

## Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 在原发性肝癌中的表达与临床意义

刘敏<sup>1</sup>, 曾霞<sup>2△</sup>, 侯恩存<sup>1</sup>, 王树声<sup>3</sup>

(1. 广西中医药大学附属瑞康医院肿瘤二科, 南宁 530011;

2. 广西医科大学免疫学教研室, 南宁 530021; 3. 广西疾病预防控制中心, 南宁 530028)

**摘要:**目的 探讨原发性肝癌中磷脂酰肌醇蛋白聚糖(Glypican3)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和基质金属蛋白酶-14(MMP-14)的表达特征,关注其在肿瘤发生、发展和转移中的作用。方法 本试验以 102 例原发性肝癌作为观察组,以 80 例正常肝组织作为对照组,采用免疫组织化学方法检测两组中 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 的表达,探讨 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 在不同临床病理特征中的表达差别及相关性。结果 观察组中 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 表达的阳性率明显高于对照组,观察组中 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 表达的阳性率与肿瘤体积、分化程度、淋巴结转移、脉管浸润、被膜侵犯和增殖细胞核抗原的表达密切相关。相关性分析显示观察组中 Glypican3 和 MMP-9、Glypican3 和 MMP-14、MMP-9 和 MMP-14 的表达均呈正相关性( $r=0.48, P=0.0241$ ;  $r=0.46, P=0.0132$ ;  $r=0.43, P=0.0313$ )。生存分析显示 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 的表达与预后相关。结论 原发性肝癌组织中 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 高表达,在肿瘤进展中有明显的促进作用,术后检测 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 的表达对判断原发性肝癌的预后有一定价值。

**关键词:**肝肿瘤;磷脂酰肌醇蛋白聚糖类;基质金属蛋白酶 9;基质金属蛋白酶 14;预后

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.02.016

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)02-0173-04

## Expressions and clinical significance of Glypican3, MMP-9 and MMP-14 in primary hepatocellular carcinoma

Liu Min<sup>1</sup>, Zeng Xia<sup>2△</sup>, Hou Encun<sup>1</sup>, Wang Shusheng<sup>3</sup>

(1. Second Department of Oncology, Affiliated Ruikang Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530011, China; 2. Teaching and Research Section of Immunology, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 3. Guangxi Center for Disease Control and Prevention, Nanning, Guangxi 530028, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression characteristics of Glypican3, MMP-9 and MMP-14 in primary hepatocellular carcinoma, and to focus on their roles on the development, progress and metastasis of tumor. **Methods** 102 cases of primary hepatocellular carcinoma were taken as the observation group and 80 cases of normal liver tissues as the control group. The expressions of Glypican3, MMP-9 and MMP-14 were detected by the immunohistochemistry method and their expression difference in different clinicopathological characteristics and the correlation were investigated. **Results** The positive rates of Glypican3, MMP-9 and MMP-14 expressions in the observation group were significantly higher than those in the control group. The positive rates of Glypican3, MMP-9 and MMP-14 expressions were closely correlated with the tumor volume, differentiation degree, lymph node metastasis, vessel infiltration, membrane invasion and PCNA expression. The correlation analysis showed that the positive relationships were found between Glypican3 and MMP-9, between Glypican3 and MMP-14 and between MMP-9 and MMP-14 in the observation group ( $r=0.48, P=0.0241$ ;  $r=0.46, P=0.0132$ ;  $r=0.43, P=0.0313$ ). The survival analysis showed that expressions of Glypican3, MMP-9 and MMP-14 were correlated with the patient's prognosis. **Conclusion** The higher-expressions of Glypican3, MMP-9 and MMP-14 may promote the occurrence and development of primary hepatocellular carcinoma. Detecting the postoperative expressions of Glypican3, MMP-9 and MMP-14 has certain value to judge the prognosis in primary hepatocellular carcinoma.

