

基质金属蛋白酶16在食管鳞癌中的表达及其生物学功能

吴秋丽 林碧芸 吴梦杰 刘明

厦门大学附属第一医院消化内科, 福建 厦门 361003

[摘要] **背景与目的:** 中国是世界上食管癌的高发区, 食管癌可发生早期淋巴结及血行转移, 这使其表现出临床进展迅速并且预后很差的特性。研究显示癌组织侵袭和转移与其诱导产生的蛋白酶降解细胞外基质、基底膜能力密切相关, 因此基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)在肿瘤的发生、发展、转移过程中发挥重要作用, 本文研究基质金属蛋白酶16(matrix metalloproteinase-16, MMP-16)在食管癌中的表达及其与食管癌浸润转移的关系, 并为食管癌早期诊断及靶向治疗提供理论依据。**方法:** 应用免疫组化、蛋白质印迹法(Western blot)及实时定量聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)检测食管癌及相应的正常组织的MMP-16蛋白表达水平和MMP-16 mRNA转录情况, 并对其临床意义进行探讨。通过构建针对MMP-16的小片段发夹状RNA(shRNA)干扰表达质粒, 应用划痕实验、Transwell小室实验、WST-1及流式细胞仪检测方法, 研究shRNA表达质粒沉默MMP-16后对Eca109细胞的迁移、侵袭、增殖及凋亡水平的影响。采用*t*检验进行统计学分析。**结果:** 在蛋白水平, MMP-16在癌组织和正常组织表达平均指数分别为 0.569 ± 0.380 和 1.483 ± 0.982 , 差异有统计学意义($P < 0.01$)。MMP-16表达与食管鳞癌组织分化程度呈正相关($R = 0.704$, $P < 0.05$), 与肿瘤的分期负相关($P < 0.05$)。干扰MMP-16的表达后Eca109细胞侵袭及迁移能力明显增加($P < 0.05$), 细胞凋亡水平下降, 增殖差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:** MMP-16在食管癌组织中低表达, 随着细胞分化程度增加而表达增加, 在Eca109细胞中干扰MMP-16后能够抑制肿瘤细胞的迁移、侵袭, 并减少凋亡水平, MMP-16在食管癌中可能起保护作用。

[关键词] 食管鳞癌; 基质金属蛋白酶16; RNA干扰; 侵袭; 迁移

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.06.005

中图分类号: R735.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)06-0423-10

Expression and biological role of Matrix metalloproteinases 16 in esophagus squamous cell carcinoma

WU Qiu-li, LIN Bi-yun, WU Meng-jie, LIU Ming (Department of Digestive System, First Affiliated Hospital to Xiamen University, Xiamen Fujian 361003, China)

Correspondence to: LIU Ming E-mail: xmlming@xmu.edu.cn

[Abstract] **Background and purpose:** Esophageal carcinoma is one of main malignancies with rapid course and a poor prognosis in China. The reasons of poor overall survival are the invasion and metastasis of the tumor. Matrix metalloproteinase (MMPs) play essential roles in promoting tumor invasion and metastasis. In this study, we aimed to investigate the expression and functional significance of matrix metalloproteinase 16(MMP-16) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). We expect to find a lead molecule for the benefit of early detecting tumor and the development of novel treatment of ESCC. **Methods:** The expression levels of MMP-16 protein and mRNA in human ESCC and the matched normal tissues were determined by immunohistochemistry, Western blot and Real-Time PCR (RT-PCR). The stable Eca109 cell line with MMP-16 knockdown and negative controls were established by RNA interference technology. The cell migration, invasion, proliferation and cell apoptosis of MMP-16 in stable interfered Eca109 cell line was examined by cell counting, scratch test, Transwell test and flow cytometry assays. The data were analyzed by *t* test. **Results:** MMP-16 protein was downregulated in cancerous group compared with the matched normal tissue and correlated with the clinical features of histological differentiation ($P < 0.05$) and tumor stage ($P < 0.05$). The levels of MMP-16 mRNA and protein in Eca109 were significantly decreased by RNA intetrence ($P < 0.05$). We demonstrated that

MMP-16 silencing significantly promoted cell invasion and migration ($P < 0.05$), and inhibited cell apoptosis ($P < 0.05$), while no significant effect was observed on cell proliferation ($P > 0.05$). **Conclusion:** MMP-16 is downregulated in human ESCC tissues. The cell migration and invasion is promoted by interference of MMP-16 in Ec109, while the cell apoptosis is inhibited. MMP-16 may be considered as a target gene for therapy of ESCC.

[**Key words**] Esophageal squamous cell carcinoma; Matrix metalloproteinase-16; RNA interference; Invasion; Migration

食管癌是世界第6大致死性的癌症, 临床上多数患者就诊时已经进入中晚期, 手术效果差, 5年生存率仅徘徊在10%~20%。其治疗效果不佳的主要原因是肿瘤的侵袭和转移^[1-2]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是肿瘤侵袭和转移过程中周围基质降解和重塑的重要酶, 但MMP抑制剂在多种癌症患者身上进行实验时, 这种药物无法减缓肿瘤生长, 有时甚至加快肿瘤生长, 这提示并非所有MMP均为原癌基因^[3-6]。基质金属蛋白酶-16(matrix metalloproteinase-16, MMP-16)在多种肿瘤组织中有较高的表达, 但在食管癌中的表达及与食管癌侵袭和转移关系的研究目前尚未有报道。我们检测食管癌组织标本MMP-16的表达水平与临床病理资料的相关性, 并利用RNA干扰的技术, 建立了有效的MMP-16基因沉默的Eca109细胞株, 观察食管癌细胞迁移、侵袭、增殖及凋亡能力的变化, 探讨控制食管癌细胞的侵袭转移的策略以及探索食管癌基因治疗的靶点。

