

大鼠肝细胞癌形成过程中 MMP-2 mRNA 的表达及应用 BB-94 的影响

张 志,方石岗,高 毅,蒋泽生,孙尔维

张志,高毅,蒋泽生,孙尔维,中国人民解放军第一军医大学珠江医院器官移植科 广东省广州市 510282
方石岗,中国人民解放军第一军医大学珠江医院普通外科 广东省广州市 510282

张志,男,1980-11-08生,江西省湖口市人,汉族,2001年第一军医大学本科毕业,现为第一军医大学珠江医院器官移植科硕士研究生。

广东省自然科学基金课题, No.974053

项目负责人:方石岗,510282,广东省广州市工业大道中253号,中国人民解放军第一军医大学珠江医院普通外科。 mshiji@hotmail.com
电话:020-61643402

收稿日期:2002-07-26 接受日期:2002-11-04

Effect of batimastat on Matrix metalloproteinase-2 mRNA in rat hepatocellular carcinoma

Zhi Zhang, Shi-Gang Fang, Yi Gao, Ze-Sheng Jiang, Er-Wei Sun

Zhi Zhang, Yi Gao, Ze-Sheng Jiang, Er-Wei Sun, Department of Organ Transplantation, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province China

Shi-Gang Fang, Department of general surgery, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province China Supported by the Natural Scientific Foundation of Guangdong Province, No. 974053

Correspondence to: Dr. Shi-Gang Fang, Department of general surgery, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province China. mshiji@hotmail.com

Received:2002-07-26 Accepted:2002-11-04

Abstract

AIM: To study the dynamic changes of matrix metalloproteinase-2 mRNA in liver tissue during the experimental hepatocarcinogenesis and the effect of Batimastat on it.

METHODS: Hepatocellular carcinoma was induced with the administration of diethyl Nitrosoamine (DENa) in rats. BB-94 was intraperitoneally injected to treat the experimental models. Reverse transcription polymerase chain reaction was used for quantitative analysis of MMP-2 mRNA expression level during the induction and therapy.

RESULTS: The expression of MMP-2 mRNA was increased throughout the hepatocarcinogenesis, and reach had its maximum plateau in the early hepatocarcinogenesis stage. BB-94 no effect on MMP-2 mRNA expression.

CONCLUSION: MMP-2 mRNA expression is increasing during hepatocarcinogenesis, and BB-94 has no effect on MMP-2 mRNA expression.

Zhang Z, Fang SG, Gao Y, Jiang ZS, Sun EW. Effect of batimastat on Matrix metalloproteinase-2 mRNA in rat hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(6):716-718

摘要

目的: 观察肝癌形成过程中 MMP-2 mRNA 表达的动态变

化, 探索明胶酶在肝癌生长浸润中的作用. 应用明胶酶抑制剂 Batimastat (BB-94) 进行治疗, 观察其对明胶酶 mRNA 表达的影响.

方法: 应用 RT-PCR 法对大鼠肝癌形成过程中各期 MMP-2 mRNA 表达情况进行观察, 并与 Batimastat 治疗组和正常对照组进行统计分析.

结果: 诱癌过程中早期肝硬化期 MMP-2 mRNA 表达成缓慢增高趋势, 至癌变期表达明显较增高, 并呈一平台. 诱癌不同时期应用 BB-94 对 MMP-2 mRNA 相对表达值无影响.

结论: 诱癌过程中 MMP-2 mRNA 表达持续升高. BB-94 治疗对 MMP-2 mRNA 的表达没有影响.

张志,方石岗,高毅,蒋泽生,孙尔维. 大鼠肝细胞癌形成过程中 MMP-2 mRNA 的表达及应用 BB-94 的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(6):716-718

