DOI:10.16016/j.1000-5404.1998.04.004

TIMP-2基因转染在裸鼠胃癌中Ⅳ型胶原酶及Ⅳ型胶原改变的研究

李 楠* 徐采朴 刘为纹 宋 波** (第三军医大学附属西南医院消化内科) 重庆,400038

提 要 **目的**:探讨组织金属蛋白酶抑制剂(TIMP-2)基因体外转染胃癌SGC-7901细胞系后建立的裸鼠侵袭模型中的Ⅳ型胶原和Ⅳ型胶原酶改变的情况。**方法**:用TIMP-2基因体外转染的胃癌SGC-7901细胞系建立裸鼠肿瘤侵袭模型,并应用免疫组化对侵袭部位的组织Ⅳ型胶原和Ⅳ型胶原酶前体(MT-MMP)的改变作了研究。**结果**:正常肾脏组织Ⅳ型胶原酶反应阳性率与在种植肿瘤中阳性率两者差异显著($P<0.01$)。Ⅳ型胶原染色显示,肾小管及肾小球基底膜完整呈连续性线状分布,肿瘤部位的Ⅳ型胶原在基底膜处出现断裂和缺失,而肿瘤浸润部见Ⅳ型胶原酶表达异常丰富。**结论**:组织金属蛋白酶抑制剂TIMP-2基因转染参与肿瘤细胞分泌胶原酶的调控过程,抑制了Ⅳ型胶原的降解,是肿瘤侵袭、转移的重要负作用因子。

关键词 胃肿瘤;Ⅳ型胶原酶;Ⅳ型胶原;基底膜;组织金属蛋白酶抑制剂
中图法分类号 R735.2

肿瘤侵袭转移是一个复杂的过程。近年来肿瘤侵袭转移与细胞外基质的关系已成为肿瘤分子生物学家研究的热点。其中由肿瘤细胞产生多种蛋白水解酶降解细胞外基质及基底膜成分是一个重要环节[1]。近来研究表明,组织金属蛋白酶抑制剂(Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2,TIMP-2)基因具有抑制肿瘤细胞表达Ⅳ型胶原酶的作用,可在体外实验抑制肿瘤细胞的侵袭[2]。本实验用TIMP-2基因转染的人胃癌细胞SGC-7901-T2种植於裸鼠肾包膜下,用免疫组化对模型侵袭的组织中Ⅳ型胶原酶前体的表达与基底膜改变作了研究,并观察了肿瘤细胞中TIMP-2基因mRNA表达与Ⅳ型胶原酶前体(Membrane matrix metalloproteinases,MT-MMP)表达的关系,探讨它们在胃癌侵袭转移中的相关性及作用机制。

1 材料和方法

1.1 动物实验

BALB/c nu/nu裸鼠30只,为4~6周龄,购自军事医学科学院实验动物中心,实验室符合三级(SPF)动物实验室标准。分为:①含TIMP-2基因组(细胞SGC-7901-T2),10只;②单纯SGC-7901肿瘤组,10只;③转染pLXSN空载体组,10只。按高进[3]方法建立动物模型,分别于接种后第7、12及30天处死裸鼠,检查肾包膜下肿瘤侵袭生长情况,留取标本,10%中性福尔马林固定,石蜡包埋切片(4 μm),做HE及免疫组化染色。

1.2 免疫组化染色

采用SP染色法显示Ⅳ胶原酶(前体)与Ⅳ胶原,第一抗体为兔抗鼠Ⅳ型胶原酶抗体(日本Kannzarn大学癌症研究中心Sota博士赠送)1∶300;鼠抗兔Ⅳ型胶原抗体(北京中山生物工程公司提供)1∶75。切片经常规脱蜡水化。0.1%~0.3%胃蛋白酶消化后,按SP法加抗Ⅳ型胶原酶抗体及二抗、三抗、DAB显色(棕色)。免疫组化染色均为PBS代替一抗作阴性对照。

1.3 观察与统计

Ⅳ型胶原酶(前体)免疫组化染色阳性结果为细胞内呈现明显的棕黄色颗粒弥散分布。根据实验结果分析,我们确定每例切片随机观察上皮细胞或肿瘤细胞20个高倍视野,其阳性细胞总数占所观察细胞总数20%以上者为阳性病例,低于20%则为阴性,5%~20%之间为可疑阳性,但统计时拟作为阴性。统计良、恶性病变各组阳性率。Ⅳ型胶原染色阳性则显示基底膜的线性结构,阴性对照片结果均为阴性。

