

· 论 著 ·

基质金属蛋白酶-2 和血管内皮生长因子 在喉癌中的表达及意义*

林 雁¹, 尹 芳², 袁 莹², 邹 剑³, 刘世喜³, 张京晶^{4△}

(1. 昆明医科大学第二附属医院耳鼻咽喉科, 昆明 650101; 2. 昆明医科大学第二附属医院病案统计科, 昆明 650101; 3. 四川大学华西医院耳鼻咽喉头颈外科, 成都 610041; 4. 昆明医科大学公共卫生学院, 昆明 650500)

摘要:目的 探讨基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和血管内皮生长因子(VEGF)在喉癌中的表达情况及临床意义。方法 在全自动图像分析仪下采用免疫组化方法分别检测经临床及病理证实的 54 例喉癌、23 例声带息肉和 15 例喉部正常黏膜组织的 MMP-2、VEGF 表达情况。结果 喉癌组织中 MMP-2 的表达率为 72.22%(39/54),与声带息肉(47.83%)和喉部正常黏膜组织(40.00%)比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。VEGF 在喉癌中的表达率为 70.37%(38/54),与声带息肉(39.13%)和喉部正常黏膜组织(46.67%)比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。MMP-2、VEGF 的表达与喉癌的临床分期、淋巴结转移及浸润深度均有一定相关性。结论 MMP-2 和 VEGF 可能共同参与喉癌的浸润和转移,与肿瘤的侵袭性生长有一定的关系。

关键词:基质金属蛋白酶-2;血管内皮生长因子;喉肿瘤;免疫组化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.16.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)16-1972-03

Expressions of MMP-2 and VEGF in laryngeal carcinoma and their clinicopathology meanings*

Lin Yan¹, Yin Fang², Yuan Ying², Zou Jian³, Liu Shixi³, Zhang Jingjing^{4△}

(1. Department of Otorhinolaryngology, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, China; 2. Department of Medical Records and Statistic Room, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, China; 3. Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 4. School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

Abstract: **Objective** To study the expressions of matrix metalloproteinase-2(MMP-2) and vascular endothelial growth factor(VEGF) in laryngeal carcinoma and their clinicopathological significance. **Methods** The immuno-histochemical technique was used to detect the expression staining results of MMP-2 and VEGF in 54 cases of laryngeal carcinoma, 23 cases of polyps of vocal cord and 15 cases of normal laryngeal mucous tissues verified by clinicopathology under the automatic image analyzer. **Results** The expression rates of MMP-2 and VEGF were 72.22%(39/54) and 70.37%(38/54) in the laryngeal carcinoma tissue, which were significantly higher than 47.83% and 39.13% in polyps of vocal cord and 40.00% and 46.67% in the normal laryngeal tissues respectively, the differences between them had statistical significance($P < 0.05$). The expressions of MMP-2 and VEGF had certain correlation with the clinical stage, lymph node metastasis and infiltration depth of laryngeal carcinoma. **Conclusion** MMP-2 and VEGF may jointly participate in the process of infiltration and metastasis in laryngeal and have certain relation with the tumorous invasive growth.

Key words: matrix metalloproteinase-2; vascular endothelial growth factor; laryngeal carcinoma; immuno-histochemistry

侵袭转移是恶性肿瘤的重要生物学行为,与肿瘤的发展有着密切的关系。肿瘤在浸润和转移过程中,形成新生血管与降解细胞外基质是两个关键环节。近年来,与这两个环节相关的目的基因研究引起广泛关注^[1-2]。目前所知的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是最强的促血管生成因子^[3]。基质金属蛋白酶(matrix metallo proteinases, MMPs)通过降解细胞外基质和促进肿瘤血管生成引起肿瘤侵袭转移,其中 MMP-2 与细胞外基质中 IV、V 型胶原降解有关^[4-5]。本文拟通过对 VEGF、MMP-2 与喉癌相互关系的分析,为喉部肿瘤浸润、转移方面的相关性研究及其临床意义提出新的实验数据及评价指标。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取昆明医科大学第二附属医院及四川大学华西医院耳鼻咽喉头颈外科 2002~2005 年收治临床及病理确诊 I~IV 期的 54 例喉鳞状细胞癌患者的组织,所采用喉癌标

本的病理分级和临床分期采用最新版 WHO 肿瘤分类标准。其中 I 期 12 例,II 期 13 例,III 期 14 例,IV 期 15 例。其中高分化癌 10 例,中分化癌 23 例,低分化癌 21 例。浸润深度 T₁₋₂ 14 例, T₃₋₄ 40 例。淋巴结转移 N₀ 23 例, N₁ 31 例。病灶位于声门上 11 例,声门 39 例,声门下 4 例。54 例喉癌患者中,男 45 例,女 9 例;年龄 32~78 岁,平均(53.0±11.2)岁, <60 岁 43 例, ≥60 岁 11 例。选取声带息肉 23 例、喉部正常黏膜组织 15 例作为对照。

