

## 荧光定量RT-PCR检测 宫颈癌患者外周血MMP-9 mRNA表达的 临床意义

董小跃,张盛燕

(瑞安市妇幼保健院妇产科,浙江 瑞安 325200)

**【摘要】** 目的 研究宫颈癌患者外周血中MMP-9 mRNA的表达,探讨其临床意义。方法 应用实时荧光定量PCR技术,检测98例经病理证实的宫颈癌及25例妇科良性肿瘤对照组外周血液中MMP-9mRNA的表达,并分析其与临床病理因素的关系。结果 98例宫颈癌组外周血MMP-9mRNA阳性率为76.5%,而对照组为48.0% ( $P<0.01$ )。在宫颈癌组内,早期宫颈癌(I~II A期)外周血MMP-9mRNA阳性率为63.5%,而中晚期宫颈癌(II b-IV期)为88.6% ( $P<0.05$ )。早期宫颈癌患者MMP-9mRNA的表达与肿瘤分期(I A、I B、II A)、病理类型(鳞癌、非鳞癌)、淋巴转移(+/-)、肿瘤大小( $<4\text{ cm}$ 、 $\geq 4\text{ cm}$ )等均无显著性相关( $P>0.05$ )。仅与年龄( $<40$ 岁、 $\geq 40$ 岁)、组织分化( $G_{1-2}$ 、 $G_3$ )、脉管瘤栓(+/-)显著相关( $P<0.05$ )。结论 荧光定量PCR技术可检测出各期宫颈癌患者外周血中MMP-9的表达,有较高的敏感性和特异性,在判断宫颈癌预后、监控复发中的应用具有一定的可行性。

**【关键词】** 宫颈肿瘤;MMP-9;外周血;RT-PCR

**【中图分类号】** R737.33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2012)01-009-03

**Clinical significance of MMP-9 mRNA detection in the peripheral blood of patients with cervical cancer by fluorescent quantitative RT-PCR.** DONG Xiao-yue, ZHANG Sheng-yan. Department of Gynecology and Obstetrics, Ruian Maternal and Child Health Care Hospital, Ruian 325200, Zhejiang, CHINA

**【Abstract】 Objective** To detect the expression of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) mRNA in the peripheral blood of patients with cervical cancer, and to evaluate its clinical significance. **Methods** The expression of MMP-9 mRNA was evaluated by fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in the peripheral blood of 98 patients with cervical cancer (the study group) and 25 patients with benign gynecological tumors (the control group). Possible correlations between clinical pathological factors were analyzed. **Results** The positive rate of MMP-9 mRNA was 76.5% in the study group and 48% in the control group, with statistically significant difference ( $P<0.01$ ). In the study group, the positive rate of MMP-9 mRNA was 63.5% in patients with FIGO Stage I A to II A cervical cancer and 88.6% in patients with FIGO Stage II b to IV cervical cancer. The expression of MMP-9 mRNA in patients with FIGO Stage I A to II A cervical cancer was significantly correlated with age, differentiation and lymph vascular space involvement, but showed no correlation with tumor staging (I A, I B, II A), pathological types (squamous Cell Carcinoma or non-squamous-cell carcinomas), lymph node metastasis (+/-) and tumor size ( $<4\text{ cm}$ ,  $\geq 4\text{ cm}$ ). **Conclusion** Fluorescent quantitative RT-PCR can detect the expression of MMP-9 in the peripheral blood of patients with cervical cancer, with high sensitivity and specificity, which could be a potential biomarker for detecting micrometastasis in cervical carcinoma.

**【Key words】** Cervical cancer; MMP-9; Peripheral blood; RT-PCR

作者简介:董小跃(1982—),女,浙江省瑞安市人,住院医师,学士。

- [12] Sin DD, Lacy P, York E, et al. Effects of fluticasone on systemic markers of inflammation in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 170(7): 760-765.
- [13] Kohsaka S, Menon V, Lowe AM, et al. Systemic inflammatory response syndrome after acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock[J]. Arch Intern Med, 2005, 165(14): 1643-1650.
- [14] Gourine AV, Dale N, Gourine VN, et al. Fever in systemic inflammation: roles of pureness [J]. Front Biosci, 2004, 9: 1011-1022.
- [15] 王士雯. 老年多器官功能不全综合症的肺启动机制[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2002, 1(1): 4-6.
- [16] Pinhu L, Whitehead T, Evans T, et al. Ventilator-associated lung injury[J]. Lancet, 2003, 61(9354): 332-340.
- [17] Levy BI, Benessiano J, Henrion D, et al. Chronic blockade of AT2-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure [J]. J Clin Invest, 1996, 98(2): 418-425.
- [18] Soler-Cataluña JJ, Martínez-García MA, Román Sánchez P, et al. Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Thorax, 2005, 60(11): 925-931.