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/716.asp>

0 引言

研究表明, 明胶酶 A(基质金属蛋白酶 2, matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 可以降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM) 的主要成分 IV 型胶原, 在肿瘤组织中呈高表达, 对肿瘤的发展和转移起重要作用^[1-4]. 我们前期的研究证明, 在肝癌形成过程中, MMP-2 在酶原及酶活性水平呈逐渐升高的趋势^[5]. 为进一步揭示其变化规律, 我们从 mRNA 水平观察了肝癌形成过程中 MMP-2 的动态变化, 同时应用 MMP-2 的抑制剂 Batimastat(BB-94) 进行治疗, 观察其对 MMP-2 mRNA 表达的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁 Wistar 大鼠, 124 只, 体质量 130-150 g, 第一军医大学动物实验中心提供, 随机分为正常组(28 只), 诱癌模型对照组(56 只)及 BB-94 治疗组(40 只), 应用经典的二乙基亚硝胺(DENA)(*动物学报* 1996; 42: 166-170)诱导肝癌模型. 正常组及诱癌组各平均分成 7 个亚组, 于诱癌 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 wk 各处死 1 个亚组, 取肝左叶液氮保存. 治疗组 40 只大鼠平均分为 4 个亚组, 在造模 8, 12, 16, 20 wk 分别选取一个亚组每日予 BB-94 悬液(英国牛津生物技术公司惠赠)腹腔注射(30 mg/kg), 用药 4 wk. 于 24 wk 处死各亚组大鼠, 取肝左叶液氮保存.

1.2 方法 取液氮保存的肝组织约 50-100 mg, 加入 Trizol 溶液 1 mL 匀浆, 放入 1.5 mL Eppendorf 管中, 室温放置 5 min, 加入氯仿 200 μ L 混匀, 室温放置 15 min, 11 000 r/min, 2-8 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 取水相, 加入异丙醇 0.5 mL 混匀, 室温放置 10 min, 11 000 r/min, 2-8 $^{\circ}$ C 离心 10 min 后 7 000 r/min, 2-8 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 弃上清空气干燥 5-10 min, DEPC 水 100 μ L 溶解提取物, 取 10 μ L 作纯度和定量分析, 余 -10 $^{\circ}$ C 保存备用. 采用紫外分光光度计检测提取物, 计算 RNA 浓度(A260, 核酸稀释倍数 * 40/1 000, A260/A280>1.8). 取 1 μ g RNA 提取物, 加入 5 倍逆转录缓冲液 5 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, Oligo(dt)15 primer 50 mg/L, 混匀, 65 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 室温加入 M-MLV 逆转录酶 200 μ , 0.1 MDTT 2 μ L, RNAsin 20 μ , DEPC 水补至总体积 25 μ L, 37 $^{\circ}$ C 逆转录 1 h, 95 变性 5 min, 取 cDNA 10 μ L 行 PCR 扩增. β -actin 上游引物: 5' -ACCCCTGAAAAAGATGA-3', 下游引物: 5' -ATCTCAAACCTCCATGATG-3'. MMP-2 上游引物: 5' -TTCTTCAAGGACCGGTTATTTGG-3', 下游引物: 5' -CTTCTTCACTTCATTGTATCTCCA-3'. PCR 条件: 10 倍 PCR 缓冲液 5 μ L, 4 dNTP 10 nmol, 引物各 25 pmol, 逆转录产物 10 μ L, 总体积 50 μ L, 加灭菌石蜡油 50 μ L, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 80 $^{\circ}$ C 3 min, 加 Tap 酶 1 M. 94 $^{\circ}$ C 50 s, 56 $^{\circ}$ C 70 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 循环 30 次, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. MMP-2, β -actin 引物基因扩增条带大小分别为 330 bp 和 120 bp. 取 PCR 产物 8 μ L 经 10 g/L 琼脂糖电泳, 紫外线下观察见 330 bp 和 120 bp 条带(参照基因产物), 凝胶图像吸光密度分析系统进行 PCR 产物条带扫描定量分析, 同时拍照保存.

统计学处理 试验结果应用 SPSS 8.0 进行处理, 计量资料行单因素方差分析, LSD 法进行组间检验, 两组间率的比较用 χ^2 检验.

2 结果

在诱发大鼠肝癌过程中, 早期肝硬化期 MMP-2mRNA 表达缓慢增高, 而至癌变期(16 wk)表达明显较增高, 并呈一平台.(表 1). 采用单因素方差分析治疗各组 and 诱癌各组之间 MMP-2 相对表达值无明显差异, 说明 BB-94 治疗对 MMP-2mRNA 的表达无影响(表 2).