1 材料和方法

1.1 药物及试剂

MMP-16多克隆抗体购自美国Abcam公司, 羊抗兔二抗及辣根过氧化物酶-卵白素-生物素标记复合物购自美国Zymed公司, 电泳及转膜系统购自Bio-Rad公司; PVDF膜购自Millipore公司; TRIzol裂解液购自北京Tiangen公司; 逆转录试剂盒购自TaKaRa公司; 实时定量聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒购自Fermentas公司; 引物由华大基因有限公司合成纯化; RT-PCR仪购自美国ABI公司。Ec109为人食管鳞状细胞癌株, 购自中国科学院上海细胞研究所; 所有细胞培养耗材及试剂购自美国Hyclone公司。质粒

pGPU6/GFP/Neo MMP-16的构建及重组质粒序列测定由上海吉玛公司完成; 转染试剂Sofast购自厦门太阳马公司; G418及WST-1检测试剂盒购自Roche公司; Transwell小室购自美国BD公司。

1.2 MMP-16蛋白在结肠癌中的表达

采用免疫组化染色法观察, 常规切皮, 厚度4 μm , 二甲苯脱蜡、水化, 3% H_2O_2 酶处理, 微波抗原修复, 山羊血清封闭。按1:500推荐稀释度滴加的MMP-16多克隆抗体显色。4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。顺序滴加羊抗兔二抗及辣根过氧化物酶-卵白素-生物素标记复合物, DAB显色、苏木素复染、封片。用已知阳性切片做阳性对照, 以PBS代替一抗做阴性对照。MMP-16蛋白表达位于细胞质, 阳性表达为浅棕色至棕褐色, 根据阳性细胞百分率和染色深浅分级而评分。①阳性细胞百分率: 0分为无细胞显色, 1分为<25%细胞显色, 2分为25%~50%细胞显色, 3分为>50%细胞显色。②显色深浅: 0分为不显色或显色不清, 1分为浅黄色, 2分为黄色, 3分为棕黄色。结果判定: 二项乘积0~2分为阴性(-), 3~6分为阳性, 7~9分为强阳性(++)。

采用蛋白质印迹法(Western blot)检测蛋白表达, 组织标本自液氮中取出研磨成粉末, 加入组织裂解后低温匀浆; 细胞直接加入裂解液后, 细胞刮刮下细胞后低温匀浆, 取少量上清液进行定量后将所有蛋白样品调至等浓度, 充分混合沉淀加5 \times 上样缓冲液, 直接上样; Marker用1 \times 上样缓冲液调整至与样品等体积; 以初始电压为80 V待条带跑至胶的交界处后120 V稳压电泳至目的蛋白泳动至距胶下缘1 cm结束; 根据NC膜和滤纸面积设定转膜电流大小转膜1 h, 从电转槽中取出后去离子水与PBST漂洗10 min \times 1次, 浸没于封闭液中缓慢摇荡1 h; 按一抗与封闭液1:500浓度滴加于玻璃皿

的封口膜上,将NC膜从封闭膜中取出正面朝上贴在一抗上,4℃摇床过夜后,用PBST漂洗膜后浸洗10 min×3次;按1:7 500稀释二抗,室温轻摇温育1.0 h后,PBST漂洗膜后再浸洗10 min×3次;HRP-ECL发光法发光成像,用胶片曝光,以GAPDH为内参。以每一个样品的目的条带的吸光度(A)值/GAPDH的A值,即为目的条带的半定量结果。同一实验重复3次取其平均值。

1.3 MMP-16 mRNA在结肠癌中的表达

组织标本自液氮中取出研磨成粉末,加入TRIzol裂解液按说明书操作提取总RNA。用分光光度计测定RNA产量($A_{260\text{ nm}}$ 值)及纯度($A_{280\text{ nm}}$ 比值),RNA纯度均在1.8~2.0之间。取1 μg总RNA合成cDNA第一链。逆转录反应所得到的cDNA稀释3倍后,取1 μL cDNA加入20 μL标准RT-PCR反应体系。引物序列:MMP-16上游5'-CCGACTAGCCCCAGAATGTC-3',下游5'-TTGGAGCTACCTCTTGTCTG-3',片段长度173 bp;GAPDH上游5'-CCATGTTTCGTCATGGGTGTGAACC-3',下游5'-AGCCAGTAGAGGCAGGGATGATGTTTC-3',片段长度251 bp。RT-PCR设定参数:95℃预变性30 s;95℃变性20 s,55℃退火30 s,72℃延伸20 s,扩增40个循环;分别得到目的基因MMP-16和内参GAPDH的Ct值,求出 ΔCt (目的基因Ct值-内参Ct值),根据公式 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 算得到目的基因的相对表达量。

1.4 细胞培养

Ec109用RPMI-1640培养基含10%胎牛血清及1%青霉素/链霉素培养,细胞置于37℃、CO₂体积分数为5%的培养箱中培养。当细胞生长到对数生长中期,即70%~80%满盘时进行传代、转染及提取蛋白。

1.5 MMP-16 shRNA质粒的构建

按照siRNA设计原则利用Ambion公司提供的siRNA Target Finder and Design Tools,根据NCBI数据库中MMP-16基因(BC075005)cDNA,针对MMP-16 cDNA设计4条RNA片