(收稿日期:2011-08-23)

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一。虽宫颈癌的诊断及治疗方面取得一定的进展,但仍有20%~34%的早期宫颈癌患者最终死于肿瘤的复发和转移。血循环中微转移的存在,提示肿瘤已不再局限于原发灶,有发展为远处转移的可能。早期诊断外周血中的微转移,有助于我们更有针对性地进行个体化的术后辅助治疗,减少复发和转移,提高患者的生存率和生活质量。本研究利用RT-PCR技术检测早期宫颈癌外周血中上皮源性特异性标志基因MMP-9 mRNA的表达,探讨它们在宫颈癌外周血中的表达及临床意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择2005年1月至2010年6月间我院首诊的98例宫颈癌患者为研究对象。年龄22~78岁,平均48岁。临床分期[按照2000年国际妇产科联盟(FIGO)的标准]: I A期8例, I B期48例, II A期7例, II B 22例, III期10例, IV期3例。按病理类型:鳞癌85例,非鳞癌13例;所有早期宫颈癌患者均予子宫次广切或子宫广切及盆清术,术后标本均行病理检查。对照组为同期手术的妇科良性肿瘤25例,其中子宫肌瘤18例,卵巢囊肿3例,子宫肌腺症1例,子宫内膜异位症3例。

1.2 主要试剂和仪器 Trial试剂(GIBLO公司);逆转录酶M2MLV (Promega公司); Taq 酶( Sangon公司);Light Cycler荧光PCR仪(德国Roche公司)。

1.3 方法 患者初诊治疗前抽取静脉血5 ml (弃去开始的1 ml,以防上皮细胞污染),于20 min内用淋巴细胞分离液分离单个核细胞。用Trizol试剂(上海复星公司)进行总RNA的提取。测A<sub>260-280</sub>处的吸光值,并计算RNA含量。然而进行逆转录反应合成cDNA后再行PCR扩增。PCR反应条件:93℃ 2 min, 93℃ 45 s, 55℃ 60 s, 共做40个循环。结果分析参考试剂盒。

1.4 统计学方法 计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用SPSS12.0软件包进行统计学分析,对计数资料单因素分析采取 $\chi^2$ 检验,以P<0.05为差异有统计学意义,P<0.01为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 宫颈癌及妇科良性肿瘤的MMP-9 mRNA转录 宫颈癌组外周血MMP-9 mRNA有75例阳性,表达率为76.5% (75/98),而对照组有12例阳性,表达率为48.0%(12/25),两组比较差异均有显著统计学意义(P<0.01)。在宫颈癌组内,早期( I A + I B + II A )

宫颈癌外周血MMP-9 mRNA有40例阳性,表达率为63.5% (40/63),而中晚期( II B + III + IV )宫颈癌有31例阳性,表达率为88.6% (31/35),两组比较差异存在统计学意义(P<0.05)。

2.2 MMP-9 mRNA 的表达与早期宫颈癌的单因素分析 ①年龄:年龄<40岁的早期宫颈癌MMP-9 mRNA表达阳性与阴性比例分别为16例(40.0%)vs 4例(17.4%),差异有统计学意义(P<0.05)。②肿瘤分期:早期宫颈癌 I A、I B、II A MMP-9 mRNA表达阳性与阴性比例分别为6例(15.0%) vs 2例(8.7%), 30例(75%)vs 18例(78.3%), 4例(10.0%)vs 3例(13.0%),差异无统计学意义(P>0.05)。③病理类型:早期宫颈癌病理类型中非鳞癌MMP-9 mRNA表达阳性与阴性比例分别为10例(25%)vs 2例(8.7%),差异有统计学意义(P<0.05)。④病理分化:表达MMP-9 mRNA的早期宫颈癌与未表达MMP-9 mRNA的早期宫颈癌低分化分别有14例(35%)和4例(17.4%),差异有统计学意义(P<0.05)。⑤淋巴结转移:早期宫颈癌淋巴结转移者MMP-9 mRNA表达阳性与阴性比例分别为6例(15%) vs 2例(8.7%),差异无统计学意义(P>0.05),见表1。

表1 MMP-9 mRNA 的表达与早期宫颈癌临床病理因素分析

因素	MMP-9mRNA(+) (n=40)	MMP-9mRNA(-) (n=23例)	$\chi^2$ 值	P <sub>i</sub> 值
年龄			3.912	0.024 <sup>△</sup>
<40	16	4		
≥40	24	19		
肿瘤分期			0.351	3.342
I A	6	2		
I B	30	18		
II A	4	3		
病理类型			3.001	0.371 <sup>△</sup>
鳞癌	30	21		
非鳞癌	10	2		
病理分化			9.588	0.002 <sup>△</sup>
低分化	14	4		
中-高分化	26	19		
淋巴结转移			4.542	0.053
阴性	34	21		
阳性	6	2		

注:△表示P<0.05,差异有统计学意义。

3 讨论

宫颈癌的复发转移是导致治疗失败及造成患者死亡的主要原因<sup>[1]</sup>,因此,如何更早发现亚临床期病变、评估治疗效果、监控复发是当前需要解决的关键问题。而肿瘤的微转移<sup>[2]</sup>是肿瘤复发转移的基础和

