

# 犬血清中 MMP2 和 MMP9 与肿瘤疾病的相关性研究

江鲜雨 裴世敏\*

(海南大学 动物科技学院 海口 570228)

中图分类号: S853

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2023)12-0137-08

**摘要:** 为了在兽医临床上找到用于犬肿瘤疾病的血清生物标志物,试验采集 113 份犬血清样本,分别采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法和明胶酶谱分析方法检测血清样本中 MMP2 与 MMP9 蛋白的质量浓度和活性,并对犬血清中 MMP2 和 MMP9 蛋白的质量浓度与活性进行了相关性分析。结果表明:肿瘤犬血清中 MMP2 和 MMP9 蛋白的质量浓度(中位数分别为 126.76  $\mu\text{g/mL}$  和 230.31  $\mu\text{g/mL}$ )均显著高于非肿瘤犬血清中 MMP2 和 MMP9 的蛋白质量浓度(中位数分别为 58.90  $\mu\text{g/mL}$  和 55.14  $\mu\text{g/mL}$ ,  $P < 0.05$ ); $\geq 7$  岁的非肿瘤犬血清中 MMP2 蛋白质量浓度极显著高于 $< 7$  岁的非肿瘤犬( $P < 0.01$ ),MMP9 蛋白质量浓度略高于 $< 7$  岁的非肿瘤犬( $P > 0.05$ ); $\geq 7$  岁的肿瘤犬血清中 MMP2 和 MMP9 蛋白质量浓度均略高于 $< 7$  岁的肿瘤犬( $P > 0.05$ ); $< 7$  岁和 $\geq 7$  岁的肿瘤犬血清中 MMP2 蛋白质量浓度均显著高于同年龄段的非肿瘤犬( $P < 0.05$ );不同肿瘤类型的肿瘤犬血清中 MMP2 蛋白质量浓度差异不显著( $P > 0.05$ );乳腺肿瘤、肉瘤和其他肿瘤中 MMP9 蛋白质量浓度极显著高于肥大细胞瘤( $P < 0.01$ ),显著高于淋巴瘤( $P < 0.05$ );肿瘤犬血清中 MMP2 和 MMP9 蛋白的活性均略高于非肿瘤犬( $P > 0.05$ );在非肿瘤犬血清样本中, MMP2 和 MMP9 蛋白的质量浓度与活性均无相关性;在肿瘤犬血清样本中, MMP2 和 MMP9 蛋白的质量浓度与活性均呈弱相关性。说明肿瘤犬血清中 MMP2 和 MMP9 蛋白的质量浓度和活性均在一定程度上高于非肿瘤犬,具有作为肿瘤早期诊断和预后标志物的潜能。

**关键词:** 肿瘤;标志物;血清;基质金属蛋白酶 2;基质金属蛋白酶 9

开放科学(资源服务)标识码  
Open Science Identity (OSID)



肿瘤疾病严重危害犬类健康,临床常见的犬类肿瘤疾病包括恶性乳腺肿瘤、肥大细胞瘤、淋巴瘤等<sup>[1-2]</sup>,具有高转移率与高死亡率<sup>[3-4]</sup>。恶性肿瘤的重要生物学特征表现为侵袭性生长和易远端转移<sup>[5]</sup>。肿瘤转移的起始步骤则是破坏细胞外基质(extracellular matrix, ECM)并侵袭进入基底膜<sup>[6]</sup>。

ECM 不仅能调节细胞的生长、分化、迁移过程,维持内环境稳定<sup>[7]</sup>,还与多种疾病中的病理过程有关<sup>[8]</sup>。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,

MMPs)家族的蛋白质参与正常生理过程中 ECM 的分解<sup>[9]</sup>,这些生理过程包括胚胎发育、生殖和组织重塑;MMPs 也在肿瘤的转移、炎症反应和病理性血管生成的过程中发挥作用<sup>[10-15]</sup>。基质金属蛋白酶 2(MMP2)和基质金属蛋白酶 9(MMP9)均属于蛋白水解酶,也是 IV 型胶原酶,二者与肿瘤的发生和发展密切相关<sup>[16]</sup>,可通过降解 ECM 促进肿瘤的侵袭与转移,同时对肿瘤细胞生长和分化、肿瘤血管生成及免疫监视等过程也起到重要作用<sup>[17-18]</sup>。

目前,在兽医临床上,病理组织学检查依旧是肿瘤疾病诊断和预后评估的主要方法,但是病理组织学检查需要使用免疫组化和组织活检等方法,通常需要一段时间后才能得到检查结果,有一定的滞后性,且需要对动物进行侵入性的组织切除操作。因此找到血清中与肿瘤相关的生物标志物,可实现非侵入性的肿瘤诊断和预后评估,从而减少对动物的创伤并降低风险。有研究表明, MMP2 和 MMP9 在犬的多种

收稿日期: 2022-12-19; 修回日期: 2023-04-04

基金项目: 新瑞鹏宠物医疗集团有限公司、深圳市瑞鹏公益基金会高校青年教师(小动物临床)科研基金项目(RPJ2020015)

作者简介: 江鲜雨(1998—),女,硕士研究生,研究方向为小动物肿瘤学,610393766@qq.com。

\* 通信作者: 裴世敏(1987—),女,讲师,博士,硕士生导师,研究方向为小动物肿瘤学,peishimin@hainanu.edu.cn。



肿瘤组织内表达上调<sup>[19]</sup>,且二者为分泌性蛋白酶,在激活状态下发挥功能,或可成为肿瘤早期诊断和预后的血清标志物<sup>[20-22]</sup>。然而,现阶段对犬肿瘤病例血清 MMP2 和 MMP9 表达情况的研究较少。本研究通过比较非肿瘤犬与肿瘤犬血清 MMP2 和 MMP9 蛋白质量浓度和蛋白活性的差异,评估 MMP2 和 MMP9 作为非侵入性诊断和预后标志物的潜在价值,以期为犬肿瘤的早期诊断和预后评估提供简单且非侵入性的手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

