

· 论 著 ·

乳腺癌组织 MT1-MMP 表达与淋巴管生成的关系*

姚广裕¹, 何 萍², 杨名添³, 刘民锋¹, 叶长生^{1△}

(1. 南方医科大学南方医院乳腺中心, 广州 510515; 2. 广州医学院第一附属医院病理科, 广州 510120;
3. 中山大学附属肿瘤医院乳腺科, 广州 510515)

摘 要:目的 通过分析乳腺癌组织中膜型基质金属蛋白酶-1(MT1-MMP)表达与血管内皮生长因子 C(VEGF-C)、微淋巴管密度(LMVD)的关系, 提供 MT1-MMP 参与乳腺癌淋巴管生成的证据。**方法** 采用免疫组织化学方法检测 87 例乳腺癌组织中 MT1-MMP、VEGF-C 和 D2-40 的表达, 分析 MT1-MMP 与 VEGF-C、LMVD 的关系及其与腋窝淋巴结转移的相关性。**结果** MT1-MMP、VEGF-C 的阳性表达以及肿瘤的淋巴管的高密度与腋窝淋巴结转移的增加相关。MT1-MMP 阳性的患者中 VEGF-C 的阳性率明显高于 MT1-MMP 阴性的患者(86.0% vs 43.2%, $P=0.000$)。MT1-MMP 阳性的患者中 LMVD 的平均值明显高于 MT1-MMP 阴性的患者(30.2 个 vs 25.1 个, $P=0.000$)。**结论** MT1-MMP 与乳腺癌淋巴管生成和淋巴结转移关系密切, 是参与乳腺癌淋巴管生成的重要因子。

关键词:膜型基质金属蛋白酶-1; 血管内皮生长因子 C; 微淋巴管密度; 乳腺肿瘤

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.24.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)24-2459-03

Relationship between MT1-MMP and Lymphangiogenesis in breast cancer*

Yao Guangyu¹, He Ping², Yang Mingtian³, Liu Minfeng¹, Ye Changsheng^{1△}

(1. Breast Center, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 2. Department of Pathology, First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510120, China;
3. Department of Breast Surgery, Cancer Center of Sun Yet-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

Abstract: **Objective** To investigate evidence of MT1-MMP involved in breast cancer lymphangiogenesis process, we study the correlation between expressions of MT1-MMP and VEGF-C, LMVD in breast cancer. **Methods** The expressions of MT1-MMP, VEGF-C and D2-40 in 87 patients with breast cancer were detected by immunohistochemical method, and the relationship between MT1-MMP, VEGF-C, LMVD and axillary lymph node metastasis were analyzed. **Results** MT1-MMP, VEGF-C positive expression and high LMVD were associated axillary lymph node metastasis. The positivity rate of VEGF-C was significantly higher in MT1-MMP positive patients than that in MT1-MMP negative ones(86.0% vs 43.2%, $P<0.01$). The LMVD was significantly higher in MT1-MMP positive patients than that in MT1-MMP negative ones(30.2 vs 25.1, $P<0.01$). **Conclusion** The expressions of MT1-MMP is closely related to lymphangiogenesis and lymph node metastasis in breast cancer, and may be an important factor involved in breast cancer lymphangiogenesis.

