论著

文章编号:1000-5404(2011)06-0600-04

MMP-2、MMP-9在高、低转移潜能乳腺癌细胞中的表达变化

张 涛[1],陈晓品[1],汤为学[2],彭志平[3],李少林[3] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院肿瘤科[1],基础医学院病理生理学教研室[2],基础医学院核医学教研室[3])

【摘要】 **目的** 筛选高、低转移潜能的乳腺癌细胞亚系,研究基质金属蛋白酶-2(matrix metalloprotainese,MMP-2)、MMP-9在高、低转移潜能乳腺癌细胞的表达差异及其意义。**方法** 利用人乳腺癌细胞系MDA-MB-435s细胞在Transwell小室上连续穿透人工基质膜获得高、低转移潜能乳腺癌细胞株。用细胞侵袭实验、免疫组化、Western blot方法,测定2株细胞的侵袭能力和MMP-2和MMP-9的表达情况。**结果** 细胞侵袭实验结果显示,侵袭实验20 h时,高转移潜能乳腺癌细胞的侵袭能力[(61.40±7.08)个/视野]强于低转移潜能乳腺癌细胞[(25.34±4.87)个/视野,$P<0.05$]。免疫组化和图像分析结果显示,MMP-2和MMP-9在高转移潜能乳腺癌细胞中的表达水平[分别为(0.24±0.04)、(0.23±0.05)]高于低转移潜能乳腺癌细胞[分别为(0.16±0.02)、(0.13±0.03),$P<0.05$]。将免疫组化结果和细胞侵袭实验结果进行Pearson相关分析,结果表明MMP-2、MMP-9的表达水平与穿透Transwell小室的数量呈正相关($r=0.957$、$r=0.964$,$P<0.05$)。Western blot检测结果也显示,高转移潜能乳腺癌细胞的MMP-2和MMP-9的表达[分别为(0.59±0.14)、(0.67±0.17)]明显高于低转移潜能乳腺癌细胞[分别为(0.31±0.07)、(0.35±0.06),$P<0.05$]。**结论** 利用细胞穿透人工基底膜能力的差异能够筛选出高、低转移潜能的乳腺癌细胞;MMP-2、MMP-9的蛋白表达与乳腺肿瘤的侵袭能力关系密切。

【关键词】 乳腺肿瘤;肿瘤转移;基质金属蛋白酶

【中图法分类号】 R345;R730.23;R737.9 【文献标志码】 A

Expressions of matrix metalloprotainese-2 and metalloprotainese-9 in human breast cancer cell line MDA-MB-435s with high- and low-metastatic potentiality

Zhang Tao[1], Chen Xiaopin[1], Tang Weixue[2], Peng Zhiping[3], Li Shaolin[3] ([1]Department of Oncology, First Affiliated Hospital, [2]Deparment of Pathophysiology, [3]Department of Nuclear Medicine, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To establish the subclones of MDA-MB-435s human breast cancer cells with high and low potentiality of metastasis, and then investigate the differences of the expressions of matrix metalloprotainese-2 and -9 (MMP-2 and MMP-9) between these 2 subclones. **Methods** Transwell invasion assay was used to screen the subclones of MDA-MB-435s cells with high- and low- metastatic potentiality. The expressions of MMP-2 and MMP-9 were examined with immunohistochemical staining and Western blot analysis, and cell invasion ability was evaluated Transwell invasion assay. **Results** Transwell invasion assay showed the ivasion ability of breast cancer cells was higher in the cells with high-metastatic potentiality than those with low-metastatic potentiality, with significant difference ($P<0.05$). Immunohistochemistry showed that the expression levels of MMP-2 and MMP-9 were significantly higher in cells with high metastatic potentiality (0.24±0.04 and 0.23±0.05 respectively) than that in cells with low metastatic potentiality (0.16±0.02 and 0.13±0.03 respectively, $P<0.05$). These results were confirmed by Western blot assay. A positive correlation was found between the expression levels of MMP-2/9 and the invasion potentiality of MDA-MB-435s ($r=0.957$, 0.964, $P<0.05$). **Conclusion** The subclones of human breast cancer cells with high- and low- metastatic potentiality can be screen with Transwell invasion assay. Tumour cells to penetrate a matrigel barrier *in vitro* is closely re-

【基金项目】 重庆市卫生局医学科研项目(07-2-082)

【通信作者】 张 涛,电话(023)89012729,E-mail:tumorzzt@163.com

lated with the expression levels of MMP-2 and MMP-9 in human breast cancer cells.

