

不同组织微环境中人胃癌异种移植瘤生物学行为及明胶酶的表达差异

李玉莲, 耿敬姝

■背景资料

胃癌是我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤, 癌细胞向局部淋巴结、腹腔和远处转移是导致死亡的主要原因。胃癌侵袭转移的机制非常复杂, 近年来研究人员通过大量工作认识到MMP-2、MMP-9在胃癌的侵袭和转移中有着不可忽略的作用。

李玉莲, 耿敬姝, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院 黑龙江省哈尔滨市 150081

黑龙江省自然科学基金资助项目, No.D2005-11

通讯作者: 李玉莲, 150081, 黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路150号, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院. liyulian1@yahoo.com.cn
电话: 0451-86298115 传真: 0451-86298116

收稿日期: 2006-09-12 接受日期: 2006-09-25

Diversified biological behaviors and gelatinase expression of human gastric carcinoma xenografts in different organic micro-environment

Yu-Lian Li, Jing-Shu Geng

Yu-Lian Li, Jing-Shu Geng, Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China

Supported by Supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. D2005-11

Correspondence to: Yu-Lian Li, Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China. liyulian1@yahoo.com.cn

Received: 2006-09-12 Accepted: 2006-09-25

Abstract

AIM: To study the expression of gelatinase (matrix metalloproteinase, MMP) and its effect on the biological behaviors of human gastric carcinoma xenografts in different organic micro-environment.

METHODS: *In situ* hybridization was used to detect the mRNA expression of MMP-2 and MMP-9 in tumors transplanted subcutaneously and intraperitoneally. HE staining was conducted to investigate the biological behaviors of the transplanted tumors.

RESULTS: The subcutaneous xenografts of human gastric carcinoma in nude mice presented an expanding growth style with limited invasion. In contrast, the intraperitoneal xenografts displayed an invasive growth pattern accompanied by more fibrous stroma. The mRNA expression of MMP-2 and MMP-9 were negative in the

cells and intercellular substance of subcutaneous xenografts, but positive in the cytoplasm from the verge and envelope of intraperitoneal xenografts.

CONCLUSION: The tissue environment has definitive effects on the tumor phenotypes, and the expression of gelatinase is closely related to the growth pattern and invasion of tumor cells.

Key Words: Gelatinase; Tumor invasion; *In situ* hybridization; Neoplasm transplantation

Li YL, Geng JS. Diversified biological behaviors and gelatinase expression of human gastric carcinoma xenografts in different organic micro-environment. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(32):3136-3138

摘要

目的: 探讨不同组织微环境中明胶酶在异种移植瘤中的表达差异及其对移植瘤生物学行为的影响。

方法: 应用原位杂交方法分别检测皮下移植瘤及腹腔移植瘤中MMP-2 mRNA, MMP-9 mRNA的表达情况, 并应用常规HE染色观察不同移植瘤的生物学行为表现。

结果: 人胃癌裸小鼠皮下异种移植瘤呈膨胀性生长, 侵袭性不明显; 腹腔内移植瘤呈侵袭性生长; MMP-2及MMP-9 mRNA在皮下移植瘤细胞及间质表达阴性, 在腹腔移植瘤为阳性表达, 且表达呈部位特异性, 即癌巢边缘部位的癌细胞胞质和/或包膜阳性表达。

结论: 相同来源的瘤组织在不同的微环境中, 生长方式明显不同, 组织环境对肿瘤侵袭表型有很大影响; 明胶酶的表达与肿瘤生长方式及侵袭性有密切联系。

关键词: 明胶酶; 侵袭; 原位杂交; 肿瘤移植

李玉莲, 耿敬姝. 不同组织微环境中人胃癌异种移植瘤生物学行为及明胶酶的表达差异. 世界华人消化杂志

■研发前沿

近年来人们开始重视间质在肿瘤的形成、分化、侵袭及转移中的调节作用。然而, 间质-肿瘤细胞是一个复杂的生物系统, 两者之间有着密切的信号传递和相互诱导, 其生物学机制远未明了。