段,经Blast Search检索确认与MMP-16以外的人类已知基因序列无同源性,顺义链:5'-GCAAACGTGATGTGGATATAA-3',5'-GGATGGATACCCAATGCAAT-3',5'-GGAAATTCAACAACCAGATAC-3',5'-GCATTGACAGGACAGAAATGG-3'。阴性对照干扰序列,经Blast比对,无任何同源性超过70%的序列,序列如下5'-GTTCTCCGAACGTGTCACGT-3',依据siRNA序列,设计模板DNA链10条,其顺序分别为Bbs I酶切位点、正义序列、9 nt loop连接序列、反义序列、RNA聚合酶III终止子(6个T)、BamH I酶切位点,质粒pGPU6/GFP/Neo MMP-16构建及重组。小干扰RNA1起始位点为815,序列为5'-CACCGCAAA CG T G A T G T G G A T A T A A T T C A A G A G A T T A T A T C C A C A T C A C G T T T G C T T T T T T T G - 3' ; 小干扰RNA2起始位点为1404,序列为5'-CACCGGATGGATACCCAATGCAAATTTCAAGAGAATTTGCATTGGGTATCCATCCTTTTTTTTG-3';小干扰RNA3起始位点为1805,序列为5'-CACCGGAAATTTCAACAACCAGATACTTCAAGAGAGTATCTGGTTGTTGAATTTCTTTTTTTTG-3';小干扰RNA4起始位点为643,序列为5'-CACCGCATTGACAGGACAGAAATGGTTCAAGAGACCATTTCTGTCTCTGTCAATGCTTTTTTTTG-3',shNC序列为5'-CACCGTTCTCCGAACGTGTCA CG T C A A G A G A T T A C G T G A C A C G T T C G G A G A A T T T T T T T G - 3' 。

1.6 质粒转染及稳定株筛选

在转染前24 h,在24孔板每孔接种 1×10^5 个细胞,24 h后细胞密度达60%~70%时,制备梭华-Sofast/DNA复合物,室温温育15~20 min。将梭华-Sofast/DNA复合物加入每孔细胞中并轻轻摇动使均匀混合,置于37℃、CO₂体积分数为5%的温育箱中温育24 h后,观察转染效率,并将细胞传代到6孔板中,每孔中加入400 mg/mL

的G418进行稳定株的筛选。每3~5 d更换1次含有G418的筛选液。2周后挑选单克隆进行扩大培养。

1.7 划痕实验

在铺板的时候, 在板的背面用记号笔划5~6道平行的横线。6孔板指数生长期的细胞, 此刻应该覆盖90%, 利用200 μL 枪头划痕, 与以上的横线垂直, 给予无血清培养基培养, 此刻测量一个距离, 在划痕与横线垂直的位置测量, 而且每个时间点都在相应的位置测。于6、24、48及72 h的各时间点测距, 统计分析结果。

1.8 侵袭实验

Ec109转染shRNA-MMP16质粒后的侵袭能力用细胞体外侵袭实验-Transwell小室检测, Ec109细胞(5×10^4 个细胞)加入0.2 mL无血清培养基中, 加入Transwell小室的上室中, 侵袭小室的内膜滤径为8 μm 的水化基底膜; Transwell小室的下室中加入0.5 mL含20%FBS的培养基。于37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 体积分数为5%的培养箱中培养36 h (主要依据细胞侵袭能力而定), 未穿透小室基底膜的细胞用棉签擦拭掉。小室用4%多聚甲醛固定15 min, 0.1%结晶紫染色10 min, 在去离子水中洗涤3次, 在显微镜下随机选取5个视野计数, 取平均值。重复实验3次。

1.9 细胞增殖检测

细胞的增殖能力用WST-1检测取干扰效率明显的2组shRNA-MMP-16质粒组、阴性对照组及未处理的Ec109组, 共4组, 每组做3个复孔。当细胞生长到对数生长中期, 即70%~80%满盘时, 消化细胞, 吹打均匀后进行细胞计数, 在96孔板中每孔加入100 μL 3 000个细胞。分别于第1、2、3、4及5天时, 每孔加入10 μL WST-1溶液, 把96孔版置于摇床上摇动1 min后, 1 h后在450 nm处测定各组 A 值, 进行统计分析。

1.10 细胞凋亡实验

取干扰MMP-16及阴性对照的Ec109细胞铺在24孔板中, 培养12 h贴壁后予终浓度为0~150 mg/L浓度的奥沙利铂, 24 h后分别收集对照组及处理组细胞。胰酶消化后, 用培养液制成单细胞悬液。每组取 1×10^5 个细胞, 用PBS洗2

次, 弃上清液, 加入500 μL 的Binding Buffer悬浮细胞; 加入5 μL Propidium iodide; 室温、避光、反应5~15 min; 在1 h内, 进行流式细胞仪检测。

1.11 统计学处理

实验均重复3次。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用Graphpad prism软件对数值进行 t 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MMP-16蛋白在癌组织中表达下调, 并与肿瘤分化程度及分期相关

免疫组化结果显示, MMP-16蛋白表达于细胞质内, MMP-16在食管癌组织和食管正常组织(距癌灶5~7 cm的食管上切端标本, 即正常食管黏膜组织)中均有不同程度的表达, 在癌组织中的表达水平显著低于正常组织($P < 0.05$), MMP-16与食管癌组织分化程度相关($P < 0.01$)。食管鳞癌高分化组MMP-16表达强于低分化组($P < 0.01$), 食管鳞癌中分化组MMP-16表达强于低分化组($P < 0.01$)。高、中分化组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。Western blot检测结果显示, MMP-16蛋白在食管癌组织和食管正常组织中均有不同程度的表达, MMP-16在癌组织及正常组织中表达平均指数分别为 0.569 ± 0.380 和 1.483 ± 0.982 , 在癌组织中的表达水平显著低于正常组织($P < 0.01$)。RT-PCR检测结果显示, 癌组织中MMP-16 mRNA表达低于配对正常组织, 但差异无统计学意义($P > 0.05$, 图1)。

进一步分析MMP-16蛋白的表达与临床数据的关系, 包括年龄、性别、病理分化程度、肿瘤分期及淋巴结转移方面, MMP-16表达与食管鳞癌组织分化程度呈正相关($R = 0.704$, $P < 0.05$), 与肿瘤的分期正相关($P < 0.05$), MMP-16在高分化食管鳞癌细胞中表达强阳性, 尤其在角化珠内, 在低分化肿瘤中表达阴性。MMP-16蛋白在 T_1/T_2 肿瘤分期中表达显著高于 T_3/T_4 肿瘤分期, MMP-16在其他临床数据中差异无统计学意义($P > 0.05$, 表1、2)。

