

基质金属蛋白酶及其抑制剂在喉鳞癌中的基因表达谱及临床病理特征相关性分析

倪荣生¹, 沈晓辉², 高下²

1. 南通大学附属南京江北医院 耳鼻咽喉头颈外科, 江苏 南京 210044

2. 南京大学医学院附属鼓楼医院 耳鼻咽喉头颈外科, 江苏 南京 210008

摘要:目的 分析喉鳞状上皮细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)中基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)家族及组织金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, TIMPs)的基因表达谱,找出与LSCC相关性最高的基因进行进一步研究,探讨其蛋白的表达与临床病理特征相关性。方法 选取28例LSCC患者,采用含人类全基因组的基因芯片来检测MMPs及TIMPs在4例LSCC患者中共同上调或下调的基因。采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)及western blot检测24例患者该基因和蛋白的表达来验证基因芯片结果,并研究该蛋白的表达与临床病理特征之间的关系。结果 基因芯片显示MMPs家族在LSCC与癌旁正常细胞之间的差异表达基因有14个,其中4个基因仅表达上调,4个基因仅表达下调,另有6个基因在部分患者中表达上调,而在另一部分患者中表达下调。未发现在4例患者中共同表达上调或下调的基因。TIMPs在LSCC与癌旁正常细胞之间全部表达下调,TIMP4在4例患者中全部表达下调。RT-PCR检测结果显示TIMP4基因在LSCC组织中低表达。western blot检测结果显示TIMP4蛋白在LSCC组织中低表达,且TIMP4蛋白的表达与淋巴结转移相关。结论 研究首次发现MMPs家族及TIMPs在LSCC的表达谱,并发现TIMP4蛋白的表达与LSCC临床病理特征相关。未来TIMP4蛋白可能作为LSCC潜在的治疗靶点。

关键词: 基因芯片; 喉鳞状上皮细胞癌; 基质金属蛋白酶; 组织金属蛋白酶组织抑制剂

中图分类号:R739.65

文献标志码:A

文章编号:1673-3770(2024)04-0055-07

引用格式:倪荣生,沈晓辉,高下. 基质金属蛋白酶及其抑制剂在喉鳞癌中的基因表达谱及临床病理特征相关性分析[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报,2024, 38(4):55-61. NI Rongsheng, SHEN Xiaohui, GAO Xia. Correlation analysis of gene expression profile of matrix metalloproteinases and their inhibitors in laryngeal squamous cell carcinoma and clinicopathological features[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2024, 38(4):55-61.

Correlation analysis of gene expression profile of matrix metalloproteinases and their inhibitors in laryngeal squamous cell carcinoma and clinicopathological features

NI Rongsheng¹, SHEN Xiaohui², GAO Xia²

1. Department of Otorhinolaryngology & Head and Neck Surgery, Nanjing Jiangbei Hospital Affiliated to Nantong University, Nanjing 210044, Jiangsu, China

2. Department of Otorhinolaryngology & Head and Neck Surgery, Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu, China

Abstract: Objective The study aimed to discover the gene expression profiles of the matrix metalloproteinases (MMPs) family and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs) in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC), to analyze the genes most relevant to LSCC, and finally clarify their relationship with clinicopathological features. **Methods** Twenty-eight patients with LSCC were studied. In four patients, genes in the MMPs family and TIMPs that are up-regulated or down-regulated simultaneously were detected by a gene chip containing the entire human genome. The gene chip results were verified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blot in the other 24 patients. The correlation between the expression of the proteins encoded by the genes and the clinicopathological characteristics of the patients were investigated. **Results** The gene chip analysis revealed 14 differentially expressed genes of MMPs family between LSCC and adjacent normal cells. Of these, four genes were up-regulated, four were down-regulated, and the remaining six were up-regulated in some patients and down-regulated in others. No genes were consistently up- or down-regulated in the four patients. In contrast, all TIMPs were down-regulated between LSCC and adjacent nor-

mal cells. The TIMP4 gene was down-regulated in all four patients. RT-PCR and western blot results showed that the TIMP4 gene and protein was poorly expressed, respectively, in LSCC tissue. Western blot also showed that the expression of TIMP4 protein was correlated with lymph node metastasis. **Conclusion** To our knowledge, this is the first description of the expression profile of MMPs and TIMPs in LSCC. The expression of TIMP4 protein was associated with the clinicopathological features of LSCC. Future studies may further confirm TIMP4 protein as a predictor of the survival of patients with LSCC and/or a potential therapeutic target of LSCC.