2006;14(32):3136-3138

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3136.asp>

0 引言

胃癌是危害人类健康的主要恶性肿瘤之一, 其中肿瘤转移是导致肿瘤治疗失败, 患者死亡的主要原因. 肿瘤转移必须破坏由细胞外基质(ECM)构成的组织屏障. 肿瘤细胞与ECM的相互作用在肿瘤的侵袭与转移中起关键作用, 多种蛋白水解酶参与降解ECM, 其中的基质金属蛋白酶(MMPs)包含20多个家族成员, 都能降解ECM^[1-4]. MMP-2, MMP-9是一种明胶酶(gelatinase), 主要水解底物是变性胶原及细胞外基质BM的主要成分IV型胶原和V型胶原等, 而IV型胶原和V型胶原是ECM及基膜的主要成分. 近年来日本及国内的学者在MMPs与胃癌侵袭转移的关系研究方面做了大量的工作, 认识到MMP-2, MMP-9在胃癌的侵袭和转移中起着十分重要的作用^[5-9]. 我们将人胃癌组织进行裸鼠皮下及腹腔种植, 观察在不同微环境下同一来源的癌组织其生物学行为的差别, 并用原位杂交方法分别检测皮下及腹腔移植瘤组织中MMP-2 mRNA, MMP-9 mRNA的表达情况.

1 材料和方法

1.1 材料 δ BALB/c裸小鼠由中国科学院实验动物研究所提供, 鼠龄5-12 wk, 体质量15-25 g. 于无菌室内恒温、恒湿层流架中饲养, 一切笼具及饲料均经灭菌处理. 人胃癌瘤株取材于哈尔滨医科大学肿瘤医院一手术切除的低分化胃腺癌原发灶. 于裸小鼠皮下接种成瘤, 当瘤组织传代稳定后, 将剪碎的瘤组织进行皮下游代的同时进行腹腔内接种和传代, 分别称为“皮下移植瘤”和“腹腔移植瘤”.

1.2 方法 处死的裸鼠均进行全身解剖检查, 取材, 经40 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋切片, 光镜观察. 然后进行MMP-2 mRNA及MMP-9 mRNA的检测, 本实验所用的皮下和腹腔移植瘤各10例取自第20-44代之间. 采用多相寡核苷酸探针和高敏感性标记技术, 经地高辛标记, AEC显色. MMP-2寡核苷酸探针序列为: (1)5'TTCTATGGCTGCC CCAAGGAGAGCTGCAAC3'; (2)5'GACAGCC CTGCAAGTTTCCATTCCGCTTCC3'; (3)5'GA ACCAAAGTCTGAAGTGCGTGAAGTTTGG3'; MMP-9寡核苷酸探针序列为: (1)TCCCTGCCCG AGACCGGTGAGCTGGATAGC3'; (2)5'CAACTC

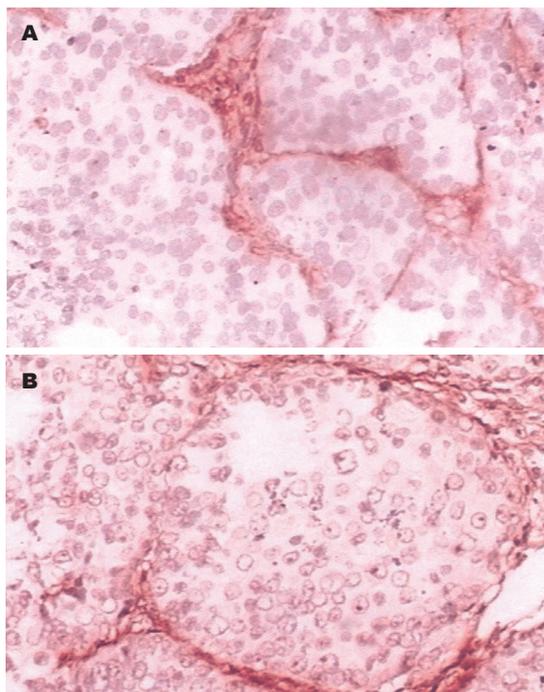


图1 MMP-2 mRNA, MMP-9 mRNA在腹腔移植瘤中的阳性表达.

GGCGGGAGAGCTGTGCGTCTTCCC3'; (3)5'CC AGGTGGACCAAGTGGGCTAGGTGACCTA3'. 以杂交缓冲液代替探针做阴性对照. 阳性标记为着红色.

