

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

※Matrix metalloproteinases 在惡性血液疾病角色的研究(II)※

※Study on the biological role of matrix metalloproteinases in※

※hematological malignancy (II) ※

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

計畫類別：■個別型計畫    □整合型計畫

計畫編號：NSC90-2320-B-002-114-

執行期間：90年8月1日至91年7月31日

計畫主持人：林亮音 副教授

共同主持人：田蕙芬教授

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：國立台灣大學 醫事技術學系

中華民國 91 年 12 月 5 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：NSC 90-2320-B-002-114

執行期限：90年8月1日至91年7月31日

主持人：林亮音 副教授

執行機構及單位名稱：國立台灣大學醫事技術學系

共同主持人：田蕙芬教授

計畫參與人員：廖書嫻

## 一、中文摘要

Matrix metalloproteinases (MMPs) 是一群能分解細胞外間質的蛋白分解酵素，在體內不論是正常生理或病態的情況下，都扮演著不可或缺的角色。人類血液細胞中，嗜中性球的二級及三級顆粒中，分別含有 MMP-8 及 MMP-9，能分解第一型的 collagen 及 gelatin。慢性骨髓性白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) 已知為多功能造血幹細胞的病變，主要由於細胞第 9 及第 22 對染色體發生易位形成費城染色體，轉錄及轉譯後產生 BCR/ABL 融合蛋白，此蛋白質具有異常酪胺酸激酶 (tyrosine kinase) 活性，會影響細胞中訊息傳遞。目前除了傳統骨髓移植，化學療法治療方式外；也發展出抑制異常酪胺酸激酶活性的藥物 (STI571)，藉以恢復正常細胞訊息傳遞功能達到治療緩解的效果。

為了評估 CML 病人於治療後 MMP-8 及 MMP-9 的變化情形，我們以測定週邊血漿中 MMP-9 的表現量，利用免疫細胞化學染色及流式細胞儀觀察細胞中 MMP-8 及 MMP-9 表現的變化，並用反轉錄酶連鎖反應半定量顆粒球層之白血球表現的 MMP-8 及 MMP-9 mRNA。結果發現，CML 病人投予 STI571 後，血漿或嗜中性球中 MMP-8 及 MMP-9 的表現，會隨著白血球數減少及不成熟白血球的消失而下降，然而，蛋白質的表現量與 mRNA 的表現量並無相關性。而不論病人是服用 STI571 或使用傳統的治療方式，其白血球數及白血球分類會接近正常人，且 MMP-8 及 MMP-9 的表現量有下降的趨勢。

綜合以上結果我們認為，以 STI571 或傳統治療方式使 CML 病人達到緩解時，嗜

中性球內 MMP-8 及 MMP-9 的表現量是類似的，同時 MMP-8 及 MMP-9 可以追蹤 CML 病人的病情。

**關鍵詞：**MMP-8, MMP-9, CML, STI-571

## Abstract

Matrix metalloproteinases (MMPs) is a proteinase family that degrade extracellular matrix. MMPs are essential under both normal and disease stages. The secondary and tertiary granules of neutrophils contain MMP-8 and MMP-9, respectively. The MMP-8 and MMP-9 could degrade type-I collagen and gelatin, respectively. Chronic myeloid leukemia (CML) is known as multi-functional mutation of stem cells. The mutation is mainly arisen from the translocation between chromosome 9 and 22. The consequent gene product is BCR/ABL fusion protein. This fusion protein has abnormal tyrosine kinase activity, which affects cellular signal transduction. The traditional treatments to CML are bone marrow transplantation and chemotherapy. STI571, which could inhibit abnormal tyrosine kinase activity and restore the cellular signal transduction, was recently developed to treat CML as molecular therapy. In order to evaluate the alteration of MMP-8 and MMP-9 expression of CML patients before and after STI571 treatment, several experiments were carried out. The MMP-9 expression level in peripheral plasma was analyzed by gelatin zymography, the contents of MMP-8 and MMP-9 in neutrophils were assessed by immunocytochemical staining and flow-cytometry, and the MMP-8 and

MMP-9 mRNA in neutrophil were measured by semi-quantitative RT-PCR. We found that the MMP-8 and MMP-9 levels in patient plasma or neutrophils after STI571 administration were decreased, which were parallel to the decrease of white blood cells and the disappearance of immature white blood cells. In addition, the MMP-8 and MMP-9 levels made no difference between traditional therapy and STI571 therapy.