Key words: MT1-MMP; VEGF-C; LMVD; breast cancer

尽管淋巴道转移是乳腺癌最常见的转移途径之一, 但是, 淋巴道转移的机制目前还未完全清楚。近来, 肿瘤新生淋巴管的发现使人们对乳腺癌淋巴道转移的机制有了新的认识——肿瘤的新生淋巴管在肿瘤的淋巴道转移中可能起着主导的作用^[1]。现在研究认为, 乳腺癌组织内新的淋巴管主要是肿瘤细胞分泌的血管内皮生长因子 C(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)诱导形成的^[2]。但由于缺乏淋巴管特异性标记物, 对肿瘤淋巴管的研究相对缓慢。单克隆抗体 D2-40 是新近发现的淋巴管内皮细胞特异性标记物, 可以用于观察乳腺癌的新生淋巴管^[3]。另外, Boardman 和 Swartz^[4]在实验中发现, 在淋巴管形成过程中, 淋巴管将要延伸的下游位置胶原发生降解, 他认为胶原溶解的主要酶类是基质金属蛋白酶。本文拟通过分析基质金属蛋白酶中最重要的成员之一——膜型基质金属蛋白酶-1(membrane type-1 MMP, MT1-MMP)与 VEGF-C、淋巴管密度的关系, 提供 MT1-MMP 参与乳腺癌淋巴管生成的证据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集南方医科大学南方医院 2009 年 10 月至

2011 年 1 月收治的乳腺癌患者 87 例。所有患者均为女性, 中位年龄 47 岁。根据患者临床状况行乳腺癌改良根治术、乳腺癌保留乳房手术, 均有完整的术后病理资料。

1.2 方法 免疫组化所用的 MT1-MMP 和 VEGF-C 一抗为 NeoMarkers 公司的兔抗人单克隆抗体, D2-40 一抗为杭州华安生物技术有限公司即用型鼠抗人单克隆抗体, 二抗试剂盒为福建迈新公司的 SP 超敏试剂盒。

所有标本均经 10% 中性甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μm 连续切片, 行病理常规染色检查及免疫组化研究。免疫组化染色采用 SP 法, 抗原经高压修复, 实验步骤按照试剂说明书操作, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

免疫组织化学检测结果判断: MT1-MMP 免疫组化阳性染色为棕黄色颗粒, 位于肿瘤细胞胞膜; VEGF-C 阳性颗粒呈棕黄色, 位于肿瘤细胞胞质。每张切片随机选取 5 个高倍视野, 按阳性细胞所占百分比评分, 定义阳性细胞大于 10% 者为阳性病例, 阳性细胞小于 10% 者为阴性病例。

标记微淋巴管密度(LMVD)判定采用 Choi 等^[5]报道的方法: D2-40 染色呈阳性染色的单个内皮细胞或内皮细胞簇分别

计为一个阳性微淋巴管,管腔大于 8 个红细胞直径或有血管平滑肌的管状结构不计入内。乳腺癌组织先在低倍镜(×40)视野下分别选取肿瘤边缘和肿瘤中心区中脉管最丰富的两个区域即“热点”,再在高倍镜(×400)下分别计数微淋巴管数目,每例计数 3 个视野,取其均值作为 LMVD。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行分析处理,计数资料分析采用 χ^2 检验,计量资料分析采用 t 检验,相关性分析采用 Pearson 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MT1-MMP、VEGF-C、D2-40 在乳腺癌组织中的表达 采用免疫组化方法检测乳腺癌组织中 MT1-MMP 蛋白的表达,其阳性率为 56.3%,阳性染色定位于肿瘤细胞(封 2 图 1)。VEGF-C 阳性率为 67.8%,颗粒呈棕黄色,位于肿瘤细胞胞质(封 2 图 2)。87 例乳腺癌组织中均可看到不同程度的 D2-40 阳性表达,阳性染色定位于淋巴管内皮细胞胞质和(或)胞浆并呈棕黄色颗粒(封 2 图 3)。

2.2 MT1-MMP、VEGF-C、LMVD 与乳腺癌腋窝淋巴结转移的关系 MT1-MMP 阴性的患者,腋窝淋巴结转移率为 59.5%,而 MT1-MMP 阳性的患者腋窝淋巴结转移率为 82.0%,差异有统计学意义($P=0.025$),二者的相关系数为 0.3($P=0.005$)。VEGF-C 阴性的患者,腋窝淋巴结转移率为 46.4%,而 VEGF-C 阳性的患者腋窝淋巴结转移率为 84.7%,差异有统计学意义($P=0.002$),二者的相关系数为 0.394($P=0.000$)。而且由表 1 也可以看出,随着腋窝淋巴结数目转移增多,肿瘤的淋巴管密度也明显增加($P=0.000$)。