[Key words] breast neoplasms; neoplasm metastasis; matrix metalloprotainese

Supported by the Project of Medical Science of Chongqing Municipal Health Bureau (07-2-082). Corresponding author: Zhang Tao, Tel: 86-23-89012729, E-mail: tumorzzt@163.com

流行病学资料显示,2010 年全球乳腺癌发病率居女性恶性肿瘤首位,病死率居女性因恶性肿瘤死亡原因第 2 位[1]。我国乳腺癌的发病率在近 20 年持续快速增长,年增长率为 3% ~4%,远高于 0.5% 的世界平均水平[2]。侵袭性生长和转移潜能是乳腺癌顽固性和难治性的根本原因。阐明乳腺肿瘤侵袭、转移发生的关键机制,建立相应的阻断途径,是根治乳腺癌的希望所在。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)促进乳腺癌浸润和转移机制之一就是 MMPs 的过度表达,通过基质的水解,使细胞外基质和基底膜所形成的屏障消失或减弱,促进了癌细胞的侵袭转移[3];目前公认其中 MMP-2 和 MMP-9 作用起着重要的作用。

本实验在建立遗传背景相同但转移能力不同的 2 株乳腺癌细胞亚系,通过免疫组化、Western blot 及图像分析等方法,检测 MMP-2 和 MMP-9 在不同转移潜能乳腺癌细胞中的表达,并探讨 MMP-2 和 MMP-9 对乳腺癌细胞生长、侵袭和转移能力的影响,为乳腺癌复发和转移的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

乳腺癌细胞系 MDA-MB-435s、小鼠成纤维细胞株(NIH3T3,中科院上海细胞所),RPMI1640、胎牛血清(Gibco 公司,美国),胰蛋白酶(华美生物工程公司),细胞培养瓶与细胞培养板(Nunc 公司,美国),基底凝胶(美国 BD 公司);Transwell 侵袭小室(Milipore PI8P01250,美国 Costar 公司,聚碳酸酯微孔膜孔径 8 μm),兔抗人 MMP-2/MMP-9 抗体(北京中山生物有限公司),MMP-2、MMP-9 探针(上海生工公司设计制作)。

1.2 高、低转移潜能乳腺癌细胞亚系的建立和鉴定

高、低转移潜能乳腺癌细胞亚系的建立和鉴定按课题组前期建立的方法进行[4]。

1.3 细胞侵袭实验

高、低转移潜能乳腺癌细胞亚系的细胞侵袭实验方法按课题组方法建立的方法进行[4],每组分别统计 200 倍视野下细胞穿过 Transwell 小室的细胞数量。

1.4 免疫组化

将成功分离的高、低转移潜能 MDA-MB-435s 细胞(2×10^4 个)分别接种于 24 孔板孔底无菌小玻片上,培养 48 h 后,吸取弃掉上层培养液,0.1 mol/L PBS 轻洗 3 次,3% H_2O_2 室温处理 90 s,正常动物血清封闭 20 min,1∶200 抗人 MMP-2 和 MMP-9 抗体分别孵育过夜(4 ℃);其余步骤按 S-P 二步法免疫组织化学检测,实验过程按试剂盒说明书进行,在光学显微镜下进行观察细胞并随机拍照,每组各拍摄 20 张 40 倍照片。阴性对照采用 PBS 代替一抗进行孵育。

1.5 Western blot 检测

弃去培养液,D-PBS 清洗细胞 3 次,用枪头吹打细胞使细胞与壁分离,将细胞转移至 Eppendorf 管,低速离心 1 min,沉淀细胞,弃去 D-PBS,加入 RIPA-Doc buffer 裂解细胞,并用超声波击碎细胞器,4 ℃离心。取上清 Bradford 法测定总蛋白量。10% Tris-Glycine SDS-PAGE 凝胶电泳,将蛋白转至 PVDF 膜,Blocking buffer(5% 脱脂奶粉,3% BSA,1 × PBST 配制)室温封闭 2 h;加入Ⅰ抗(1∶200 抗人 MMP-2 和 MMP-9 抗体)4 ℃过夜,1 × PBST 漂洗 15 min × 4 次;Ⅱ抗,室温摇床 1 h,1 × PBST 漂洗 10 min × 4 次,PVDF 膜置于 ECL 反应液中 1 min,曝光显色,实验重复 3 次。

1.6 图像分析和统计处理

高倍镜下随机选取免疫组化结果,每组 20 张,采用北航 CM-2000B 型生物医学图像分析系统进行免疫组化阳性区域平均光密度(optical density, OD)测量,结果 $\bar{x} \pm s$ 表示。Western blot 结果图像输入电脑,采用北航 CM-2000B 型生物医学图像分析系统对目的条带积分光密度值与内参积分光密度值进行比较,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

