和 RECK 基因的表达及临床意义

鄢 阳, 郑军华*, 许云飞, 张海民, 黄建华, 彭 波, 高其若, 黄国华, 巢月根, 孔宪国

(同济大学附属第十人民医院泌尿外科, 上海 200072)

[摘要] **目的:**观察 MMP-2、MMP-9、VEGF 和 RECK 基因在膀胱癌组织中的表达,探讨膀胱癌转移可能的基因机制。**方法:**采用 RT-PCR 法检测 50 例膀胱癌手术切除标本中 MMP-2、MMP-9、VEGF 和 RECK 基因的表达,并分析其临床意义。**结果:**MMP-2、MMP-9、VEGF 和 RECK 在膀胱癌组织中的阳性表达率分别为 80%、56%、78% 和 64%。膀胱癌组织 MMP-2、MMP-9 和 VEGF 三种基因的表达水平高于癌周组织($P < 0.05$),而 RECK 基因的表达水平低于癌周组织($P < 0.05$)。膀胱癌组织中 MMP-2、MMP-9 和 VEGF 基因的表达水平与膀胱癌组织的病理分级分期密切相关,而 RECK 基因的表达水平与膀胱癌的分级分期无明显相关。**结论:**膀胱癌组织存在多基因的表达异常,其发生、发展及转移与多基因联合作用有关。

[关键词] 膀胱肿瘤;多基因表达;肿瘤转移

[中图分类号] R 737.14

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2007)10-1075-04

Expression of MMP-2, MMP-9, VEGF and RECK genes in bladder cancer and its clinical significance

YAN Yang, ZHENG Jun-hua*, XU Yun-fei, ZHANG Hai-min, HUANG Jian-hua, PENG Bo, GAO Qi-ruo, HUANG Guo-hua, CHAO Yue-gen, KONG Xian-guo (Department of Urology, The 10th People's Hospital of Shanghai, Tongji University, Shanghai 200072, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the expression of MMP-2, MMP-9, vascular endothelial growth factor (VEGF) and RECK genes in bladder cancer tissues, so as to provide evidence for studying the molecular mechanism of bladder cancer metastasis.

Methods: Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to determine the expression of MMP-2, MMP-9, VEGF and RECK genes in 50 operative specimens of bladder cancer and their corresponding adjacent normal tissues; and the clinical significance of the expression was analyzed. **Results:** The positive rates of MMP-2, MMP-9, VEGF and RECK mRNA in the bladder cancer specimens were 80%, 56%, 78% and 64%, respectively. The expression levels of MMP-2, MMP-9 and VEGF mRNA in bladder cancer specimens were significantly higher than those in the paired adjacent normal bladder tissues ($P < 0.05$); the expression level of RECK genes in bladder cancer specimens was significantly lower than that in the normal tissue ($P < 0.05$). The expression levels of MMP-2, MMP-9 and VEGF was closely correlated with the clinical stages and grades of bladder cancer; there was no relation between the level of RECK expression and clinical stages and grades of the cancer. **Conclusion:** Abnormal expression of multi-genes is present in bladder cancer tissues; the development, progression and metastasis of bladder cancer are associated with abnormal expression of multi-genes.

[KEY WORDS] bladder neoplasms; expressions of multiple gene; neoplasm metastasis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 27(10):1075-1078]

肿瘤转移是制约临床治疗效果的常见因素,也是导致患者死亡的主要原因之一。肿瘤的发生、发展及转移是多基因综合作用的结果,但具体作用机制及方式尚不清楚。RECK 基因是新发现的基质金属蛋白酶(MMPs)抑制基因,广泛表达于多种正常组织,可抑制 MMP-2/9 和 MT1-MMP 的活性。研究^[1]表明,肿瘤组织中 RECK 基因呈低表达,其表达水平与肿瘤的侵袭力成负相关,肿瘤组织中 RECK 基因表达水平高,患者预后往往较好,但其具体抑癌机制尚未明确。本研究采用 RT-PCR 方法同时检测 RECK、MMP-2、MMP-9 和血管内皮生成因子(VEGF)基因在膀胱癌及配对的癌旁组织(距肿瘤切缘 2 cm)中的表达,以探讨这些基因与膀胱