2 结果

动物实验:实验组中第7天鼠肾被膜上见有肿瘤生长,少量瘤细胞沿肾小管侵袭,但不超过7~8层正常肾皮质细胞,而对照组及空载体组已有部分瘤细胞呈浸润性生长。第12天实验组中只有2只出现明显浸润倾向,而对照组10只中6只已有侵袭性生长,且浸润程度亦较实验组深,个别已近达肾髓质。第30天的比较,实验组裸鼠全部存活,其肾脏内成瘤率60%(6/10),其浸润肾小球、肾髓质占肾总面积(17.3±7.9)%。而对照组则有90%(9/10)出现浸润,而且一只已濒于死亡,体重达正常鼠体重1/4。镜下见生长的瘤细胞成团,成簇侵袭正常肾皮层及肾髓质,受损的肾小管及肾小球已变形,淋巴结检查实验组腹腔淋巴结转移者4例(40%);而实验对照组有淋巴结转移者占80%(8例);空载体组与对照组之间差异不显著($P>0.05$)。

免疫组化染色:Ⅳ型胶原酶(MT-MMP)在正常肾小管上皮细胞阴性,少量间质细胞有阳性表达。而上皮基底膜Ⅳ型胶原染色阳性,表现为清晰的棕黄色连续细线状分布或完整环绕肾小管基底膜,见图1。在有侵袭的肿瘤组织与之相近的正常肾组织见上皮细胞及肿瘤组织内癌细胞表达Ⅳ型胶原酶明显增

* 李 楠,男,40岁,博士 ** 泌尿外科

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

强，见图2。且近肿瘤边缘具有聚集成团及成簇状的MT-MMP表达，见图3，而Ⅳ型胶原染色见有断续出现或缺失，见图4。有MT-MMP表达丰富之瘤组织大部Ⅳ型胶原缺失，残留在癌巢中少量片断或呈点状。Ⅳ型胶原酶表达在高浸润的肿瘤病变的阳性率、强度与呈膨胀压迫性生长及低浸润肿瘤比较，差异显著（$P<0.05$），见附表。