Therefore, our results demonstrated that both STI571 and traditional therapy resulted in the decreases of MMP-8 and MMP-9 levels in neutrophils, and that MMP-8 and MMP-9 could monitor disease status after appropriate therapy of CML.

**Keywords:** MMP-8, MMP-9, CML, STI-571

## 二、緣由與目的

慢性骨髓性白血病 (chronic myeloid leukemia, 簡稱 CML), 是一種骨髓系幹細胞 (myeloid stem cell) 異常增生 (proliferation) 的疾病, 主要是由於多功能造血幹細胞 (pluripotent hematopoietic stem cell) 惡性株系擴張 (malignant clonal expansion) 所造成的, 使病人無論在週邊血 (peripheral blood, PB) 或骨髓 (bone marrow, BM) 中, 都有骨髓系血球過度增生的情形出現【1】。1960年 Nowell 和 Hungerford 發現, 超過 90% 的 CML 病人體內有費城染色體 (Philadelphia chromosome, Ph) 的存在【2】, 1986年 確認出 BCR-ABL 融合基因的特性【3】。

CML 是一種多階段性的疾病。週邊血液相出現白血球增高 (通常大於 25000/ $\mu$ l) 的現象。30-50% CML 的病人體內可見血小板數目增加; 另一方面, 能觀察到血紅素正常或偏低。在週邊血液抹片中, 可見各種時期, 成熟及不成熟的顆粒球, 但仍以成熟的細胞為多。白血球鹼性磷酸酶 (leukocyte alkaline phosphatase, LAP), 的活性大幅下降。細胞染色體檢查可觀察費城染色體的存在; 骨髓檢查 (bone marrow aspiration) 可以觀察到細胞過多、脂肪含量下降、骨髓系細胞和紅血球系細胞比例上升 (M/E ratio increase)。

關於 CML 的治療方面, 1980 年以前大多採用支持性療法, 之後則有骨髓移植

(bone marrow transplantation, BMT) 的發展, 目前則有新興的酪胺酸激酶抑制劑 (tyrosine kinase inhibitor) 能完全治癒 CML【4】。

MMP-8 (human neutrophil collagenase) 是在 1968 年被發現, 是一個高度醣化 (glycosylation) 的蛋白質, 大小約 60 kDa。在血液細胞中, MMP-8 只存在於嗜中性球的二級顆粒中。MMP-8 是一個中性的蛋白分解酵素, 能初步分解天然纖維狀 (native fibrillar) 的第 I、II、III 型 collagen, 其中, 第 I 型 collagen 是結締組織內最主要的結構。在正常狀態下, 嗜中性球會分泌少量的 MMP-8; 但當嗜中性球受到發炎反應物質的刺激而活化時, MMP-8 則會大量表現, 自顆粒中釋放出來且被活化。

MMP-9 (gelatinase B) 是一個大小約 92 kDa 的醣蛋白, 主要能分解第 IV 型的 collagen 以及 gelatin。人體中, 角質細胞、單核球細胞、泡狀巨嗜細胞、多形核白血球及一些惡性細胞都會表現 MMP-9。

在嗜中性球中, MMP-9 以 pro-enzyme 的型式被合成且儲存於第三級顆粒中, 此時, pro-MMP-9 會與一個 25 kDa 的蛋白質形成複合物。當細胞受到刺激, 將複合物分泌至細胞外時, 此複合物會被血漿中的組織蛋白酶 G、胰蛋白酶、stromelysin-1 及 72 kDa gelatinase (MMP-2) 活化成活化態的 MMP-9【5】。在組織中, MMP-9 的活性會受到 TIMP 的調控, 其中以 TIMP-2 的抑制效果及特異性最佳。

本實驗室先前的研究中發現, CML 病人在經過傳統的治療之後, 隨著病情的好轉, 也就是當病程轉變為血液相緩解或完全緩解時, 嗜中性球中 MMP-8 及 MMP-9 的表現量會有下降的趨勢。

在本篇研究中, 兩個對於傳統治療反應不良的 CML 病人 (病人 A 與病人 B), 在服用 STI571 前及服用後, 收集病人的週邊血液, 除了進行血球分類, 以確認他們對 STI571 的反應良好之外, 也分析血漿及嗜中性球中 MMP-8 及 MMP-9 表現的情形, 並持續追蹤。希望能藉此了解 STI571 除了能導正細胞的分化及凋亡外, 是否也會影響嗜中性球中 MMP-8 及 MMP-9 的表現。

