

参考文献

- 1 俞森洋. 现代机械通气的理论与实践[M]. 北京:中国协和医科大学出版,2000;241-243
- 2 周明根,黄子通,蒋龙元,等. 适应性支持通气在部分支持通气中对呼吸力学和呼吸功的影响[J]. 中华急诊医学杂志, 2006,15(1); 61-63
- 3 Tassaux D, Dalmás E, Gratadour P, *et al.* Patients - ventilator interactions during ventilatory support: a preliminary study comparing the effects of adaptive support ventilation with synchronized intermittent mandatory ventilation plus inspiratory pressure support. Crit Care Med, 2002,30:801-807
- 4 Fernandez R, Cabrerá J, Calaf N, *et al.* P_{0.1}/P_{Imax}: an index for as-

- sessing respiratory capacity in acute respiratory failure. Intensive Care Med,1990,16:175-179
- 5 Whitelaw WA, Derenne JP. Airway occlusion pressure. J Appl Physiol, 1993,74:1475-1483
- 6 Fernandez R, Blanch L, Artigas A. Respiratory center activity during mechanical ventilation. J Crit Care,1991,6:102-111
- 7 C. Bruschi, P. Crotti, E. Dacosto, *et al.* Novellini. Levodropropizine does not affect P_{0.1} and breathing pattern in healthy volunteers and patients with chronic respiratory impairment. Pulmonary pharmacology and therapeutics,2003,16:231-236

(收稿:2009-11-16)

(修回:2010-01-25)

RECK 和 MMP-9 在喉鳞癌中的表达及其临床意义

常 玮 王斌全

摘 要 **目的** 探讨癌基因 MMP-9 和抑癌基因 RECK 在喉癌组织中的表达与喉癌临床特征的关系,了解喉癌的生物学行为,并研究两种基因的表达相关性。**方法** 分别采用 PV9000 免疫组织化学两步法及 RT-PCR 方法检测 38 例喉鳞癌组织及对癌旁正常组织中 MMP-9 和 RECK 蛋白的表达及 mRNA 转录情况,同时取 10 例喉乳头状瘤作为对照。**结果** ①MMP-9 在喉鳞癌组织中蛋白阳性表达率为 92.11%,显著高于癌旁组织中表达($P < 0.01$);而 RECK 在癌组织中蛋白阳性表达率为 60.53%,显著低于癌旁组织中表达($P < 0.01$);②MMP-9 与 RECK 在癌组织中的 mRNA 相对表达量均与癌旁组织中的表达相比有显著差异($P < 0.01$);③MMP-9 和 RECK 在喉鳞癌组织中的表达水平与患者临床分期和肿瘤病理学分级分别呈正相关和负相关。MMP-9 在伴颈淋巴结转移组中的表达水平明显高于非转移组,而 RECK 则正好相反;④MMP-9 的基因表达水平与 RECK 基因表达呈负相关($r = -0.907, P < 0.01$)。**结论** ①MMP-9 和 RECK 两因子在喉鳞癌组织中的表达水平与喉鳞癌患者的临床病理参数密切相关;②MMP-9 和 RECK 可能共同参与了喉鳞癌的发生、发展,并与喉鳞癌的浸润及转移有密切关系。

关键词 喉鳞癌 MMP-9 RECK 免疫组织化学 RT-PCR

Expression s of Matrix Metalloproteinase -9 and RECK and Its Significance in Carcinoma of Larynx. Chang Wei, Wang Binquan. Department of Otorhinolaryngology, The First Hospital of Shanxi Medical University, Shanxi 030001, China

Abstract Objective To investigate the relation between expression of MMP-9 and RECK in laryngeal carcinoma and it's clinical characteristics and to explore the biological action of laryngeal tumor. **Methods** 38 laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) specimens and normal mucosa were examined for the expression level of MMP-9 and RECK protein by IHC method (PV9000) and RT-PCR was employed to measure the expression of MMP-9 and RECK mRNA. Ten laryngeal papilloma were used for controls. **Results** The expression level of MMP-9 protein in carcinoma of larynx was 92.11%, which was significantly higher than that of the adjacent tissues ($P < 0.01$). The expression level of RECK protein in carcinoma of larynx was 60.53%, which was significantly lower than that of the adjacent tissues($P < 0.01$). The expression of MMP-9 and RECK mRNA between tumor and adjacent tissues was significantly different($P < 0.01$). The expression of the two cytokines was significantly associated with clinical staging, pathological grading and cervical lymph node metastasis. The expression of RECK genes was negatively correlated with the expressions of MMP-9 in larynx cancer($r = -0.907, P < 0.01$). **Conclusion** The expression of MMP-9 and RECK in the tissue of larynx squamous carcinoma was significantly correlated with clinicopathological indexes of the tumor. The two cytokines might participate in the occurrence and development of larynx squamous carcinoma.

