

· 论 著 ·

MMP-2 在胃癌组织中的表达及其与微血管生成和淋巴结转移的关系

刘倩¹, 吴小翎^{2△}, 罗红春³

(1. 重庆市渝北区人民医院消化内科 401120; 2. 重庆医科大学附属第二医院消化内科 400010;

3. 重庆医科大学附属第一医院感染科 400016)

摘要:目的 观察人类胃癌组织中基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的表达水平,并探讨其与微血管生成和淋巴结转移的关系。方法 采用免疫组织化学染色 S-P 法检测 92 例胃癌组织及 21 例正常胃黏膜组织中 MMP-2 蛋白的表达水平,用抗 CD34 单克隆抗体标记血管内皮细胞以检测微血管密度(MVD),以血管内皮生长因子受体 3(VEGFR-3)标记淋巴管内皮细胞以检测淋巴管密度(LMVD)。结果 92 例胃癌组织标本中,MMP-2、VEGFR-3 阳性表达率分别为 81.5%(75/92)、75.0%(69/92);MVD 值为(47.29±7.6)个/视野。21 例正常胃黏膜组织中,MMP-2、VEGFR-3 阳性表达率分别为 23.8%(5/21)、33.3%(7/21);MVD 值为(18.33±8.4)个/视野。结论 MMP-2 与胃癌微血管生成和淋巴结转移关系密切;联合检测 MMP-2、MVD 及 VEGFR-3 的表达对评价胃癌病理特征和判断预后有一定的价值。

关键词:胃肿瘤;基质金属蛋白酶-2;淋巴结;肿瘤转移;微血管生成

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.13.006

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)13-1262-03

Expression of MMP-2 in human gastric cancer and its relationship with micro-angiogenesis and lymph node metastasis

Liu Qian¹, Wu Xiaoling^{2△}, Luo Hongchun³

(1. Department of Gastroenterology, People's Hospital of Yubei District, Chongqing 401120, China;

2. Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China;

3. Department of Infection, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of matrix metalloproteinase 2(MMP-2) in human gastric cancer and its relationship with micro-angiogenesis and lymph node metastasis. Methods The expression of MMP-2 was detected by immunohistochemistry in 92 cases of gastric adenocarcinomas and 21 cases of normal gastric mucosas. The microvessel density(MVD) was detected by labeling vascular endothelial cells with CD34 and lymphatic MVD was detected by labeling lymphatic vessel endothelial cells with VEGFR-3. Results The positive rates of MMP-2, MVD and VEGFR-3 in human gastric cancer tissues were higher than those in normal gastric mucosas. Expressions of MMP-2 and VEGFR-3 were related with histopathological grading, invasion range, lymph node metastasis and TNM stages($P < 0.05$). MVD was not correlated with histopathological grading($P > 0.05$), but was significantly correlated with invasion range, lymph node metastasis and TNM stages($P < 0.05$). Conclusion MMP-2 is significantly correlated with micro-angiogenesis and lymph node metastasis. To investigate expression of MMP-2, MVD and VEGFR-3 may be helpful for estimating pathological characteristics and prognosis.

Key words: stomach neoplasms; matrix metalloproteinase 2; lymph nodes; neoplasm metastasis; micro-angiogenesis

目前,中国胃癌的发病率和病死率仍处于所有恶性肿瘤的前位,总体 5 年生存率仅为 30% 左右^[1],严重威胁着人类的健康。研究发现,基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)作为人体内降解细胞外基质的主要酶类在肿瘤发生、发展等众多生理和病理过程中发挥着重要作用^[2]。而 MMP-2 可通过降解 IV 型胶原酶从而降解细胞外基质,参与肿瘤细胞的迁移、黏附和侵袭,与患者的预后密切相关。微血管密度(microvessel density, MVD)是反映肿瘤血管生成活性的重要指标,其所选取的血管内皮细胞标记物中以 CD34 抗原特异性最高^[3];淋巴管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor C, VEGF-C)是近年发现的血管内皮生长因子家族的新成员,它通过激活淋巴管内皮细胞膜上血管内皮生长因子受体 3(vascular endothelial growth factor receptor-3, VEGFR-3)来促进肿瘤淋巴管的增生及肿瘤的淋巴道转移^[4]。本研究以免疫