Key words: Gene chip; Laryngeal squamous cell carcinoma; Matrix metalloproteinase; Tissue inhibitor of metalloproteinase

喉鳞状上皮细胞癌 (laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC) 是头颈部最常见的肿瘤之一, 占喉癌的 85%~90%^[1]。喉癌被列为全球第 23 位最常见的人类恶性肿瘤, 2018 年全球新发喉癌患者约 18 万, 约有 95 000 人死于喉癌^[2]。尽管手术、放疗、多周期化疗等综合治疗取得了很大进展, 但 LSCC 患者的远期预后仍不理想。导致 LSCC 患者不良预后的主要原因很多, 包括局部复发、易侵犯邻近组织或器官、淋巴结转移和远处转移^[3]。大约 60% 的 LSCC 患者在诊断时已是晚期 (III 或 IV 期)^[4-5]。由于 LSCC 发生和发展机制不明确, LSCC 的 5 年生存率在过去 40 年中从 66% 下降到 63%^[6]。因此, 迫切需要揭示 LSCC 的发病机制, 寻找早期诊断的生物标志物, 探索有效的新治疗靶点。

恶性肿瘤的侵袭和转移是一个非常复杂的多步骤过程, 导致癌症侵袭和转移的关键步骤之一是细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的降解, 而参与调控 ECM 降解过程的最重要物质是基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 及其抑制剂。MMPs 是属锌依赖性内肽酶家族的一类蛋白酶, 能特异性水解 ECM 蛋白。因在结构、底物特异性、序列同源性、细胞定位和分泌等方面存在差异, MMPs 被分为不同的亚家族: 胶原酶、明胶酶、基质溶素、肌醇溶素、膜型 MMPs 和其他 MMPs^[7-8]。组织金属蛋白酶抑制剂 (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, TIMPs) 是一种内源性金属蛋白酶抑制剂, 由 TIMP1、2、3、4 四个成员组成。TIMPs 不仅是 MMPs 的内源性抑制剂, 还具有独立于 MMPs 的生物学活性, 包括调节细胞生长分化、血管生成、细胞凋亡和突触可塑性^[7]。MMPs 与 TIMPs 之间的平衡在癌症进展和转移中起着至关重要的作用。

基因芯片是一种创新技术, 可对成千上万个基因同时进行表达分析, 从而在整体基因水平而不是逐个基因水平上分析和理解癌症特异性基因表达谱。我们应用含人类全基因组的基因芯片检测患者的 LSCC 组织和癌旁正常组织的基因表达, 鉴定 MMPs 家族及 TIMPs 家族基因表达谱, 找出相关性最高的基因进行进一步研究分析, 了解其与 LSCC

临床病理特征相关性。

1 资料与方法

1.1 临床资料

28 例手术治疗的 LSCC 患者组织标本 (2007 年 10 月至 2009 年 7 月) 均来自南京大学附属鼓楼医院耳鼻咽喉头颈外科。组织标本均经常规组织病理学证实, 术前无放疗或化疗。4 例患者的组织标本用人全基因组芯片进行分析, 24 例患者的组织标本用逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 和 western blot 进行检测。术中切除的肿瘤组织和癌旁正常组织立即置入液氮中冷冻, 后转入 -80 °C 冰箱保存。所有患者均签署知情同意书, 研究方案经鼓楼医院伦理委员会批准 (AF/SC-08/02.1)。