统计学处理 采用成组设计等级资料两标本比较(Mann-Whitney Test)秩和检验.

2 结果

2.1 肿瘤生长方式 裸小鼠皮下移植瘤呈膨胀性生长, 有包膜, 与周围分界清楚, 易剥离, 为有限侵袭性的肿瘤; 光镜下瘤细胞虽保持原人癌细胞的形态特征, 但瘤细胞呈团巢状生长, 细胞多边形, 排列紧密, 瘤组织中间质结缔组织少, 边缘可见疏松的纤维结缔组织包膜; 膜腔移植瘤光镜下呈典型的低分化腺癌特点, 瘤细胞稍大为类圆形, 胞质染色淡, 核染色质增粗, 瘤细胞表现为明显的“条索状”浸润性生长, 癌周无明显包膜, 癌巢及癌细胞索间见有粗大的硬纤维分隔.

2.2 MMP-2 及MMP-9 mRNA表达 MMP-2 mRNA及MMP-9 mRNA在皮下移植瘤细胞及间质表达阴性, 在腹腔移植瘤为阳性表达, 且表达呈部位特异性, 即癌巢边缘部位的癌细胞胞质和/或包膜阳性表达(图1A-B); MMP-2 mRNA及MMP-9 mRNA在皮下移植瘤与腹腔移植瘤表达差异具有显著性($P<0.05$).

■ 创新盘点

裸小鼠体内人癌的异位和正位异种移植瘤可作为研究组织微环境中调节肿瘤细胞表型的非遗传因素的活体模型; 在不同组织微环境中生长的同一来源的肿瘤细胞, 其表型的差异也可表现在对间质细胞的诱导方面.

■ 应用要点

侵袭是肿瘤的恶性行为主要特征之一, 表现为肿瘤细胞侵袭性破坏宿主组织和向远处转移. 肿瘤细胞侵袭性实验研究方法分体内和体外两大类. 体内实验的特点是能显示癌细胞侵袭过程与宿主之间的关系. 本研究建立人胃癌裸鼠异种移植瘤模型, 旨在对肿瘤的发展、增殖、侵袭及转移等方面的研究提供途径.

■同行评价

本研究为该课题组系列性研究内容之一。文章不同于以往报道之处是应用分子病理手段检测了不同微环境下胃癌异种移植瘤中明胶酶的表达差异,从而进一步验证了组织微环境对肿瘤侵袭表型有很大影响,明胶酶在肿瘤转移中起一定作用。课题实验设计合理,研究结果可信,为阐明胃癌转移机制提供了又一佐证。

3 讨论

肿瘤细胞侵袭性实验研究方法分为体内和体外两大类,体内实验能显示癌细胞侵袭过程与宿主之间的关系。因为肿瘤的侵袭、转移是一个多步骤的自然选择过程,探讨间质在肿瘤的形成、分化、演进、侵袭与转移中的调节作用不可忽视^[10-13]。故我们采用体内实验方法,所用的人胃癌移植瘤具有稳定的细胞生长周期及DNA含量,且传代成瘤率几近100%,为胃癌的侵袭性研究提供了一个新的与人体环境更为接近的实验模型。在肿瘤的侵袭转移研究中,MMPs受到了高度重视,人们对MMP及其抑制剂进行了大量的研究,了解其生理及病理学方面的重要意义。明胶酶作为MMP的一个亚型,他的表达激活以及其功能的有效发挥,受内外环境多种因素的影响,尽管众多的研究表明其与消化系统肿瘤的侵袭和转移有密切的联系,但这一领域尚有许多未知的东西有待探讨。在明胶酶与胃癌相关研究方面,Monig *et al*^[14]对114例胃癌患者行根治性手术标本采用免疫组织化学半定量方法对MMP-2进行研究,结果显示,MMP-2的表达与肿瘤进展及胃癌淋巴结转移密切相关。张成武 *et al*^[15]采用S-P免疫组织化学方法检测20例正常黏膜上皮、20例异型增生、108例胃癌组及47例相应癌淋巴结MMP-9的表达情况,发现胃癌组织MMP-9阳性率为88.9%(96/108)明显高于正常胃黏膜和异型增生MMP-9阳性表达率20.2%和70%,差异具有显著性;癌转移淋巴结MMP-9表达阳性率为100%,明显高于胃癌原发灶;MMP-9表达强度与胃癌的生长方式、浸润程度、淋巴结转移、远处转移、脉管侵犯及病期密切相关,从而认为MMP-9的表达与胃癌侵袭转移及预后密切相关。本实验将相同来源的瘤组织(裸小鼠腹腔种植结节)分别在免疫缺陷的裸小鼠皮下及腹腔种植,前者出现明显的膨胀性生长,而后者表现为浸润性生长,不同的移植部位出现了显著的生物学行为差异。皮下移植瘤在皮下的微环境中丧失了人胃癌组织明显浸润性生长的特性,而腹腔移植瘤在腹腔的微环境中保持人胃低分化腺癌浸润性生长的生物学特性,并伴有活跃的纤维结缔组织增生。但是裸小鼠皮下与腹腔不同组织微环境究竟对肿瘤细胞侵袭性的调节机制是什么?检索国内外文献未见有深入的研究。我们观察到人胃癌腹腔