组织化学染色 S-P 法检测胃癌组织及正常胃黏膜组织中 MMP-2 的表达,并探讨其与微血管生成和淋巴结转移的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2006 年 6 月至 2009 年 3 月重庆医科大学附属第二医院普外科胃腺癌根治术患者 92 例,其中男 66 例,女 26 例,年龄(48.19±5.8)岁;其中,高、中分化者 61 例,低分化者 76 例;浸及全层者 68 例,未浸及全层者 24 例;有淋巴结转移者 70 例,无淋巴结转移者 22 例;TNM 分期: I ~ II 28 期者例, III ~ IV 期者 64 例。全部病例均经 HE 切片复读确认。另选取正常胃黏膜组织标本 21 例作对照。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 全部标本经 10% 中性甲醛液固定,石蜡包埋,4 μm 厚连续切片。采用免疫组织化学染色 S-P 法。MMP-2 鼠抗人单克隆抗体(CAT: MAB-0244)、CD34 鼠

△ 通讯作者, Tel: 15826109119; E-mail: cocoa0704@126.com。

抗人单克隆抗体(CAT:MAB-0034)购自福州迈新生物技术开发有限公司,VEGFR-3 鼠抗人单克隆抗体(CAT:ZA-0267)购自北京中杉生物试剂公司,工作滴度为 1:200;DAB 显色剂、即用型第二代免疫组化 EliVision™ plus 广谱试剂盒(鼠/兔)购自福州迈新生物技术开发有限公司。切片经高温高压抗原修复,并用已知阳性切片同时在同一条件下染色作为阳性对照,用磷酸盐缓冲液(pH=7.4)代替一抗作为阴性对照,染色步骤按照试剂盒说明书进行。

1.2.2 免疫组织化学染色结果判断 在胃黏膜和胃腺癌组织中,MMP-2 表达于细胞质内,以细胞质出现棕黄色颗粒为阳性细胞;VEGFR-3 以细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性细胞。在 100 倍光镜下观察并随机选取上、下、左、右及中间各 5 个视野,综合考虑染色强度和阳性细胞数,采用半定量积分法^[5]判定免疫组织化学染色结果:计算阳性细胞百分数并赋予分值,≤5%为 0 分,6%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,>75%为 4 分;观察着色强度并赋予分值,无着色为 0 分,浅黄着色为 1 分,黄色着色为 2 分,棕黄着色为 3 分。二者相乘,0 分为(-),1~4 分为(+),5~8 分为(++),9~12 分为(+++)。由 2 名富有经验的病理医师独立对免疫组织化学染色结果分别进行评分,对同一病例的评分结果取平均值作为该病例的最终评分。

1.2.3 MVD 肿瘤 MVD 计数参照 Weidner 等^[6]报道的方法进行,计数时只要呈现棕色单个内皮细胞(即 CD34 阳性细胞)或内皮细胞群者,且和邻近的微血管或肿瘤细胞分开,就可将之作为一个微血管。先在低倍镜(×100)下选择 MVD 最高的区域,然后在高倍镜下(×400)计数不同区域的血管数。单红染的内皮细胞或内皮细胞堆积无论有无管腔均参与计数,但管腔较大且有较厚肌层或管腔内有 8 个以上红细胞的血管不计数。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件对数据进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,项目间比较采用 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

在胃黏膜和胃腺癌组织中,MMP-2 阳性表达位于细胞质内,呈棕黄色(封 2 图 1);VEGFR-3 阳性表达位于细胞质内,呈棕黄色颗粒状(封 2 图 2);CD34 阳性内皮细胞在肿瘤组织中形成条状或簇状结构,呈棕黄色(封 2 图 3)。92 例胃腺癌组织标本中,MMP-2、VEGFR-3 阳性表达率分别为 81.5%(75/92)、75.0%(69/92);MVD 值为(47.29±7.6)个/视野。21 例正常胃黏膜组织中,MMP-2、VEGFR-3 阳性表达率分别为 23.8%(5/21)、33.3%(7/21);MVD 值为(18.33±8.4)个/视野。MMP-2、VEGFR-3 在胃腺癌组织中的阳性表达及与 MVD 的相关性见表 1~2。

表 1 正常胃黏膜和胃腺癌组织中 MMP-2、VEGFR-3 的表达与 MVD 值

组别	n	MMP-2 阳性(n)	MVD($\bar{x} \pm s$)	VEGFR-3 阳性(n)
胃腺癌组	92	75*	47.29±7.6*	69*
正常胃黏膜组	21	5	18.33±8.4	7