1.2 方法

1.2.1 基因芯片的制备及分析

将肿瘤组织和癌旁正常组织在液氮中研磨成粉, 用 Trizol 试剂一步法提取总 RNA。总 RNA 进行分离后, 根据总 RNA 的电泳条带判断 RNA 的完整性。用分光光度法测定 OD_{260}/OD_{280} 比值 > 1.8, 保证样品的纯度。基因芯片使用 2 μ g 的总 RNA 制备生物素探针。将肿瘤和正常组织的总 RNA 与 100 pmol 的 T7-oligo (dT)₂₄ 引物混合, 在 70 °C 10 min 变性, 然后在冰上冷却。采用 RNA 转录标记试剂盒制备全 cDNA, 使用 QIAGEN RNeasy Kit 纯化总 RNA, 癌组织 cDNA 用 Cy3 标记, 癌旁组织 cDNA 使用 Cy5 标记, 混合后的荧光探针与基因芯片 (Agilent 4 \times 44K 人全基因组 oligo 芯片, 由上海生物芯片有限公司提供) 杂交。杂交芯片用 Agilent 扫描仪 (G2655AA, 美国) 进行扫描获得荧光信号图像, 采用 GenePix Pro3.0 图像软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号强度和比值。将所得数据的前景值与背景值相减, 得出 Cy3、Cy5 的强度值, 再将数据进行标准均一化处理。计算基因 ratio 值 Cy3/Cy5, 以 ratio 值 > 2 或 < 0.5, Flag 为 0, S/N (信噪比) > 2.6, 分别作为显著性上调或显著性下调的标准。

1.2.2 RT-PCR 检测 24 例 LSCC 组织和癌旁正常组织中 *TIMP4* 基因的表达

按 Trizol 一步法抽提总 RNA, 紫外线分光光度计测定浓度, 用 M-MLV 逆转录酶 (Invitrogen 公司, 美国) 逆转录成 cDNA, 置于 -20 °C 保存。参照基因数据库的序列, 使用在线 Primer3.0 软

件自行设计引物, 由上海英骏生物技术有限公司合成。引物序列及 PCR 条件见表 1。产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 结果用 LabWorks45 软件拍照、保存, 测定并以目的基因与内参照基因 β -actin 扩增条带的光吸收度比值作为目的基因的相对表达值。

表 1 引物序列及 PCR 条件
Table 1 Primer sequences and PCR conditions

基因	引物序列	产物大小/bp	退火温度/°C	循环次数
<i>TIMP4</i>	Sense, 5'-GCCTTTTGACTCTTCCCT-3'	302	56	34
	Anti-sense, 5'-CATAATGCTGAGCCTGGT-3'			
β -actin	Sense, 5'-TCGACAACGGCTCCGGCAT-3'	241	56	28
	Anti-sense, 5'-AAGGTGTGGTGCCAGATTTTC-3'			

1.2.3 Western blot 检测 24 例 LSCC 组织和癌旁正常组织中 *TIMP4* 蛋白的表达

采用博士德蛋白提取试剂盒提取各种样本总蛋白, 每种蛋白样品取 20 μ g, 加入 3 \times 加样缓冲液, 煮沸 3 min 后上样, 在制备好的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳 1.5~2.0 h; 切取所要蛋白条带的凝胶, 然后在 4 °C、25 V 电压下经电转仪将蛋白质转至 PVDF 膜上; 将 PVDF 膜放入含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 中, 室温下封闭 2 h; 加入一抗 (1:1 000 稀释) 4 °C 孵育过夜; 次日用 TBS-T 室温下洗膜 4 次, 每次 15 min, 接着加入辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔 IgG 抗体 (1:1 000 稀释), 室温下轻轻摇动 2 h; 然后同样用 TBS-T 室温下洗膜 4 次, 每次 15 min, 最后加入 ECL 试剂, 室温下温育 2~4 min 后曝光, 用 Kodak Digital Science 1D 图像分析软件测定, 并以目的蛋白与内参照蛋白 Tubulin 条带的光吸收度比值作为目的蛋白的相对表达值。

比较采用配对样本 *t* 检验, *TIMP4* 蛋白的表达水平与临床资料的相关性中年龄、肿瘤分期及淋巴结转移采用独立样本 *t* 检验, 肿瘤分型、肿瘤分化采用单因素方差分析。*TIMP4* 基因及蛋白的表达水平采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MMPs 家族在 LSCC 的基因表达谱