表 1 MT1-MMP、VEGF-C、LMVD 与乳腺癌腋窝淋巴结转移的关系

项目	腋窝淋巴结分期				P
	N0	N1	N2	N3	
MT1-MMP(%)	— 15(40.5)	9(24.3)	12(32.4)	1(2.7)	0.025★
	+	9(18.0)	12(24.0)	20(40.0)	
VEGF-C(%)	— 15(53.6)	6(21.4)	6(21.4)	1(3.6)	0.002★
	+	9(15.3)	15(25.4)	26(44.1)	
LMVD($\bar{x}\pm s$)	19.8±2.2	25.8±2.5	32.5±3.4	38.2±2.3	0.000◆

★: χ^2 检验;◆: t 检验。

2.3 MT1-MMP 与 VEGF-C、LMVD 的关系 免疫组化结果显示,MT1-MMP 阳性的患者中 VEGF-C 的阳性率为 86.0%,而 MT1-MMP 阴性的患者中 VEGF-C 的阳性率为 43.2%,差异有统计学意义($P=0.000$),二者的相关系数为 0.452($P=0.000$)。MT1-MMP 阳性的患者中 LMVD 的平均值为 30.2 个,而 MT1-MMP 阴性的患者中 LMVD 的平均值为 25.1 个,差异有统计学意义($P=0.000$),二者的相关系数为 0.368($P=0.000$),见表 2。

表 2 MT1-MMP 与 VEGF-C、D2-40 的关系

项目	MT1-MMP		P
	—	+	
VEGF-C(%)	— 21(56.8)	7(14.0)	0.000
	+	16(43.2)	
LMVD($\bar{x}\pm s$)	25.1±5.7	30.2±6.9	0.000

3 讨 论

基础和临床研究都表明,肿瘤新生淋巴管是促进乳腺癌癌细胞淋巴道转移的主要因素^[6-7]。目前研究表明,肿瘤促使淋

巴管新生是肿瘤细胞分泌的生长因子调控的,主要是 VEGF-C。VEGF-C 与淋巴上皮细胞表面的受体 VEGFR3 结合后,通过酪氨酸激酶信号系统发挥作用,促进淋巴管上皮的增生、迁移和新的淋巴管形成^[8-9]。目前,很多研究都显示无论是乳腺癌、肺癌、甲状腺癌还是胃癌、食道癌和大肠癌,肿瘤内新生淋巴管标记物的表达都与淋巴结转移相关^[6-7,10-13]。本研究也提示,乳腺癌中肿瘤细胞 VEGF-C 的表达与腋窝淋巴结转移呈正相关。

然而,VEGF-C 的作用是使肿瘤周围已经存在的淋巴管上皮增生、出芽、形成管状结构。但是,新生的淋巴管如何同周围基质构建新的组织,并最终使新生淋巴管成为肿瘤内间质的组成部分呢?这就涉及基质的降解和重建,目前在新生淋巴管的研究中,对于基质的变化关注尚不多见。

基质降解和重建首先是一个基质组分的酶解过程,参与这一过程的主要酶类是基质金属蛋白酶家族(matrix metalloproteinases, MMPs),其中 MT1-MMP 在肿瘤基质代谢中的作用最受关注。MT1-MMP 通过跨膜结构域固定于细胞膜表面发挥作用,不仅可以直接降解诸如胶原、纤维结合蛋白等基质组分,而且可以激活 MMP-2 降解多种基质成分。在实验中还证实,MT1-MMP 降解基质主要是通过一种机制^[14]。