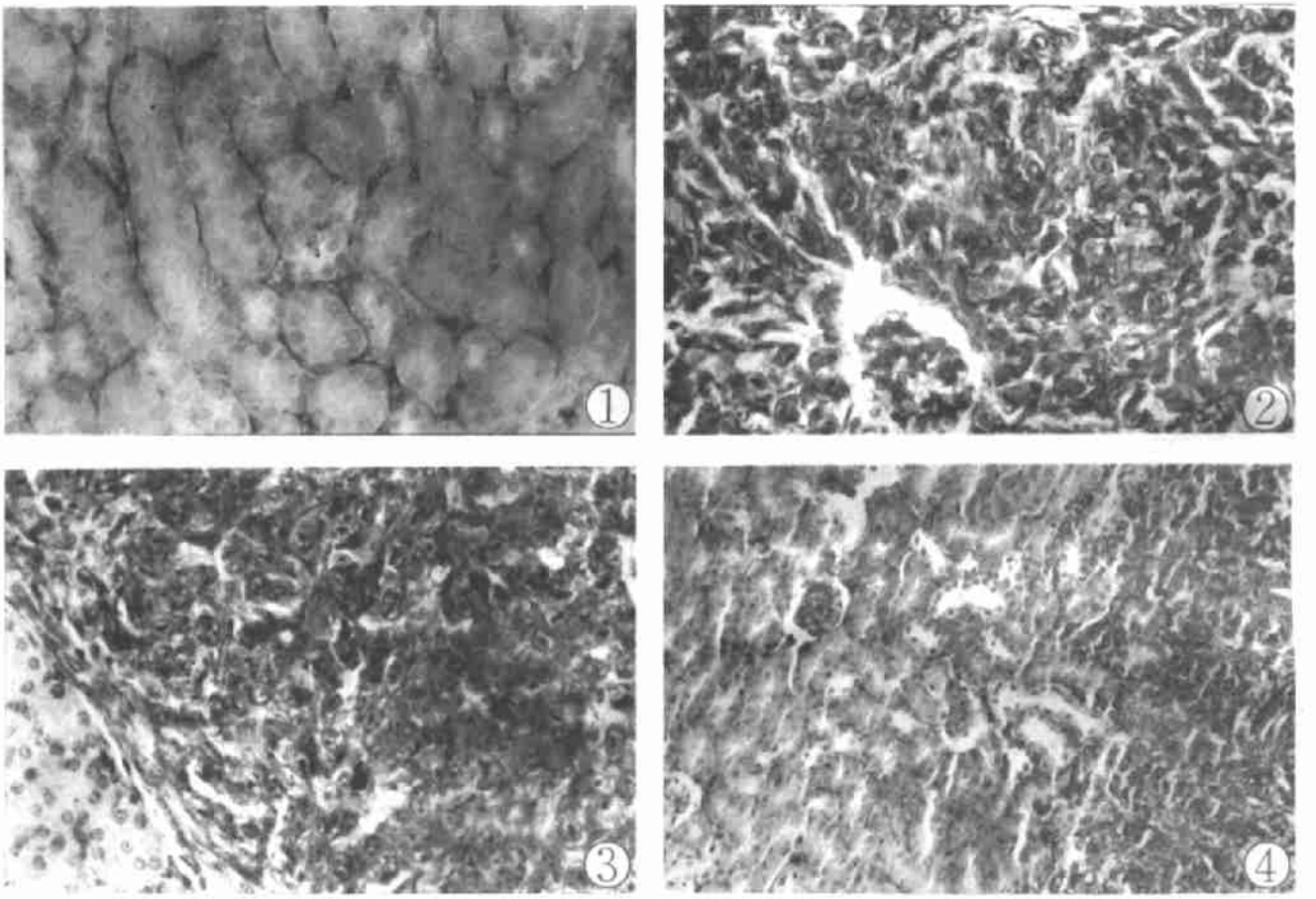


图1 裸鼠正常肾Ⅳ型胶原表达 (S-P×400)

Fig 1 The expression of type Ⅳ collagen on normal kindey of nude mice (S-P×400)

图2 裸鼠肾侵袭肿瘤组织，MT-MMP的表达 (S-P×400)

Fig 2 The expression of MT-MMP on invasion tumor tissue in kindey of nude mice (S-P×400)

图3 裸鼠肿瘤组织中MT-MMP表达多于正常肾组织 (S-P×200)

Fig 3 The expression of MT-MMP in tumor tissue was more than normal kindey tissue of nude mice (S-P×200)

图4 肿瘤与正常组织中Ⅳ型胶原的不同表达 (S-P×200)

Fig 4 The different expression of type Ⅳ collagen in tumor and normal tissues (S-P×200)

附表 胃癌侵袭模型中Ⅳ型胶原和MT-MMP在裸鼠中的组化反应结果

Table The results of immunohistochemical of type Ⅳ collagen and MT-MMP in the invasion model of gastric carcinoma in nude

Groups	Number	MT-MMP(%)	Type Ⅳ collagen
Normal tissue	20	11(55.0)	Intact-continue
Tumor tissue	10	8(80.0)	Fragment-disappear
Transfered tissue	10	4(40.0)	Fragment-disappear
Control tissues	10	8(80.0)	Fragment-disappear
Higher invasion	20	20(100.0)	Fragment-disappear
Lower invasion	6	1(66.6)	Break
Expand tissues	4	1(25.0)	Intact-continue

Normal tissue of nude mice is refered to uninactivated tissues

3 讨论

近年来，肿瘤浸润转移过程中的细胞外基质降解作用已日益引起人们重视。其中癌细胞释放Ⅳ型胶原酶与细胞外基质中基底膜改变的关系已有众多报道[4]。本实验在体外胃癌细胞SGC-7901转染金属蛋白酶抑制剂TIMP-2基因研究基础上，利用体内裸鼠肾包膜下种植肿瘤的侵袭模型采用免疫组化方法显示上述两者的改变，从而可以研究TIMP-2基因转染对胃癌浸润生长的影响。