**Key words:** liver neoplasms; Glypicans; matrix metalloproteinase 9; matrix metalloproteinase 14; prognosis

肿瘤的生物行为包括生长、浸润、转移,三者均是恶性肿瘤患者死亡的重要原因,约 90% 患者死于肿瘤的侵袭和转移。原发性肝癌病变进展快,均表现为迅速发展的肿瘤生物学过程。磷脂酰肌醇蛋白聚糖(Glypican)是由蛋白质、脂质和糖三者共价连接的复杂糖复合物,能和多种细胞外的生长和转移因子相结合发挥生物学作用,Glypican-3 是家族的重要成员<sup>[1-2]</sup>。基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和基质金属蛋白酶-14(MMP-14)均为细胞外基质中降解重要的酶,其阳性表达时显示细胞外基质的降解作用明显,且对促进肿瘤的进展有重要作用<sup>[3]</sup>。

Glypican-3 对基质金属蛋白酶家族(MMPs)有明显的激活作用,对细胞外基质形成有效地降解,引起肿瘤细胞的迁移。本文关注原发性肝癌中 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 的表达,关注其相关性及对预后的判断价值,以期临床工作提供支持。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2008 年 1 月至 2009 年 12 月行原发性肝癌根治手术后留取的蜡块组织作为观察组,纳入均符合 WHO 关于肝癌的诊断标准。本组共观察 102 例,其中男 52

例,女 50 例,年龄 45~79 岁,平均(60.3±6.5)岁。其中胆管癌 53 例,肝细胞癌 49 例。选取切端正常的肝组织 80 例作为对照组,其中男 40 例,女 40 例,年龄 46~78 岁,平均(59.8±7.6)岁。两组一般临床资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。

## 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学检测 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 蛋白的表达** Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 蛋白的浓缩液均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。按不同比例进行预实验,选择最佳配比浓度进行正式实验。采用免疫组织化学技术 SP 法检测组织中 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 蛋白的表达,严格试验步骤,并由同一技师操作,减少误差,严格质控。

**1.2.2 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 蛋白检测结果的判定方法** 实验结果以细胞质中 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 蛋白出现均匀棕黄色颗粒为阳性细胞,每张切片选择 10 个 400 倍的高倍视野,取其平均值作为样本最终的阳性表达率,以阳性细胞大于或等于 25%定为阳性,以阳性细胞小于 25%定为阴性。计算组间阳性率的差别。

**1.3 统计学处理** 数据均采用 SAS6.12 进行分析,分别应用

$\chi^2$  检验、相关分析和生存分析,均以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 观察组与对照组中 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 蛋白表达阳性率的比较** Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 在观察组与对照组中的表达差异有统计学意义,即三者观察组中表达的阳性率明显高于对照组,见表 1。

**2.2 观察组中不同临床特征患者 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 蛋白表达阳性率的比较** 观察组中 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 的表达在不同肿瘤体积、分化程度、淋巴结转移、脉管浸润、被膜侵犯和增殖细胞核抗原(PCNA)的表达中差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 2。

**2.3 观察组中 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 表达的相关性分析** 对观察组中 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 的表达进行线性相关性分析,结果显示 Glypican3 和 MMP-9( $r=0.48$ ,  $P=0.024$  1)、Glypican3 和 MMP-14( $r=0.46$ ,  $P=0.013$  2)、MMP-9 和 MMP-14( $r=0.43$ ,  $P=0.031$  3)的表达均呈正相关,见图 1~3。

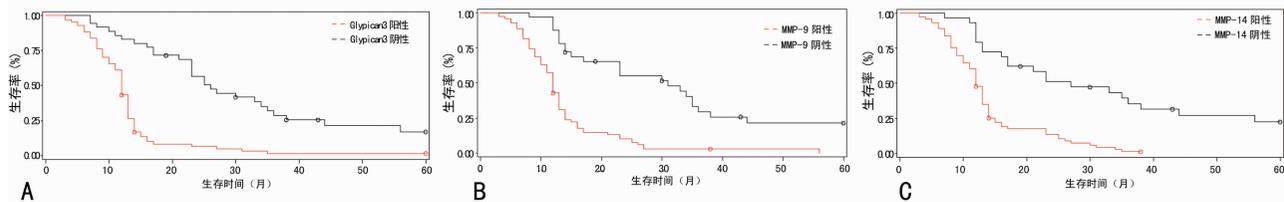
表 1 观察组与对照组中 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 蛋白表达阳性率的比较[n(%)]

