

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2014.06.010

RECK 与 MMP-2 在口腔扁平苔藓的表达及意义

李 磊^{1,2} 周晓清² 徐晓楠² 孔大军² 袁昌清^{1△}⁽¹⁾ 青岛大学口腔医学院 山东 青岛 266002, ⁽²⁾ 济宁医学院附属济宁市第一人民医院, 山东 济宁 272011

摘 要 **目的** 通过分析抑癌基因 RECK 及基质金属蛋白酶-2(MMP-2)在口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OLP)组织中的表达,并探讨其在鳞状细胞癌变中的意义。**方法** 通过 Western blot 检测 RECK、MMP-2 蛋白在 OLP 中的表达,并与其在口腔鳞状细胞癌及正常口腔黏膜中的表达进行比较。**结果** 从正常口腔黏膜到扁平苔藓及鳞状细胞癌, MMP-2 蛋白的表达依次增加,而 RECK 蛋白的表达依次降低,差别均具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 口腔黏膜扁平苔藓中金属蛋白酶抑制剂 RECK 表达的高低可作为判断 OLP 癌变潜能的检测指标之一。

关键词 基质金属蛋白酶;抑癌基因;口腔扁平苔藓

中图分类号: R758.65 **文献标识码:** B **文章编号:** 1000-9760(2014)120-416-02

口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OLP)是口腔黏膜的一种慢性炎症性损害,发病率 2% 左右^[1],癌变率 0.4%~3.3%^[2],其主要病理学特点是基底膜破坏,此破坏过程由基质金属蛋白酶(MMPs)家族控制。抑癌基因 RECK(reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs)能在转录水平抑制各类 MMP 的生物活性^[3]。本文采用 Western blot 印迹检测 OLP 中 RECK 及 MMP-2 蛋白的表达,探讨其在 OLP 发生及癌变过程中的作用。

1 资料和方法

1.1 临床资料

选取济宁医学院附属济宁市第一医院口腔科 2010 年至 2013 年门诊就诊的 27 例疑似后经病理确诊的 OLP 患者,切取活检组织分 2 份,1 份常规石蜡切片明确诊断,另 1 份立即放入液氮中, -80℃ 冰箱保存。以 17 例正常口腔黏膜组织(来源于外伤患者)、24 例口腔鳞癌组织作对照。

1.2 方法

1.2.1 Western blot 检测 各组 RECK 及 MMP-2 的表达率 取出新鲜冷冻组织剪切成细小的碎片,按照每 20mg 组织加入 150μl 含 1%PMSF 的裂解液,置于冰上充分裂解后 12000g 离心 15min,取上清,BCA 法测定蛋白浓度,总蛋白加入 1/4 体积的上样缓冲液后,金属浴 10 min,上样量均 40 μg,

SDS-PAGE 电泳蛋白质电泳分离后,电转移槽转移至 PVDF 膜,5% 的脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 1 h,稀释 RECK 或 MMP-2 多克隆鼠抗人抗体 4℃ 过夜,回收一抗后使用 0.5% TBST 室温下摇床上洗 3 次,每次 10 min,将二抗用 TBST 稀释 5000 倍室温下孵育 60 min 后, TBST 在室温下摇床上洗 3 次,每次 10 min,加入化学发光剂 ECL 显色,凝胶成像系统摄像。

1.2.2 结果判定 以内参 GAPDH 为参照,如 GAPDH 能正常显影,目标条带出现则为阳性(+),无目标条带则为阴性(-)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理。

2 结果

2.1 MMP-2 在正常口腔黏膜、扁平苔藓和口腔鳞癌中的表达

MMP-2 在正常口腔黏膜、扁平苔藓和鳞癌中的表达分别为 11.8%、51.9%、91.7%。在鳞癌组织大多有表达,且表达一般较强(见图 1),MMP-2 在扁平苔藓中的表达相对于口腔正常黏膜组织及口腔鳞癌,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 RECK 在正常口腔黏膜、扁平苔藓和口腔鳞癌中的表达

RECK 在正常口腔黏膜、扁平苔藓和鳞癌中的表达分别为 94.1%、40.7%、4.2%,且在鳞癌组织中的表达强度较弱(见图 1),经统计分析,RECK 在扁平苔藓中的表达相对于口腔正常黏膜组织及