Key words Laryngeal carcinoma; MMP-9; RECK; IHC; RT-PCR

材料与方法

1. 临床资料:收集 2008~2009 年于山西医科大学第一医院耳鼻喉科及山西省肿瘤医院行手术治疗的喉癌组织 38 例,包括癌组织和对应癌旁正常黏膜组织。均为首次手术,详细记录患者年龄、肿瘤部位、表型、分期、分化及转移情况等。术前均经病理证实为鳞癌,均未行放疗和化疗,取 10 例喉乳头状瘤组织作为对照组。一部分标本用 10% 中性甲醛固定 24h,常规石蜡包埋,连续切片(4 μ m),用于免疫组织化学实验及常规的病理学检查;另一部分放入深低温(-86 $^{\circ}$ C)冰箱中保存备用,用于 RT-PCR 实验用。38 例喉癌患者,男性 35 例,女性 3 例;年龄 42~80 岁,其中声门上型 19 例,声门型 13 例,跨声门型 6 例;临床分期按 2002 美国癌症联合会(AJCC)分期方案进行,其中:T₁ 期 4 例, T₂ 期 18 例, T₃ 期 10 例, T₄ 期 6 例;依据病理分化程度类型分为:高分化鳞癌 10 例,中分化鳞癌 19 例,低分化鳞癌 9 例。全部患者行手术治疗,喉全切除 8 例,喉扩大次全切除伴发音重建 7 例,喉部分切除 23 例,25 例行颈清扫术,经病理证实有淋巴结转移 23 例。术中行多方位切缘冷冻未见癌细胞。

2. 试剂:免疫组化试剂包括 Goat Anti-Human RECK

Monoclonal Antibody (Santa Cruz, 美国),以及 Rabbit Anti-MMP-9 (北京博奥森生物技术有限公司),二步法 PV-9000 免疫组化检测试剂和浓缩型 DAB 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);RT-PCR 试剂包括 Trizol Reagent, RT-PCR 试剂盒(北京金式金生物技术有限公司)。

3. 方法:(1)免疫组织化学 PV-9000 二步法:参照 PV-9000 二抗试剂盒,检测石蜡标本切片中的 RECK 蛋白和 MMP-9 蛋白的表达。RECK 和 MMP-9 先行预试验,确定合适的一抗浓度分别为 1:400 和 1:200。抗原修复采用热修复。(2)RT-PCR 方法:按照 Trizol 说明书,提取各冻存组织总 RNA,分别进行纯度和浓度的鉴定和检测。将合格总 RNA 按 RT-PCR 试剂盒要求进行反转录合成 cDNA,再加入目的基因引物进行 PCR 扩增,产物用 1.5% 琼脂糖电泳检测并记录结果。PCR 引物由 Primer 5.0 设计,经上海生工公司合成(表 1)。RECK 和 MMP-9 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 2min;94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 退火:55 $^{\circ}$ C (RECK) 30s, 54 $^{\circ}$ C (MMP-9, GAPDH) 30s;延伸:72 $^{\circ}$ C (RECK, MMP-9, GAPDH) 40s, RECK, MMP-9, GAPDH 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5min,产物经 1.5% 琼脂糖电泳检测。

表 1 RECK、MMP-9、GAPDH 引物序列和产物大小

基因	上游序列(5'-3')	下游序列(5'-3')	产物大小
MMP-9	GGG ACG GCAATGCTGATG	AGG GCG AGGACCATAGAGG	505
RECK	GCAGGGGAAGTTGGTTGTTA	TGCCAGCAAAACAAGAACAG	175
GAPDH	TGAACGGGAAGCTCACTGG	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	307