另外有三個以傳統方式治療的 CML 病人 (病人 C、病人 D 及病人 E) 檢體，取其週邊血漿，分析其中 MMP-9 的表現量，並與服用 STI571 病人血漿中 MMP-9 的表現量做比較。以探討服用 STI571 與使用傳統治療方式，對病人體內 MMP-9 的影響。

最後，再收集白血病樣反應病人、慢性骨髓性白血病病人及正常人的週邊血檢體，分析嗜中性球及血漿中 MMP-8、MMP-9 的表現量，以統計的方式，觀察其表現量是否有具有差異性。希望能提供日後鑑別診斷白血病樣反應及慢性骨髓性白血病之用。

### 三、結果與討論

在所收集到的兩個服用 STI571 病例中，先觀察病人 A。由血球計數及白血球分類的結果發現，在服藥後，病人週邊血中的白血球數有下降的趨勢，且不成熟的血球逐漸消失，血球分類趨於正常。週邊血的血漿中 MMP-9 的表現量也下降。再觀察病人 B，在服藥後，與病人 A 同樣可以從血液檢查的結果中，觀察到病人 B 有白血球及成熟嗜中性球數下降的現象，且不成熟白血球消失，血漿中 MMP-9 的表現量雖然有下降。

由於血漿中的 MMP-9 並非完全由嗜中性球所分泌，在血液細胞中除了嗜中性球外，T-淋巴球及單核球都會分泌。所以不能直接反應嗜中性球所表現的 MMP-9。因此，將所收集到病人的週邊血進行血球分離，取其中 PMN 層的血球，做免疫細胞化學染色，以觀察細胞內 MMP-8 及 MMP-9 的表現情形。發現當病人 A 連續服用 STI571 當中，其 PMN 細胞中 MMP-8 及 MMP-9 的表現量並沒有太大的差異。而病人 B 也可以觀察到相同的現象。

因此，更進一步以流式細胞儀分析單顆嗜中性球中 MMP-8 及 MMP-9 的表現量。其中，病人 A 在服用 STI571 後，其嗜中性球中 MMP-8 及 MMP-9 的表現量下降，此結果與血漿中的結果相符合。至於病人 B 嗜中性球中 MMP-8 及 MMP-9 的表現量則沒有明顯隨著血液相緩解而降低的

現象。

接著我們進一步評估 PMN 細胞 MMP-8 與 MMP-9 的 mRNA，與其蛋白質表現量的相關性。結果發現，不論是病人 A 或是病人 B，PMN 中 MMP-8 與 MMP-9 的 mRNA 表現量，與其蛋白質的表現量並沒有相關性。

另外，我們評估了三例以傳統方法治療的病人 (病人 C、病人 D、病人 E)。採集其週邊血漿分析 MMP-9 蛋白質的表現量，並與病人血液檢查的結果相對照。由病人血球計數及白血球分類的結果發現，整體而言在治療後，傳統療法的病人與使用 STI571 治療的病人類似，都能達到血液相的緩解的目的，同時，病人血漿中的 MMP-9 表現量會有減少的現象。

### 四、計畫成果自評

如當初研究計畫所期待的，結果顯示以 STI571 或傳統治療方式使 CML 病人達到緩解時，嗜中性球內 MMP-8 及 MMP-9 的表現量是類似的，同時 MMP-8 及 MMP-9 可以追蹤 CML 病人的病情。提供了些許 MMP-8 與 MMP-9 表現於 CML 的相關資訊。

### 五、參考文獻

1. Janusz HSK, Owen NW. Consequences of BCR-ABL expression within the hematopoietic stem cell in chronic myeloid leukemia. *Stem Cells*. 2000; 18: 399
2. Spiers AS. The clinical features of chronic granulocytic leukemia. *Clin Hematol*. 1997; 6: 77
3. Stefan F, Moshe T. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. *Annals of Inter. Med*. 1999; 131: 207
4. John MG, Brian JD. Chronic myeloid leukemia: current treatment options. *Blood*. 2001; 98: 2039
5. Okada Y, Gonoji Y, Hayakawa T. Matrix metalloproteinase 9 from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *J. Biol. Chem*. 1992; 267: 21712