

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

※MATRIX METALLOPROTEINASES 在惡性血液疾病※

※內角色的研究 ※

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫
計畫編號：NSC89-2314-B-002-277-
執行期間：89年8月1日至90年7月31日

計畫主持人：林亮音
共同主持人：田蕙芬

- 本成果報告包括以下應繳交之附件：
- 赴國外出差或研習心得報告一份
 - 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
 - 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
 - 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：台大醫學院醫事技術學系

中華民國90年12月31日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC89-2314-B-002-277-

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：林亮音 執行機構及單位名稱：台大醫技系所

共同主持人：田蕙芬 執行機構及單位名稱：台大內科部

計畫參與人員：溫慧雯 執行機構及單位名稱：台大醫技所

一、中文摘要

Matrix Metalloproteinases (MMPs) 是一群與破壞結締組織有關的蛋白酵素，一般相信與癌症的浸潤和轉移有關。其中，MMP-8 能夠分解結締組織的主要構成物，type I collagen，而 MMP-9 則是能分解 gelatin。慢性骨髓性白血病 (CML) 已知為多功能造血幹細胞發生惡性株系病變，進而導致周邊血及骨髓內骨髓球細胞大量增生，形成一種病程為二相或三相的血液癌症。目前對於 MMPs 於 CML 中所扮演的角色並不十分清楚，因此本實驗希望能夠探討 MMP-8 與 MMP-9 於 CML 病人之意義。

為了評估以 MMP-8, MMP-9 區分 CML 和同樣有白血球大量增生之白血病樣反應 (LR) 的可行性，以及觀察 CML 於各病程中 MMP-8, MMP-9 的變化情形，我們以酵素免疫分析法測定病人及正常人之 MMP-8 與 MMP-9 在周邊血中濃度，及利用流式細胞儀定量其於嗜中性球細胞內的含量，並利用反轉錄聚合酶連鎖反應半定量單核球層 (MNC) 或顆粒球層 (PMN) 之白血球表現的 MMP-8 與 MMP-9 mRNA。結果發現 LR 病人所測得之 MMP 於血漿中濃度，以及細胞內的含量，與細胞表現之 MMP-8, MMP-9 mRNA 平行，且均較 CML 或正常人為高，並與白血球之絕對數目無關。

綜上所述，由本實驗之結果，初步提供了些許 MMP-8 與 MMP-9 表現於 CML 的相關資訊。

關鍵詞：MMP-8, MMP-9, CML, leukemoid reaction (LR)

Abstract

Matrix metalloproteinases (MMPs) are believed to be important in the destruction and remodeling of the connective tissue and play important roles in tumor invasion and metastasis. Among MMPs, MMP-8 is able to decompose the major constituent of connective tissues, type I collagen, and MMP-9 is able to decompose gelatin. Chronic myeloid leukemia (CML) is a

malignant clonal disorder of hematopoietic stem cells and demonstrates a biphasic or triphasic disease, which increases in myeloid cells not only in peripheral blood but also in the bone marrow. Since the role of MMPs in CML is not clear, this study is designated to find out the significance of MMP-8 and MMP-9 to CML patients.

In order to evaluate the possibility of differentiating CML from leukemoid reaction (LR), which also exhibits large proliferation of leukocytes, with MMP-8 and MMP-9, and to observe the change of MMP-8 and MMP-9 in the different stages of CML, we determined the concentrations of MMP-8 and MMP-9 in peripheral blood in CML patients and normal individuals by enzymatic immuno-analysis, and the MMP-8 and MMP-9 contents in neutrophils by flowcytometry. We also semi-quantified the mRNA in mononuclear cells (MNC) or granulocytes (PMN) by reverse-transcription polymerase chain reaction. We found that the plasma MMP-8 and MMP-9 concentrations and the MMP-8 and MMP-9 contents in neutrophils from the LR patients, which were not relevant to the absolute neutrophil counts, were parallel to the MMP-8 and MMP-9 mRNA expressed by PMN cells, and were higher than those in the CML patients or normal individuals.