基因芯片显示 MMPs 家族在 LSCC 与癌旁正常细胞之间的差异表达基因有 14 种 (表 2), 其中 *MMP3*, *MMP11*, *MMP13*, *MMP15* 仅表达上调, *MMP23B*, *MMP25*, *MMP27*, *MMP28* 仅表达下调, *MMP9* 在 1 例患者中表达上调, 在 1 例患者中表达下调。*MMP19* 在 2 例患者中表达上调, 而在 1 例患者中表达下调。*MMP1*, *MMP10*, *MMP12* 在 3 例患者中表达上调, 在 1 例患者中表达下调。*MMP7* 在 3 例患者中表达下调, 在 1 例患者中表达上调。在 1 例 LSCC 患者中共同上调或下调的基因有 12 个, 在 2 例 LSCC 患者中共同上调或下调的基因有 3 个, 在 3 例 LSCC 患者中共同上调或下调的基因有 5 个, 未发现在 4 例患者中共同表达上调或下调的 MMPs。

1.3 统计学处理

基因芯片数据使用 Agilent 基因芯片分析套件 3.3 和倍数变化分析。半定量 RT-PCR 和 western blot 数据使用 SPSS 18 软件统计学分析。*TIMP4* 基因的表达水平在 LSCC 组织及癌旁正常组织两组间

表 2 MMPs 家族在 LSCC 的基因表达谱
Table 2 Gene expression profile of MMPs family in LSCC

基因同向差异表达的例数	Cy3/Cy5 比值 ^①	基因库登记号	基因名称	基因符号
1	5.148	NM_002422	Matrix metalloproteinase 3	<i>MMP3</i>
	8.845	NM_002423	Matrix metalloproteinase 7	<i>MMP7</i>
	5.532	NM_004994	Matrix metalloproteinase 9	<i>MMP9</i>
	42.879	X81334	Matrix metalloproteinase 13	<i>MMP13</i>
	2.512	D85510	Matrix metalloproteinase 15	<i>MMP15</i>
	0.021	NM_022791	Matrix metalloproteinase 1	<i>MMP1</i>
	0.091	NM_004994	Matrix metalloproteinase 9	<i>MMP9</i>
	0.070	NM_002425	Matrix metalloproteinase 10	<i>MMP10</i>

续表

基因同向差异表达的例数	Cy3/Cy5 比值 ^①	基因库登记号	基因名称	基因符号
2	0.212	NM_002426	Matrix metalloproteinase 12	<i>MMP12</i>
	0.045	NM_022791	Matrix metalloproteinase 19	<i>MMP19</i>
	0.108	NM_004142	Matrix metalloproteinase 25	<i>MMP25</i>
	0.151	NM_022122	Matrix metalloproteinase 27	<i>MMP27</i>
	3.342	NM_022791	Matrix metalloproteinase 19	<i>MMP19</i>
3	0.360	NM_006983	Matrix metalloproteinase 23B	<i>MMP23B</i>
	0.197	NM_032950	Matrix metalloproteinase 28	<i>MMP28</i>
	20.408	NM_022791	Matrix metalloproteinase 1	<i>MMP1</i>
	12.047	NM_002425	Matrix metalloproteinase 10	<i>MMP10</i>
	8.531	NM_005940	Matrix metalloproteinase 11	<i>MMP11</i>
	30.449	NM_002426	Matrix metalloproteinase 12	<i>MMP12</i>
	0.157	NM_002423	Matrix metalloproteinase 7	<i>MMP7</i>

注:①多例 Cy3/Cy5 比值为多例标本 Cy3/Cy5 的平均值。

2.2 TIMPs 家族在 LSCC 的基因表达谱

TIMPs 在 LSCC 的基因表达谱有 4 个(表 3), 均表达下调。在 1 例 LSCC 患者中下调的基因为 *TIMP1*。在 3 例 LSCC 患者中共同下调的基因为 *TIMP2*、*TIMP3*。在 4 例 LSCC 患者中共同下调的基因为 *TIMP4*。为验证基因芯片的结果,我们选择与 LSCC 相关性最高的 *TIMP4* 基因用 RT-PCR 和 western blot 在 24 例 LSCC 及癌旁正常组织中予以