1.2 试剂 鼠抗人 MMP-2 单克隆抗体(ZM20115)、鼠抗人 VEGF 单克隆抗体(ZM20137)均购于美国 Santo 公司。采用甲醛固定,石蜡包埋,作 MMP-2、VEGF 的免疫组化染色(SP 法)。所有切片均通过两名资深病理学专家盲法认定。染色过程中,分别用已知的 MMP-2 阳性的乳腺肿瘤、VEGF 阳性的结肠肿瘤作为阳性对照;用 PBS 液代替一抗作阴性对照。

1.3 方法 MMP-2 和 VEGF 的表达采用半定量方法。以目

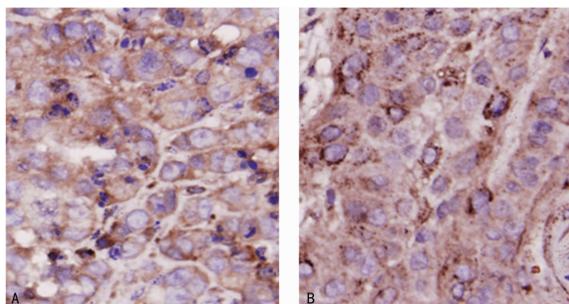
* 基金项目:云南省教育厅科学研究基金资助项目(2011C077);昆明医学院第二附属医院联邦中青年医师培养基金资助项目(2011-LB-01)。作者简介:林雁(1976—),博士,讲师,主要从事耳鼻咽喉头颈外科学基础与临床研究。△ 通讯作者,E-mail:tree1219@163.com。

标细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性。随机选择观察 20 个显微镜($\times 400$)视野,结果判定:用阳性细胞百分比联合免疫组化染色深度进行判定。阳性细胞的百分率: $<10\%$ 为 0 分, $11\% \sim 25\%$ 为 1 分, $>25\% \sim 50\%$ 为 2 分, $>50\% \sim 75\%$ 为 3 分, $>75\%$ 为 4 分。染色深度:无染色或基本不染色为 0 分;淡黄色为 1 分;棕黄色为 2 分;棕褐色为 3 分。以阳性细胞百分比及免疫组化染色深度所得分数相加作为总得分。0 分为阴性(-),1~3 分为弱阳性(+),4~8 分为强阳性(++)[2]。

1.4 统计学处理 所有资料采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,用 t 检验, χ^2 检验及 Spearman 等级相关进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

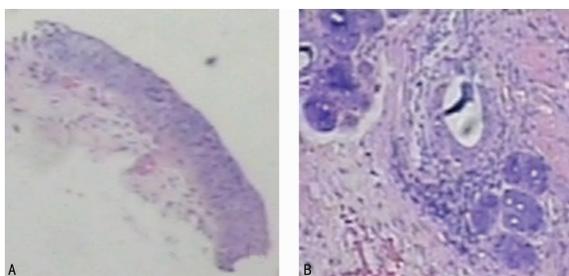
2 结 果

2.1 MMP-2、VEGF 在喉癌、声带息肉和喉部正常黏膜组织中的表达 见图 1~3。54 例喉癌中有 39 例 MMP-2 呈强阳性表达,其表达阳性率明显高于声带息肉组和喉部正常黏膜组($P < 0.05$);声带息肉组及喉部正常黏膜组中 MMP-2 的阳性表达较少,分别为 11 例和 6 例,且大部分呈弱阳性表达。喉癌中 VEGF 阳性表达率也明显高于声带息肉组及喉部正常黏膜组($P < 0.05$),见表 1。



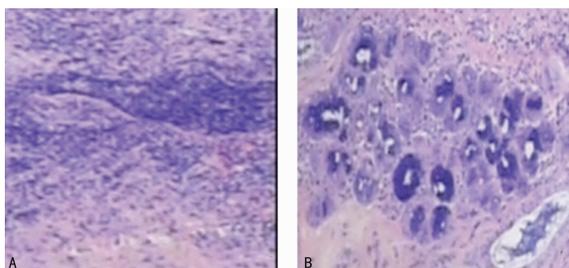
A: MMP-2; B: VEGF.

图 1 MMP-2 及 VEGF 在喉癌中的表达(SP $\times 400$)



A: MMP-2; B: VEGF.

图 2 MMP-2 及 VEGF 在声带息肉中的表达(SP $\times 400$)



A: MMP-2; B: VEGF.