表 1 MMP-2 灰度值/ β -actin 灰度值($\bar{x} \pm s$)

t/wk	诱癌组(n=8)	正常对照组(n=4)
0	4.28 \pm 0.98	4.37 \pm 0.85
4	4.32 \pm 0.87	4.31 \pm 0.76
8	8.44 \pm 1.56 ^{ac}	4.47 \pm 0.85
12	11.89 \pm 1.88 ^{ac}	4.35 \pm 0.79
16	24.21 \pm 2.58 ^{ac}	4.43 \pm 0.97
20	26.31 \pm 3.15 ^{ac}	4.56 \pm 0.95
24	25.67 \pm 3.01 ^{ac}	5.01 \pm 1.02

^aP <0.05 vs 同期正常对照; ^cP <0.05 vs 前期试验组.

表 2 第 24 周各组大鼠 MMP-2/ β -actin mRNA 灰度值相对表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MMP-2 相对表达值
诱癌组	8	25.7 \pm 3.0
治疗组		
8 wk 给药组	10	24.5 \pm 3.0
12 wk 给药组	10	26.3 \pm 3.2
16 wk 给药组	10	25.1 \pm 2.9
20 wk 给药组	10	26.2 \pm 3.5

3 讨论

本实验结果表明在诱癌过程中 MMP-2mRNA 呈持续增高趋势. 与 Benyon et al [6] 的研究结果一致, 肝硬化期 MMP-2mRNA 轻度升高至正常对照的 3-4 倍. 此时, 肝细胞坏死后肝脏行组织修复, 胶原等细胞外基质(extracellular matrix, ECM)增生沉积, 同时, ECM 的降解吸收也上调, 在此过程中 MMP-2 起关键作用. 我们的前期研究也证明, 肝硬化形成过程中, MMP-2 的酶原和活性形式均升高; 肝硬化的形成与 MMP-2 降解 IV 型胶原增多有密切的关系[7-9]. 与 Takahara et al [10] 的结果不同, 本实验显示, 肝硬化形成期, MMP-2 的表达从 mRNA 水平即开始升高, 并非 MT1-MMP 激活 MMP-2 增多所致.

已经证实, MMP-2 在多种肿瘤的侵袭转移中起到重要作用[11-14]. 国内外众多研究指出, 在肝细胞癌中, MMP-2 蛋白水平亦呈高表达, 与肝肿瘤侵袭转移的关系极为密切[5,15-19]. 而针对 MMP-2 的 BB-94 治疗, 能起到减小癌肿面积的效果; 同时, Yamamoto et al [2] 也发现, 在肝癌细胞的培养上清中, 可以检测到活性 MMP-2 分子; 而肝癌形成过程中 MMP-2mRNA 表达的变化, 国内外未见报道. 本研究结果提示, 肝细胞癌形成和侵袭转移过程中, MMP-2 表达升高起自 mRNA 水平, 自非典型增生期开始, MMP-2mRNA 表达即已较肝硬化期明显升高. 非典型增生的细胞, 已经具有了某些癌细胞的生物学行为, 从基因表达水平为肿瘤的进一步发展作准备. 至早期癌变期及肿瘤演进期(相当于诱癌第 16, 20, 24 周)肝癌组织中的 MMP-2mRNA 表达继续升高至正常的 5-7 倍. 肝癌细胞主动表达 MMP-2, 对于其快速生长和侵袭转移有重要意义[1,2,20-24].

值得注意的是, MMP-2mRNA 表达量在肝癌形成后即成一平台, 表明 MMP-2 的表达与肿瘤的生长时间、肿瘤的大小无关; 而 Arii 和 Ogata 的研究也证明, 低分化肝癌 MMP-2mRNA 表达高于高分化肝癌; Ogata 还提出, 肝癌细胞表达 MMP-2 与否, 可纳入肝癌分级的标准[25,26]; 所以, MMP-2mRNA 表达的水平, 可能仅与肿瘤的分化程度有关.

BB-94 是第一个在肿瘤模型治疗中广泛应用的 MMPs 抑制剂. 在裸鼠肠壁大肠癌种植转移模型中, BB-94 的治疗能够抑制肿瘤生长和侵袭转移[27]. BB-94

能控制黑色素瘤转移, 明显减少 B16-BL6 鼠腹腔注射黑色素瘤细胞后肺转移灶的数量和大小^[28,29].