These results provided a preliminary information concerning the behavioral patterns of MMP-8 and MMP-9 in CML.

Keywords: MMP-8, MMP-9, CML, leukemoid reaction (LR)

二、緣由與目的

白血球 (leukocyte) 是人體免疫系統的重要成員之一，主要負責保護人體免於細菌、黴菌、病毒、寄生蟲等外來物的侵害【1】。人體週邊血液中的白血球，由三種血球組成：淋巴球 (lymphocyte)，單核球 (monocyte) 和顆粒球 (granulocyte)。淋巴球主要的功能在

於抗原呈獻及抗體製造【2】；單核球則可吞噬外來的病原體，屬於吞噬細胞 (phagocyte)，進入組織後又稱為巨噬細胞 (macrophage)；顆粒球可再依其細胞型態，對細胞染劑的特性以及細胞質中含有的顆粒的不同，分為嗜中性球 (neutrophil)，嗜鹼性球 (basophil)，嗜酸性球 (eosinophil)。嗜中性球細胞質內含有三種顆粒【4】，分別是初級顆粒 (primary granule，又稱作 azurophilic granule 或是 nonspecific granule)，次級顆粒 (secondary granule，也稱為 specific granule) 以及新近發現的三級顆粒 (tertiary granule，也有人稱為 gelatinase granule)【5】。在嗜中性球之二級顆粒中所含的 collagenase，及三級顆粒內的 gelatinase，均屬於 matrix metalloproteinases (簡稱 MMPs) 的一員。MMPs 是一群能夠分解細胞外間質的蛋白分解酵素之總稱【6】。MMP-8 屬於 collagenase 的一員，又稱為 collagenase-2【7】。依照醱化的程度，是一個約 70 至 80 kDa 大小的醱蛋白，在細胞分化為骨髓球時開始合成，並儲存於嗜中性球二級顆粒之內。當細胞受到發炎反應物質的刺激，如 HOCL 以及 cathepsin G，而活化嗜中性球時，MMP-8 會自顆粒中釋放出來且被活化【8】。MMP-9 是大小約為 92 kDa 的醱蛋白，且主要能夠分解的物質為 type IV collagen 及 gelatin (為 type I collagen 的分解產物)，和另一種 MMP (MMP-2, gelatinase A) 相似，因此又被稱為 92-kDa gelatinase，或 gelatinase B【9】。MMP-9 能夠由滋養層細胞 (trophoblast)，蝕骨細胞 (osteoclast)，角質細胞，單核球，肺泡巨噬細胞，嗜中性球，和許多癌細胞所分泌【10】；亦有研究指出 T 淋巴球也能夠分泌少量 MMP-9【11】。在血液循環中，若是任何一種白血球的數目高於一般平均值的 2SD，即稱為白血球過多症【12】。白血球過多主要反應出二種來自於身體的異常：一是可能因為先天或後天的惡性疾病，造成骨髓製造過多的白血球；二是由於藥物、毒物或者身體對疾病的反應，而造成白血球數目上升【13】。在本論文中，將著重於探討二種都能引起周邊血內的白血球數目上升的疾病，分別為白血病樣反應 (leukemoid reaction, LR) 及慢性骨髓性白血病 (chronic myeloid leukemia, CML)。由於白血病樣反應 (LR) 在血液方面的臨床症狀和慢性骨髓性白血病 (CML) 相當類似，因此對於二者的鑑別診斷就相當重要。一般而言，若已知病人原本疾病的狀態例如感染，或是已確定為癌症並造成轉移，且周邊血中增加的白血球以成熟的嗜中性球為主，此時即易於診斷為

