

• 临床研究 •

乳腺癌中 MTA1、MMP-9 表达与临床病理研究

李 斌¹, 陈武科², 陈 鹏³, 廖和和¹

(1. 西安医学院附属医院肿瘤科, 陕西西安 710077; 2. 西安交通大学第一附属医院肿瘤外科 710061;

3. 西安医学院生化教研室 710021)

摘要:目的 探讨 MTA1、MMP-9 表达量与乳腺癌淋巴转移的关系及临床意义, 初步探讨 MTA1、MMP-9 之间的关系。方法 采用免疫组化法对 45 例浸润性乳腺导管癌中 MTA1、MMP-9 的表达情况进行检测。结果 对实验结果进行定量分析, 采用 χ^2 检验, Fisher 精确检验。乳腺癌中 MTA1、MMP-9 阳性表达率为 71%、64%。MTA1 与淋巴结转移相关, 与年龄、肿瘤大小、ER、PR、c-erbB-2 无相关性; MTA1 蛋白定位变化可能与乳腺癌淋巴转移相关 ($P < 0.05$); MMP-9 与淋巴结转移成正相关 ($P < 0.05$), 与 PR 呈负相关 ($P < 0.05$), 与年龄、肿瘤大小、ER、c-erbB-2 无相关性; MTA1 与 MMP-9 有正相关趋势 ($P = 0.057$), 但无统计学意义; MTA1(+) / MMP-9(+) 表达与乳腺癌淋巴转移显著性相关 ($P < 0.05$)。结论 MTA1 高表达促进乳腺癌细胞的淋巴结转移, MTA1 蛋白定位变化与乳腺癌淋巴转移相关; MMP-9 的高表达促进乳腺癌淋巴转移; MMP-9 与孕激素受体表达呈负相关; 发生淋巴结转移时乳腺癌组织中的 MMP-9 升高主要由间质细胞产生; MTA1、MMP-9 两者联合表达是乳腺癌高度浸润的生物学标志。

关键词:乳腺癌; MTA1; MMP-9; 转移; 免疫组织化学**中图分类号:** R737.9; R730.43**文献标识码:** A**文章编号:** 1671-8348(2010)12-1552-03

Clinic pathological study of metastasis-associated protein1 (MTA1), Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in breast cancer

LI Bin¹, CHEN Wu-ke², CHEN Peng³, et al.

(1. Department of Tumor, Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710077, China;

2. Department of Tumor Surgery, First Affiliated Hospital of Xi'an Traffic University, Xi'an 710061, China;

3. Department of Biochemistry, Xi'an Medical College, Xi'an 710021, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between the expression of MTA1, MMP-9 protein and lymph node metastasis in breast cancer. The relationships between the expressions of MTA1, MMP-9 protein and the clinical parameters of breast carcinoma were analyzed. To initiatory explore the relationship between MTA1, MMP-9 protein. **Methods** SP immunohistochemical technique was used to detect the expressions of MTA1 and MMP-9 protein among the 45 human breast cancer samples. **Results** The positive rates of MTA1, MMP-9 protein were 71.0%, 64.0% respectively. Analysis of MTA1 over-expression indicated there hadn't relationships between age, tumor size, ER, PR and c-erbB-2 and MTA1. But MTA1 was significantly correlated with lymphatic metastasis ($P < 0.05$). MMP-9 over-expression was significantly correlated with lymphatic metastasis ($P < 0.05$) and was inversely correlated with PR ($P < 0.05$). There had not relationships between MMP-9 and age, tumor size, ER and c-erbB-2. The co-expression of MTA1 and MMP-9 was significantly correlated with lymphatic metastasis ($P < 0.05$). **Conclusion** The over-expression of MTA1 stimulates the lymph node metastasis of breast cancer and the orientation variety of MTA1 protein is related to the metastasis of breast cancer. The over-expression of MMP-9 stimulates the metastasis of lymph node of breast cancer and a negative correlation was found between MMP-9 and PR. The co-expression of MTA1 and MMP-9 was the biological character of breast cancer high aggressiveness.