明胶,购自上海百研生物科技有限公司;犬基质金属蛋白酶 2 ELISA 试剂盒、犬基质金属蛋白酶 9 ELISA 试剂盒,均购自上海酶联生物科技有限公司;CaCl<sub>2</sub>,购自西陇科学股份有限公司;ZnCl<sub>2</sub>,购自天津市恒兴化学试剂制造有限公司;Tris-HCl,购自福州飞净生物科技有限公司;Brij-35,购自上海麦克林生化科技有限公司;Triton X-100、考马斯亮蓝,均购自北京博奥拓达科技有限公司。

### 1.2 主要仪器

全自动多色荧光及化学发光凝胶成像系统(型号为 ChampChemi 500 Plus),购自森西赛智科技有限

公司;酶标仪(型号为 iMark™ Microplate Reader),购自伯乐生命医学产品有限公司;电泳仪(型号为 DYY-6C),购自北京六一生物科技有限公司;恒温孵育箱(型号为 CO<sub>2</sub>-80A),购自上海丙林电子科技有限公司;冷冻离心机(型号为 Centrifuge 5418 R),购自赫洛莱博仪器科技有限公司。

### 1.3 样本的采集

于 2020 年 9 月份—2021 年 12 月份,采集前来新瑞鹏宠物医院北京分院和海南分院就诊的犬血清样本共 113 份,将其分为非肿瘤犬血清和肿瘤犬血清两大类。非肿瘤犬纳入标准为在医院诊断中没有发现肿瘤疾病,同时临床检查及血常规和肝肾生化指标在正常范围内,且无严重基础疾病,多数为来打疫苗或进行绝育等非肿瘤疾病相关手术的犬,总计 52 例;肿瘤犬纳入标准为通过医院诊断为患有肿瘤疾病或病例本身已经患有肿瘤疾病前来医院进行治疗且无其他严重基础疾病的犬,其中乳腺肿瘤 8 例,肥大细胞瘤 4 例,肉瘤 4 例,淋巴瘤 3 例,其他肿瘤 42 例,总计 61 例。非肿瘤犬的年龄分布在 0~11 岁之间,肿瘤犬的年龄分布在 3~15 岁之间。血清样本采集方法为病例采血后离心取血清,于-80℃保存。血清样本基本信息见表 1。

表 1 血清样本基本信息  
Table 1 Basic information of serum samples

样本类型	年龄范围/岁	≥7 岁犬血清样本数/份	<7 岁犬血清样本数/份	血清样本总数/份
非肿瘤犬	0~11	11	41	52
肿瘤犬	3~15	47	14	61

### 1.4 血清 MMP2 和 MMP9 蛋白质量浓度的检测

使用犬基质金属蛋白酶 2/9 ELISA 试剂盒测定血清样本中 MMP2 和 MMP9 的蛋白质量浓度:首先在 96 孔板中分别加入 5 倍稀释的血清和标准样品 50 μL,置于 37℃恒温箱内孵育 30 min 后用洗涤液洗板 5 次,每次 1 min;然后加入酶标试剂 50 μL,继续置于 37℃恒温箱内孵育 30 min 后用洗涤液洗板 5 次,每次 1 min;加入显色剂 A 和显色剂 B 各 50 μL,37℃避光条件下显色 10 min,最后加入终止液 50 μL 终止反应。在酶标仪上读取 450 nm 波长下的 OD 值,根据绘制的标准曲线计算出所测蛋白的质量浓度。

### 1.5 血清 MMP2 和 MMP9 蛋白活性的检测

采用明胶酶谱分析方法检测血清样本中 MMP2 和 MMP9 的蛋白活性,具体步骤:将血清与 4×Loading Buffer 以 3:1 混合后在含有 0.1%明胶的 8%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳;将凝胶放入复性缓冲液(含有 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、1 μmol/L ZnCl<sub>2</sub>、2.5% Triton X-100、50 mmol/L Tris-

HCl) 中复性 4 次,每次 15 min;在漂洗液(含有 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、1 μmol/L ZnCl<sub>2</sub>、50 mmol/L Tris-HCl) 中漂洗 2 次,每次 20 min;在孵育液(含有 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、1 μmol/L ZnCl<sub>2</sub>、0.02% Brij-35、50 mmol/L Tris-HCl) 中孵育 20 h;用 0.05%考马斯亮蓝染色缓冲液染色 3 h 后再用含有 30%甲醇和 10%乙酸的脱色液 A 脱色 30 min,然后用含有 20%甲醇和 10%乙酸的脱色液 B 脱色 1 h,最后用含有 10%甲醇和 5%乙酸的脱色液 C 脱色 2 h;采用 ImageJ 软件对条带强度进行量化分析。

### 1.6 数据的统计分析

采用 Primer GraphPad 5 软件进行 *t* 检验和单因素方差分析,分析不同类型血清样本中 MMP2/MMP9 蛋白质量浓度和蛋白活性的差异显著性,*P*>0.05 表示差异不显著,*P*<0.05 表示差异显著,*P*<0.01 表示差异极显著;采用 SPSS 18.0 软件进行 Pearson 相关系数双侧检验,分析非肿瘤犬和肿瘤犬血清 MMP2/MMP9 蛋白质量浓度和蛋白活性的相关性。