采用 SPSS 10.0 统计软件对高、低转移潜能细胞穿过 Transwell 微孔膜的数量以及两组细胞免疫组化、Western blot 的光密度值进行完全随机设计的 t 检验;免疫组化光密度值和细胞侵袭实验结果进行 Pearson 相关分析。

2 结果

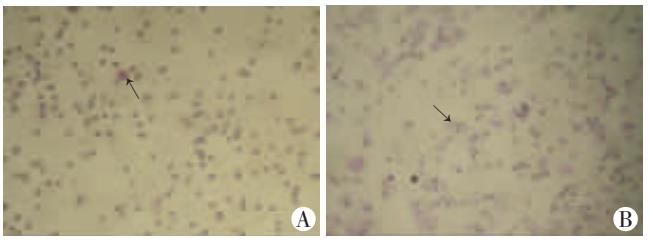
2.1 细胞侵袭实验

侵袭实验结果表明,侵袭实验 20 h 时,所筛选高、低转移潜能细胞穿过 Transwell 小室的数量有明显差异,即高转移潜能细胞侵袭能力强于低转移潜能细胞($P < 0.05$,表 1,图 1),也表明用 Transwell 法成功建立了人 MDA-MB-435s 高、低转移潜能乳腺癌细胞亚系。

表 1 不同转移潜能乳腺癌细胞的细胞侵袭能力和 MMP-2、MMP-9 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

乳腺癌细胞	细胞侵袭数目(个/视野)	免疫组化		Western blot	
		MMP-2	MMP-9	MMP-2	MMP-9
低转移潜能	25.34 ± 4.87	0.16 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.31 ± 0.07	0.35 ± 0.06
高转移潜能	61.40 ± 7.08[a]	0.24 ± 0.04[a]	0.23 ± 0.05[a]	0.59 ± 0.14[a]	0.67 ± 0.17[a]

a: $P < 0.05$,与低转移潜能乳腺癌细胞比较



A:低转移潜能乳腺癌细胞;B:高转移潜能乳腺癌细胞 ↑:穿过Transwell小室的细胞

图1 倒置显微镜下观察侵袭实验20 h时Transwell小室的乳腺癌细胞 (×200)

2.2 免疫组化检测MMP-2和MMP-9在不同转移潜能乳腺癌细胞中的表达

免疫组化结果显示,在高转移潜能乳腺癌细胞(图2)和低转移潜能乳腺癌细胞(图3)中,MMP-2和MMP-9均呈阳性反应,阳性反应产物主要位于细胞质中,细胞核淡染。阴性对照无着色。图像分析和统计学结果表明,在高转移潜能乳腺癌细胞MMP-2和MMP-9的表达与低转移潜能乳腺癌细胞相比较,明显较强($P<0.05$)。见表1。

将免疫组化结果和细胞侵袭实验结果进行Pearson相关分析,结果表明MMP-2、MMP-9的表达水平与穿透Transwell小室的数量呈正相关($r=0.957$、$r=0.964$,$P<0.05$)。

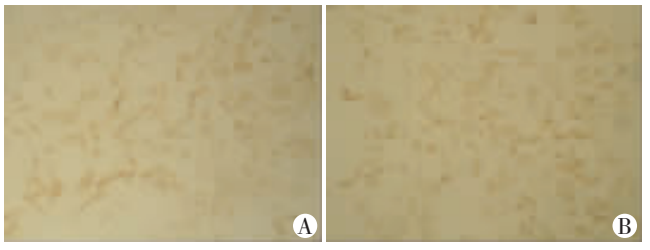


图2 高转移潜能乳腺癌细胞MMP-2(A)、MMP-9(B)的表达 (S-P ×200)

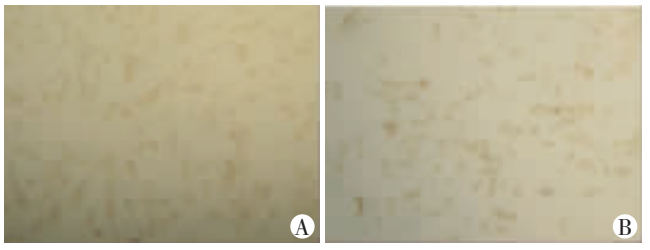
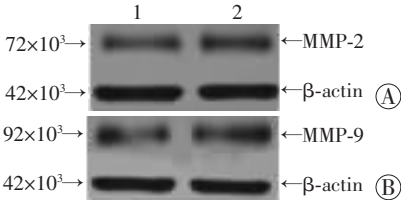