癌侵袭、转移等生物学行为的关系,为进一步研究肿瘤转移的基因机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 标本取自我科 2002 年 7 月至 2004 年 4 月期间住院手术治疗的 50 例膀胱癌患者,其中男性 33 例,女性 17 例,年龄 46~72 岁,平均(61±6)岁。

[基金项目] 国家自然科学基金(30270522),上海市科委基金(054119604)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30270522) and Fund of Science Committee of Health Department of Shanghai Municipal Government(054119604)。

[作者简介] 鄢 阳, 硕士, 助教。

* Corresponding author. E-mail: zhengjh0471@sina.com

每例取癌及癌旁组织(距肿瘤切缘 2 cm)标本各 1 份,离体 10 min 内投入液氮速冻 30 min 后,转入 -80℃冻存。术后均经病理检查证实为膀胱移行细胞癌,其中浅表性膀胱癌(T_{is}~T₁)30 例,浸润性癌(T₂~T₃)20 例。膀胱癌细胞分级为 G₁期 22 例,G₂期 19 例,G₃期 9 例。在前列腺增生症患者行开放性手术时取得 5 例正常膀胱组织作为正常对照。所有患者均知情同意并签署知情同意书。

1.2 RT-PCR 测定 MMP-2、MMP-9、VEGF 和 RECK 基因的表达

1.2.1 RNA 抽提 采用 TRIzol(Gibco BRL 公司)试剂抽提组织总 RNA。采用分光光度法测定提取的 RNA 含量及纯度,D₂₆₀/D₂₈₀约为 1.8~2.0。

1.2.2 RT-PCR 应用 TaKaRa 公司的 RT-PCR 试剂盒扩增 MMP-2、MMP-9、VEGF、RECK 和 β-actin。各基因引物序列见表 1,引物由上海生工生物工程服务有限公司合成。MMP-2 反应条件为:94℃预变性 2 min;94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 30 s,扩增 35 个循环后于 72℃延伸 3 min;MMP-9 反应条件为:94℃预变性 2 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,扩增 35 个循环后于 72℃延伸 3 min;VEGF 反应条件为:94℃预变性 2 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,扩增 35 个循环后于 72℃延伸 3 min;RECK 反应条件为:94℃预变性 2 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,扩增 35 个循环后于 72℃延伸 3 min;β-actin 反应条件为:94℃预变性 2 min;94℃ 30 s,59℃ 30 s,72℃ 30 s,扩增 35 个循环后于 72℃延伸 3 min。

表 1 PCR 引物序列

Tab 1 Sequences of primer pairs

Gene	Sequence	Length (bp)
RECK	F 5'-ATG TGC CGT GAT GTA TGT GAA C-3'	180
	R 5'-ACA GCA GCC TAA GCC AAC C-3'	
MMP-2	F 5'-CCA ACT ACA ACT TCT TCC CTC-3'	245
	R 5'-TCC GTC CTT ACC GTC AAA-3'	
VEGF	F 5'-TTG CTG CTC TAC CTC CAC-3'	418,490
	R 5'-AAT GCT TTC TCC GCT CTG-3'	
MMP-9	F 5'-GGG ACG GCA ATG CTG ATG-3'	506
	R 5'-AGG GCG AGG ACC ATA GAC G-3'	
β-actin	F 5'-AGC GGG AAA TCG TGC GTG-3'	309
	R 5'-CAG GGT ACA TGG TGG TGC C-3'	

1.2.3 PCR 产物相对定量分析 10 μl PCR 产物经 2%的普通琼脂糖凝胶电泳,然后行光密度扫描,以 MMP-2、MMP-9、VEGF 和 RECK 的光密度值与内参照 β-actin 的光密度值之比 IA 作为表达水平

的参数,对 MMP-2、MMP-9、VEGF 和 RECK 基因的扩增产物进行相对定量。

1.3 统计学处理 对于计数资料采用四格表确切概率法和 χ²检验分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验分析比较不同组均值。P<0.05 为结果有统计学意义,所有数据均用 SPSS 12.0 统计软件进行处理。