## 2 结果与分析

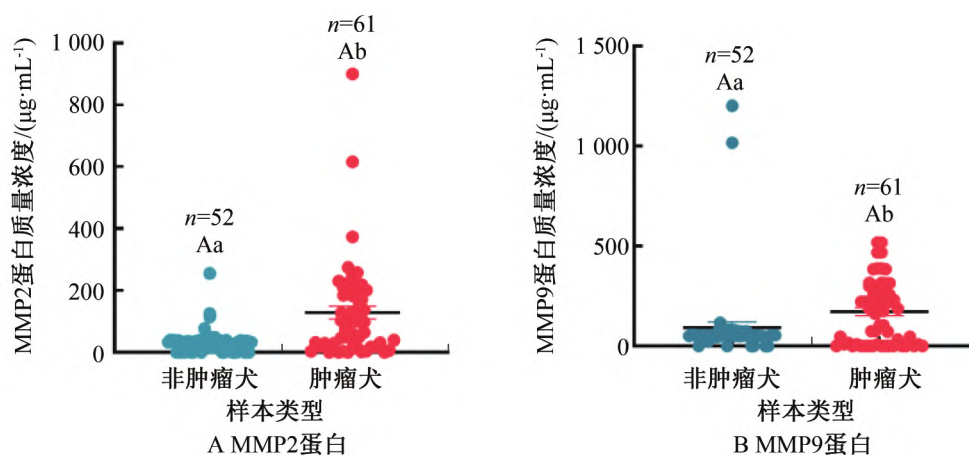
### 2.1 犬血清 MMP2 和 MMP9 蛋白质量浓度的检测

结果显示: 非肿瘤犬血清 MMP2 和 MMP9 蛋白质量浓度范围分别为 3.41 ~ 147.86  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 39.26 ~ 82.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 中位数分别为 58.90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 55.14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。肿瘤犬血清 MMP2 和 MMP9 蛋白质量浓度范围分别为 17.25 ~ 543.84  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 15.67 ~ 518.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 中位数分别为 126.76  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 230.31  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 见表 2。肿瘤犬血清 MMP2 和 MMP9 蛋白质量浓度均显著高于非肿瘤犬(见图 1)。 $\geq 7$  岁的非肿瘤犬血清 MMP2 蛋白质量浓度显著高于  $< 7$  岁的非肿瘤犬( $P < 0.01$ , 见图 2A),

MMP9 蛋白质量浓度略高于  $< 7$  岁的非肿瘤犬( $P > 0.05$ , 见图 2B),  $\geq 7$  岁的肿瘤犬血清 MMP2 和 MMP9 蛋白质量浓度均略高于  $< 7$  岁的肿瘤犬( $P > 0.05$ , 见图 3A 和图 3B)。

表 2 犬血清 MMP2 和 MMP9 蛋白质量浓度的统计结果  
Table 2 Statistical results of mass concentrations of MMP2 and MMP9 protein in canine serum  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

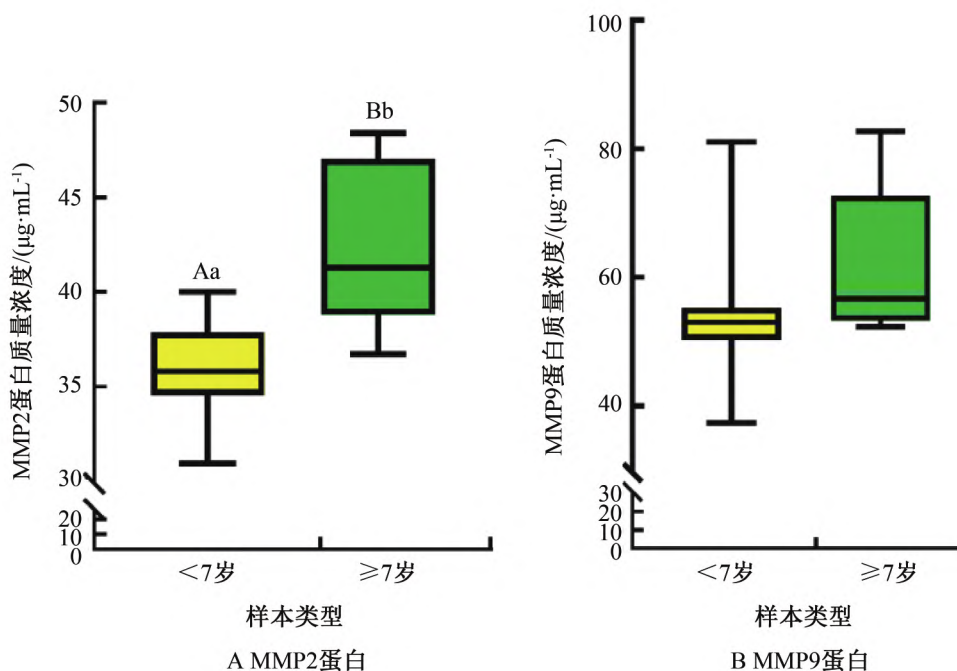
蛋白	非肿瘤犬		肿瘤犬	
	范围	中位数	范围	中位数
MMP2	3.41 ~ 147.86	58.90	17.25 ~ 543.84	126.76
MMP9	39.26 ~ 82.33	55.14	15.67 ~ 518.50	230.31



注: 大写字母相同、小写字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。

图 1 犬血清 MMP2 和 MMP9 蛋白质量浓度的样本分布

Fig. 1 Sample distribution of MMP2 and MMP9 protein mass concentrations in canine serum