检测,发现 *TIMP4* 基因在 LSCC 中低表达(图 1), 结果与基因芯片相同,*TIMP4* 基因在 LSCC 中表达量为 0.787 ± 0.937 , 在癌旁正常组织中表达量为 1.208 ± 1.197 , 两组之间差异有统计学意义 ($t = -2.132, P = 0.044$)。 *TIMP4* 蛋白在 LSCC 中表达量为 0.586 ± 0.415 , 在癌旁正常组织中表达量为 0.742 ± 0.407 , 两组之间差异有统计学意义 ($t = -2.461, P = 0.022$), 见图 2。

表 3 *TIMPs* 家族在 LSCC 的基因表达谱
Table 3 Gene expression profile of *TIMPs* family in LSCC

基因同向差异表达的例数	Cy3/Cy5 比值 ^①	基因库登记号	基因名称	基因符号
1	0.447	NM_003254	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	<i>TIMP1</i>
3	0.316	NM_003255	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	<i>TIMP2</i>
		NM_000362	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	<i>TIMP3</i>
4	0.200	NM_003256	Tissue inhibitor of metalloproteinase 4	<i>TIMP4</i>

注:①多例 Cy3/Cy5 比值为多例标本 Cy3/Cy5 的平均值。

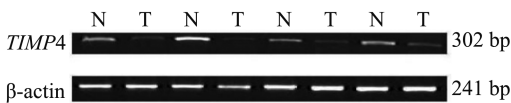


图 1 *TIMP4* 基因在 LSCC(T) 及对应癌旁正常组织(N) 中的表达

Figure 1 The expression of *TIMP4* in LSCC (T) and matched normal tissue (N)

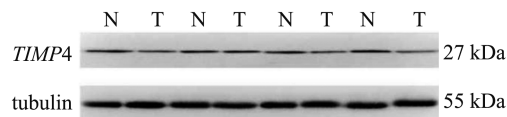


图 2 *TIMP4* 蛋白在 LSCC(T) 及对应癌旁正常组织(N) 中的表达

Figure 2 The expression of *TIMP4* protein in LSCC (T) and adjacent normal tissues(N)

2.3 *TIMP4* 蛋白与临床病理资料的相关性

我们研究 *TIMP4* 蛋白表达水平与临床病理资

料(年龄、肿瘤分型、分化、分期及淋巴结是否转移) 之间的相关性,发现 *TIMP4* 蛋白表达与患者的年龄、肿瘤分型、肿瘤分化及肿瘤分期之间无相关性 ($P > 0.05$), 与淋巴结是否转移有相关性 ($P < 0.05$) (表 4), 且 *TIMP4* 蛋白在有淋巴结转移组中的表达量小于无淋巴结转移组中的表达量,提示 *TIMP4* 能抑制 LSCC 的淋巴结转移。

表 4 *TIMP4* 蛋白表达水平与临床资料之间的相关性
Table 4 Association of *TIMP4* protein expression with patient clinical data

参数	例数	<i>TIMP4</i>	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄/岁			0.466	0.646
≤62	15	0.628 ± 0.425		
>62	9	0.548 ± 0.388		
肿瘤分型			3.156	0.063
声门上型 LSCC	14	0.442 ± 0.245		
声门型 LSCC	8	0.779 ± 0.448		
声门下型 LSCC	2	0.964 ± 0.841		

续表

参数	例数	TIMP4	t	P
肿瘤分化			1.909	0.173
高	7	0.791±0.497		
中	10	0.612±0.416		
低	7	0.385±0.154		
肿瘤分期			-0.932	0.361
I + II	3	0.394±0.212		
III + IV	21	0.627±0.420		
淋巴结转移			-2.624	0.017
是	9	0.386±0.159		
否	15	0.725±0.456		