LR【14】。但若血中白血球的增生同時伴隨出現不成熟的白血球，則必須進一步地檢測其它項目。目前已知 CML 與 LR 不同的是嗜中性球內鹼性磷酸酶活性，在 LR 的病人會正常或升高，而 CML 的病人則是有下降的情形。細胞染色體檢查時，LR 病人不會出現異常，但有高達 90% 以上的 CML 病人會出現費城染色體。骨髓切片檢查方面，若有癌症轉移的病人可以看到轉移到骨髓中的癌細胞，CML 病人則是可見不成熟的骨髓系列細胞大量增生。在本實驗室先前的研究中發現，處於慢性期的 CML 病人，其骨髓血漿中 MMP-9 的含量，遠高於正常的骨髓捐贈者，以及 AML (acute myeloid leukemia) 病人【15】。另外，由於慢性骨髓性白血病與白血病樣反應，都會在周邊血內表現大量白血球增生，因此，本研究亦將探討慢性骨髓性白血病，白血病樣反應以及正常成人，三者之間在不同分子層次：transcriptional, translational, 以及 post-translational 對於 MMP-8, MMP-9 表現量是否有所不同，所得之結果，或可提供日後鑑別診斷慢性骨髓性白血病與白血病樣反應之用。

三、結果與討論

為了評估 MMP-8 及 MMP-9 作為區分 CML 及 LR 之標記的可行性，我們將新診斷為 CML 的病人，和 LR 病人及正常人自蛋白質及核糖核酸各方面來進行探討。首先，比較 CF，LR，以及正常人，此三者之間於週邊血的血漿內，MMP-8、MMP-9 的濃度。綜合看來，LR 的病人無論是 MMP-8, MMP-9 血漿內的含量均高於正常人及 CML，而 CML 病人又高於正常人在血中的濃度。其中只有一例 CML 病人 (病患 C) 其血漿濃度偏高，且近似於 LR 病人。測得之正常人 (共 10 例)，MMP-8 在血漿內的濃度小於 10 ng/mL，MMP-9 濃度亦小於 50 ng/mL。CML 的四例 (依序為病患 B、A、D、C) 分別是 MMP-8: 17、68、70、536 ng/mL，MMP-9: 258、332、431、2344 ng/mL。LR 病人 (共六例，病患 II 至 VII) 的表現分別為 MMP-8: 127 - 357 ng/mL，平均為 240 ng/mL；MMP-9: 492 - 1951 ng/mL，平均是 967 ng/mL。進一步探討 MMP 濃度與白血球內嗜中性球的絕對數目是否相關，我們分別將嗜中性球及帶狀細胞的絕對數目或骨髓球、後骨髓球及嗜中性球與帶狀細胞四種細胞的絕對數目與血漿內 MMP-8 及 MMP-9 的濃度做一比較，經計算的結果並無關聯。以 CML 病人來看，嗜中性球細胞數的多寡和血漿中的

MMP-8、MMP-9 濃度無關；而在嗜中性球數目最多的 CML 病人，其 MMP-8、MMP-9 濃度甚至較 LR 病人為低。加入了較不成熟的細胞（骨髓球、後骨髓球）來進行比較，亦同樣不具有相關性。而在 LR 病人的部分，血漿 MMP-8、MMP-9 的濃度，和嗜中性球的數目亦無相關。

由於血漿內的 MMP 濃度似乎不會因為嗜中性球細胞數目增加而增加，促使我們想進一步地了解，在三群人之中，於細胞內尚未釋放的 MMP 是否亦有所不同。於是具有 MMP-8 或 MMP-9 特異性抗體，針對細胞內的 MMP-8，MMP-9，以細胞免疫染色法 (ABC 法)，希望能夠觀察到細胞內 MMP 的含量變化情形。在我們將周邊血內之全部白血球製作為細胞抹片後，雖然正常人及 LR 病人可辨認出嗜中性球細胞及其它血球細胞，但對於 CML 病人的細胞抹片，卻不能夠清楚地分辨細胞型態。另外，細胞抹片經由化學免疫染色後，在顯微鏡下以肉眼觀察，LR 病人的血球細胞內之 MMP-8 與 MMP-9 含量均明顯高於正常人及 CML 病人，但 CML 病人一方面無法於細胞抹片上清楚分辨血球的型態，另一方面也無法直接以肉眼區分 CML 病人與正常人細胞內 MMP 呈色多寡之差異。不過，於顯微鏡下可以看到 MMP-8，MMP-9 均存在顆粒狀的胞器之中。