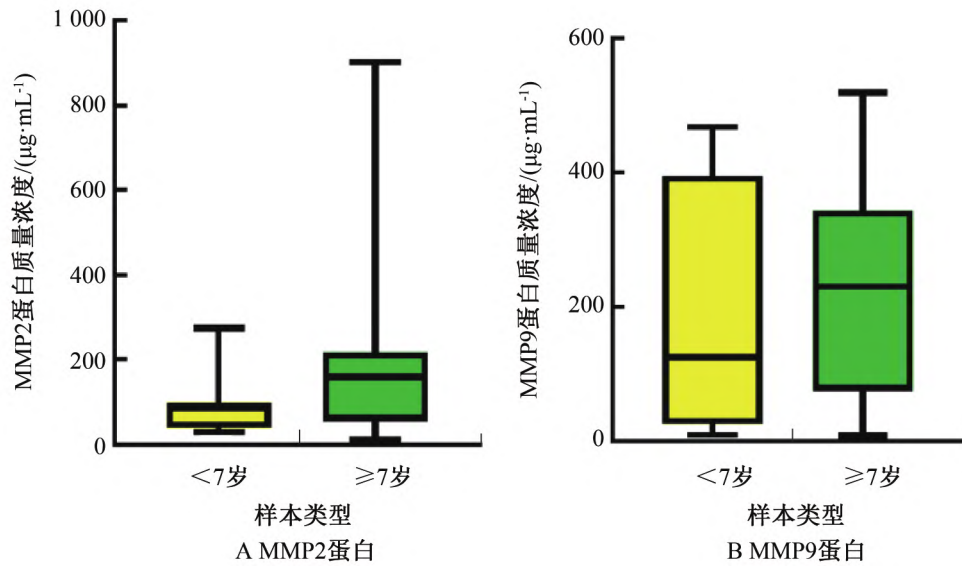


注: 大小写字母完全不同表示差异极显著( $P < 0.01$ ), 无柱标表示差异不显著( $P > 0.05$ )。

图 2  $< 7$  岁和  $\geq 7$  岁的非肿瘤犬血清 MMP2 和 MMP9 蛋白质量浓度的比较结果

Fig. 2 Comparison results of serum mass concentrations of MMP2 and MMP9 protein in non-tumor canine aged  $< 7$  years and  $\geq 7$  years





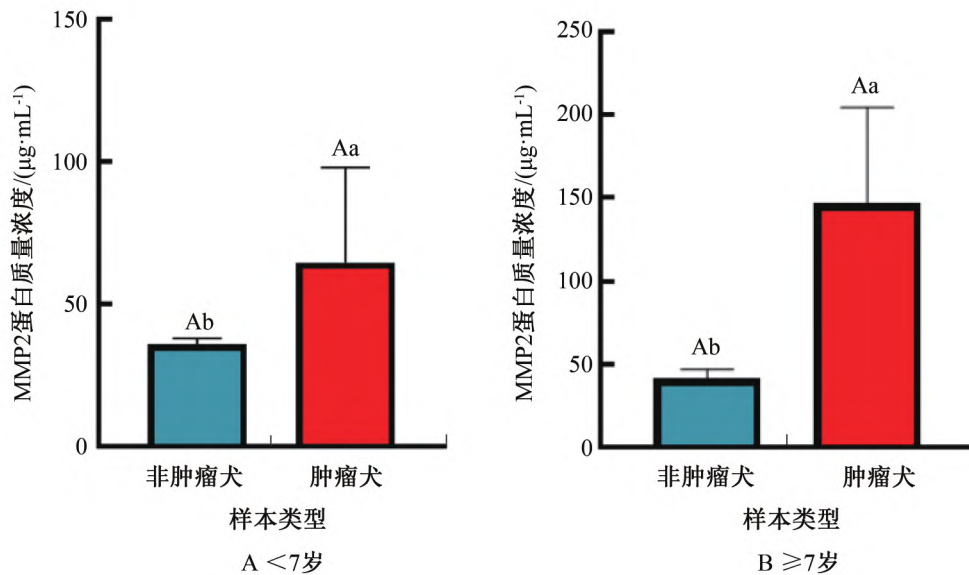
注: 无柱标表示差异不显著 ( $P>0.05$ )。

图3 <7岁和≥7岁的肿瘤犬血清MMP2和MMP9蛋白质量浓度的比较结果

Fig. 3 Comparison results of serum mass concentrations of MMP2 and MMP9 protein in tumor canine aged <7 years and ≥7 years

由于肿瘤犬血清MMP2蛋白质量浓度显著高于非肿瘤犬 ( $P<0.05$ ), 而≥7岁的非肿瘤犬血清MMP2蛋白质量浓度极显著高于<7岁的非肿瘤犬 ( $P<0.01$ ), 且≥7岁的肿瘤犬血清样本数(47份)远高于

非肿瘤犬(11份), 因此为了探究年龄对犬血清MMP2蛋白质量浓度的影响, 研究进一步对相同年龄段非肿瘤犬与肿瘤犬血清MMP2蛋白质量浓度进行比较分析, 结果见图4。



注: 大写字母相同、小写字母不同表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

图4 <7岁和≥7岁犬血清MMP2蛋白质量浓度的检测结果

Fig. 4 Detection results of serum MMP2 protein mass concentration in canine aged <7 years and ≥7 years