基底膜作为细胞外基质中的重要成分之一，它在

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

癌肿生长中的变化是一个备受关注的问题。金属蛋白酶抑制剂 TIMPs 与Ⅳ型胶原酶(MMP-2,MMP-9)之间的动态平衡影响着基底膜的完整性[5]，其中 MT-MMP 的变化是Ⅳ型胶原酶未活化的形式，它不但影响基底膜胶原成份降解，亦参与影响Ⅳ型胶原酶二个亚型(MMP-3、MMP-9)的激活过程，是近年颇受重视的新发现。我们在体外肿瘤侵袭能力的研究中发现，转染 TIMP-2 基因的 SGC-7901 细胞其穿透 Boyden Chamber 侵袭小室的能力减弱，在 mRNA 水平 TIMP-2 基因较未转染组表达增强。为探讨含有过量表达 TIMP-2 基因的肿瘤细胞在体内侵袭的生物学行为，我们在裸鼠肾包膜下建立侵袭肿瘤模型。所得结果与体外报道基本一致，并且通过观察实验组肿瘤侵袭程度及成瘤时间、成瘤率比对照组明显降低，而且 MT-MMP 表达与Ⅳ型胶原酶破坏两者间的关系呈明显对应关系，即在侵袭胃癌组织边缘 MT-MMP 阳性，基底膜断裂或缺失，侵袭程度高的组织中 MT-MMP 表达更加丰富，而基底膜的结构不完整，缺失更甚。另外发现 MT-MMP 呈灶状或巢状分布，在肿瘤中无明显均一性表达，表明肿瘤分化的异质性，具有高转移能力，表达高浓度 MMPs 的肿瘤细胞只是瘤实质中的一部分，其分化中心含有高侵袭能力的肿瘤细胞，而大部分瘤细胞可能不具备侵袭能力或侵袭能力弱。

用 TIMP-2 基因转染的肿瘤细胞体内降解基底膜及分泌 MMP-MT 的能力与母系肿瘤明显不同，说明了 TIMP-2 基因具有抑制肿瘤细胞恶性表型的作用；另一方面 MT-MMP 与基底膜完整性的免疫组化亦是肿瘤侵袭能力变化的显著标志，本研究说明了 TIMP-2 基因参与抑制肿瘤细胞浸润转移的分化调节，是阻断肿瘤转移的有效治疗方法之一。

参考文献

1 Douglas B. Invasion and metastasis. Cancer and Metastasis Reviews,1996;15(1):77

2 Khokha R, Zimmer M J. Wilson S M *et al*. Up-regulation of TIMP-1 expression in B16-F10 melanoma cells supresses their metastatic ability in chick embryo. Clin Exp Metastasis,1992;10(4):365

3 高　进，董化一. 恶性瘤细胞在小鼠肾内侵袭过程的研究——肾被膜囊下移植后的光镜和电镜改变. 解剖学报,1988;19(1):63

4 Matrisian L M. The matrix-degrading metalloproteinases. Biochemistry,1992;14(5):455

5 Grigioni W F, Derrino A, Foulunalo C *et al*. Progress of gastric carcinoma revealed by interactions between tumor cells and basement membrane. Med Pathol,1994;7(2):220

(收稿：1997-06-11；修回：1998-03-17)

(编辑　冷怀明)

Study of the changes of type Ⅳ collagen and type Ⅳ collagenase in TIMP-2 gene transfected gastric carcinoma in nude mice

Li Nan, Xu Caipu, Liu Weiwen, Song Bo (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing,400038)

Abstract　Objective: To study the changes of type Ⅳ collagen and type Ⅳ collagenase in the tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 gene (TIMP-2) *in vitro* transfected gastric carcinoma in nude mice. Methods: TIMP-2 gene was used to transfect *in vitro* SGC-7901 cell line of gastric carcinoma and this cell line was transferred to nude mice to establish the invasive model of gastric carcinoma. The changes of type Ⅳ collagen and the precursor of type Ⅳ collagenase (MT-MMP) were studied in the tissue of the invaded region with immunohistochemical assay. Results: The results showed that the positive rate of type Ⅳ collagenase (MT-MMP) was 36.6% in normal kindey tissue and 70% in malignant lesions ($P<0.05$). The intact patterns of type Ⅳ collagen was seen in normal groups while the disruptive and fragmentary patterns in malignants. Conclusions: The results suggest that TIMP-2 plays an important role in the destruction of type Ⅳ collagen and the promotion in the invasion and metastasis of gastric carcinoma.

Key words　stomach neoplasm; type Ⅳ collagenase; type Ⅳ collagen; basement membrane; tissue inhibitor of matrix metalloproteinase

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net