Key words: breast cancer; MTA1; MMP-9; Metastasis; Immunohistochemistry

MTA1 是一个肿瘤转移相关基因, 其蛋白表达水平与人及鼠乳腺癌细胞株的转移能力成正相关^[1]。MMPs 是一类与肿瘤的侵袭和转移关系十分密切的蛋白水解酶, MMP-9 是其中重要的一员, MMP-9 高表达的肿瘤细胞在侵袭、转移过程中突破各种屏障能力较强。具有转移倾向的癌细胞可自身分泌或诱导其他细胞分泌大量的 MMP-9, 破坏基底膜的完整性, 导致癌细胞向其他部位转移。

1 材料与方法

1.1 标本来源 病例资料来自陕西省人民医院, 由病案室从 2005 年 1 月 1 日至 2006 年 5 月 31 日曾于该院行“乳腺癌改良根治术”患者的病历中随机抽样 45 例。均为女性, 年龄 22~67 岁, 平均 49 岁, 术前未行放、化疗, 术后病理诊断均为浸润性导管癌。参照乳腺癌 TNM 分期 (AJCC/UICC 分期标准,

1997) 对所有患者进行了临床分期, 其中 I 期 1 例、II A 期 10 例、II B 期 22 例、III 期 12 例, 未发现有 IV 期乳腺癌。上述患者手术切除的乳腺癌组织石蜡标本取自陕西省人民医院病理科。雌激素受体 (ER)、孕激素受体 (PR)、c-erbB-2 表达情况由陕西省人民医院病理科用免疫组化染色 SABC 法测得。

1.2 方法 标本均经 10% 中性缓冲甲醛固定, 做 4 μ m 连续切片, 进行 HE 及免疫组织化学染色。按照 WHO 关于乳腺癌的组织学新分类法分类, 统计临床病理资料, 山羊抗 MTA1 多克隆抗体购于 Santa Cruz Biotechnology Inc (sc9446), 鼠抗 MMP-9 多克隆抗体购于武汉博士德生物工程有限公司。常规免疫组化染色, DAB 发色。以 PBS 代替一抗作阴性对照, 分别以已知 MTA1、MMP-9 阳性的乳腺癌组织切片作阳性对照。

1.3 结果判断 MTA1 蛋白主要表达细胞核, 核仁不染色,

呈褐色及棕黄色^[2]；MMP-9 主要位于胞浆中，呈棕黄色^[3]。按 Ta-Kha 等^[4]的方法，以同一显微镜倍数(40 倍)观察全片，确定肿瘤浸润边缘，选择 5 个高倍(400 倍)视野，合并计算所分析的 5 个不同视野染色细胞百分数及染色强度；阳性染色细胞率小于 10%为阴性(－)；阳性染色细胞率在 10%~50%之间或染色浅为阳性(+)；阳性染色细胞率大于 50%及染色深为强阳性(++)。

1.4 统计学方法 数据经 SSPS11.5 软件处理，采用卡方检验、方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTA1、MMP-9 在乳腺癌及癌旁正常组织中的表达 MTA1 阳性表达率为 71.1%，MMP-9 阳性表达率为 64%。MTA1 蛋白主要表达于乳腺癌细胞胞核，部分细胞表达于胞浆，呈棕黄色颗粒(图 1，图 2)；MMP-9 主要位于癌巢周边瘤细胞的胞浆中及成纤维细胞、巨噬细胞、内皮细胞等基质细胞胞浆中，癌巢周围的间质中常有胞质棕色成纤维细胞出现，胞浆内可见棕色颗粒，多聚集在核周，也可见巨噬细胞散在出现，其胞质内棕色颗粒分布不均匀，大多在胞膜下密集成堆，核周则稀疏浅淡。一些血管的部分内皮细胞胞质呈浅棕色，颗粒细小，血管内血细胞胞质则呈深棕色(图 3，图 4)。