基於上述理由，我們進一步利用流式細胞儀來觀察細胞內 MMP-8 及 MMP-9 的含量。一來可以解決定量上的困難，二則能夠針對特定的細胞分析其 MMP 之含量。於是，我們以能特異表現於嗜中性球的細胞標記，CD 16b，作為以流式細胞儀分析檢體時的一個參數。

針對每個檢體，我們以固定數量（約 5×10^5 個）的白血球進行分析，先將細胞標記上 CD 16b（只有嗜中性球會染上螢光，本實驗使用的抗體螢光標識為 FITC），接著以細胞膜通透試劑組處理細胞，再以 mouse anti-human MMP-8, -9 抗體與細胞反應後，利用一個可抗 MMP-8, -9 抗體且標識有螢光 (rPE) 的抗體，來反應出細胞內 MMP-8 或 MMP-9 的含量。每個檢體所分析的嗜中性球數目均固定為一萬顆。

在收集之六例正常人，二例 CML 病人（病患 A、B）及五例 LR 病人（病患 I 至 V）均能明顯看到細胞內 MMP-8，MMP-9 的表現，見，且含量以 LR 病人最高，CML 病人次之，正常人最少。但正常人全部的嗜中性

球平均只有 21% 測得 MMP-8，26% 的嗜中性球測得 MMP-9；二例 CML 病人約有 87% 的嗜中性球測得 MMP-8，約有 95% 能測得 MMP-9；而 LR 病人在細胞內的含量最高，五例 LR 病人其嗜中性球幾乎百分之百都能測得 MMP-8 及 MMP-9。

因此在 CML 病人，LR 病人，還有正常人血漿內 MMP 濃度以 LR 病人最高，CML 次之，正常人最少。同時能表現 MMP 的嗜中性球數目及其中 MMP 含量，也都是 LR 病人含量高於 CML 病人，而 CML 病人又高於正常人。

接下來我們想探討 LR 與 CML 之嗜中性球內 MMP 含量的差異，是否緣自於 mRNA 含量的差異，於是將由全血分離得到的顆粒球層的部分，萃取出全部的 RNA，再取出相同量 ($1 \mu\text{g}$)，以具 MMP-8，MMP-9 特異性的引子 (primer)，進行反轉錄酶聚合酶連鎖反應之後，發現 MMP-8，MMP-9 在正常人，其 mRNA 量相地少，所收集到的 CF 病人（病患 C）其 mRNA 量亦相地少，幾乎觀察不到有表現；而以 LR 病人（病患 III 及 IV）表現的 mRNA 為最高。至於為何 CML fresh 病人其 mRNA 量相當少，近似於正常人，但卻能夠於細胞內及血漿中表現較正常人為高的 MMP-8 與 MMP-9 蛋白質，推測有二個可能，其一是可能由於進行 RT-PCR 反應的 cycle 數太少（本實驗所使用於進行 MMP-8 聚合酶連鎖反應者為 30 cycles，MMP-9 為 35 cycles）無法確實反應 mRNA 的含量；其二可能是此例病患較為特殊（病患 C 於接受治療前曾服食中藥），而呈現此一結果。欲解決此一難題，有待收集到其他 CML fresh 病人後進行分析，方能得到更進一步的結論。

由此推測，CML 病人，LR 病人，還有正常人其 mRNA 的表現與表現 MMP 的嗜中性球細胞數、細胞內 MMP 含量，以及分泌到血漿內的 MMP 濃度，似乎有平行的傾向。

由血漿內 MMP-8、MMP-9 濃度，及流式細胞儀分析嗜中性球細胞內 MMP-8、MMP-9 含量顯示：LR 病人含量都遠高於 CF 病人以及正常人，而 CF 病人又高於正常人。1999 年有報告指出【16】，若將發炎反應前會出現而引起發炎反應的細胞激素，如 TNF，IL-8，或是細菌所含有的內毒素 (LPS)，注射入正常人的體內，在很短的時間內 (20 分鐘)，就能引發血漿中 MMP-9 大量上升。而此研究認為，MMP-9 的上升是