那么,MT1-MMP 是否参与乳腺癌淋巴管新生过程呢?本研究从免疫组化的层面分析了这一关系。研究发现,免疫组化结果显示,MT1-MMP 阳性的患者中 VEGF-C 的阳性率明显高于 MT1-MMP 阴性的患者(86.0% vs 43.2%, $P=0.000$)。MT1-MMP 阳性的患者中 LMVD 的平均值明显高于 MT1-MMP 阴性的患者(30.2 个 vs 25.1 个, $P=0.000$)。这一结果说明,在 LMVD 高的肿瘤中,即在新生淋巴管活跃的肿瘤中,不仅 VEGF-C 表达高,而且 MT1-MMP 表达也高。这就提示,MT1-MMP 参与了新生淋巴管的生成过程。

目前,国内外关于 MT1-MMP 是否参与乳腺癌淋巴管新生过程仅在 Nisato 等^[15]的研究中稍有暗示,他们在体外淋巴上皮三维培养过程中,可以检测到 MT1-MMP mRNA 的表达增加。但是,Nisato 等^[15]研究并非设计研究 MT1-MMP 与乳腺癌新生淋巴管的关系,因此,尚不足以回答 MT1-MMP 是否参与新生淋巴管的生成过程这个问题。但是,可以推测,在恶性肿瘤淋巴道转移过程中,肿瘤细胞可以同时促进 VEGF-C 和 MT1-MMP 的表达,此时 VEGF-C 可以促进淋巴管上皮的增生、迁移,而 MT1-MMP 则通过降解肿瘤周围的间质,为新的淋巴管延伸清除基质屏障,从而共同促进新生淋巴管形成,促使肿瘤细胞转移。

恶性肿瘤的浸润和转移是一个非常复杂的过程。本研究从免疫组化着手,初步探讨 MT1-MMP 与淋巴管生成的关系。今后的研究应更加深入的研究 MT1-MMP 和 VEGF-C 的关系以及 MT1-MMP 参与肿瘤淋巴管生成的机制。

参考文献:

[1] Jackson DG, Prevo R, Clasper S, et al. LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis[J]. Trends Immunol, 2001, 22(6): 317-321.

[2] Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(8): 3566-3570.

[3] Walgenbach-Bruenagel G, Tolba RH, Varnai AD, et al. Detection of lymphatic invasion in early stage primary

- colorectal cancer with the monoclonal antibody D2-40[J]. *Eur Surg Res*, 2006, 38(5): 438-444.
- [4] Boardman KC, Swartz MA. Interstitial flow as a guide for lymphangiogenesis[J]. *Circ Res*, 2003, 92(7): 801-808.
- [5] Choi WW, Lewis MM, Lawson D, et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression[J]. *Mod Pathol*, 2005, 18(1): 143-152.
- [6] Tsutsui S, Matsuyama A, Yamamoto M, et al. The Akt expression correlates with the VEGF-A and -C expression as well as the microvessel and lymphatic vessel density in breast cancer[J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(3): 621-630.
- [7] Wu M, Han L, Shi Y, et al. Development and characterization of a novel method for the analysis of gene expression patterns in lymphatic endothelial cells derived from primary breast tissues[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(6): 863-872.
- [8] 周红兵, 张秀忠, 任泽强. 中期因子与血管内皮生长因子 C 在胰腺肿瘤组织中的表达及其意义[J]. *重庆医学*, 2011, 40(17): 1725-1727.
- [9] Ran S, Volk L, Hall K, et al. Lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer[J]. *Pathophysiology*, 2010, 17(4): 229-251.
- [10] Zhong D, Li Y, Peng Q, et al. Expression of Tiam1 and VEGF-C correlates with lymphangiogenesis in human colorectal carcinoma[J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(8): 689-695.
- [11] Gou HF, Chen XC, Zhu J, et al. Expressions of COX-2 and VEGF-C in gastric cancer: correlations with lymphangiogenesis and prognostic implications[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30(4): 14-19.
- [12] Feng Y, Wang W, Hu J, et al. Expression of VEGF-C and VEGF-D as significant markers for assessment of lymphangiogenesis and lymph node metastasis in non-small cell lung cancer[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2010, 293(5): 802-812.
- [13] Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, et al. Lymph vessel density correlates with nodal status, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2005, 91(2): 125-132.
- [14] 姚广裕, 曾木圣, 林鹏, 等. 膜型基质金属蛋白酶-1 对乳腺癌细胞浸润能力的影响[J]. *中华肿瘤杂志*, 2006, 28(9): 650-653.
- [15] Nisato RE, Harrison JA, Buser R, et al. Generation and characterization of telomerase-transfected human lymphatic endothelial cells with an extended life span[J]. *Am J Pathol*, 2004, 165(1): 11-24.