2.2 MTA1、MMP-9 与临床病理特征关系 表 1 所示。MTA1、MMP-9 与淋巴结转移密切相关($P<0.05$)，MMP-9 与 PR 密切相关($P<0.05$)，而与患者年龄、肿瘤大小、雌激素无关。

表 1 MTA1、MMP-9 表达与临床病理特征[n(%)]

病理资料	n	MTA1 阳性表达	P	MMP-9 阳性表达	P
年龄(岁)					
<50	22	14(63.6)	0.337	13(59.1)	0.524
≥50	23	18(78.2)		16(69.5)	
大小(cm)					
<2	14	12(85.7)	0.178	9(64.2)	1
≥2	31	20(64.5)		20(64.5)	
淋巴转移					
有	25	21(84.0)	0.049	20(80.0)	0.027
无	20	11(55.0)		9(45.0)	
ER					
(+)	15	10(33.3)	0.732	8(53.3)	0.331
(-)	30	22(73.3)		21(70.0)	
PR					
(+)	13	8(61.5)	0.286	5(38.5)	0.016
(-)	32	24(75.0)		24(75.0)	
c-erbB-2					
(+)	20	17(85.0)	0.10	13(65.0)	1
(-)	25	15(60.0)		16(64.0)	

表 2 MTA1 定位改变与乳腺癌淋巴结转移[n(%)]

MTA1	n	淋巴转移		P
		有	无	
胞核表达	24	9(0.36)	15(0.75)	
胞浆表达	21	16(0.64)	5(0.25)	0.016
总数	45	25	20	

2.3 MTA1 定位改变与乳腺癌淋巴结转移的相关性分析 如表 2 所示。在有淋巴结转移的 25 例乳腺癌组织中，MTA1 胞浆表达阳性者为 64.0%，在无淋巴结转移的 20 例病例中，MTA1 胞浆表达阳性者为 25.0%，差异有统计学意义。

表 3 MTA1 和 MMP-9 联合表达与乳腺癌淋巴结转移(%)

MTA1/MMP-9	n	淋巴转移		P
		有	无	
(+)/(+)	23	18(0.72)	5(0.25)	0.003
(+)/(－)	9	3	6	0.75
(－)/(+)	6	2(0.28)	4(0.75)	
(－)/(－)	7	2	5	
总数	45	25	20	

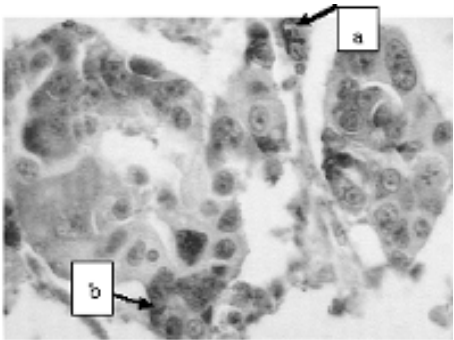


图 1 乳腺癌细胞 MTA1 表达阳性，MTA1 蛋白表达于细胞核(a)及细胞膜(b)(SP×400)

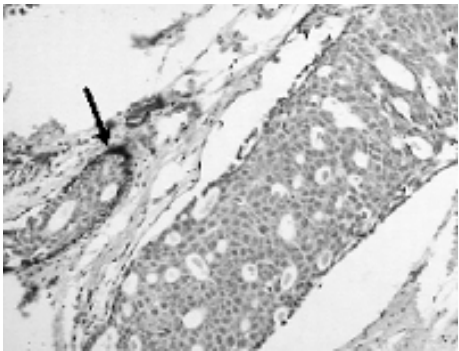
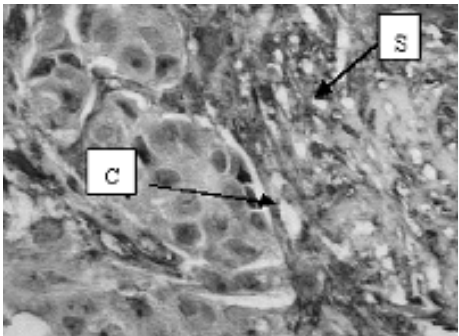