组别	n	Glypican3		$\chi^2$	P	MMP-9		$\chi^2$	P	MMP-14		$\chi^2$	P
		阳性	阴性			阳性	阴性			阳性	阴性		
观察组	102	67(65.69)	35(34.31)	44.479 8	<0.01	70(68.63)	32(31.37)	38.200 6	<0.01	73(71.57)	29(28.43)	36.872 7	<0.01
对照组	80	13(16.25)	67(83.75)			18(22.50)	62(77.50)			21(26.25)	59(73.75)		

表 2 观察组中不同临床特征患者 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 蛋白表达阳性率的比较[n(%)]

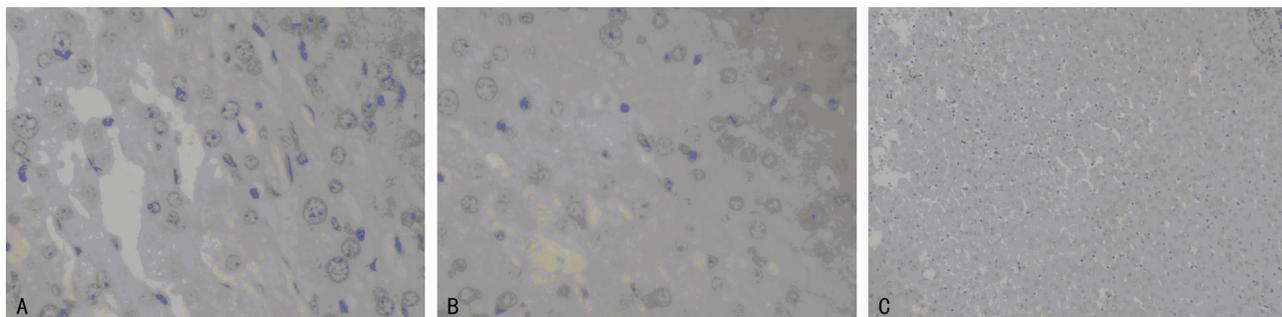
临床病理特征	n	Glypican3		MMP-9		MMP-14	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
肿瘤体积(cm)							
<3	42	18(42.86)	24(57.14)	20(47.62)	22(52.38)	24(57.14)	18(42.86)
≥3	60	49(81.67)*	11(18.33)	50(83.33)*	10(16.67)	49(81.67)*	11(18.33)
分化程度							
高	43	18(41.86)	25(58.14)	21(48.84)	22(51.16)	23(53.49)	20(46.51)
中+低	59	49(83.05)*	10(16.95)	49(83.05)*	10(16.95)	50(84.75)*	9(15.25)
淋巴结转移							
无	62	34(54.84)	28(45.16)	37(59.68)	25(40.32)	39(62.90)	23(37.10)
有	40	33(82.50)*	7(17.50)	33(82.50)*	7(17.50)	34(85.00)*	6(15.00)
脉管浸润							
无	67	39(58.21)	28(41.79)	41(61.19)	26(38.81)	43(64.18)	24(35.82)
有	35	28(80.00)*	7(20.00)	29(82.86)*	6(17.14)	30(85.71)*	5(14.29)
被膜侵犯							
无	68	39(57.35)	29(42.65)	41(60.29)	27(39.71)	44(64.71)	24(35.29)
有	34	28(82.35)*	6(17.65)	29(85.29)*	5(14.71)	29(85.29)*	5(14.71)
PCNA 表达(%)							
<25	57	31(54.39)	26(45.61)	33(57.89)	24(42.11)	36(63.16)	21(36.84)
≥25	45	36(80.00)*	9(20.00)	37(82.22)*	8(17.78)	37(82.22)*	8(17.78)