2 结果

2.1 膀胱癌组织 MMP-2、MMP-9、VEGF 和 RECK 的 RT-PCR 表达 MMP-2、MMP-9、VEGF 和 RECK 基因在膀胱癌及癌旁组织中的表达见图 1。MMP-2、MMP-9、VEGF 基因在膀胱癌组织中的阳性表达率分别为 80%(40/50)、56%(28/50)和 78%(39/50),均显著高于癌周组织的 18%(9/50)、26%(13/50)和 18%(9/50),具有显著差异(P<0.05)。RECK 基因在癌周组织中的阳性表达率为 96%(48/50),高于癌组织的 64%(32/50),具有显著差异(P<0.05)。5 例正常膀胱组织中,RECK 表达阳性率 100%(5/5),MMP-9 表达阳性率 20%(1/5),MMP-2 和 VEGF 未见表达。

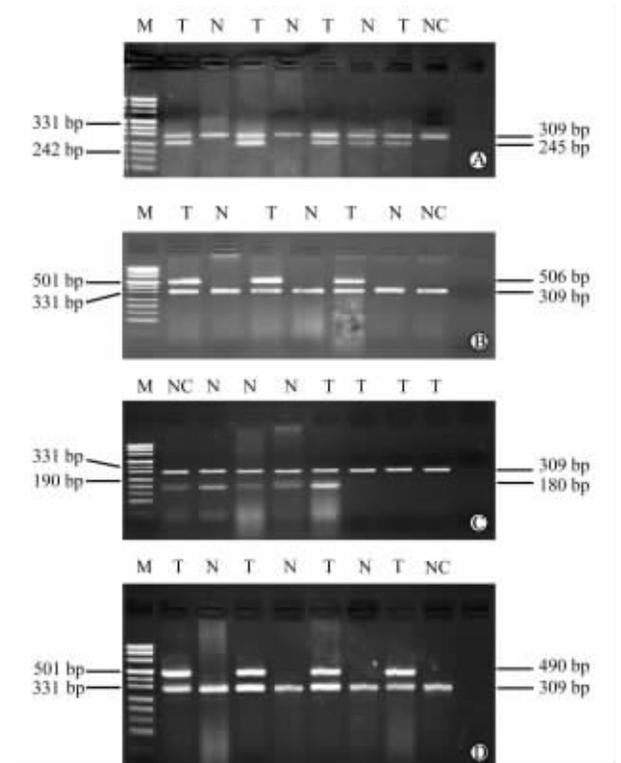


图 1 膀胱癌组织和癌周组织中 MMP-2、MMP-9、VEGF 和 RECK 基因的 RT-PCR 结果
Fig 1 RT-PCR results of MMP-2, MMP-9, VEGF and RECK genes in bladder cancer and normal bladder tissues
A: MMP-2; B: MMP-9; C: RECK; D: VEGF. M: Marker; T: Tumor; N: Normal bladder; NC: Negative control

2.2 RT-PCR 表达结果的定量分析 4 种基因在癌组织及癌周组织中的表达水平见表 2。MMP-2、MMP-9 和 VEGF 基因在癌组织中的表达水平显著高于癌周组织($P < 0.05$), 而 RECK 基因在癌组织中的表达水平显著低于癌周组织($P < 0.05$)。

2.3 MMP-2、MMP-9、VEGF 和 RECK 表达水平与膀胱癌病理特征的关系 结果见表 3。随着膀胱癌浸润能力提高, MMP-2、MMP-9、VEGF 基因的表达水平也相应升高, 在浸润癌组织中表达水平高于表浅癌组织, 差异具有显著性($P < 0.05$)。肿瘤细胞分级方面, MMP-2、MMP-9、VEGF 基因随着肿瘤细胞分化程度降低, 表达水平升高, 差异具有显著性($P < 0.05$)。RECK 基因表达水平在肿瘤不同

分期及肿瘤细胞不同分级间无显著差异。

表 2 50 例膀胱癌组织及配对的癌周组织中 4 种基因的相对表达水平

Tab 2 Expression levels of MMP-2, MMP-9, VEGF and RECK gene in bladder cancer and normal bladder tissues

($n=50, \bar{x} \pm s$)

Gene	Bladder cancer tissue	Normal bladder tissue 2 cm near the resected edge
MMP-2	0.929 1 ± 0.294 5	0.567 8 ± 0.120 3*
MMP-9	0.760 2 ± 0.223 0	0.507 5 ± 0.113 8*
VEGF	0.813 6 ± 0.135 9	0.536 7 ± 0.148 7*
RECK	0.169 9 ± 0.041 9	0.281 6 ± 0.058 8*