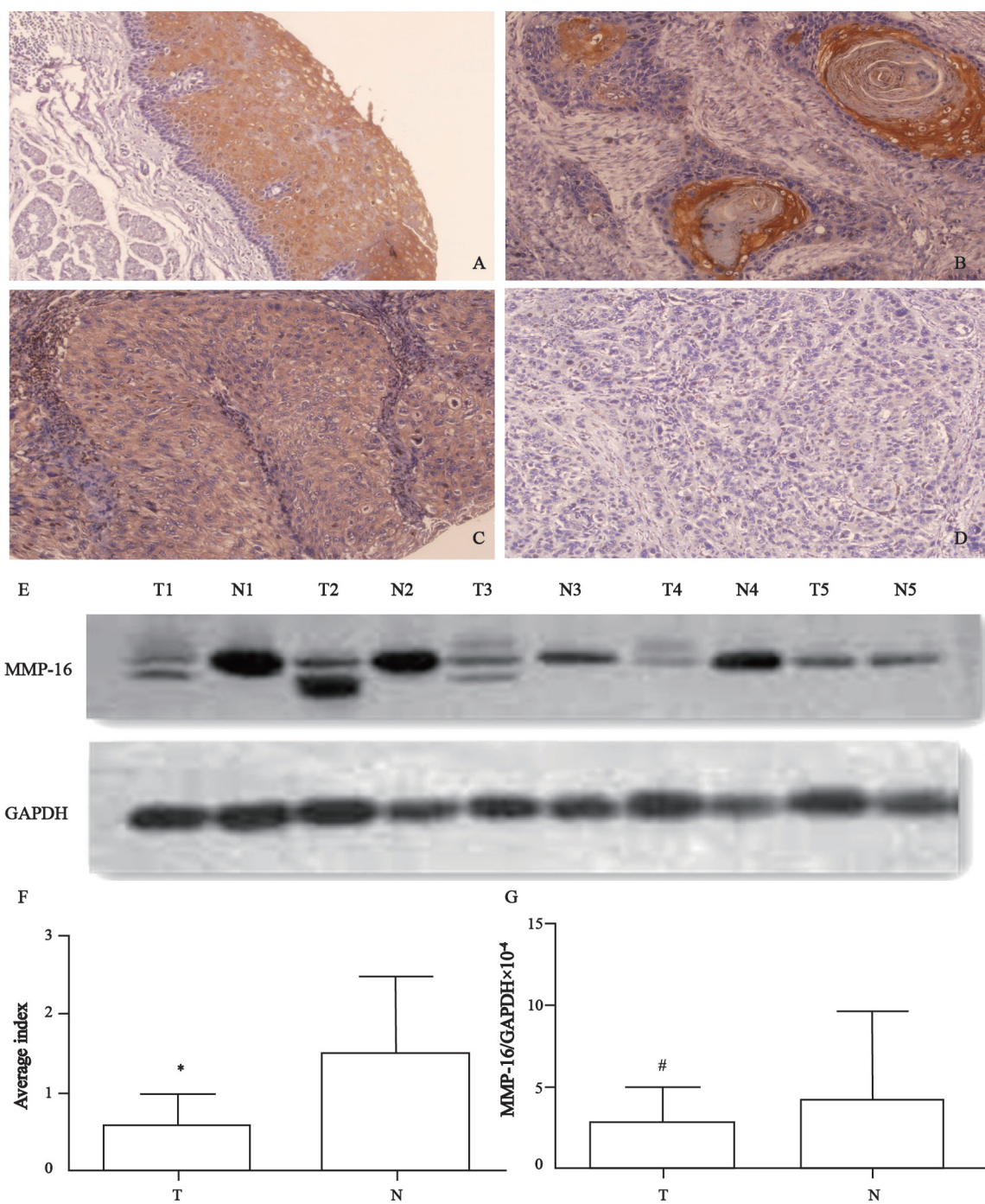


图 1 MMP-16蛋白及mRNA在食管鳞癌中的表达

Fig. 1 The expression level of MMP-16 protein and mRNA in ESCC tissues and matched normal tissues

T: ESCC tissue; N: Normal tissue. A-D: Immunohistochemical analysis of MMP-16 expression in ESCC tissue with three degrees of differentiation (well, moderately, poorly differentiation indicated in B, C, D, respectively) and the matched normal tissue(indicated in A); E: Western blot analysis of MMP-16 protein expression in ESCC tissue and the matched normal tissue; F: The results of the relative protein expression in two groups were presented as a histogram; G: RT-PCR analysis of MMP-16 expression in ESCC tissue and the matched normal tissue. *: $P < 0.01$, compared with the matched normal tissue. #: $P > 0.05$, compared with the match normal tissue.

表 1 MMP-16蛋白在食管鳞癌组织及正常组织中表达

Tab. 1 The expression level of MMP-16 protein and in ESCC tissues and matched normal tissues

Group	MMP-16 protein					P value
	Total	-	+	++	Positive/%	
Normal tissues	36	2	5	29	94.4	0.006
ESCC tissues	36	11	15	10	69.4	

表 2 MMP-16蛋白在食管鳞癌的表达与临床病理关系

Clinical feature	MMP-16 positive/%	MMP-16 negative/%	P value
Total	28	8	
Age/year			1.000
<60	17	5	
≥60	11	3	
Gender			0.926
Male	18	5	
Female	10	3	
Grade of differentiation			0.000
Well	13	0	
Moderately	7	3	
Poorly	1	12	
Tumor stage			0.032
T ₁ /T ₂	18	7	
T ₃ /T ₄	3	8	
Lymph node metastasis			0.174
Negative	19	11	
Positive	2	4	

2.2 MMP-16在食管癌细胞株中的表达

RT-PCR检测结果显示, Ec109中MMP-16 mRNA表达量最高, 为细胞系EC9706的225.97倍, 为TE1的8.76倍(表3)。Western blot检测结果表明, 蛋白MMP-16在3种食管癌高分化细