\*:  $P<0.05$ ,与对应临床病理特征项比较。



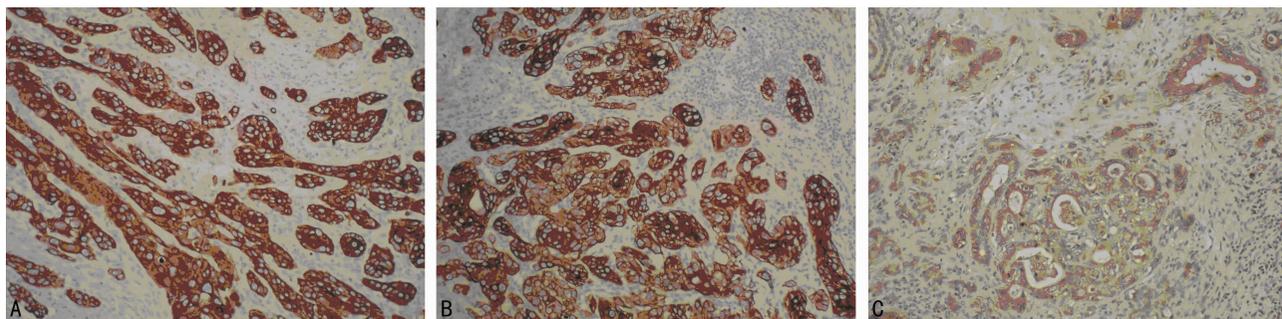
A: Glypican3; B: MMP-9; C: MMP-14。

图 1 Glypican3、MMP-9、MMP-14 的表达与原发肝癌生存的关系



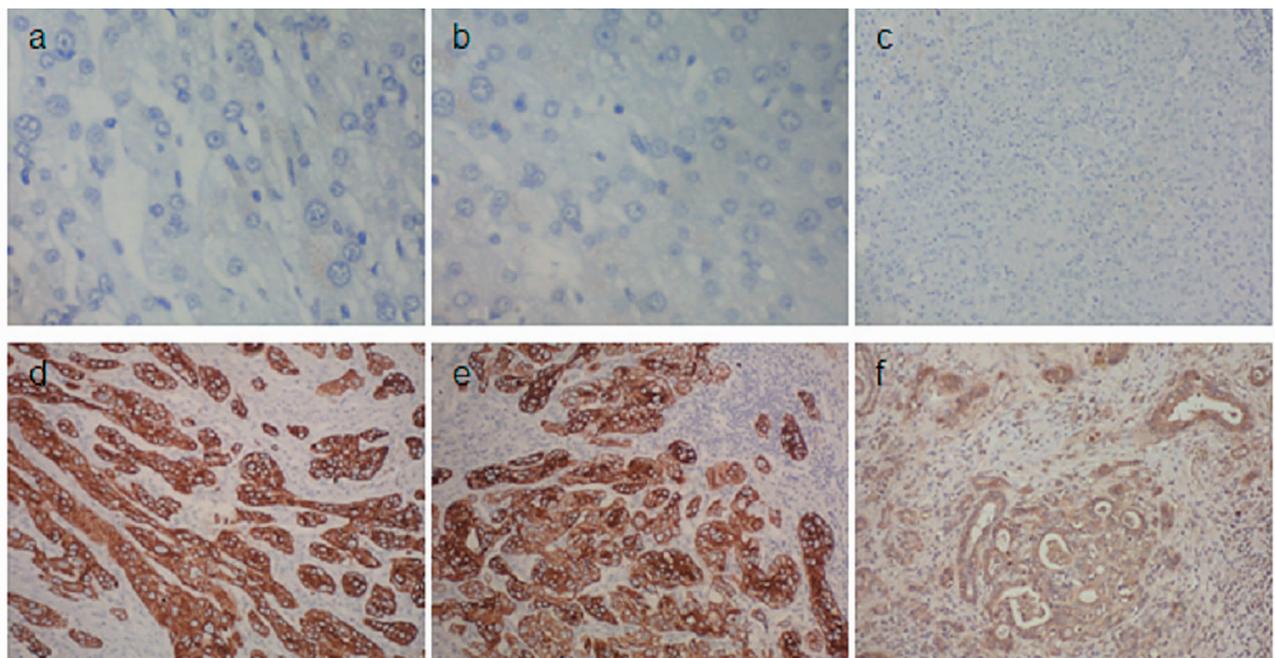
A: Glypican3 在正常肝细胞中阴性表达; B: MMP-9 在正常肝细胞中阴性表达; C: MMP-14 在正常肝细胞中阴性表达。