*: $P < 0.05$,与正常胃黏膜组比较。

表 2 胃腺癌组织中 MMP-2 阳性表达与 MVD 及 VEGFR-3 的相关性

项目	MMP-2 表达		<i>t</i>
	阳性	阴性	
MVD($\bar{x} \pm s$)	49.23±5.8	15.90±5.2	4.6
VEGFR-3 阳性(n)	58	2	8.4

3 讨 论

胃癌是中国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,其高侵袭、转移性往往是治疗失败的主要原因,故及时诊断并阻止其侵袭、转移成为当前研究的热点和难点。然而它又受到多种因素调控,其中涉及肿瘤细胞穿过细胞外基质(extracellular matrix,ECM)屏障、血管基底膜(basement membrane, BM),再进入宿主微环境;正常情况下肿瘤细胞无法通过其间的网状间隙,一旦肿瘤细胞进入间质基质,就可获得远处播散的通道,因此,ECM 的降解是肿瘤细胞生长、侵袭和转移过程中至关重要的一步^[7-8]。IV 型胶原酶是降解细胞外基质主要成分 IV 型胶原的关键酶,具有 2 种分子类型,分别为相对分子质量 72 000 的 MMP-2 和 92 000 的 MMP-9,在肿瘤侵袭和转移的过程中尤以 MMP-2 更为重要^[9]。本研究发现,MMP-2 在胃癌组织中表达显著高于正常胃黏膜组织,伴有淋巴结转移的胃癌组织 MMP-2 表达显著高于无淋巴结转移者($P < 0.05$),TNM 分期中侵及浆膜及浆膜以外的胃癌组织 MMP-2 表达显著高于未侵及浆膜者($P < 0.05$),TNM 分期中,Ⅲ、Ⅳ期胃癌组织 MMP-2 表达显著高于 I、II 期($P < 0.05$),表明 MMP-2 在胃癌组织中表达升高与胃癌细胞向周围组织器官浸润、转移能力相关。Kamata 等^[10]在胃癌转移相关蛋白的研究中也发现 MMP-2 表达与肿瘤有无淋巴结转移、浸润深度和 TNM 分期密切相关;同时,Ahmed 和 Mohammed^[11]通过原位杂交的方法亦检测出直肠癌患者癌块及癌旁组织中 MMP-2 蛋白的表达明显升高,且与肿瘤分化程度、浸润深度、有无淋巴结转移及肿瘤大小密切相关。提示胃癌细胞分泌的 MMP-2 增强了癌细胞在胃组织内和向周围组织侵袭和转移的能力,也与本实验的前期细胞学实验结果相符^[12]。

肿瘤中新形成的血管具有其自身独特的结构特点,主要表现为管壁不完整、无平滑肌成分,仅由有孔的内皮细胞和片状的基膜构成^[13]。因此,恶性实体肿瘤中新生血管的定量被认为是一种重要的独立的预后标志^[6]。CD34 抗原又称人原始造血细胞抗原,是一种表达在正常内皮细胞表面的相对分子质量为(105~120)×10³的跨膜糖蛋白^[14],除 Karposi 肉瘤和血管内皮细胞瘤等少数肿瘤外,绝大多数肿瘤的实质细胞不表达 CD34 抗原,而肿瘤内的间质细胞仅血管内皮细胞表达,这就为使用免疫组织化学染色的方法定量研究肿瘤内血管生成提供了依据。本研究发现,胃癌组织 MVD 明显高于正常胃黏膜组织的 MVD;侵及胃壁深层、突破浆膜层及浆膜以外者 MVD 明显高于未侵及浆膜者,提示新血管内皮细胞释放的促血管生成因子可促进胃癌细胞向深层胃壁浸润,血管发生程度高的胃癌细胞浸润性强、侵袭力大;MMP-2 阳性表达者 MVD 明显高于 MMP-2 阴性表达者,TNM 分期Ⅲ、Ⅳ期患者 MVD 也明显高

于 I、II 期患者。因此, MMP-2 除了可加速基底膜、ECM 的降解外, 还可通过诱导新生血管的生成和血管内皮细胞的迁移来促进肿瘤血管形成和肿瘤侵袭、转移。有研究认为, MMP-2 促进新生血管生成可能是通过合成并释放血管生长相关的多种因子, 如 VEGF、成纤维细胞生长因子受体-1、肿瘤坏死因子、表皮生长因子等途径来完成的。