图 2 乳腺癌细胞 MTA1 表达阳性，在肿瘤前缘表达较强(SP×100)



C 为乳腺癌细胞；S 为间质细胞。
图 3 乳腺癌细胞、间质细胞 MMP-9 表达阳性，MMP-9 表达于胞浆及胞膜(SP×400)

2.4 MTA1 和 MMP-9 联合表达与乳腺癌淋巴结转移 如表

3 所示,在有淋巴结转移的 25 例乳腺癌组织中,MTA1/MMP-9 均为阳性的表达率为 72%,而在无淋巴结转移的 20 例乳腺癌组织中 MTA1/MMP-9 均为阳性的表达率为 25%,两者差异有统计学意义($P < 0.05$)。

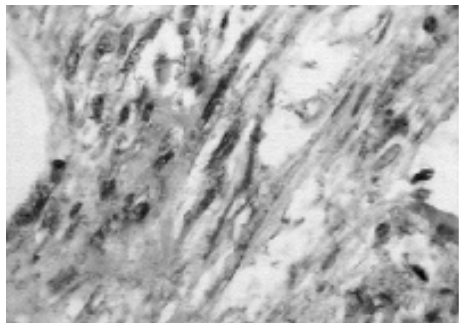


图 4 乳腺癌组织中成纤维细胞 MMP-9 表达阳性,MMP-9 表达于胞浆及胞膜(SP×400)

3 讨 论

本研究用免疫组化的方法测定 MTA1 蛋白在 45 例乳腺浸润性导管癌的表达,发现 MTA1 蛋白不但表达于细胞核而且在细胞浆中也有表达。这与李春海和李克勤^[5]的研究有所不同,MTA1 基因的产物为核蛋白,应用间接免疫荧光法,可见 MTA1 蛋白定位于细胞核内,但核仁显示阴性。在有淋巴结转移乳腺癌组织中胞浆表达率为 64.0%,而在无淋巴结转移的乳腺癌组织中胞浆表达率为 25.0%,两者差异有统计学意义($P < 0.05$)。这一结果表明在乳腺癌的发生进展中可能存在着 MTA1 基因蛋白产物表达定位的异常,而这种定位异常与淋巴结的转移可能相关。

另外,在一部分浸润性乳腺导管癌中,MTA1 阳性细胞表现出向肿瘤边缘集中分布的趋势,而肿瘤边缘是其侵袭最活跃的部位。淋巴结转移组 MTA1 的阳性表达率显著高于无淋巴结转移组,两组比较差异有统计学意义,说明 MTA1 的高表达能促进乳腺癌的淋巴结转移,这与 Cui 等^[6]对食管癌及 Moon 等^[7]对肝癌的研究结果一致。这说明 MTA1 基因是肿瘤浸润和转移的关键分子机制之一。

本研究免疫组化法研究结果与 Monteagudo 等^[8]报道的相一致,即 MMP-9 不仅由肿瘤细胞分泌,更多情况下是由间质细胞,如巨噬细胞、中性粒细胞、毛细血管内皮细胞分泌。距离肿瘤越近,染色间质细胞数越多,距离癌组织越远间质细胞表达越少,提示 MMP-9 表达较强部位位于肿瘤浸润前缘,说明 MMP-9 参与肿瘤向外浸润、扩展的过程。在乳腺癌的间质中淋巴管和血管结构发育不健全,其内皮细胞中却有 MMP-9 表达,这有利于癌细胞穿透淋巴管或血管壁,以便转移和侵袭。