3 讨论

肿瘤微环境是由实体肿瘤内部和周围的细胞以及 ECM 的生物化学和生物物理成分及其复杂的相互作用形成的,是肿瘤发生、发展和转移的关键因素^[9],是近年来的研究热点之一。ECM 不但提供了维持器官形态和完整性的组织支架,还提供了调节细胞行为的生物力学和生物化学线索^[10],在细胞增殖、分化、存活和运动中起着重要作用。在肿瘤发生等病理条件下,ECM 本该作为生物屏障抑制肿瘤细胞的增殖和转移,然而,在肿瘤进展过程中,ECM 被重塑并转化为促进侵袭的微环境,ECM 通过为肿瘤细胞提供持续的生长信号、有助于避免生长抑制并最终抵抗细胞死亡,在肿瘤增殖中起着至关重要的作用^[11]。肿瘤微环境在调节癌细胞的侵袭性、运动、传播和定植到远端器官中发挥着重要的作用^[12]。ECM 在正常组织生理和病理条件下都是动态的^[13],MMPs 与 TIMPs 共同构成了一个蛋白水解系统,其不仅参与 ECM 成分的分解和随后的组织重塑,而且在肿瘤微环境中起着重要的调节作用,对肿瘤的进展至关重要^[14]。这种复杂的平衡参与正常和病理事件,如伤口愈合、组织重塑、血管生成、侵袭、肿瘤发生和转移^[15]。

我们应用含人类全基因组的基因芯片来检测 LSCC 基因,获得全部 MMPs 家族及其组织抑制剂的基因表达谱,人类基质金属蛋白酶家族有 23 种 MMP,其中有 14 种 MMP 在 LSCC 中差异表达。MMPs 作为 ECM 结构和功能的主要调节因子,在癌症中高度表达,并已被证明支持肿瘤进展^[16]。MMPs 参与多种过程,如细胞基质的发育和重塑,细胞黏附、迁移、分化和增殖,组织修复,血管生成,胚胎发育^[17]。MMPs 能够通过降解 ECM 和通过与生长因子相互作用影响信号转导来模拟肿瘤微环境^[18]。MMPs 在肿瘤的侵袭、血管生成、转移前生

态位的形成和抗肿瘤免疫中发挥着重要作用^[19]。我们发现在 3 例患者中 MMP1, MMP10, MMP11, MMP12 表达上调,而 MMP7 表达下调。Zou^[20]通过对癌症基因组图谱数据库中的 mRNA 表达数据进行分析,发现在头颈部鳞状上皮细胞癌样本中与匹配的正常组织相比表达上调最多的 10 个基因中,有 6 个基因属于 MMPs,其中也包括 MMP1, MMP10, MMP11, MMP12。

TIMPs 能抑制 MMP 酶活性,提示 TIMPs 可能具有抗肿瘤活性。我们发现 TIMPs 全部在 LSCC 中差异表达,均为下调,且 TIMP4 在 4 例患者中全部表达下调,提示在 MMPs 家族及 TIMPs 家族的基因表达谱中, TIMP4 基因与 LSCC 的相关性最高。我们进一步研究该蛋白的表达与临床病理特征之间的关系,发现 TIMP4 蛋白与淋巴结转移相关,提示 TIMP4 在 LSCC 的淋巴结转移中起重要作用。与我们研究相似的是, Ma 等^[21]通过捕捉显微切割及基因芯片技术构建 LSCC 基因表达谱,发现 MMP1、MMP3、MMP12 和 MMP13 在 LSCC 组织中显著上调表达, TIMP4 在 LSCC 组织中显著下调表达。TIMP4 是 TIMPs 家族中最后发现的,也是研究最少的成员。TIMP4 是一种 195 个氨基酸长的非糖基化多肽,是目前发现的最大的 MMP 抑制剂。TIMP4 能抑制所有的 MMPs,对肿瘤的生长和转移有不同程度的影响^[22]。TIMP4 已被证实在体外血管生成模型中具有抗血管生成作用^[23]。TIMP4 在各种癌症中的表达各不相同: TIMP4 在卵巢癌、子宫内膜癌、甲状腺癌和结肠癌组织中表达增加^[24-26],而在膀胱癌、前列腺癌、头颈癌和脑星形细胞瘤中 TIMP4 的表达降低^[14,27]。TIMP4 在胰腺癌中的表达增加,但 TIMP4 表达从 T1 到 T4 趋于减少^[28]。Melendez-Zajgla 等^[14]认为 TIMP4 在各种癌症中的表达各不相同的原因是:①使用的方法可能影响一些结果,如由于存在不同的 TIMP4 蛋白池, mRNA 表达分析可能无法准确反映特定时间点的蛋白水平。②疾病或组织特异性差异可能是部分结果不同的原因,例如肾乳头状癌细胞中 TIMP4 升高,而肾透明细胞癌中 TIMP4 降低^[29]。③癌症进展过程中的时间表达变化也可以解释这种差异,如在前列腺癌、乳腺癌和胶质瘤的早期, TIMP4 的表达增加,而在晚期, TIMP4 的表达减少。与之相反的是, TIMP4 在晚期宫颈癌中上调表达^[30]。