* $P < 0.05$ vs bladder cancer tissue

表 3 膀胱癌组织不同分期和分级间 4 种基因的相对表达水平

Tab 3 Expression levels of four genes in bladder cancer of different grades and phases

Gene	Tis-T ₁ ($n=30$)	T ₂ -T ₃ ($n=20$)	G ₁ ($n=22$)	G ₂ ($n=19$)	G ₃ ($n=9$)
MMP-2	0.557 8 ± 0.110 3	0.942 1 ± 0.274 5*	0.592 6 ± 0.255 3	0.836 8 ± 0.124 3	1.305 9 ± 0.123 8 [△]
MMP-9	0.527 5 ± 0.113 8	0.760 2 ± 0.323 0*	0.436 5 ± 0.042 5	0.695 7 ± 0.090 3	1.171 8 ± 0.109 2 [△]
VEGF	0.615 7 ± 0.135 8	1.175 9 ± 0.197 2*	0.869 2 ± 0.154 9	1.194 7 ± 0.179 0	0.901 7 ± 0.146 1 [△]
RECK	0.179 9 ± 0.041 9	0.281 6 ± 0.058 8	0.309 9 ± 0.045 8	0.285 8 ± 0.063 7	0.245 1 ± 0.043 7

* $P < 0.05$ vs Tis-T₁; [△] $P < 0.05$ vs G₁ or G₂

3 讨论

肿瘤转移的机制非常复杂, 涉及多种黏附分子、基质蛋白酶、细胞因子以及相应的信号转导机制和相关的基因改变。细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 是阻碍肿瘤侵袭、转移的天然屏障。癌细胞必须穿透 ECM, 才能向外侵袭转移。ECM 主要由 IV 型胶原组成, 基质金属蛋白酶 2、9 (MMP-2、9) 是降解 IV 型胶原最主要的蛋白水解酶。肿瘤细胞成功转移的另一重要条件便是转移后的肿瘤细胞局部必须有新生血管的形成。VEGF 是目前已知最强的血管生长调控基因。因此本研究应用 RT-PCR 技术同步检测了基质金属蛋白酶基因以及血管内皮生长因子基因在膀胱癌中的表达及其临床意义。

3.1 MMP-2、MMP-9 与 RECK 表达相关性 RECK 基因是最近发现的金属蛋白酶抑制基因, 位于 9p13→p12 染色体, 全长约 87 kb。在正常人体组织中正常表达, 而在肿瘤组织中低表达^[1]。目前认为 RECK 可能通过抑制 MMP 酶活性和肿瘤血管新生两方面影响肿瘤的侵袭转移。RECK 基因可抑制 MMP-2、9 和 MT1-MMP 三种基质金属蛋白酶的活性, 抑制血管新生, 诱导肿瘤细胞凋亡^[2]。Wu 等^[3]

对肿瘤模型的研究认为肿瘤细胞转移过程中, MT1-MMP 在癌细胞表面积聚后激活 MMP-2, 两种蛋白水解酶协同降解癌细胞连接基质, 使得癌细胞脱离原病灶进而发生转移。因此, 对于 RECK 基因在肿瘤中的表达以及与肿瘤转移的关系是目前的研究热点之一。Masui 等^[4]发现胰腺癌中 RECK 低表达, 其表达水平与 MMP-2 的激活程度成反比, 低表达患者术后预后差。Cho 等^[5]研究发现直肠癌 RECK 基因下调和基因启动子甲基化有关, 在细胞株中去甲基化可恢复 RECK 基因表达, 发生转移的直肠癌其转移病灶和转移淋巴结中, MMPs 和 RECK 表达水平与无转移的直肠肿瘤差异显著, 说明其能抑制肿瘤转移。Chang 等^[6]研究发现肺癌 RECK 基因下调与基因启动子甲基化有关, 更重要的是 RECK 的下调水平和肺癌淋巴结转移密切相关。Takenaka 等^[7]研究发现, RECK 基因的表达水平与肺癌肿瘤血管生成密切相关, 高表达患者肿瘤组织中微毛细血管计数水平明显低于低表达患者, 且这种负相关仅见于 VEGF 高表达时, 提示 RECK 可能通过 VEGF 途径抑制血管新生。