我们前期试验结果表明, 近期 BB-94 治疗可以明显缩小癌结节的面积^[30]. BB-94 能阻断酶原型 MMP-2 的活化, 可通过降低 MMP-2 的活性来抑制肝癌的生长和转移. Kinoshita et al^[30] 研究表明膜型金属蛋白酶 (membrane type MMP, MT1-MMP) 是 MMP2 的直接激活剂, MMP-2 的前导肽被 MT1-MMP 切除后而激活, 这一过程可被组织金属蛋白酶抑制因子和 BB-94 阻断. 有报道指出, BB-94 可以直接与活性 MMP-2 的钙离子结合部位结合, 从而达到直接抑制活性 MMP-2 的效果^[31]. 以上结果均提示, BB-94 能够从蛋白水平抑制 MMP-2 的活性. 但其作用起始是否可以追溯到 mRNA 表达调节水平, 是否能够减少 MMP-2 mRNA 的表达; 抑或, 由于肿瘤转移是一个极其复杂的调节过程, 抑制 MMP-2 的蛋白活性是否会导致肿瘤细胞代偿性表达 MMP-2 mRNA 升高? 目前国内外没有这方面的研究报道.

从本实验的结果来看, BB-94 治疗对肝癌组织表达 MMP-2 mRNA 的量没有影响. 说明, BB-94 治疗仅仅是从蛋白激活水平起作用, 对 MMP-2 转录和翻译水平没有正向或负向的调节作用. 但这个结果是否意味着肝癌细胞表达 MMP-2 mRNA 的量只受肿瘤分化程度的作用, 而不受外界细胞接触、MMP-2 活性浓度等反馈调控的影响, 则有待进一步观察研究和讨论.