4. 结果判定标准:MMP-9 蛋白和 RECK 蛋白均表达于胞质中,故阳性标准细胞的胞质染色应呈棕黄色。参考 Fujimura^[1]等的标准,光镜下对每张切片随机取 5 个视野,根据阳性细胞的阳性强度按无着色、淡黄色、棕黄色和棕褐色分别打分 0、1、2、3 分;然后再按着色阳性细胞数所占百分比打分:①小于 5% 为 0 分;②5%~25% 为 1 分;③26%~50% 为 2 分;④大于 50% 为 3 分。最后以两者之和判断其表达结果:①小于 2 分为阴性(-);②2~4 分为阳性(+);③4~6(包括 4)为强阳性(++)。RT-PCR 检测结果的判定以出现扩增带为阳性,应用图像分析软件 Quantity One 4.4.0 对电泳条带进行测定,其中 PCR 产物的含量以累积光密度(IOD)表示,IOD = 平均光密度 $\times$ 发光面积,目的基因 mRNA 的相对含量以同一标本目的基因与内参照 GAPDH 的 PCR 产物含量的比值来表示;重复 3 次取平均值,如果无扩增条带,则 IOD 值为 0。

5. 统计学处理:使用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析。检验水准为双侧 $\alpha = 0.05$ 。采用 χ^2 检验或精确概率检验法(fisher's exact test)比较两组或多组之间阳性率的差别。RT-PCR 结果采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,应用独立样本 *t* 检验进行组间比较,相关性分析采用 Pearson 定量相关系数。多组数据总体差异采用方差分析。

结 果

1. MMP-9, RECK 蛋白在喉癌组织及癌旁正常

组织中的表达:MMP-9, RECK 蛋白的表达在细胞质较为明显(图 1、图 2)。MMP-9 及 RECK 蛋白阳性表达率在癌组织和癌旁组织之间 *P* 均 < 0.01 ,有极显著差异。MMP-9 及 RECK 蛋白阳性表达率在癌旁组织与对照组之间 *P* 分别为 0.437, 0.349, 差异无统计学意义(表 2)。

2. MMP-9 和 RECK mRNA 在喉癌组织和癌旁组织中的表达:MMP-9 和 RECK mRNA 在喉癌组织和癌旁组织及对照组中的表达电泳结果(图 3)。喉鳞癌组织中 RECK 基因的表达水平明显低于癌旁组织($P < 0.01$),而 MMP-9 则显著高于癌旁组织($P < 0.01$)(表 3)。

3. RECK 和 MMP-9 基因表达水平与临床病理特征的关系:MMP-9 和 RECK 在喉鳞癌组织中的表达水平与患者肿瘤的临床分型无关($P > 0.05$),而与临床分期和肿瘤病理学分级分别呈正相关和负相关($P < 0.05$)。MMP-9 在伴颈淋巴结转移组中的表达水平明显高于非转移组,而 RECK 则正好相反($P < 0.01$)(表 4)。