淋巴管的生成是在已有淋巴管的基础上以出芽方式生长的, 新生淋巴管与新生微血管相对比较稳定, 并且在大小和形式上也变化少^[15]。VEGFR-3 也被称作 flt4, 主要表达在淋巴管内皮细胞, 是第 1 个被克隆的淋巴管内皮标记物。本实验发现, VEGFR-3 主要定位在肿瘤的间质内皮细胞中。肿瘤组织中阳性反应较强, 表明淋巴管密度明显增高, 而在正常胃黏膜组织中反应较弱, 二者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 侵及胃壁深层、突破浆膜层及浆膜以外者 VEGFR-3 的表达明显高于未侵及浆膜者, 有淋巴结转移者 VEGFR-3 的表达明显高于无淋巴结转移者, 低分化组表达明显高于高分化组。MMP-2 阳性表达者 VEGFR-3 亦明显高于 MMP-2 阴性表达者。因此, 高表达 VEGFR-3 的胃癌组织除了通过诱导淋巴管的生成以促进肿瘤细胞的淋巴道转移外, 还可能通过 MMP-2 降解 ECM 为新生淋巴管提供生长空间, 从而为肿瘤生成提供充足营养, 促进肿瘤增殖、分化和迁移。

MMP-2、CD34 和 VEGFR-3 在胃癌组织中的表达明显高于正常胃黏膜组织。胃癌细胞可能通过 MMP-2 侵入小血管和淋巴管而发生转移, 联合检测胃癌组织中的 MMP-2、CD34 和 VEGFR-3 的表达, 可为判断患者预后和制定合理治疗方案提供重要理论依据。

参考文献:

- [1] 秦新裕, 刘凤林. 努力提高胃癌的术后 5 年生存率[J]. 外科理论与实践, 2008, 13(1): 4-6.
- [2] Chambers AF, Matrisian LM. Charting view of the role of matrix metalloproteinase in metastasis[J]. J Natl Cancer Inst, 1997, 89(17): 1260-1270.
- [3] Kimura H, Nakajima T, Kagawa K, et al. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma as evaluated by CD34 immunohistochemistry[J]. Liver, 1998, 18(1): 14-19.
- [4] Breslin JW, Yuan SY, Wu MH, et al. Alters barrier function of cultured lymphatic endothelial cells through a VEGFR-3-dependent mechanism [J]. Lymphat Res Biol, 2007, 5(2): 105-113.
- [5] Reiser-Erkan C, Erkan M, Pan Z, et al. Hypoxia-inducible

proto-oncogene Pim-1 is a prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7(9): 1352-1359.

- [6] Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 1992, 84(24): 1875-1887.
- [7] Shim KN, Jung SA, Joo YH, et al. Clinical significance of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gastric cancer[J]. J Gastroenterology, 2007, 42(2): 120-128.
- [8] Schwartz G. Invasion and metastases in gastric cancer: in vitro and in vivo models with clinical correlations[J]. Semin Oncol, 1996, 23(3): 316-324.
- [9] He Q, Chen J, Lin HL, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, E-cadherin and matrix metalloproteinases-2 in gastric carcinoma and lymph node metastases[J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(17): 1498-1504.
- [10] Kamata I, Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, et al. Significance of lymphatic invasion and cancer invasion-related proteins on lymph node metastasis in gastric cancer[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24(9): 1478-1479.
- [11] Ahmed MM, Mohammed SH. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in situ mRNA expression in colorectal tumors from Iraqi patients[J]. Indian J Pathol Microbiol, 2011, 54(1): 7-14.
- [12] 刘倩, 吴小翎, 罗红春, 等. MMP-2 反义寡核苷酸对人胃癌细胞 SGC7901 增殖和侵袭能力的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(4): 147-151.
- [13] Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal[J]. N Engl J Med, 1986, 315(26): 1650-1659.
- [14] Smilek P. Molecular predictors in head and neck tumours [J]. Klin Onkol, 2010, 23(4): 218-223.
- [15] Anthony JP, Foster RD, Price DC, et al. Lymphatic regeneration following microvascular limb replantation: a qualitative and quantitative animal study[J]. Reconstr Microsurg, 1997, 13(5): 327-330.

(收稿日期: 2011-12-29 修回日期: 2012-01-24)

《重庆医学》——中文核心期刊, 欢迎投稿, 欢迎订阅!