综上,我们的研究提供了 MMPs 家族及 TIMPs 家族在 LSCC 的基因表达谱,并找出相关性最高的基因 TIMP4 进行进一步研究分析,发现 TIMP4 蛋

白与淋巴结转移相关,并且 TIMP4 蛋白在有淋巴结转移组中的表达量小于无淋巴结转移组中的表达量,提示 TIMP4 能抑制 LSCC 的淋巴结转移。我们的研究可能为寻找治疗 LSCC 的新靶点开辟了新的途径。然而,由于 LSCC 的样本量有限,以及 TIMP4 如何抑制 LSCC 淋巴结转移的具体机制还不清楚,因此有必要扩大样本量或进行进一步的前瞻性研究,以获得更可靠的数据支持。

参考文献:

- [1] Yin DH, Guo L, Li SS, et al. Clinical significance of neuropilin-2 expression in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Am J Otolaryngol*, 2020, 41(4): 102540. doi:10.1016/j.amjoto.2020.102540
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424. doi:10.3322/caac.21492
- [3] Rivière D, Mancini J, Santini L, et al. Lymph-node metastasis following total laryngectomy and total pharyngolaryngectomy for laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma: frequency, distribution and risk factors [J]. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*, 2018, 135(3): 163-166. doi:10.1016/j.anorl.2017.11.008
- [4] Steuer CE, El-Deiry M, Parks JR, et al. An update on larynx cancer[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 31-50. doi:10.3322/caac.21386
- [5] 黄恒丰, 马鲲鹏, 杨迪, 等. MiR-181b-5P 和 EPB41L3 蛋白在喉癌中的表达及临床意义[J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2023, 37(1): 41-46. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2021.502
 HUANG Hengfeng, MA Kunpeng, YANG Di, et al. Expression and clinical significance of miR-181b-5P and EPB41L3 protein in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University*, 2023, 37(1): 41-46. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2021.502
- [6] Wu YY, Zhang YL, Zheng XW, et al. Circular RNA circCORO1C promotes laryngeal squamous cell carcinoma progression by modulating the let-7c-5p/PBX3 axis [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 99. doi:10.1186/s12943-020-01215-4
- [7] Olivares-Urbano MA, Griñán-Lisón C, Zurita M, et al. Matrix metalloproteinases and TIMPs as prognostic biomarkers in breast cancer patients treated with radiotherapy: a pilot study[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(1): 139-148. doi:10.1111/jcmm.14671
- [8] 裴雪艳, 王琰. 侵袭性伪足和 MMP-14 在肿瘤发病机制中的研究进展[J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2020, 34(6): 129-134. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2019.604
 PEI Xueyan, WANG Yan. Progress in the research on the roles of invadopodia and metalloproteinase-14 in tumorigenesis and cancer development [J]. *Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University*, 2020, 34(6): 129-134. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2019.604
- [9] Sala M, Ros M, Saltel F. A complex and evolutive character: two face aspects of ECM in tumor progression [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1620. doi:10.3389/fonc.2020.01620
- [10] Yuzhalin AE, Lim SY, Kutikhin AG, et al. Dynamic matrisome: ECM remodeling factors licensing cancer progression and metastasis [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2018, 1870(2): 207-228. doi:10.1016/j.bbcan.2018.09.002
- [11] Kaczorowska A, Miękus N, Stefanowicz J, et al. Selected matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-7) and their inhibitor (TIMP-2) in adult and pediatric cancer [J]. *Diagnostics*, 2020, 10(8): 547. doi:10.3390/diagnostics10080547
- [12] Neophytou CM, Panagi M, Stylianopoulos T, et al. The role of tumor microenvironment in cancer metastasis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *Cancers*, 2021, 13(9): 2053. doi:10.3390/cancers13092053
- [13] Levi N, Papismadov N, Solomonov I, et al. The ECM path of senescence in aging: components and modifiers [J]. *FEBS J*, 2020, 287(13): 2636-2646. doi:10.1111/febs.15282
- [14] Melendez-Zajgla J, del Pozo L, Ceballos G, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4. The road less traveled [J]. *Mol Cancer*, 2008, 7: 85. doi:10.1186/1476-4598-7-85
- [15] Lambert E, Dassé E, Haye B, et al. TIMPs as multifacial proteins [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004, 49(3): 187-198. doi:10.1016/j.critrevonc.2003.09.008
- [16] Peeney D, Fan Y, Nguyen T, et al. Matrisome-associated gene expression patterns correlating with TIMP2 in cancer [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 20142. doi:10.1038/s41598-019-56632-3
- [17] Simonova OA, Kuznetsova EB, Tanas AS, et al. Abnormal hypermethylation of CpG dinucleotides in promoter regions of matrix metalloproteinases genes in breast cancer and its relation to epigenomic subtypes and HER2 overexpression [J]. *Biomedicine*, 2020, 8(5): 116. doi:10.3390/biomedicine8050116
- [18] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment [J].