图 2 Glypican3、MMP-9、MMP-14 在正常肝细胞中表达



A: Glypican3 在原发肝癌中阳性表达; B: MMP-9 在原发肝癌中阳性表达; C: MMP-14 在原发肝癌中阳性表达。

图 3 Glypican3、MMP-9、MMP-14 在原发肝癌中表达



a: 对照组 Glypican3 染色(×400); b: 对照组 MMP-9 染色(×400); c: 对照组 MMP-14 染色(×400); d: 观察组 Glypican3 染色(×400); e: 观察组 MMP-9 染色(×400); f: 观察组 MMP-14 染色(×400)。

图 4 各组 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 染色情况

**2.4** 观察组中 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 表达的生存分析 本组患者随访时间为 3~60 个月,平均 18.9 个月。经检验,原发性肝癌中 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 的表达均与患者预后相关( $P < 0.05$ ),即 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 高表达患者的预后差。见图 4。

### 3 讨 论

恶性肿瘤发生发展过程与多基因和多蛋白的变化有关<sup>[4-5]</sup>。Glypican-3 在肿瘤中的作用是影响不同的生长因子信号,其不仅可以结合细胞黏附分子和细胞外基质相关的因子,还可以调节细胞的增殖和分化<sup>[6-7]</sup>。而 MMPs 是一组在结构上具有很大的同源性,并能有效地降解细胞外基质的蛋白质,MMP-9 和 MMP-14 是 MMPs 的重要成员,其发挥作用时能够在细胞的表面对 MMP-2 有效地激活,并促进 MMPs 家族其他因子的活化,共同降解细胞外基质的作用<sup>[8-9]</sup>。Glypican3 的功能是通过上调自分泌/旁分泌经典 Wnt 信号通路刺激细胞的生长,Glypican3 通过 Wnt 信号转导途径调控肿瘤细胞的迁移、黏附及细胞骨架的形成,也有观点认为 Glypican3 可以调控基质金属蛋白的活性,Glypican3 通过多糖硫酸链与 MMP-9 结合促进恶性肿瘤细胞发生转移<sup>[7]</sup>。因此 Glypican-3 对肿瘤转移的主要机制可能与活化 MMPs 并有效地降解细胞外基质有关。