(收稿日期: 2011-10-22 修回日期: 2012-02-16)

(上接第 2458 页)

- growth factor injected systemically improves the recovery of the inferior alveolar nerve in a rabbit model of mandibular distraction osteogenesis[J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2011, 49(7): 557-561.
- [2] Hannila SS, Kawaja MD. Nerve growth factor-mediated collateral sprouting of central sensory axons into deafferented regions of the dorsahorn is enhanced in the absence of the p75 neurotrophin receptor[J]. *J Comp Neuro*, 2005, 486(4): 331-343.
- [3] 黄家俊, 罗华. 神经生长因子促进中枢神经系统损伤后神经再生的作用机制[J]. *医学综述*, 2008, 14(3): 330-332.
- [4] Okuma Y, Nomura Y. Senescence-accelerated mouse (SAM) as an animal model of senile dementia: pharmacological, neurochemical and molecular biological approach[J]. *Jpn J Pharmacol*, 1998, 78(4): 399-404.
- [5] Nomura Y, Okuma Y. Age-related defects in lifespan and learning ability in SAMP8 mice[J]. *Neurobiol Aging*, 1999, 20(2): 111-115.
- [6] Tirassa P, Manni L, Aloe L, et al. Cholecystokinin-8 and nerve growth factor: two endogenous molecules working for the upkeep and repair of the nervous system[J]. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2002, 1(5): 495-510.
- [7] 方煌, 罗永湘. 神经生长因子研究近况[J]. *中华手外科杂志*, 1995, 9(Suppl 11): 64-67.
- [8] Yan Q, Johnson EM. An immunohistochemical study of the nerve growth factor receptor in developing rats[J]. *J Neurosci*, 1988, 8(9): 3481-3498.
- [9] Defoumy L, Lallemand F, Malgrange B. Structure and development of cochlear afferent innervation in mammals[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 301(4): C750-C761.
- [10] Zhang L, Jiang H, Hu Z. Concentration-dependent effect of nerve growth factor on cell fate determination of neural progenitors[J]. *Stem Cell Dev*, 2011, 20(10): 1723-1731.
- [11] Park SN, Back SA, Choung YH, et al. Alpha-synuclein deficiency and efferent nerve degeneration in the mouse cochlea: A possible cause of early-onset presbycusis[J]. *Neurosci Res*, 2011, 71(3): 303-310.
- [12] Seidman MD, Ahmad N, Bai U. Molecular mechanisms of age-related hearing loss[J]. *Ageing Res Rev*, 2002, 1(3): 331-343.
- [13] 刘强和, 罗香林, 耿宛平, 等. 快速老化小鼠的听功能和耳蜗螺旋神经元的增龄性变化[J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2008, 22(3): 215-221.
- [14] 刘强和, 罗香林, 耿宛平, 等. 快速老化小鼠的听功能和耳蜗毛细胞的增龄性变化[J]. *华夏医学*, 2008, 21(2): 213-215.
- [15] Menardo J, Tang Y, Ladrech S, et al. Oxidative stress, inflammation and autophagic stress as the key mechanisms of premature age-related hearing loss in SAMP8 mouse cochlea[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011: [Epub ahead of print].

(收稿日期: 2011-11-14 修回日期: 2012-02-16)