图 3 MMP-2 及 VEGF 在正常喉黏膜中的表达(SP $\times 400$)

2.2 喉癌中 VEGF 与 MMP-2 表达与临床病理特征之间的关系 VEGF 与 MMP-2 的表达在临床分期、有淋巴结转移、浸润深度中的差异有统计学意义($P < 0.05$)。在分化程度、性

别、年龄、病灶部位组别之间的差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。经 Spearman 相关检验发现,喉癌 MMP-2 与 VEGF 的表达有显著相关性($r_s = 0.573, P < 0.05$)。

表 1 MMP-2、VEGF 在喉部正常黏膜、声带息肉和喉癌组织中的表达[n(%)]

组别	n	MMP-2 阳性	VEGF 阳性
喉癌组	54	39(72.22)	38(70.37)
声带息肉组	23	11(47.83) *	9(39.13) *
喉部正常黏膜组	15	6(40.01) *	7(46.67) *

* : $P < 0.05$,与喉癌组比较。

表 2 喉癌中 MMP-2、VEGF 表达与临床病理特征之间的关系[n(%)]

临床病理特征	n	MMP-2 阳性	VEGF 阳性
性别			
男	45	34(75.56)	32(71.11)
女	9	5(55.56)	6(66.67)
年龄			
≥ 60	11	8(72.73)	6(54.55)
< 60	43	31(72.09)	32(74.42)
病灶部位			
声门上	11	7(63.64)	8(72.73)
声门	39	30(76.92)	27(69.23)
声门下	4	2(50.00)	3(75.00)
分化程度			
低分化	21	17(80.95)	16(76.19)
中分化	23	18(78.26)	17(73.91)
高分化	10	5(50.00)	4(40.00)
T 分期			
T ₁₋₂	14	6(42.86)	6(42.86)
T ₃₋₄	40	33(82.50)	32(80.00)
N 分期			
N ₀	23	11(47.83)	12(52.17)
N ₁	31	28(90.32)	26(83.87)
临床分期			
I + II	25	14(56.00)	14(52.00)
III + IV	29	25(86.21)	24(86.21)

3 讨 论

肿瘤细胞在黏附及移动过程中,降解细胞外基质,发生浸润,从而促进转移,MMP-2 起到重要作用[6]。肿瘤的生存与否,与肿瘤组织自身及转移部位的血管生成直接相关。因此 VEGF 的作用也尤为明显[7-8]。文献研究表明肿瘤浸润性是转移的先决条件,新生血管形成则为肿瘤细胞提供物质代谢的可能性,从而诱导肿瘤发生转移。同样 MMP-2 可以与 VEGF 相互作用,促进肿瘤的转移。因此,本实验采用 SP 免疫组化检测 MMP-2 和 VEGF 在喉癌中的表达,阐明其与喉部恶性肿瘤病理、临床、预后等的相关关系,并为头颈部恶性肿瘤的治疗发现新的路径。

本研究结果表明,MMP-2 和 VEGF 在喉癌组织中均高度表达,说明 MMP-2 和 VEGF 的表达量与恶性程度有关。VEGF 刺激肿瘤细胞的血管内皮增生,促进肿瘤新生血管形成[9]。恶性肿瘤内部经常出现的坏死使得组织中 VEGF 的表达异常增高,而 MMP-2 能够降解基质中的弹性蛋白等多种蛋白核心及胶原[10-11]。在浸润和转移过程中,MMP-2 对于细胞外基质的降解是必不可少的。所以在喉癌中,在伴有浸润和转移的肿瘤组织中 MMP-2 呈高表达。

VEGF 与临床分期、病理分级有关。在喉癌发生及发展过程中,血管为肿瘤提供营养和转移途径,在没有新的血管形成以前,肿瘤只能缓慢生长,不易出现转移^[12-13]。在新血管形成以后,肿瘤呈指数倍生长,转移概率提高。低分化肿瘤更容易发生转移。本研究结果表明,MMP-2 的表达与临床分期、病理分级、淋巴结转移有关,而同时 VEGF 在增加血管通透性的同时,也能促进肿瘤细胞的转移,并且 VEGF 与 MMP-2 二者的表达具有正相关性^[14-15]。

综上所述,本文通过对 VEGF 和 MMP-2 的分析表明,在喉癌的侵袭过程中,二者存在一定的相关性。VEGF 和 MMP-2 可能成为临床及病理学判定的重要生物学指标,并为头颈部恶性肿瘤提供实验及理论依据,但二者之间相互作用的机制还有待深入研究。

参考文献:

- [1] 林雁,张京晶,刘世喜,等. 内皮素 A 受体拮抗剂在人喉癌种植瘤的实验研究[J]. 华西医学, 2009, 24(10): 2674-2676.
- [2] Johanna MP, Kirsi MR, Vesa VK, et al. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-2 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis[J]. *Clinical Cancer Research*, 2004, 10(22): 7621-7628.
- [3] Kitadai Y, Haruma K, Tokutomi T. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinomas[J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(9): 2195-2200.
- [4] Partyka R, Gonciarz M, Jalowiecki P, et al. VEGF and metalloproteinase-2 (MMP-2) expression in gastric cancer tissue[J]. *Med Sci Monit*, 2012, 18(4): 130-134.
- [5] Akhavan MM, Karimi M, Ghodrati M, et al. AT1 receptors activation enhances the expression of MMP-2, MMP-13 and VEGF but not MMP-9 in B16F10 melanoma cells[J]. *Pak J Biol Sci*, 2011, 14(17): 821-830.
- [6] Desch A, Strozyk EA, Bauer AT, et al. Highly invasive melanoma cells activate the vascular endothelium via an MMP-2/integrin alphavbeta5-induced secretion of VEGF-A[J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(2): 693-705.
- [7] Adya R, Tan BK, Punn A, et al. Visfatin induces human endothelial VEGF and MMP-2/9 production via MAPK and PI3K/Akt signalling pathways: novel insights into visfatin-induced angiogenesis[J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 78(2): 356-365.
- [8] Misra S, Fu AA, Puggioni A, et al. Increased shear stress with upregulation of VEGF-A and its receptors and MMP-2, MMP-9, and TIMP-1 in venous stenosis of hemodialysis grafts[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(5): H2219-2230.
- [9] Tian X, Cong M, Zhou W, et al. Relationship between protein expression of VEGF-C, MMP-2 and lymph node metastasis in papillary thyroid cancer[J]. *J Int Med Res*, 2008, 36(4): 699-703.
- [10] Doyle JL, Haas TL. Differential role of beta-catenin in VEGF and histamine-induced MMP-2 production in microvascular endothelial cells[J]. *J Cell Biochem*, 2009, 107(2): 272-283.
- [11] Misra S, Shergill U, Yang B, et al. Increased expression of HIF-1alpha, VEGF-A and its receptors, MMP-2, TIMP-1, and ADAMTS-1 at the venous stenosis of arteriovenous fistula in a mouse model with renal insufficiency[J]. *J Vasc Interv Radiol*, 2010, 21(8): 1255-1261.
- [12] Chetty C, Lakka SS, Bhoopathi P, et al. MMP-2 alters VEGF expression via alpha beta3 integrin-mediated PI3K/AKT signaling in A549 lung cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(5): 1081-1095.
- [13] Sun HY, Wei SP, Xu RC, et al. Sphingosine-1-phosphate induces human endothelial VEGF and MMP-2 production via transcription factor ZNF580: novel insights into angiogenesis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 395(3): 361-366.
- [14] Pratheeshkumar P, Kuttan G. Vernolide-A inhibits radiation induced hypoxia mediated tumor angiogenesis by regulating HIF-1alpha, MMP-2, MMP-9, and VEGF [J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2011, 30(2): 139-151.
- [15] Peng ZH, Wan DS, Li LR, et al. Expression of COX-2, MMP-2 and VEGF in stage II and III colorectal cancer and the clinical significance[J]. *Hepatoqastroenterology*, 2011, 58(106): 369-376.

(收稿日期: 2013-11-08 修回日期: 2014-02-27)

(上接第 1971 页)

- SIRT1 overexpression protects murine osteoblasts against TNF- α -induced injury in vitro by suppressing the NF- κ B signaling pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(5): 668-674.
- [11] Jung YJ, Lee JE, Lee AS, et al. SIRT1 overexpression decreases cisplatin induced acetylation of NF- κ B p65 subunit and cyto toxicity in renal proximal tubule cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 419(2): 206-210.
 - [12] Visekruna A, Joeris T, Seidel D, et al. Proteasome mediated degradation of IkappaB alpha and processing of p105 in crohn disease and ulcerative colitis[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(12): 3195-3203.
 - [13] Berndt U, Bartsch S, Philipsen L, et al. Proteomic analysis of the inflamed intestinal mucosa reveals distinctive immune response profiles in Crohns disease and ulcerative colitis[J]. *J Immunol*, 2007, 179(1): 295-304.
 - [14] Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, et al. Modulation of NF-kappaB dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase[J]. *EMBO J*, 2004, 23(12): 2369-2380.
 - [15] Yoshizaki T, Milne JC, Imamura T, et al. SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes[J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(5): 1363-1374.

(收稿日期: 2013-12-08 修回日期: 2014-02-22)