4 参考文献

- Musso O, Theret N, Campion JP, Turlin B, Milani S, Grappone C, Clement B. In situ detection of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and the metalloproteinase inhibitor TIMP2 Transcripts in human primary hepatocellular carcinoma and in liver metastasis. *J Hepatol* 1997;26:593-605
- Yamamoto H, Itoh F, Adachi Y, Sakamoto H, Adachi M, Hinoda Y, Imai K. Relation of enhanced secretion of active matrix metalloproteinases with tumor spread in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1997;112:1290-1296
- Giannelli G, Bergamini C, Marinosci F, Fransvea E, Quaranta M, Lupo L, Schiraldi O, Antonaci S. Clinical role of MMP-2/TIMP-2 imbalance in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2002;97:425-431
- Sawada S, Murakami K, Murata J, Tsukada K, Saiki I. Accumulation of extracellular matrix in the liver induces high metastatic potential of hepatocellular carcinoma to the lung. *Int J Oncol* 2001;19:65-70
- 蒋泽生, 方石岗, 高毅, 汪爽, 陈建锋. 二乙基亚硝胺诱发大鼠肝细胞癌发生过程中基质金属蛋白酶动态变化. *世界华人消化杂志* 2001; 9:759-762
- Benyon RC, Iredale JP, Goddard S, Winwood PJ, Arthur MJ. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 in increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* 1996;110: 821-831
- 高毅, 王宇, 杨继震, 黄宇琦. 实验性肝纤维化过程中明胶酶 A 基因表达的动态变化. *世界华人消化杂志* 1999;7:1003-1004
- 黄宇琦, 高毅, 杨继震, 方石岗, 王宇. 大鼠肝纤维化基质金属蛋白酶及其抑制因子的表达. *世界华人消化杂志* 1999;7:795-796
- Herbst H, Wege T, Milani S, Pellegrini G, Orzechowski HD, Bechstein WO, Neuhaus P, Gressner AM, Schuppan D. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol* 1997;150:1647-1659
- Takahara T, Furui K, Yata Y, Jin B, Zhang LP, Nambu S, Sato H, Seiki M, Watanabe A. Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase in fibrotic human livers. *Hepatology* 1997;26:1521-1529
- Fan YZ, Zhang JT, Yang HC, Yang YQ. Expression of MMP-2, TIMP-2 protein and the ratio of MMP-2/TIMP-2 in gallbladder carcinoma and their significance. *World J Gastroenterol* 2002;8:1138-1143
- Yu C, Pan K, Xing D, Liang G, Tan W, Zhang L, Lin D. Correlation between a single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter and risk of lung cancer. *Cancer Res* 2002;15:6430-6433
- Kuittinen O, Soini Y, Turpeenniemi-Hujanen T. Diverse role of MMP-2 and MMP-9 in the clinicopathological behavior of Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 2002;69:205-212
- Matsuyama Y, Takao S, Aikou T. Comparison of matrix metalloproteinase expression between primary tumors with or without liver metastasis in pancreatic and colorectal carcinomas. *J Surg Oncol* 2002;80:105-110
- 朱争艳, 杜智, 王毅军, 张文, 孙保存. 原发性肝癌钙粘素 E 和基质金属蛋白酶检测及临床意义. *世界华人消化杂志* 2001;9:839-840
- 曲增强, 吴孟超, 陈汉, 钱其军, 方石岗. IV 型胶原酶的表达与肝癌侵袭转移的关系. *新消化病杂志* 1997;5:575-576
- 张云生, 高毅, 黄宇琦, 王宇, 杨继震. 基质金属蛋白酶在肝细胞癌中的表达. *广东医学* 2000;23:132-134
- 刘景章, 赵子渊, 陈保华, 高毅. 肝硬化肝癌 IV 型胶原酶的表达. *世界华人消化杂志* 2001;9:711-713
- 刘景章, 高毅. 基质金属蛋白酶在肝细胞癌中表达的实验研究. *中国误诊学杂志* 2002;2:499-501
- Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Metalloproteinases and cancer invasion. *Seminars Cancer Biol* 1990;1:99-106
- Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Reviews* 1993;73:161-165
- Tryggvason K, Hoyhtya M, Pyke C. Type-IV collagenases in invasive tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1993;24:209-218
- Stetler-Stevenson WG. Progelatinase A activation during tumor cell invasion. *Invasion Metast* 1994;14:259-268
- Arii S, Mise M, Harada T, Furutani M, Ishigami S, Niwano M, Mizumoto M, Fukumoto M, Imamura M. Overexpression of matrix metalloproteinase-9 gene in hepato cellular carcinoma with invasive potential. *Hepatology* 1996;24:316-322
- Ogata R, Torimura T, Kin M, Ueno T, Tateishi Y, Kuromatsu R, Shimauchi Y, Sakamoto M, Tamaki S, Sata M, Tanikawa K. Increased expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 with tumor dedifferentiation in hepato cellular carcinomas. *Hum Pathol* 1999;30:443-450
- Wang X, Fu X, Brown PD, Crimmin MJ, Hoffman RM. Matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 (batimastat) inhibits human colon tumor growth and spread in a patient-like orthotopic model in nude mice. *Cancer Res* 1994;54:4726-4728
- Chirivi RG, Garofalo A, Crimmin MJ, Bawden LJ, Stoppacciaro A, Brown PD, Giavazzi R. Inhibition of the metastatic spread and growth of B16-BL6 murine melanoma by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Int J Cancer* 1994;58:460-464
- Dabrowska A, Giermasz A, Marczak M, Golab J, Jakobisiak M. Potentiated antitumor effects of interleukin 12 and matrix metalloproteinase inhibitor batimastat against B16F10 melanoma in mice. *Anticancer Res* 2000;20:391-394
- 蒋泽生, 方石岗, 高毅, 陈建锋, 汪爽. Batimastat 对大鼠原发性肝癌生长侵袭转移的影响. *世界华人消化杂志* 2001;9:546-549
- Kinoshita T, Sato H, Takino T, Itoh M, Akizawa T, Seiki M. Processing of a precursor of 72-Kilodalton type IV collagenase/gelatinase A by a recombinant membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 1996;56:2535-2538
- Zervos EE, Shafii AE, Haq M, Rosemurgy AS. Matrix metalloproteinase inhibition suppresses MMP-2 activity and activation of PANC-1 cells in vitro. *J Surg Res* 1999;84:162-167