前提。因此早期诊断肿瘤的微转移对指导个体化治疗和判断预后具有重要临床价值。RT-PCR技术的灵敏性较高,可检出 $1 \times 10^7$ 个正常细胞中的1个肿瘤细胞,使外周血微转移检测成为可能。实时荧光定量聚合酶链式扩增反应(PCR)作为一项新技术,可检测出 $10^6 \sim 10^8$ 个单个核细胞中的一个肿瘤细胞,其巧妙地把核酸扩增、杂交、光谱分析和实时检测技术结合在一起,借助荧光信号检测PCR产物。与普通PCR或巢式PCR相比,实时荧光定量PCR具有更可靠的灵敏度和特异性,其自动化的检测能最大限度减少污染,显著减少假阳性的发生率<sup>[3]</sup>。

基质金属蛋白酶是一个大家族,因其需要 $Ca^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 等金属离子作为辅助因子而得名。基质金属蛋白酶(MMPs)几乎能降解细胞外基质(ECM)中的各种蛋白成分,破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障,在肿瘤侵袭转移中起关键性作用,从而在肿瘤浸润转移中的作用日益受到重视,被认为是该过程中主要的蛋白水解酶。MMP-9是基质金属蛋白酶(MMPs)家族中的一员,为IV型胶原酶,可有效降解基底膜的主要成分IV型胶原及明胶,它的异常表达与人类许多恶性肿瘤的转移密切相关。在肿瘤组织中发现细胞角蛋白的存在,则意味着微转移的发生<sup>[4]</sup>。

本研究采用RT-PCR技术检测宫颈癌外周血中MMP-9 mRNA的转录。结果发现,MMP-9 mRNA在宫颈癌和对照组中的阳性率分别为76.5%和48.0%,两者差异有显著统计学意义( $P < 0.01$ )。在宫颈癌中,中晚期宫颈癌外周血MMP-9 mRNA阳性率明显高于早期宫颈癌(88.6% vs 63.5%),两组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。以上资料表明在宫颈癌外周血中存在表达MMP-9 mRNA的肿瘤细胞;同时MMP-9 mRNA的转录均显示了很高的特异性,通过RT-PCR技术检测宫颈癌外周血中肿瘤细胞具有较好的敏感性和特异性。

目前,尽管早期宫颈癌的5年生存率达85%~90%,但临床医师发现一部分无高危因素的,术后很快发生盆腔复发和转移的患者,预后较差。有关预后因素的探讨被引为宫颈癌临床处理依据或参考的有:肿瘤体积大小、宫颈间质浸润深度、宫颈癌生长形态及癌细胞类型、淋巴血管受侵、淋巴结转移、肿瘤组织非鳞癌成分;以及手术标本切缘与年龄、贫血<sup>[5]</sup>。文献报道,MMP-9 mRNA的转录与胃肠道、肺、乳腺等恶性肿瘤的预后因素如分期、浸润深度、淋巴结转移有关<sup>[6]</sup>。在本研究中,表达MMP-9 mRNA的早期宫颈癌与未表达MMP-9 mRNA的早期宫颈癌相比,年轻、低分化及鳞癌更多见,差异有统计学意义。上述资料提示微转移可能与上述因素有关,而其作用机制有待进一步探索和证实。对于MMP-9 mRNA患者给予加强预后监测或预防性治疗,可减少远处转移,改善预后,提高生存率。

#### 参考文献

- [1] 牟玲,吕凤林,汪云,等. HPV18 E2基因在宫颈癌及癌前病变组织中的表达及其临床意义[J]. 重庆医学, 2008, 37(20): 2321-2324.
- [2] 贾学慧. 人乳头状瘤病毒及其致病的研究进展[J]. 海南医学, 2010, 21(18): 111-114.
- [3] Kim JT, Song EY, Chung KS, et al. Up-regulation and clinical significance of serine protease kallikrein 6 in colon cancer [J]. Cancer, 2011, 117(2): 2608-2019.
- [4] Lakatos G, Sipos F, Miheller P, et al. The Behavior of Matrix metalloproteinase-9 in lymphocytic colitis, collagenous colitis and ulcerative colitis [J]. Pathol Oncol Res, 2011, 7(16): 120-123.
- [5] Agorastos T, Zafrakas M, Mastrominas M. Long-term follow-up after cervical cancer treatment and subsequent successful surrogate pregnancy [J]. Reprod Biomed Online, 2009, 19(2): 250-251.
- [6] Marcaccini AM, Novaes AB JR, Meschiari CA, et al. Circulating matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) and MMP-9 are increased in chronic periodontal disease and decrease after non-surgical periodontal therapy[J]. Clin Chim Acta, 2009, 409(1-2): 117-122.

(收稿日期:2011-06-27)