本研究中所应用的是较为成熟的免疫组织化学技术,结果准确、客观,说服力强。本试验结果显示原发性肝癌中 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 表达的阳性率明显高于正常肝组织,提示 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 蛋白对肿瘤的发生和发展有明显的促进作用,即 3 种蛋白参与了肿瘤形成过程,由于 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 高表达,类似癌基因的作用,其实是 3 种蛋白调节细胞间的物质代谢,进而使细胞间、基质间的信息传递出现失控性增生和分化成熟障碍,引起肿瘤的进展<sup>[10-11]</sup>。实验结果显示 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 之间呈正相关性,提示 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 可能具有正向协同效应,即 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 共同促进原发性肝癌的进展。试验结果显示观察组中 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 的表达在不同肿瘤体积、分化程度、淋巴结转移、脉管浸润、被膜侵犯和 PCNA 的表达中差别有统计学意义,提示 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 参与到肿瘤的生长、分化及转移中。由于 PCNA 反应的是细胞的增殖程度,因此 3 种蛋白也可能与细胞增殖有一定关系。由于以上因素均与肿瘤的预后相关,因此检测 3 者可能对判断预后具有重要价值,而生存分析直接证实了此结论,即原发性肝癌患者组织中 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 高表达时,患者的预后差。近年相关研究也显示 MMP-9 和 MMP-14 可以促进血管内皮生因子为代表的血管生成,促进肿瘤血管的新生,而 Glypican3 对血管内皮生因子也有明显的调节作用<sup>[12-13]</sup>。因此 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 对肿瘤发生发展的促进作用也可能是以血管内皮生长因子作为中介因子,调节二者的关系及协同性。

总之,原发性肝癌组织中 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 高表达,在肿瘤进展中有明显的促进作用,术后检测 Glypican3、MMP-9 和 MMP-14 的表达对判断原发性肝癌的预后有一定价值。

### 参考文献:

- [1] Timek DT, Shi J, Liu H, et al. Arginase-1, HepPar-1, and glypican-3 are the most effective panel of markers in distinguishing hepatocellular carcinoma from metastatic tumor on fine-needle aspiration specimens[J]. *Am J Clin Pathol*, 2012, 138(2): 203-210.
- [2] Zhang L, Liu H, Sun L, et al. Glypican-3 as a potential differential diagnosis marker for hepatocellular carcinoma: a tissue microarray-based study[J]. *Acta Histochem*, 2012, 114(6): 547-552.
- [3] 刘爱东, 李青, 要瑞莉, 等. MMP-14 mRNA 在胃腺癌中的表达及意义[J]. *重庆医学*, 2012, 41(5): 439-441.
- [4] Dedes PG, Gialeli Ch, Tsonis AI, et al. Expression of matrix macromolecules and functional properties of breast Cancer cells are modulated by the bisphosphonate zoledronic acid[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820(12): 1926-1939.
- [5] Fjeldstad K, Kolset SO. Decreasing the metastatic potential in cancers—targeting the heparan sulfate proteoglycans [J]. *Curr Drug Targets*, 2005, 6(6): 665-682.
- [6] Li L, Jin R, Zhang X, et al. Oncogenic activation of glypican-3 by c-Myc in human hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2012, 56(4): 1380-1390.
- [7] 吴飞翔, 黄山, 马良, 等. 肝癌细胞中与 glypican3 相关的信号转导分子表达分析[J]. *中国肿瘤*, 2011, 20(7): 521-524.
- [8] Zarrabi K, Dufour A, Li J, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase 14 (MMP-14)-mediated Cancer cell migration [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(38): 33167-33177.
- [9] Koyama Y, Naruo H, Yoshitomi Y, et al. Matrix metalloproteinase-9 associated with heparan sulphate chains of GPI-anchored cell surface proteoglycans mediates motility of murine colon adenocarcinoma cells [J]. *J Biochem*, 2008, 143(5): 581-592.
- [10] 缪辉来, 谢贵林, 温继育, 等. Glypican-3 蛋白在肝细胞癌患者血清和组织中的表达及意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(21): 2311-2315.
- [11] 刘湘林, 龚燕飞, 方谷芬. 肝细胞癌患者血清中 Glypican-3 蛋白的表达及与 AFP 联合检测意义[J]. *实用预防医学*, 2009, 16(2): 562-564.
- [12] Hav M, De Potter A, Ferdinande L, et al. Glypican-3 is a marker for solid pseudopapillary neoplasm of the pancreas [J]. *Histopathology*, 2011, 59(6): 1278-1279.
- [13] Peters MG, Farias E, Colombo L, et al. Inhibition of invasion and metastasis by glypican-3 in a syngeneic breast Cancer model [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2003, 80(2): 221-232.