胞株中均有表达, Ec109细胞株MMP-16蛋白表达最高, 与RT-PCR结果相符(图2)。因此, 选取Ec109细胞株进一步研究MMP-16的功能($P<0.05$)。

表 3 3种食管癌细胞系MMP-16 mRNA表达

Tab. 3 RT-PCR analysis of MMP-16 mRNA in esophagus squamous cell lines

Cell line	Ct	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	P value
TE-1	32.35±1.39 [▲]	-4.69±0.53	25.81	
Ec9706	36.69±0.73 [#]	0	1	
Ec109	29.16±1.51	-7.82±0.32	225.97	
F value	35.366			0.00

*: $P<0.05$, compared with Ec109; #: $P<0.01$, compared with Ec109; ▲: $P<0.05$, compared with Ec9706.

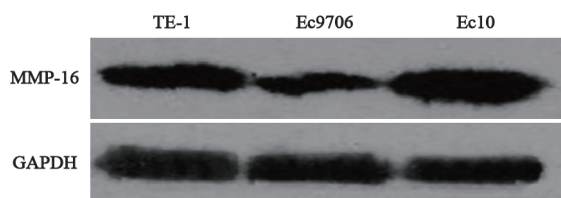


图 2 MMP-16 蛋白在食管癌细胞系中的表达

Fig. 2 Western blot analysis of MMP-16 protein in esophagus squamous cell lines

2.3 MMP-16干扰质粒的干扰效果

经G418筛选, 收集稳定转染细胞并提取蛋白, 采用Western blot检测转染shRNA后, 提取Ec109组(空白对照组)、NC组(阴性对照组即转染无关序列组)、shRNA1组(转染shRNA-1组)、shRNA2(转染shRNA-2组)、shRNA3(转染

shRNA-3组)和shRNA4(转染shRNA-4组)的蛋白水平, 结果显示, Ec109组及 NC组表达差异无统计学意义($P>0.05$), 转染shRNA4组MMP-16蛋白表达均有不同程度下降, 其中shRNA2组蛋白表达下降最显著, 与RT-PCR结果相符合($P<0.05$, 图3)。

2.4 干扰MMP-16对Ec109细胞的迁移能力影响

细胞划痕0、72 h后即可见shRNA2组的Ec109细胞迁移的距离明显多于阴性对照组细胞, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图4)。

2.5 干扰MMP-16对Ec109细胞的侵袭能力影响

本论文采用Transwell细胞侵袭实验, 研究

了ATL对ESCs侵袭能力的影响。结果表明，与对照组相比，ATL(100 nmol/L)处理24 h后，ESCs穿过人工基质matrigel滤膜的细胞个数明显减少($P < 0.01$ ，图5)。上述结果表明，干扰MMP-16后可以促进Ec109的侵袭转移能力。

2.6 干扰MMP-16对Ec109细胞的增殖能力影响

干扰shRNA2-MMP-16及阴性对照在450 nm波长下检测各孔A值分别为：第1天 0.613 ± 0.022 和 0.702 ± 0.046 ；第2天 1.162 ± 0.060 和 1.347 ± 0.005 ；第3天， 1.938 ± 0.039 和 2.117 ± 0.041 ；第4天， 2.044 ± 0.031 和 2.134 ± 0.048 ；第5天， 2.186 ± 0.027 和 $2.186 \pm$

0.061 。两组细胞增殖能力变化差异无统计学意义($P > 0.05$ ，图6)。

2.7 干扰MMP-16对Ec109细胞的凋亡能力影响

0~150 mg/L奥沙利铂处理Ec109细胞24 h，奥沙利铂在低浓度0~50 mg/L时shRNA2组及阴性对照组两组细胞凋亡率低，差异无统计学意义($P > 0.05$)；奥沙利铂(100 mg/L，24 h)作用，两组凋亡比率分别为 $29.9\% \pm 1.18\%$ 和 $9.39\% \pm 1.15\%$ ($P < 0.05$)；奥沙利铂(150 mg/L，24 h)作用，两组凋亡比率分别为 $63.37\% \pm 2.06\%$ 和 $15.23\% \pm 1.91\%$ ($P < 0.05$ ，图7)。

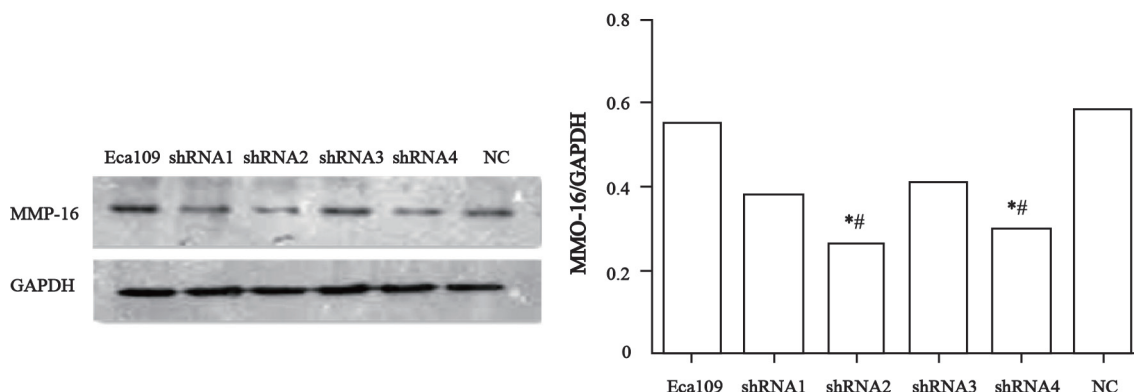


图3 shRNA转染后MMP-16蛋白表达

Fig. 3 Western blot analysis to confirm the shRNA silencing of MMP-16, with GAPDH used as a loading control

*: $P < 0.05$, compared with negative control; #: $P < 0.01$, compared with negative control; Ec109: Blank control; NC: Negative control.