由图4可知: <7岁和≥7岁的肿瘤犬血清MMP2蛋白质量浓度均显著高于同年龄段的非肿瘤犬 ( $P<0.05$ )。

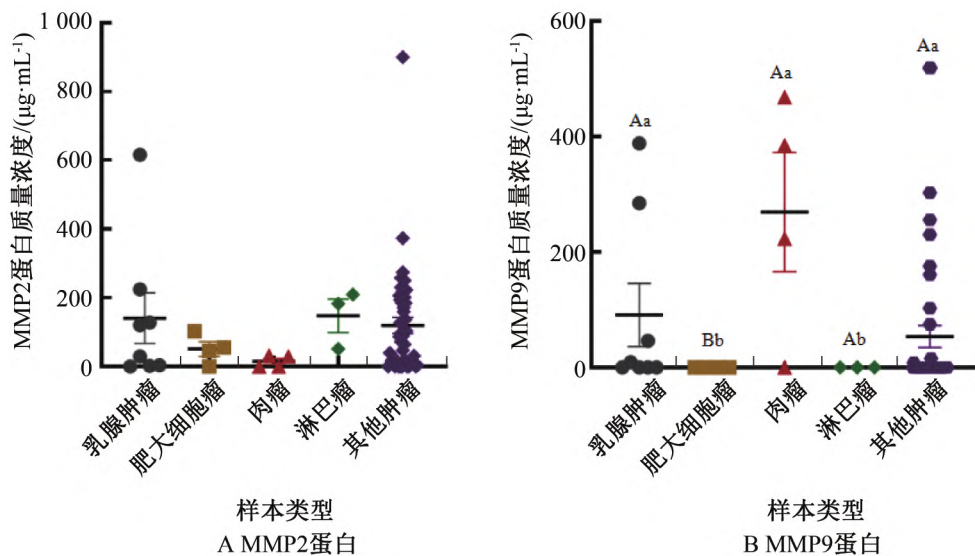
不同肿瘤类型肿瘤犬血清MMP2和MMP9蛋白质量浓度的样本分布见图5。

由图5可知: 不同肿瘤类型的肿瘤犬血清MMP2蛋白质量浓度差异不显著 ( $P>0.05$ ); 乳腺肿瘤、肉瘤

和其他肿瘤的MMP9蛋白质量浓度极显著高于肥大细胞瘤 ( $P<0.01$ ) 显著高于淋巴瘤 ( $P<0.05$ )。

## 2.2 血清中MMP2和MMP9的蛋白活性检测

部分非肿瘤犬和肿瘤犬血清MMP2和MMP9蛋白的明胶酶谱检测结果见图6, 非肿瘤犬和肿瘤犬血清中MMP2和MMP9蛋白活性的量化分析结果见图7。



注: 大小写字母完全不同表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 大写字母相同、小写字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 未标字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

图5 不同肿瘤类型肿瘤犬血清 MMP2 和 MMP9 蛋白质量浓度的样本分布

Fig. 5 Distribution of MMP2 and MMP9 protein mass concentrations in serum of canine with different tumor types

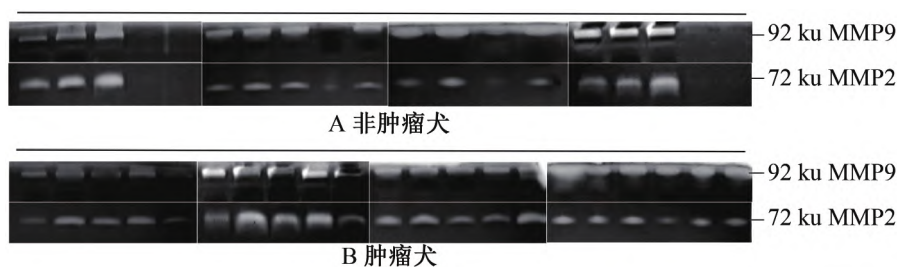
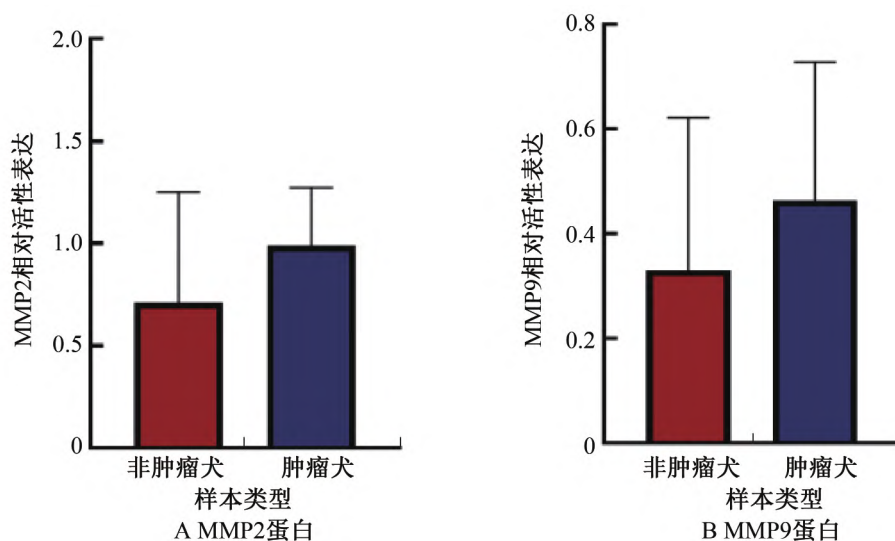


图6 部分非肿瘤犬和肿瘤犬血清 MMP2 和 MMP9 蛋白的明胶酶谱检测结果

Fig. 6 Determination results of MMP2 and MMP9 proteins in serum of some non-tumor canine and tumor canine by gelatin enzyme spectrometry



注: 无柱标表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

图7 非肿瘤犬和肿瘤犬血清 MMP2 和 MMP9 蛋白活性的量化分析结果

Fig. 7 Quantitative analysis results of MMP2 and MMP9 protein activity in serum of non-tumor and tumor canine

从图6可以看出,大部分肿瘤犬血清样本中的 MMP2 和 MMP9 蛋白活性高于非肿瘤犬,但部分非肿

瘤犬血清样本中 MMP2 和 MMP9 蛋白活性也较高。

由图7可知,肿瘤犬血清 MMP2 和 MMP9 蛋白



活性均略高于非肿瘤犬( $P>0.05$ ) ,提示肿瘤犬体内可能通过分泌更多有活性的 MMP2 和 MMP9 蛋白进入血液循环来促进肿瘤的发展。

### 2.3 犬血清 MMP2 和 MMP9 蛋白质量浓度与活性的相关性分析

非肿瘤犬血清 MMP2 和 MMP9 蛋白质量浓度和活性的相关性分析结果见表 3 ,肿瘤犬血清 MMP2 和 MMP9 蛋白质量浓度和活性的相关性分析结果见表 4。