- Cell, 2010, 141 (1) : 52-67. doi:10.1016/j.cell.2010.03.015
- [19] Quintero-Fabián S, Arreola R, Becerril-Villanueva E, et al. Role of matrix metalloproteinases in angiogenesis and cancer[J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 1370. doi:10.3389/fonc.2019.01370
- [20] Zou MY, Zhang C, Sun Y, et al. Comprehensive analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Acta Oncol*, 2022, 61 (4) : 505-515. doi:10.1080/0284186X.2021.2009564
- [21] Ma LJ, Li W, Zhang X, et al. Differential gene expression profiling of laryngeal squamous cell carcinoma by laser capture microdissection and complementary DNA microarrays[J]. *Arch Med Res*, 2009, 40 (2) : 114-123. doi:10.1016/j.arcmed.2008.12.005
- [22] Koskivirta I, Rahkonen O, Mäyränpää M, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases 4 (TIMP4) is involved in inflammatory processes of human cardiovascular pathology[J]. *Histochem Cell Biol*, 2006, 126 (3) : 335-342. doi:10.1007/s00418-006-0163-8
- [23] Pullen NA, Anand M, Cooper PS, et al. Matrix metalloproteinase-1 expression enhances tumorigenicity as well as tumor-related angiogenesis and is inversely associated with TIMP-4 expression in a model of glioblastoma[J]. *J Neurooncol*, 2012, 106 (3) : 461-471. doi:10.1007/s11060-011-0691-5
- [24] Ripley D, Tunuguntla R, Susi L, et al. Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitors of metalloproteinase-3 and-4 in normal ovary and ovarian carcinoma[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16 (5) : 1794-1800. doi:10.1111/j.1525-1438.2006.00714.x
- [25] Tunuguntla R, Ripley D, Sang QX, et al. Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-3 and-4 in benign endometrium and endometrial cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2003, 89 (3) : 453-459. doi:10.1016/s0090-8258(03)00077-5
- [26] Boufraqech M, Zhang LS, Nilubol N, et al. Lysyl oxidase (LOX) transcriptionally regulates SNAI2 expression and TIMP4 secretion in human cancers[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22 (17) : 4491-4504. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2461
- [27] Rorive S, Lopez XM, Maris C, et al. TIMP-4 and CD63; new prognostic biomarkers in human astrocytomas[J]. *Mod Pathol*, 2010, 23 (10) : 1418-1428. doi:10.1038/modpathol.2010.136
- [28] Bister V, Skoog T, Virolainen S, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases-21 and-26 and TIMP-4 in pancreatic adenocarcinoma[J]. *Mod Pathol*, 2007, 20 (11) : 1128-1140. doi:10.1038/modpathol.3800956
- [29] Hagemann T, Gunawan B, Schulz M, et al. mRNA expression of matrix metalloproteases and their inhibitors differs in subtypes of renal cell carcinomas[J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37 (15) : 1839-1846. doi:10.1016/s0959-8049(01)00215-5
- [30] Lizarraga F, Espinosa M, Maldonado V, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 is expressed in cervical cancer patients[J]. *Anticancer Res*, 2005, 25 (1B) : 623-627

(编辑:曾婕)