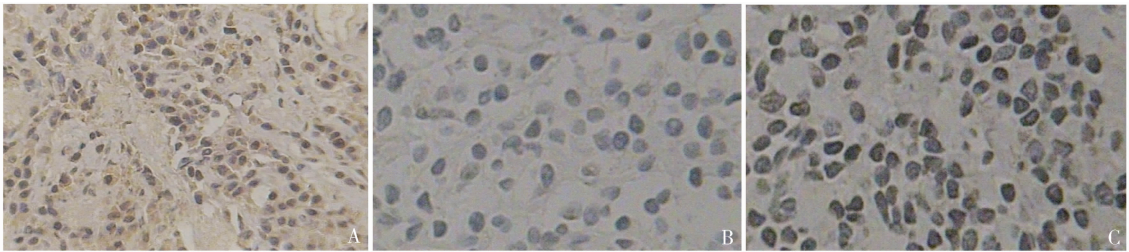


图 1 MMP-9 蛋白免疫组化结果

A. MMP-9 蛋白在喉癌组织中表达 (×250); B. MMP-9 蛋白在喉乳头状瘤中表达 (×250); C. MMP-9 蛋白癌旁正常组织中表达 (×400)

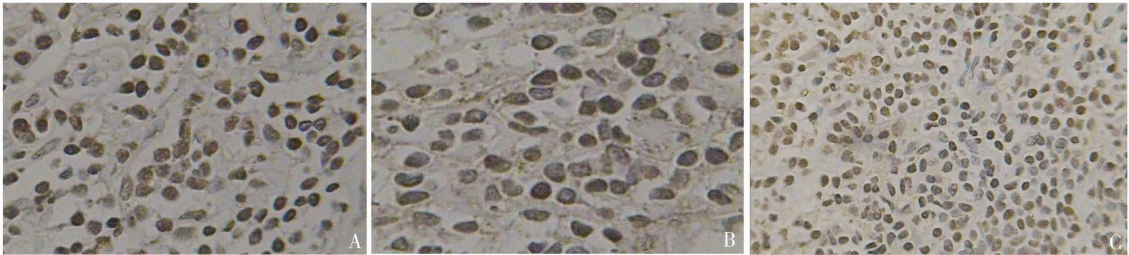


图 2 RECK 蛋白免疫组化结果

A. RECK 蛋白在喉癌组织中表达 (×400); B. RECK 蛋白在喉乳头状瘤中表达 (×250); C. RECK 蛋白癌旁正常组织中表达 (×250)

表 2 MMP-9、RECK 蛋白在喉癌组织及癌旁正常组织中的表达

组别	n	MMP-9 表达情况			阳性率 (%)	RECK 表达情况			阳性率 (%)
		-	+	++		-	+	++	
癌组织	38	3	16	19	92.11	15	19	4	60.53
癌旁组织	38	31	6	1	18.40	1	5	32	97.30
对照组	10	7	2	1	30.00	1	3	6	90.00

使用 SPSS13.0 软件,两两之间行 χ^2 检验

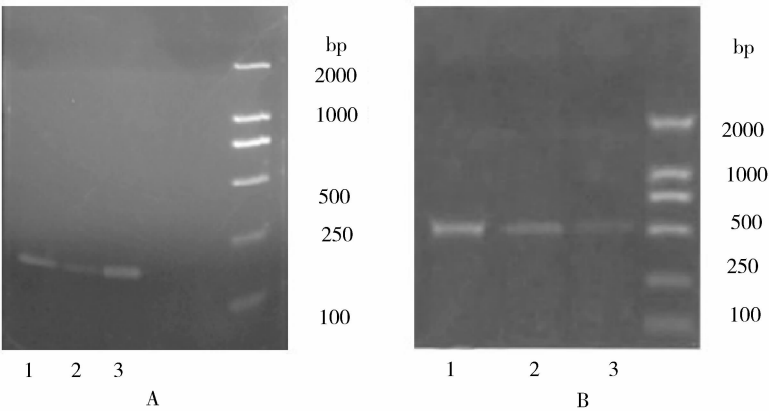


图 3 RECK 和 MMP-9 基因 RT-PCR 结果

A. RECK; B. MMP-9; 1. 癌组织; 2. 喉乳头状瘤; 3. 癌旁正常黏膜

表 3 喉鳞癌及癌旁组织中 RECK 和 MMP-9 相对表达水平

目标基因	n	癌组织平均 IOD 值	癌旁组织平均 IOD 值	t	P
RECK	38	0.3597 ± 0.0187	0.9002 ± 0.0130	22.92	<0.01
MMP-9	38	1.5023 ± 0.0134	0.6917 ± 0.0077	55.43	<0.01

独立样本 t 检验进行组间比较, P 均 <0.01

表 4 RECK 和 MMP-9 mRNA 表达水平与患者病理特征的关系

病理特征	n	RECK/GRAPDH		MMP-9/GRAPDH	
		平均 IOD 值	P	平均 IOD 值	P
分型声 门上型	19	0.3799 ± 0.0167	0.691	1.5011 ± 0.0049	0.131
声门型	13	0.3780 ± 0.0070		1.4995 ± 0.0024	
跨声门型	6	0.3859 ± 0.0036		1.5056 ± 0.0029	
病理分化 高分化	10	0.3997 ± 0.0136	<0.01	1.4243 ± 0.0075	<0.01
中分化	19	0.3547 ± 0.0075		1.4604 ± 0.0082	
低分化	9	0.3204 ± 0.0066		1.5011 ± 0.0789	
分期 T ₁	4	0.4118 ± 0.0149	<0.01	1.4079 ± 0.0067	<0.01
T ₂	18	0.3554 ± 0.0082		1.4527 ± 0.0077	
T ₃	10	0.3488 ± 0.0054		1.4633 ± 0.0097	
T ₄	6	0.3135 ± 0.0063		1.5067 ± 0.0037	
淋巴结转移 有	23	0.3224 ± 0.0110	<0.01	1.4947 ± 0.0081	<0.01
无	15	0.4031 ± 0.0139		1.4326 ± 0.0080	