移植瘤中癌巢边缘及临近的间质细胞MMP-2, MMP-9 mRNA阳性表达,且主要表达在间质;皮下移植瘤以膨胀性生长为主,MMP-2, MMP-9 mRNA表达均为阴性。同一来源的肿瘤细胞在不同组织微环境中所呈现的侵袭性及MMP-2, MMP-9 mRNA表达均有显著性差异,提示了肿瘤细胞与相邻的间质细胞之间具有相互诱导作用,组织微环境对肿瘤表型可有决定性的影响,并且MMP-2, MMP-9 mRNA的表达与胃癌细胞的生长方式及侵袭性有密切联系,为我们研究胃癌的侵袭、转移提供了一个新思路。

4 参考文献

- Price JT, Thompson EW. Mechanisms of tumour invasion and metastasis: emerging targets for therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2002; 6: 217-233
- 范玉晶, 韩明子. 基质金属蛋白酶和消化道肿瘤的相关性. *世界华人消化杂志* 2004; 9: 2174-2176
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 43 Suppl: S42-S51
- Liu HL, Li XH, Wang DY, Yang SP. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in fibrotic rat liver. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 881-884
- 蔡蓉, 卢健. 胃癌侵袭转移相关基因的研究进展. *生命科学* 2004; 4: 206-225
- 李莉, 张声, 林华, 林建银. 基质金属蛋白酶和组织金属蛋白酶抑制剂表达失衡与胃癌浸润转移的关系. *癌症* 2002; 3: 305-310
- 王璐, 张丽红, 李玉林, 李一雷, 刘湛. 基质金属蛋白酶-9及其mRNA在胃癌中的表达与血管新生的关系. *中华医学杂志* 2003; 9: 782-786
- 汪丽燕, 乔镇, 关景明. 基质金属蛋白酶与其抑制剂在消化道肿瘤中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2004; 11: 2674-2678
- 张晓东, 黄梅芳, 李传银, 金懋林. 胃癌侵袭和转移相关基因的研究现状. *肿瘤* 2001; 6: 477-479
- Pupa SM, Menard S, Forti S, Tagliabue E. New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. *J Cell Physiol* 2002; 192: 259-267
- Lynch CC, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* 2002; 70: 561-573
- Mueller MM, Fusenig NE. Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. *Differentiation* 2002; 70: 486-497
- Bindels EM, Vermey M, De Both NJ, van der Kwast TH. Influence of the microenvironment on invasiveness of human bladder carcinoma cell lines. *Virchows Arch* 2001; 439: 552-559
- Monig SP, Baldus SE, Hennecken JK, Spiecker DB, Grass G, Schneider PM, Thiele J, Dienes HP, Holscher AH. Expression of MMP-2 is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Histopathology* 2001; 39: 597-602
- 张成武, 邹寿椿, 徐文娟, 赵仲生. 胃癌基质金属蛋白酶-9表达的临床意义. *中国胃肠外科杂志* 2000; 1: 25-27

电编 李琪 编辑 王晓瑜