表 3 非肿瘤犬血清 MMP2 和 MMP9 蛋白质量浓度和活性的相关性分析结果

Table 3 Correlation analysis results of MMP2 and MMP9 protein mass concentration and activity in serum of non-tumor dogs

项目	MMP2 蛋白活性	MMP9 蛋白活性
MMP2 蛋白质量浓度	-0.047	
MMP9 蛋白质量浓度		0.019

注: Pearson 相关系数 $<0.300$ 表示二者无相关性, $0.300\sim 0.700$ 表示二者呈弱相关性, $>0.700$ 表示二者呈较强的相关性。

由表 3 可知:在非肿瘤犬血清样本中,MMP2 和 MMP9 蛋白的质量浓度与活性均无相关性。

表 4 肿瘤犬血清 MMP2 和 MMP9 蛋白质量浓度和活性的相关性分析结果

Table 4 Correlation analysis results of MMP2 and MMP9 protein mass concentration and activity in serum of tumor canine

项目	MMP2 蛋白活性	MMP9 蛋白活性
MMP2 蛋白质量浓度	0.459	
MMP9 蛋白质量浓度		0.349

注: Pearson 相关系数 $<0.300$ 表示二者无相关性, $0.300\sim 0.700$ 表示二者呈弱相关性, $>0.700$ 表示二者呈较强的相关性。

由表 4 可知:在肿瘤犬血清样本中,MMP2 和 MMP9 蛋白的质量浓度与活性均呈弱相关性。

### 3 讨论

目前,肿瘤标志物已经成为肿瘤早期诊断研究的热点之一。除了组织外,血液中也存在肿瘤标志物<sup>[23]</sup>。已有研究证明在犬乳腺肿瘤、淋巴瘤、骨肉瘤等肿瘤疾病中肿瘤的转移和恶性程度与 MMP2 和 MMP9 的表达相关<sup>[24-26]</sup>。有研究结果表明,肿瘤组织中 MMP2 和 MMP9 会异常表达,提示其可作为肿瘤侵袭和预后的特征性标志<sup>[27-28]</sup>,但在肿瘤病例的血液样本中,MMP2 和 MMP9 在肿瘤疾病预后中的作用尚不明确。

肿瘤的转移过程依赖于 ECM 的降解<sup>[29]</sup>,MMP2

和 MMP9 可以加速 ECM 的降解,然后使肿瘤细胞更容易转移<sup>[30]</sup>。转移是肿瘤侵袭的重要途径,大部分恶性肿瘤都具有极强的转移性<sup>[31-32]</sup>,所以 MMP2 和 MMP9 的表达在肿瘤疾病中多呈现上调,能够加快肿瘤的转移<sup>[33]</sup>。肿瘤能够通过外周血的循环而发生转移,因此笔者推测肿瘤组织中 MMP2 和 MMP9 可能会释放到外周血中促进肿瘤转移,成为血液中的肿瘤标志物。

本研究结果表明,肿瘤犬血清 MMP2 和 MMP9 蛋白的质量浓度和活性均在一定程度上高于非肿瘤犬,说明 MMP2 和 MMP9 有望成为血清中的肿瘤标志物。明胶酶谱检测结果表明,大部分肿瘤犬血清样本中的 MMP2 和 MMP9 蛋白活性高于非肿瘤犬,但部分非肿瘤犬血清样本中 MMP2 和 MMP9 蛋白活性也较高,这可能与犬的年龄及自身其他潜在疾病有关<sup>[34]</sup>。蛋白质量浓度与蛋白活性相关性分析结果表明,在非肿瘤犬和肿瘤犬血清样本中,MMP2 和 MMP9 的蛋白质量浓度与蛋白活性表现为无相关性或弱相关性,可能是因为收集的血清样本中部分 MMP2 和 MMP9 蛋白失去了活性。

在本研究中,由于肿瘤犬血清 MMP2 蛋白质量浓度显著高于非肿瘤犬,而 $\geq 7$ 岁的非肿瘤犬血清 MMP2 蛋白质量浓度极显著高于 $<7$ 岁的非肿瘤犬,且 $\geq 7$ 岁的肿瘤犬血清样本数(47 份)远高于非肿瘤犬(11 份),因此为了探究年龄对犬血清 MMP2 蛋白质量浓度的影响,进一步对相同年龄段非肿瘤犬与肿瘤犬血清中 MMP2 蛋白质量浓度进行比较分析,结果表明, $<7$ 岁和 $\geq 7$ 岁的肿瘤犬血清 MMP2 蛋白质量浓度均显著高于同年龄段的非肿瘤犬,说明虽然年龄对犬血清 MMP2 蛋白质量浓度存在影响,但是否患肿瘤仍然是 MMP2 蛋白质量浓度高低的重要影响因素。

肿瘤标志物具有重要功能,可以用于肿瘤的普查、筛查,肿瘤的诊断、分期,肿瘤患者手术、化疗、放疗后的疗效监测,肿瘤的预后评估,以及寻找未知来源的转移肿瘤原发灶<sup>[35]</sup>。目前已被发现的肿瘤标志物有血清癌胚抗原(carcinoembryonic antigen,CEA)、甲胎蛋白( $\alpha$ -fetoprotein,AFP)、前列腺特异抗原(prostate specific antigen,PSA)和绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin,HCG)、循环 microRNA-214 和循环 microRNA-126、血清血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)、胰岛素样生长因子-1(insulin like growth factor-1,IGF-1)和 C 反应蛋白(C-reactive-protein,CRP)等<sup>[36-38]</sup>。已有研究证明循环肿瘤细胞和 MMP9 之间具有相关性,且二者联合分析的结果可以作为肿瘤转移和预后的依据<sup>[28]</sup>。此外有研究证明,血清 MMP2 和 MMP9 的活性虽然可作为预测犬阴囊内血管瘤复