MMP-9 阳性表达率(64%),与年龄、肿瘤大小无关;有淋巴结转移的阳性率为 80%,明显高于无淋巴结转移组,转移组和无淋巴结转移组差异有统计学意义($P < 0.05$),这与 Monteagudo 等^[8]结果一致。表明 MMP-9 表达的测定可作为乳腺癌浸润转移的重要分子学标志。MMP-9 与 PR 差异有统计学意义($P < 0.05$),成负相关关系;与 ER 间有负相关趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。乳腺作为女性激素受体的靶器官,推测可能 MMP-9 与激素依赖机制有一定关系,与 c-erbB-2 无关。

通过对 MTA1/MMP-9 联合表达的研究发现,在无淋巴结转移组其共同表达率为 25%,在淋巴结转移组共同表达率为 72%,两组差异有统计学意义($P < 0.01$)。所以 MTA1/

MMP-9 联合表达对于判断乳腺癌的生物学恶性度有重要意义,尤其是对有无淋巴结转移。对于临床医师更具意义,如果临床发现患者无淋巴结转移,而 MTA1(+)/MMP-9(+)则可能该患者有更高的转移率。对于是否能引起患者存在更高复发率及死亡率,还需进一步研究。

综上所述,MTA1、MMP-9 在乳腺癌转移中作用明显。对乳腺癌的远隔转移,尤其是 MMP-9 的过表达更应引起临床医生的注意^[9-11]。

参考文献:

- [1] 李孟圈,李靖若,鲍俊涛,等. MTA1 蛋白在乳腺癌中的表达及临床意义[J]. 山东医药,2007,47(15):17.
- [2] 谢海健,钟雪云,杜彬,等. 贲门癌中转移相关基因 MTA1 表达的病理研究[J]. 广东医学,2005,26(5):635.
- [3] Hee JK, Chan-Il P, Byeong WP, et al. Expression of MT-1 MMP, MMP2, MMP9 and TIMP mRNAs in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast [J]. Yonsei Medical Journal, 2006, 47(6):333.
- [4] Ta-Kha S, Fujiyama Y, Bamba T, et al. Stromal expression of MMP-9 and urokinase receptor is inversely associated with liver metastasis and with infiltration growth in human colorectal cancer: a novel approach from immune inflammatory aspect[J]. Jpn J Cancer Res, 1997, 88:72.
- [5] 李春海,李克勤. 肿瘤微血管生成的机制与肿瘤侵袭和转移[J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 22(3):181.
- [6] Cui Q, Matsusue K, Kono A, et al. Assignment of the metastasis-associated gene (Mta1) to mouse chromosome band 12 F and the metastasis-associated gene2 (Mta2) to mouse chromosome band 19 B by fluorescence in situ hybridization[J]. Cytogenet Cell Genet, 2001, 94(34):246.
- [7] Moon WS, Chang K, Tarnawski AS. Overexpression of metastatic tumor antigen 1 in hepatocellular carcinoma: Relationship to vascular invasion and estrogen receptor-alpha[J]. Hum Pathol, 2004, 35(4):424.
- [8] Monteagudo C, Merino MJ, San-Juan J, et al. Immunohisto-chemical distribution of type IV collagenase in normal, benign, and malignant breast tissue [J]. Am J Pathol, 1990, 136(3):585.
- [9] Luznik L, Slansky JE, Jalla S, et al. Successful therapy of metastatic cancer using tumor vaccines in mixed allogeneic bone marrow chimeras[J]. Blood, 2003, 101(4):1645.
- [10] Porrata LF, Ingle JN, Litzow MR, et al. Prolonged survival associated with early lymphocyte recovery after autologous hematopoietic stem cell transplantation for patients with metastatic breast cancer [J]. Bone Marrow Transplant, 2001, 28(9):865.
- [11] 张尧. 肾细胞癌 MMP-9、VEGF 的表达及其临床意义 [J]. 重庆医学, 2007, 36(13):31.

(收稿日期:2009-06-13 修回日期:2009-11-16)