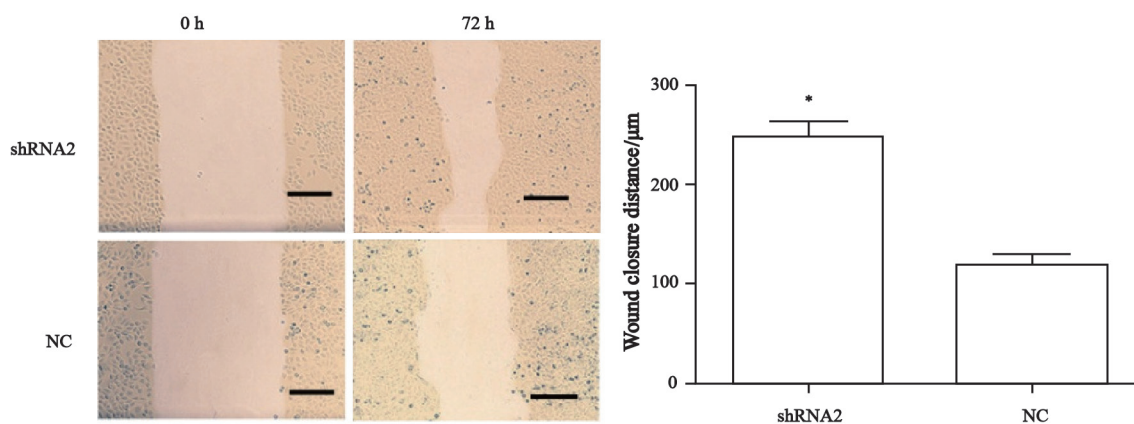


图4 shRNA2干扰后细胞划痕实验结果

Fig. 4 Wound healing assay in Ec109-shMMP16 and negative control cells

shRNA2: shMMP16 cells; NC: Negative control. *: $P < 0.05$, compared with negative control.

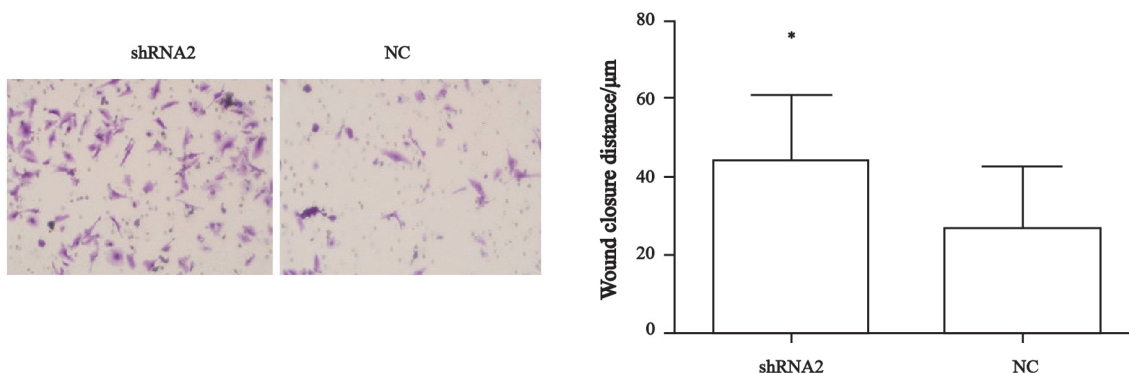


图5 shRNA2干扰后细胞侵袭实验结果

Fig. 5 Migration assay and a histogram of the quantification in Ec109-shMMP16 and control cells

shRNA2: shMMP16 cells; NC: Negative control. *: $P < 0.01$, compared with negative control.

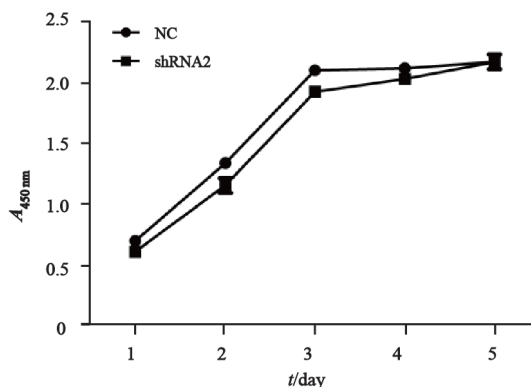


图6 WST-1检测shRNA2-MMP-16对细胞增殖影响

Fig. 6 WST-1 assay analysis of cell proliferation in Ec109-shMMP16 and control cells