图3 低转移潜能乳腺癌细胞MMP-2(A)、MMP-9(B)的表达 (S-P ×200)

2.3 Western blot检测MMP-2和MMP-9蛋白在不同转移潜能乳腺癌细胞中的表达

利用抗人MMP-2和MMP-9抗体,在条带特定的位置均可发生特异的免疫染色反应,将Western blot结果条带与标准蛋白相对分子质量对比,其目的条带MMP-2和MMP-9相对分子质量分别为72×10^3、92×10^3。对条带进行图像分析和统计学分析,结果显示,高转移潜能乳腺癌细胞的MMP-2和MMP-9条带光密度值明显高于低转移潜能乳腺癌细胞($P<0.05$)。见表1,图4。



1:低转移潜能乳腺癌细胞;2:高转移潜能乳腺癌细胞

图4 Western blot检测MMP-2(A)和MMP-9(B)蛋白在高、低转移潜能乳腺癌细胞中的表达

3 讨论

肿瘤细胞的转移能力受多种因素的影响,侵袭是具有转移特性的肿瘤细胞必备的基本特征之一[5]。MDA-MB-435s细胞自身具有较高的肺转移特性,筛选不同转移潜能细胞株的方法,近年来有细胞单克隆技术[6-7]、羊膜浸润筛选系统[8]、体内连续筛选法[9]等。本实验采用MDA-MB-435s细胞,利用人工基质膜浸润筛选系统,获得了来源于同一亲本的不同转移表型的细胞株,2株细胞株通过常规光镜、透射电镜、促血管形成实验和细胞侵袭、细胞黏附率实验等鉴定,具有明显的不同转移潜能[4]。这种分离方法具有工作量少,实验过程简化的特点,为分析乳腺癌细胞的转移潜能生物特性提供了可靠的材料。

乳腺癌的浸润和转移是复杂的多步骤序贯过程,是众多因子相互协调以及共同作用的结果[10]。在这个过程中,基底膜破坏和细胞外基质的降解是一个重要且始终贯穿的因素,在此过程中,MMPs是这一过程中不可缺少的酶类。MMPs是基质中重要的水解系统,可降解细胞外基质的所有成分,使细胞外基质和基底膜所形成的屏障消失或减弱,促进了癌细胞的侵袭转移。MMPs是一组具有高度同源性的结构和功能相关的锌离子依赖性内肽酶,目前已知接近30种。一般认为和肿瘤侵袭、转移关系密切的是MMP-2和MMP-9。我们通过免疫组化、Western blot和图像分析等方法,观察高、低转移潜能乳腺癌细胞中MMP-2和MMP-9的表达情况,比较2株已证实转移潜能有显著差异的细胞间MMP-2和MMP-9的表达水平有无统计学差异。结果显示,MDA-MB-435s细胞中,MMP-2和MMP-9的表达均在细胞质中。本实验中,高转移潜能细胞中MMP-2及MMP-9均为高表达,而低转移潜能

细胞中两者均呈低表达。经统计学检验，两组间MMP-2和MMP-9的表达水平有统计学差异，实验结果和其他不同来源转移能力不同的乳腺癌细胞株的MMP-2和MMP-9表达情况一致[11-12]。

研究表明，MMP-2和MMP-9在正常组织或良性肿瘤中无表达或低表达，而在癌组织及转移灶中表达和活性显著增强；MMP-2、MMP-9的活性与乳腺肿瘤的侵袭能力关系密切[13]。MMP-2是MMPs中与肿瘤关系最为密切的因子之一，锌离子依赖，由肿瘤细胞和间质细胞分泌酶原，水解后能特异性地降解基底膜的主要成分Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ、Ⅹ型胶原、纤维黏连蛋白(FN)和明胶；MMP-9是MMPs中相对分子质量最大的酶，酶原被激活后形成Ⅳ型胶原酶，降解、破坏靠近肿瘤表面的细胞外基质中的Ⅳ、Ⅴ型胶原和明胶[14]。Zeng等[15]通过研究发现乳腺癌组织中MMP-2和MMP-9均有过度表达，并与癌转移密切相关。王岩等[16]对95例乳腺癌、癌旁组织和良性病变标本进行MMP-2、MMP-9蛋白表达的测定，结果发现浸润性乳腺癌组织MMP-2、MMP-9的活性显著高于癌旁组织和良性病变，且淋巴结转移组MMP-2、MMP-9活性显著高于非淋巴转移组。还有研究发现，MMP-2、MMP-9的蛋白和mRNA表达于肿瘤细胞及周围的基质细胞，在肿瘤浸润的边缘MMPs表达增强，淋巴结转移乳腺癌组MMP-9表达水平明显高于无转移组，且淋巴结转移灶中癌细胞的MMP-9表达水平也高于原发灶[12]。本实验通过对细胞侵袭实验和免疫组化结果进行相关性分析，结果显示MMP-2、MMP-9的表达与细胞侵袭能力呈正相关。