发的无创性预后指标,但是通过多变量分析显示血清MMP2和MMP9的活性不是独立的预后因素<sup>[39]</sup>。以上说明仅靠一种蛋白作为肿瘤标志物并不能准确反映肿瘤的恶性程度及发展情况,因此需要找出更多的肿瘤标志物进行联合检测,才能提高犬恶性肿瘤检出的准确率。

#### 4 结论

本研究结果表明,肿瘤犬血清MMP2和MMP9蛋白的质量浓度和蛋白活性均在一定程度上高于非肿瘤犬,具有作为肿瘤早期诊断和预后标志物的潜能,未来可以把寻找更多的肿瘤标志物进行联合检测作为研究方向。

#### 参考文献:

- [1] GOLDSCHMIDT M, PEÑA L, RASOTTO R, et al. Classification and grading of canine mammary tumors[J]. *Vet Pathol*, 2011, 48(1): 117-131.
- [2] VALDIVIA G, ALONSO-DIEZ Á, ALONSO-MIGUEL D, et al. Epitheliosis is a histopathological finding associated with malignancy and poor prognosis in dogs with mammary tumors[J]. *Vet Pathol*, 2022, 59(5): 747-758.
- [3] CANADAS A, FRANA M, PEREIRA C, et al. Canine mammary tumors: comparison of classification and grading methods in a survival study[J]. *Vet Pathol*, 2019, 56(2): 208-219.
- [4] HOSSEINI E, PEDRAM B, BAHRAMI A M, et al. Cutaneous mast cell tumor (mastocytoma): cytohistopathological and haematological investigations[J]. *Diagn Pathol*, 2014, 9: 9.
- [5] KINSELLA A, GREEN B, LEPTS G, et al. The role of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin in large bowel tumour cell invasion and metastasis[J]. *Br J Cancer*, 1993, 67: 904-909.
- [6] PRAKASH S S. Cavitation of tumoral basement membrane as onset of cancer invasion and metastasis: physics of oncogenic homeorhesis via nonlinear mechano-metabolomics[J]. *Converg Sci Phys Oncol*, 2016, 2(1): 015001.
- [7] VU H T, HOANG T X, KIM J Y. All-trans retinoic acid enhances matrix metalloproteinase 2 expression and secretion in human myeloid leukemia THP-1 cells[J]. *BioMed Res Int*, 2018, 2018: 1-10.
- [8] GIALELI C, KARAMANOS N K, SKANDALIS S S, et al. Extracellular matrix structure[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 97: 4-27.
- [9] FANJUL-FERNÁNDEZ M, FOLGUERAS A R, CABRERA S, et al. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1803(1): 3-19.
- [10] GIANNELLI G, ANTONACI S. Gelatinases and their inhibitors in tumor metastasis: from biological research to medical applications[J]. *Histol Histopathol*, 2002, 17(1): 339-345.
- [11] BJÖRKLUND M, KOIVUNEN E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1755(1): 37-69.
- [12] WINER A, ADAMS S, MIGNATTI P. Matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy: turning past failures into future successes[J]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17(6): 1147-1155.
- [13] GONZALEZ-AVILA G, SOMMER B, MENDOZA-POSADA D A, et al. Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2019, 137: 57-83.
- [14] QUINTERO-FABIÁN S, ARREOLA R, BECERRIL-VILLANUEVA E, et al. Role of matrix metalloproteinases in angiogenesis and cancer[J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 1370.
- [15] FIELDS G B. Mechanisms of action of novel drugs targeting angiogenesis promoting matrix metalloproteinases[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1278.
- [16] SCANNEVIN R H, ALEXANDER R, HAARLANDER T M, et al. Discovery of a highly selective chemical inhibitor of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) that allosterically inhibits zymogen activation[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(43): 17963-17974.
- [17] DAS S, AMIN S A, JHA T. Inhibitors of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) for the management of hematological malignancies[J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 223: 113623.
- [18] BROWN G T, MURRAY G I. Current mechanistic insights into the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis[J]. *J Pathol*, 2015, 237(3): 273-281.
- [19] GKOUVERIS I, NIKITAKIS N G, ASEERVATHAM J, et al. Matrix metalloproteinases in head and neck cancer: current perspectives[J]. *Metalloproteinases Med*, 2017, 4: 47-61.
- [20] PAN S, HU Y, HU M, et al. Platelet-derived PDGF promotes the invasion and metastasis of cholangiocarcinoma by upregulating MMP2/MMP9 expression and inducing EMT via the p38/MAPK signalling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(7): 3577-3595.
- [21] HOLLBORN M, STATHOPOULOS C, STEFFEN A, et al. Positive feedback regulation between MMP-9 and VEGF in human RPE cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(9): 4360-4367.
- [22] MUGHEES M, SENGUPTA A, KHOWAL S, et al. Mechanism of tumour microenvironment in the progression and development of oral cancer[J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(2): 1773-1786.
- [23] ZHAO J Y, TANG Q Q, LUO Y T, et al. Predictive value of a serum tumor biomarkers scoring system for clinical stage II/III rectal cancer with neoadjuvant chemoradiotherapy[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2022, 14(10): 2014-2024.
- [24] SOKOŁOWSKA J, URBANŃSKA K. Immunohistochemical assessment of metalloproteinases MMP2 and MMP9 expression in canine various subtypes of lymphomas in relation with proliferative and apoptotic markers[J]. *Pol J Vet Sci*, 2019, 22(2): 203-211.
- [25] RAPOSO T P, BEIRÃO B C, PIRES I, et al. Immunohistochemical expression of CCR2, CSF1R and MMP9 in canine inflammatory mammary carcinomas[J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(4): 1805-1813.
- [26] GEBHARD C, FUCHS - BAUMGARTINGER A, RAZZAZI - FAZELI E, et al. Distribution and activity levels of matrix metalloproteinase 2 and 9 in canine and feline osteosarcoma[J]. *Can J Vet Res*, 2016, 80(1): 66-73.
- [27] VAN TUBERGEN E A, BANERJEE R, LIU M, et al. Inactivation or loss of TTP promotes invasion in head and neck cancer via transcript stabilization and secretion of MMP9, MMP2, and IL-6[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(5): 1169-1179.
- [28] SUN Y, CHEN Y, LI S, et al. NanoVelcro-captured CTC number concomitant with enhanced serum levels of MMP7 and MMP9 enables accurate prediction of metastasis and poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma[J]. *Int J Nanomed*, 2017, 12: 6399-6412.
- [29] WU X Z, CHEN D, XIE G R. Extracellular matrix remodeling in