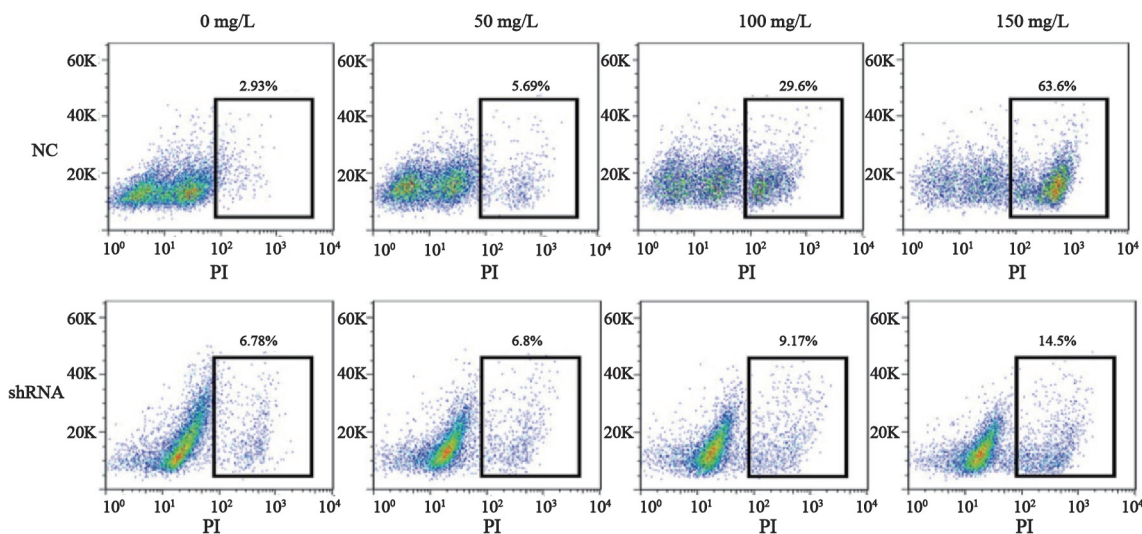


图7 奥沙利铂24 h对shRNA2-MMP-16凋亡影响

Fig. 7 Apoptotic analysis by flow cytometry in Ec109-shMMP16 and control cells treated with oxaliplatin for 24 h

3 讨论

肿瘤的侵袭转移是一个多步骤的过程，

肿瘤侵袭转移必须通过突破细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)及基底膜实现, 从而向周围组织侵袭和远处转移。MMP几乎能降解除多糖外的全部ECM成分, 因而在肿瘤

的侵袭转移中起着重要的促进作用。MMPs还与细胞凋亡、细胞增殖、血管生成、免疫监督有关,因此在肿瘤生长发育中有非常重要的作用^[7-8]。本文研究MMP-16与食管癌浸润转移关系,并为食管癌早期诊断及靶向治疗提供理论依据。

本研究显示,临床组织标本中,免疫组化检测MMP-16蛋白在食管正常组织中强阳性表达,在高分化及中分化食管鳞癌组织中也呈现强表达,低分化食管鳞癌中很少表达,与魏力等^[9]研究MMP-26在子宫内膜癌的研究结果相似,研究中采用免疫组化的方法,发现MMP-26在高分化癌组织的表达明显高于中、低分化癌组织,中分化癌组织中MMP-26表达明显高于低分化癌组织。我们用Western blot检测36对食管癌及配对的食管正常组织MMP-16蛋白发现,食管鳞癌组织和食管正常组织均有MMP-16表达,但在癌组织中的表达量明显低于食管正常组织。这与Moilanen等^[4]的MMP-8的研究结果相似,他们均采用Western blot,显示MMP-8在癌组织中表达低于食管正常的组织。RT-PCR结果显示MMP-16 mRNA在食管癌不同分化程度、分期及淋巴结是否转移方面差异均无统计学意义,这说明在MMP-16mRNA转录翻译MMP-16蛋白过程中,转录后MMP-16加工起了主要作用,从而使MMP-16 mRNA表达水平与临床关系不大,相关文献显示MiR-155^[10]及MiR-146a^[11]对MMP-16的转录后加工有重要影响,同时也需要我们做大样本的临床调查来验证。MMP-16蛋白在T₁/T₂期食管癌组织中表达明显强于T₃/T₄期食管癌患者。本研究首先从组织标本中基因到蛋白水平研究了MMP-16在食管癌中的表达及与食管癌临床病理资料的关系,发现MMP-16在食管癌细胞的侵袭和转移中可能起保护作用,虽然MMP-16蛋白差异表达TNM临床病理分期及淋巴结转移中的差异统计学意义,可能是由于临床样本数量较少,但根据上述资料,我们推测MMP-16在随着癌组织分化程度降低而表达逐渐下降,在癌症侵袭转移中可能起保护作用,并且MMP-16对正常鳞状上皮细胞的生长发育也起重要的作用。

本次实验中,我们利用RNA干扰技术有

效下调Eca109细胞株中MMP-16基因表达,之后利用WST-1方法检测食管癌细胞株的生长活力,结果发现WST-1干扰组细胞增殖能力和对照组相比,略有下降,但差异无统计学意义($P>0.05$),MMP-16基因表达下调并不明显影响Eca109细胞株的增殖能力。

本次实验中,我们应用流式细胞仪PI染色法检测Eca109细胞凋亡,结果发现MMP-16干扰组的细胞凋亡率和对照组相比,凋亡明显减少,提示靶向抑制食管癌Eca109细胞株MMP-16基因表达并能抑制肿瘤细胞凋亡。MMP-16可能诱导食管鳞状细胞癌的凋亡,MMP-16在食管鳞癌中可能起抑癌作用,与我们前期的食管鳞癌组织标本的研究结果相符。目前关于MMP16在癌症中凋亡的研究较少,在MMPs家族中既有促凋亡又有抗凋亡作用。MMP-3、MMP-7、MMP-9、MMP-11可以调控细胞凋亡,乳腺上皮细胞过表达MMP-3时可以诱导细胞凋亡^[12-13];MMP-7通过释放膜结合FASL,诱导邻近细胞的凋亡^[8];同时MMP-7也可以通过裂解肝素结合表皮生长因子而抑制凋亡;过表达MMP-11将降低癌细胞的自发凋亡。因此我们认为,MMP16基因在不同肿瘤或是相同肿瘤的不同细胞株中对细胞增殖及凋亡具有不同的影响。对于MMP16是否影响其他食管癌细胞株的增殖和凋亡,则需进一步的研究。

MMP-16是MMP家族的新成员,定位于细胞膜表面,能够降解胶原酶III、明胶、纤维连接蛋白及层粘连蛋白-1等,还可以在细胞表面激活其他MMP成员,如proMMP-2。研究表明,MMP-16在一些恶性肿瘤中呈过度表达。MMP-16也同样在正常组织中表达,在发育和成熟的乳腺组织中起重要作用,在脑、肺、胎盘及平滑肌中也均表达^[14]。MMP-16最开始发现于口腔黑色素瘤^[15];随后发现MMP-16在胃癌^[16]、肝癌^[17]、肾癌^[18]、脑星形细胞癌^[19]、胰腺癌^[20]中均有表达;在黑色素瘤、胃癌及肝癌中肿瘤组织中MMP-16呈现高表达,并且与肿瘤的侵袭和转移密切相关。但MMP-16在乳腺癌^[21]、脑星形细胞癌^[19]及尿路上皮癌^[21]的侵袭转移中作用有限。本实验中,转染了MMP-16有效干扰质粒的Ec109细胞与