本研究发现, 膀胱癌旁组织中有 48 例 RECK (96%) 表达阳性, 癌组织中仅有 32 例表达阳性, 癌

旁组织表达水平高于癌组织,差异具有统计学意义。其表达水平和患者肿瘤分级分期无关。随着膀胱癌分级分期提高,MMP-2、MMP-9基因在浸润癌组织中表达水平高于表浅癌组织,差异具有显著性。肿瘤细胞分级方面,MMP-2、MMP-9基因随着肿瘤细胞分化程度降低,表达水平升高。

3.2 MMP-2、MMP-9和VEGF表达相关性 新生血管形成是癌生长的基础,同时又是恶性肿瘤转移的重要途径。血管形成是多种因子相互作用,多步骤协调发展的结果,其中最重要的步骤是内皮细胞的增殖、浸润及基底膜的降解。VEGF和MMPs是参与此过程的重要因子。VEGF是已知的作用最强的促血管生成因子。上皮性癌侵袭周围组织的第一障碍是基底膜,其主要成分由Ⅳ型胶原组成。Ⅳ型胶原酶包括MMP-2和MMP-9,主要降解Ⅳ型胶原、明胶和纤维粘连蛋白,两种酶在癌浸润转移方面有重要作用。Kanayama等^[8]研究发现肌肉侵袭性的T₂以上分期的膀胱癌组织中,MMP-2的基因表达程度显著高于Tis-T₁期癌,且随着表达程度的升高,患者的无瘤生存率下降。在>T₂期的患者中,MMP-2的表达水平越高则预后越差。Ozdemir等^[9]研究MMP-1、MMP-2和MMP-9表达与基底膜的关系,发现MMP-9在浅表膀胱癌浸润过程中对基底膜的破坏起重要作用。MMPs可通过降解基质和调节血管活性因子的释放影响癌的血管形成。同时,VEGF还可以刺激癌间质产生和释放MMPs,促进ECM的降解。故癌组织中VEGF和MMP-2、9的表达水平增高,对于血管生成具有协同作用。本研究结果发现MMP-2、9 mRNA在膀胱癌中表达水平高于癌周组织,差异具有显著性,特别是浸润组MMP-2、9基因表达水平明显高于表浅组,差别有显著性意义。本研究结果表明,30例表浅癌VEGF mRNA阳性表达19例,20例浸润癌中VEGF mRNA阳性表达20例,浸润性膀胱癌VEGF mRNA表达率明显高于表浅癌($P<0.05$)。这提示VEGF

与膀胱癌的浸润转移有关。

本研究结果表明,癌组织中MMP-2、MMP-9、VEGF基因表达升高,在浸润性癌组织中的表达高于表浅癌组织,与癌的转移能力相关。RECK基因在癌组织中表达多有缺失,表达水平低于癌周正常组织,可能参与抑制癌的侵袭转移。

[参考文献]

- [1] Takahashi C, Sheng Z, Horan T P, et al. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 13221-13226.
- [2] 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: 789-800.
- [3] Wu X, Gan B, Yoo Y, et al. FAK-mediated src phosphorylation of endophilin A2 inhibits endocytosis of MT1-MMP and promotes ECM degradation[J]. Dev Cell, 2005, 9: 185-196.
- [4] Masui T, Doi R, Koshiba T, et al. RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9: 1779-1784.
- [5] Cho C Y, Wang J H, Chang H C, et al. Epigenetic inactivation of the metastasis suppressor RECK enhances invasion of human colon cancer cells[J]. J Cell Physiol, 2007, 213: 65-69.
- [6] Chang H C, Cho C Y, Hung W C. Downregulation of RECK by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Sci, 2007, 98: 169-173.
- [7] Takenaka K, Ishikawa S, Kawano Y, et al. Expression of a novel matrix metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in resected non-small cell lung cancer[J]. Eur J Cancer, 2004, 40: 1617-1623.
- [8] Kanayama H, Yokota K, Kurokawa Y, et al. Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer[J]. Cancer, 1998, 82: 1359-1366.
- [9] Ozdemir E, Kakehi Y, Okuno H, et al. Role of matrix metalloproteinase-9 in the basement membrane destruction of superficial urothelial carcinomas[J]. J Urol, 1999, 161: 1359-1363.

[收稿日期] 2007-06-12

[修回日期] 2007-09-30

[本文编辑] 贾泽军, 邓晓群