- hepatocellular carcinoma: effects of soil on seed [J]. Med Hypotheses ,2005 ,66( 6) : 1115-1120.
- [30] KHALIL R A. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases [J]. Prog Mol Biol Transl Sci , 2017 , 147: 1-73.
- [31] HANAHAN D ,WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell ,2011 ,144( 5) : 646-674.
- [32] TURAJLIC S ,SWANTON C. Metastasis as an evolutionary process [J]. Science ,2016 ,352( 6282) : 169-175.
- [33] JIANG K , CHEN H , FANG Y , et al. Exosomal ANGPTL1 attenuates colorectal cancer liver metastasis by regulating Kupffer cell secretion pattern and impeding MMP9 induced vascular leakiness[J]. J Exp Clin Cancer Res ,2021 ,40( 1) : 21.
- [34] MURPHY G. Riding the metalloproteinase roller coaster[J]. J Biol Chem ,2017 ,292( 19) : 7708-7718.
- [35] SUN Z ,ZHANG N. Clinical evaluation of CEA ,CA19-9 ,CA72-4 and CA125 in gastric cancer patients with neoadjuvant chemotherapy [J]. World J Surg Oncol ,2014 ,12: 397.
- [36] VALENCAKOVA-AGYAGOSOVA A , FRISCHOVA Z , SEVCIKOVA Z , et al. Determination of carcinoembryonic antigen and cancer antigen ( CA 15-3) in bitches with tumours on mammary gland: preliminary report [J]. Vet Comp Oncol , 2014 ,12( 3) : 205-214.
- [37] MALOV S I , MALOV I V , KUVSHINOV A G , et al. Search for effective serum tumor markers for early diagnosis of hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C [J]. Sovrem Tekhnologii Med , 2021 ,13( 1) : 27-33.
- [38] HEISHIMA K , ICHIKAWA Y , YOSHIDA K , et al. Circulating microRNA - 214 and - 126 as potential biomarkers for canine neoplastic disease [J]. Scientific Rep , 2017 ,7( 1) : 2301.
- [39] FATHIPOUR V , KHAKI Z , NASSIRI S M , et al. Prognostic value of zymographic gelatinase activity of MMP-2 and MMP-9 in tumor recurrence of canine intrascrotal hemangiomas [J]. J Comp Pathol , 2020 ,29( 1) : 25-31.

## Study on the correlation between serum MMP2/MMP9 and tumor diseases in canine

JIANG Xianyu ,PEI Shimin \*

( College of Animal Science and Technology , Hainan University Haikou 570228 ,China)

**Abstract:** In order to identify serum biomarkers for canine tumor diseases in veterinary clinic , enzyme-linked immunosorbent assay ( ELISA) and gelatin enzyme assay were used to detect the protein mass concentration and activity of MMP2 and MMP9 in serum samples from 113 dog cases , and the correlation between the protein mass concentration and activity of MMP2 and MMP9 in dog serum was analyzed. The results showed that the protein concentrations of MMP2 and MMP9 in serum of tumor dogs ( median 126.76  $\mu\text{g/mL}$  and 230.31  $\mu\text{g/mL}$  , respectively) were significantly higher than those in serum of non-tumor dogs ( median 58.90  $\mu\text{g/mL}$  and 55.14  $\mu\text{g/mL}$  ,  $P<0.05$  ). The serum MMP2 protein mass concentration of  $\geq 7$  years old non-tumor dogs was significantly higher than that of  $<7$  years old non-tumor dogs (  $P<0.01$  ) , and the serum MMP9 protein mass concentration of  $\geq 7$  years old non-tumor dogs was slightly higher than that of  $<7$  years old non-tumor dogs (  $P>0.05$  ) , and the serum MMP2 and MMP9 protein mass concentrations of  $\geq 7$  years old tumor dogs were slightly higher than that of  $<7$  years old non-tumor dogs (  $P>0.05$  ). The serum MMP2 protein mass concentration of  $<7$  years old and  $\geq 7$  years old tumor dogs was significantly higher than that of same age group of non-tumor dogs (  $P<0.05$  ). There were no significant differences in MMP2 protein mass concentrations among different tumor types (  $P>0.05$  ). The protein mass concentrations of MMP9 of breast tumors , sarcomas and other masses were extremely significantly higher than those of mastocytoma (  $P<0.01$  ) , and significantly higher than those of lymphoma (  $P<0.05$  ). The protein activities of MMP2 and MMP9 in serum of tumor dogs were slightly higher than those of non-tumor dogs (  $P>0.05$  ). In the serum samples of non-tumor dogs , the protein mass concentrations of MMP2 and MMP9 were not correlated with the protein activity. The protein mass concentrations of MMP2 and MMP9 were weakly correlated with the protein activity in the serum samples of tumor dogs. These results indicated that the protein mass concentration and activity of MMP2 and MMP9 in serum of tumor dogs were improved to a certain extent compared with non-tumor dogs , which had the potential to be used as markers for early diagnosis and prognosis of tumor.

**Keywords:** tumor; biomarker; serum; MMP2; MMP9

( 026)