各组数据经 SPSS 软件分析,方差不齐,并呈正态分布;组间差异性比较采用方差分析

4. 喉鳞癌组织中 RECK 和 MMP-9 基因表达量的相互关系:RECK mRNA 与 MMP-9 mRNA 在喉鳞癌组织中的表达呈负相关($r = -0.907, P < 0.01$) (图 4)。

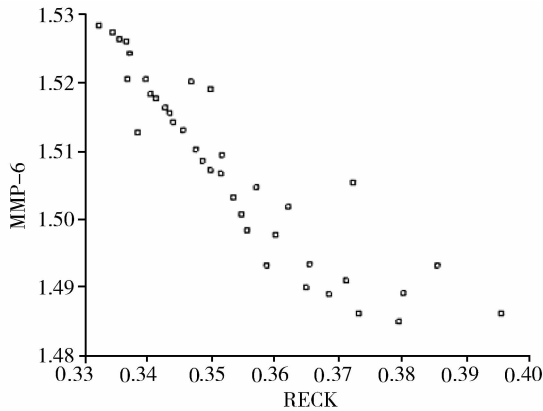


图 4 RECK 和 MMP-9mRNA 表达的相关性分析

讨 论

1. MMP-9 蛋白和 mRNA 在喉鳞癌组织中的表达及意义:MMP 是一组结构与功能相关的锌离子依赖性内肽酶,至少由 20 种能降解 ECM 的酶类组成^[2]。MMP-9 是其中一种,它以无活性的前体形式产生,作用非常广泛。可降解明胶与Ⅳ、Ⅴ、Ⅺ型胶原、弹性蛋白 (elastin)、层粘连蛋白 (laminin) A 链,也能降解间质胶原 (Ⅰ、Ⅲ) 和基质蛋白等^[3]。多项研究证实:在黑色素瘤、胆管癌、胰腺癌、大肠癌、肺癌、卵巢癌、胃癌、食管鳞状细胞癌、口腔鳞状细胞癌和甲状腺细胞癌等组织中均存在 MMP-9 的高表达,证明在肿瘤发生过程中有可能存在 MMP-9 表达的上调,而促进 ECM 的降解,而肿瘤的侵袭与转移很大程度有赖

于 ECM 的降解。本实验喉鳞癌组织中 MMP-9 的表达高于癌旁组织($P < 0.01$)。同时, MMP-9 的表达与喉癌的临床分型无关($P > 0.05$),而随着肿瘤病理分化的降低,临床分期的增高、淋巴结转移的发生,其表达逐渐增高。这提示随着肿瘤 MMP-9 表达量的增高,其降解 ECM 基膜的能力增强,肿瘤发生深部浸润的屏障被破坏,间接促进了肿瘤的侵袭能力,同时其发生淋巴结转移的可能性也越来越大。由此可见检测 MMP-9 的表达可用于评估喉鳞癌的侵袭转移潜能,对于治疗方案的制定及判断预后都有重要的意义。MMP-9 有望成为喉鳞状细胞癌诊断和治疗研究的病理学靶向指标。

2. RECK 蛋白和 mRNA 在喉鳞癌组织中的表达及意义:RECK 是 1998 年日本学者 Takahashi 等^[4]将 v-Ki-ras 基因转染到小鼠的纤维原细胞 (NIH3T3) 而克隆到的 cDNA 表达中分离出的新基因。RECK 基因定位于人染色体 9p12~13,整个基因的长度约 87kb,其中包含 21 个外显子,20 个内含子,共有 13 个单核苷酸多态性 (SNP)。研究表明^[5] RECK 可以抑制基质金属蛋白酶 (MMPs),从而抑制肿瘤的侵袭和转移。RECK 能至少在转录后水平调节 3 种基质金属蛋白酶 (MMP):MMP-2、MMP-9 和 MT1-MMP (MMP-14),其中 MMP-2 和 MMP-9 是肿瘤浸润转移过程中涉及的主要蛋白水解酶。本实验中,喉鳞癌组织中 RECK 蛋白和基因的表达水平明显低于癌旁组织($P < 0.01$),高分化肿瘤组织中 RECK 的表达明显高于低分化组织,RECK 基因在喉鳞癌组织中的表达水平与临床分期、淋巴结转移等因素明显

(转至第 3 页)