△ [通信作者]袁昌清, E-mail: yqc613@163.com

口腔鳞癌,差别具有统计学意义($P<0.01$)。见表 2。

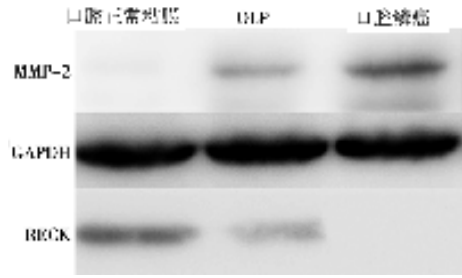


图 1 口腔正常黏膜、口腔扁平苔藓及口腔鳞癌中 RECK 及 MMP-2 的蛋白表达

表 1 MMP-2 在正常口腔黏膜组织、扁平苔藓组织和鳞癌组织中的表达及阳性率比较

	n	+	-	阳性率/%
正常黏膜组	17	2	15	11.8
鳞癌组	24	22	2	91.7
扁平苔藓组	27	14	13	51.9▲■

注:▲与正常组织组比较, $\chi^2=9.702$, $P<0.05$;■与鳞癌组织比较, $\chi^2=26.176$, $P<0.01$ 。

表 2 RECK 在正常口腔黏膜组织、扁平苔藓组织和鳞癌组织中的表达及阳性率比较

	n	+	-	阳性率/%
正常黏膜组	17	16	1	94.1
鳞癌组	24	1	23	4.2
扁平苔藓组	27	11	16	40.7▲■

注:▲与正常组织组比较, $\chi^2=9.446$, $P<0.05$;■与鳞癌组织比较, $\chi^2=33.174$, $P<0.01$ 。

3 讨论

OLP 是一种常累及皮肤或黏膜慢性炎症性病变,临床表现多种多样,其病因和发病机制尚无定论,但免疫机制在其发病中的作用受到了广泛的重视和认可。Torti 等^[4]研究发现抗原特异性机制和非抗原特异性机制作用的结果都可以导致基底膜的损伤。MMPs 家族是一组锌离子依赖性内肽酶,其中基质金属蛋白酶(MMP-2, MMP-9)是唯一能降解 ECM 和 IV 型胶原的酶,MMP-2 是一种非糖化的明胶酶,可特异性水解 IV 型胶原,在肿瘤的侵袭和转移中起着重要作用。Cai 等^[5]报道 MMP-2 和 MMP-9 在扁平苔藓恶变中表达上调,且 MMP-2 的表达与扁平苔藓恶变相关。本文结

果显示 MMP-2 在正常口腔黏膜、OLP、鳞癌组织的表达依次增加,故推测其在扁平苔藓致病中起到一定的作用。

抑癌基因 RECK 是 Takahashi 等^[3]发现的一种新型抑癌基因。大量研究表明^[6-7] RECK 具有金属蛋白酶抑制剂的功能,可以抑制多种基质金属蛋白酶的生物活性,从而抑制多种恶性肿瘤的局部侵袭力及远处转移力^[8-9]。本文采用 Western blot 方法,检测到 RECK 蛋白在正常口腔黏膜、OLP、鳞癌组织中的表达依次降低,且差别具有统计学意义,说明 RECK 蛋白表达的降低,可能与 OLP 癌变有关系。本文为扁平苔藓癌变的预测提供了新的可能,有利于我们进一步了解口腔扁平苔藓的生物学行为。

参考文献:

[1] Brant J M, Vasconcelos A C, Rodrigues L V. Role of apoptosis in erosive and reticular oral lichen planus exhibiting variable epithelial thickness[J]. Braz Dent J, 2008, 19(3): 179-185.

[2] Scully C, Beyli M, Ferreira M C, et al. Update on oral lichen planus: etiopathogenesis and management[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 1998, 9(1): 86-122.

[3] Takahashi C, Sheng Z, Horan T P, et al. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(22): 13221-13226.

[4] Torti D C, Jorizzo J L, McCarty M A. Oral lichen planus[J]. Arch Dermatol, 2007, 143(4): 511-515.

[5] Cai H X, Pan C B, Li H G. Expression of matrix metalloproteinases in cancerization of oral mucosa[J]. Acad J Sums, 2002, 23(8): 477-479.

[6] Oh J, Takahashi R, Kondo S, et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis[J]. Cell, 2001, 107(6): 789-800.

[7] Sternlicht M D, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001, 17: 463-516.

[8] Zhou X, Huang S, Jiang L, et al. Expression of RECK and MMP-2 in salivary adenoid cystic carcinoma: correlation with tumor progression and patient prognosis[J]. Oncol Lett, 2014, 7(5): 1549-1555.

[9] Zhang C, Ling Y, Zhang C, et al. The silencing of RECK gene is associated with promoter hypermethylation and poor survival in hepatocellular carcinoma[J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(4): 451-458.

(收稿日期 2014-11-01)