近年来，对MMPs在乳腺癌的转移和预后过程中的作用是乳腺癌研究热点之一。本实验证实，利用人工基质膜浸润筛选系统对不同转移潜能乳腺癌细胞株进行分离的方法，能够获得不同转移潜能的乳腺癌细胞株；高、低转移潜能乳腺癌细胞株MMPs的表达变化情况，与肿瘤细胞的侵袭能力相关，本实验结果提示分离不同转移潜能肿瘤细胞的新方法可靠，高转移潜能乳腺癌细胞株中MMP-2和MMP-9的表达明显高于低转移潜能乳腺癌细胞株，且与肿瘤细胞的转移潜能有明确关系，为寻找抗肿瘤细胞转移的药物和方法提供了实验依据。

参考文献：

[1] Jemal A, Siegel R, Xu J, *et al*. Cancer statistics, 2010[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-300.

[2] Dumitrescu R G, Cotarla I. Understanding breast cancer risk—where do we stand in 2005[J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(1): 208-221.

[3] Garg P, Vijay-Kumar M, Wang L, *et al*. Matrix metalloproteinase-9-mediated tissue injury overrides the protective effect of matrix metalloproteinase-2 during colitis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 296(2): G175-G184.

[4] 张涛，汤为学，蔡辉，等. 不同转移潜能乳腺癌细胞亚系的建立与生物学特性的分析[J]. 第三军医大学学报，2008，30(18)：1726-1729.

[5] Chambers A F, MacDonald I C, Schmidt E E, *et al*. Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy[J]. Cancer Metastasis Rev, 1995, 14(4): 279-301.

[6] Yates C, Wells A, Turner T. Luteinising hormone-releasing hormone analogue reverses the cell adhesion profile of EGFR overexpressing DU-145 human prostate carcinoma subline[J]. Br J Cancer, 2005, 92(2): 366-375.

[7] Kerachian M A, Cournoyer D, Harvey E J, *et al*. Isolation and characterization of human bone-derived endothelial cells[J]. Endothelium, 2007, 14(2): 115-121.

[8] Tamhane A, Vajpayee R B, Biswas N R, *et al*. Evaluation of amniotic membrane transplantation as an adjunct to medical therapy as compared with medical therapy alone in acute ocular burns[J]. Ophthalmology, 2005, 112(11): 1963-1969.

[9] Zhao M, Zhang Y, Liu W, *et al*. Estrogenic activity of lambda-cyhalothrin in the MCF-7 human breast carcinoma cell line[J]. Environ Toxicol Chem, 2008, 27(5): 1194-1200.

[10] Van-Trappen P O, Ryan A, Carroll M, *et al*. A model for co-expression pattern analysis of genes implicated in angiogenesis and tumour cell invasion in cervical cancer[J]. Br J Cancer, 2002, 87(5): 537-544.

[11] Daniele A, Zito A F, Giannelli G, *et al*. Expression of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in sentinel lymph node and serum of patients with metastatic and non-metastatic breast cancer[J]. Anticancer Res, 2010, 30(9): 3521-3527.

[12] Lebeau A, Müller-Aufdemkamp C, Allmacher C, *et al*. Cellular protein and mRNA expression patterns of matrix metalloproteinases-2, -3 and -9 in human breast cancer: correlation with tumour growth[J]. J Mol Histol, 2004, 35(5): 443-455.

[13] Radisky E S, Radisky D C. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 15(2): 201-212.

[14] Quaranta M, Daniele A, Coviello M, *et al*. MMP-2, MMP-9, VEGF and CA 15.3 in breast cancer[J]. Anticancer Res, 2007, 27(5B): 3593-3600.

[15] Zeng Z S, Guillem J G. Colocalisation of matrix metalloproteinase-9-mRNA and protein in human colorectal cancer stromal cells[J]. Br J Cancer, 1996, 74(8): 1161-1167.

[16] 王岩，刘晓霞，候正文，等. 基质金属蛋白酶及其抑制剂在乳腺癌转移、浸润中的作用[J]. 临床与实验病理学杂志，2002，18(3)：273-275.

(收稿 2010-10-13 修回 2010-11-23)
(编辑 吴培红)