对照组相比, 食管癌细胞的迁移和侵袭能力上升, 提示下调MMP-16表达可以促进食管癌细胞株的迁移和侵袭能力, 说明MMP-16在食管鳞状细胞癌中可能起抑制食管癌侵袭和转移的作用。

本研究发现MMP-16表达下调后, 有效干扰质粒的Ec109细胞出现凋亡减少, 迁移和侵袭能力减弱, 因此我们认为MMP-16在食管癌Ec109的凋亡、迁移和侵袭中可能起着重要作用。但具体作用机制尚未明确, 值得将来进一步研究。我们认为MMP-16将来可能在抑制食管鳞癌肿瘤的发生、发展中起重要作用, 因此阻断所有MMP基因并非明智方法, 应该根据不同肿瘤特点阻断原癌基因的MMP表达, 同时恢复或增加该肿瘤中起抑癌作用的MMP表达。

[参 考 文 献]

- [1] SAKANO A, YANAI H, SAKAGUCHI E, et al. Clinical impact of tumor invasion depth staging of esophageal squamous cell carcinoma using endoscopic ultrasonography [J]. *Hepatogastroenterology*, 2010, 57(104): 1423-1429.
- [2] ILSON D H. Oesophageal cancer: new developments in systemic therapy [J]. *Cancer Treat Rev*, 2003, 29(6): 525-532.
- [3] GUTI RREZ-FERN NDEZ A, FUEYO A, FOLGUERAS A R, et al. Matrix metalloproteinase-8 functions as a metastasis suppressor through modulation of tumor cell adhesion and invasion [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(8): 2755-2763.
- [4] MOILANEN M, PIRIL E, GRENNAN R, et al. Expression and regulation of collagenase-2 (MMP-8) in head and neck squamous cell carcinomas [J]. *J Pathol*, 2002, 197(1): 72-81.
- [5] PALAVALLI L H, PRICKETT T D, WUNDERLICH J R, et al. Analysis of the matrix metalloproteinase family reveals that MMP8 is often mutated in melanoma [J]. *Nat Genet*, 2009, 41(5): 518-520.
- [6] MONTEL V, KLEEMAN J, AGARWAL D, et al. Altered metastatic behavior of human breast cancer cells after experimental manipulation of matrix metalloproteinase 8 gene expression [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(5): 1687-1694.
- [7] EGBLAD M, WERB Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(3): 161-174.
- [8] POWELL W C, FINGLETON B, WILSON C L, et al. The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis [J]. *Curr Biol*, 1999, 9(24): 1441-1447.
- [9] 魏力, 郝凤英. MMP-26 在子宫内膜癌组织中的表达 [J]. *医学临床研究*, 2008, 25(3): 419-422.
- [10] LIU J, MIL A, AGUOR E N, et al. MiR 155 inhibits cell migration of human cardiomyocyte progenitor cells (hCMPs) via targeting of MMP-16 [J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(10): 2379-2386.
- [11] ASTARCI E, ERSON-BENSAN A E, BANERJEE S. Matrix metalloproteinase 16 expression is downregulated by microRNA-146a in spontaneously differentiating Caco-2 cells [J]. *Dev Growth Differ*, 2012, 54(2): 216-226.
- [12] ALEXANDER C M, HOWARD E W, BISSELL M J, et al. Rescue of mammary epithelial cell apoptosis and entactin degradation by a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 transgene [J]. *J Cell Biol*, 1996, 135(1): 1669-1677.
- [13] WITTY J P, LEMPKA T, COFFEY R J, et al. Decreased tumor formation in 7, 12-dimethylbenzanthracene-treated stromelysin-1 transgenic mice is associated with alterations in mammary epithelial cell apoptosis [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(7): 1401-1406.
- [14] SZABOVA L, YAMADA S S, BIRKEDAL-HANSEN H, et al. Expression pattern of four membrane-type matrix metalloproteinases in the normal and diseased mouse mammary gland [J]. *J Cell Physiol*, 2005, 205(1): 123-132.
- [15] TATTI O, ARJAMA M, RANKI A, et al. Membrane-type-3 matrix metalloproteinase (MT3-MMP) functions as a matrix composition-dependent effector of melanoma cell invasion [J]. *PLoS one*, 2011, 6(12): 28325-28329.
- [16] LOWY A M, CLEMENTS W M, BISHOP J, et al. β -Catenin/Wnt signaling regulates expression of the membrane type 3 matrix metalloproteinase in gastric cancer [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(9): 4734-4741.
- [17] ARAI I, NAGANO H, KONDO M, et al. Overexpression of MT3-MMP in hepatocellular carcinoma correlates with capsular invasion [J]. *Hepatogastro-enterology*, 2007, 54(73): 167-171.
- [18] KITAGAWA Y, KUNIMI K, UCHIBAYASHI T, et al. Expression of messenger RNAs for membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human renal cell carcinomas [J]. *J Urol*, 1999, 162(3): 905-909.
- [19] NAKADA M, NAKAMURA H, IKEDA E, et al. Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors [J]. *Am J Pathol*, 1999, 154(2): 417-428.
- [20] ELLENRIEDER V, ALBER B, LACHER U, et al. Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression [J]. *Int J Cancer*, 2000, 85(1): 14-20.
- [21] KITAGAWA Y, KUNIMI K, ITO H, et al. Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human urothelial carcinomas [J]. *J Urol*, 1998, 160(4): 1540-1545.

(收稿日期: 2013-10-14 修回日期: 2014-03-20)