由嗜中性球大量分泌所致。另有研究發現【3】，轉移的癌細胞會在對骨髓浸潤的過程中，使得嗜中性球大量上升，周邊血出現未成熟血球細胞，並合併有破壞骨髓障壁的情形出現。因此對於LR的病人，推測在嗜中性白血球內及血漿中大量增加的MMP-8、MMP-9，一方面可能是發炎反應時所產生的物質，如細胞激素，或外來引起發炎之毒性質物使得LR病人血漿內的MMP大量上升；另一方面則有可能因為轉移到骨髓的癌細胞所造成的，因而使得嗜中性球大增，而導致MMP-8及MMP-9量升高。

另外，在mRNA的表現，發現LR病人表現量較高，CF及正常人較少，和由流式細胞儀測定的細胞內MMP表現量及ELISA測得血漿中MMP的濃度，有平行的趨勢，以及由流式細胞儀所分析的嗜中性球中，能測得MMP-8、MMP-9的百分比數可知，在血漿內測得之MMP-8，MMP-9的濃度高低，與嗜中性球之絕對數目並無關連，反而可能與單顆嗜中性球細胞，其所能製造與釋放的MMP量有關。

綜上所述，本研究為MMP-8，MMP-9於CML與LR及正常人三者間的變化，提供些許資訊，也發現釋放於血漿內的MMP-8與MMP-9的濃度，並不是取決於週邊血內白血球總數，或是嗜中性球的絕對數目。

四、計畫成果自評

如當初研究計畫所期待的，結果顯示MMP-8，MMP-9於CML與LR及正常人三者間的變化，提供了些許MMP-8與MMP-9表現於CML與LR的相關資訊。

五、參考文獻

1. Wendy S., Ronald H., et al. White blood cells 1: nonmalignant disorders. *The Lancet*. 2000; 355:1351
2. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993; 81:2844
3. Malech H.L., Gallin J.L., et al. Current concepts: neutrophils in human diseases. *N Eng. J. Med*. 1987; 317:687
4. Niels B., Jack B.C. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 1997; 89(10): 3503
5. Niels B., Maxwell S., et al. Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation. *Blood*. 1995; 85(3): 812
6. Hideaki N. Matrix metalloproteinases. *The J. Bio. Chem*. 1999; 274(31): 21491
7. Maymon E., Romero R., et al. Human neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase 8) in parturition, premature rupture of the membrane, and intrauterine infection. *American J. of obstetrics and gynecology*. 2000; 183(1): 94
8. Karen A.H., Tayebbeh F.P., et al. Human neutrophil collagenase. *J. of biological chemistry*. 1990; 265(20): 11421
9. Inder S., Timothy C., et al. Novel regulation of type IV collagenase (MMP-9 and -2) activities by transforming growth factor- α 1 in human prostate cancer cell line. *Mol. Bio. Cell*. 1999; 10:407
10. Akane T., Katsuhiko A., et al. Matrix metalloproteinase-9 production, a newly identified function of mast cell progenitors. *Blood*. 1999; 94:2390
11. Jordi E., Carme V., et al. Fibronectin upregulates gelatinase B and induced coordinated expression of gelatinase A by human T lymphocyte cell lines. *Blood*. 1999; 94:2754
12. Brennan J.K., et al. Chemical mediators of granulopoiesis: A review. *Exp. Hematol*. 1980; 8:441
13. Richard L., Thomas C. B., et al. Wintrobe's clinical hematology. Vol 2, ninth edition, Philadelphia, London. 1993
14. Denise M. H. Clinical hematology and fundamentals of hemostasis. 3rd. Chap 16,20. 1997.
15. MMP 蛋白酶在白血病中之意義的研究。台大醫技所碩士論文，民國八十九年，李承擘 撰。
16. Jerome P., Marie-Claude W., et al. Human neutrophils secrete gelatinase B in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 1999; 20:458