

大肠癌组织中 MMP-2 与 TIMP-2 的表达及临床意义

李英健¹, 赵恩宏¹, 苏锐¹, 侯雷¹, 刘志满¹, 中兴斌²

(承德医学院附属医院: 1. 外三科; 2. 病理科, 河北承德 067000)

摘要:目的 研究基质金属蛋白酶-2(MMP-2)与组织金属蛋白酶抑制剂-2(TIMP-2)在大肠癌中的表达,探讨二者在大肠癌发展过程中的意义。方法 应用免疫组化法检测 52 例大肠癌、20 例大肠腺瘤和 20 例正常大肠黏膜组织中 MMP-2 与 TIMP-2 的表达,并分析二者表达与性别、年龄、肿瘤发生部位、浸润程度、组织分化程度及淋巴结转移等临床指标间的关系。结果 MMP-2 在大肠正常黏膜、大肠腺瘤和大肠癌中的表达强度依次增加,而 TIMP-2 在三者中的表达强度则依次降低。MMP-2 在浸润程度深的大肠癌中的表达高于浸润程度浅的,低分化的高于中高分化的,有淋巴结转移的高于无淋巴结转移的;TIMP-2 的表达则在浸润程度深的低于浸润程度浅的,低分化的低于中高分化的,在有淋巴结转移的低于无淋巴结转移的。MMP-2 与 TIMP-2 在大肠癌组织中的表达与患者的性别、年龄及肿瘤发生部位无显著相关性,MMP-2 与 TIMP-2 在大肠癌中的表达呈负相关。结论 MMP-2 与 TIMP-2 表达的失衡与大肠癌的浸润和转移密切相关。

关键词:肠肿瘤;基质金属蛋白酶-2;组织金属蛋白酶抑制剂-2;免疫组织化学

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.16.013

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)16-2006-03

Expression and clinical significance of MMP-2 and TIMP-2 in human colorectal carcinoma

Li Yingjian¹, Zhao Enhong¹, Su Rui¹, Hou Lei¹, Liu Zhiman¹, Shen Xingbin²

(1. Third Department of Surgery; 2. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China)

Abstract: Objective To study the expression of matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) in colorectal carcinoma and to investigate its significance in the development process of colorectal cancer. Methods To detect the expression of MMP-2 and TIMP-2 in 52 cases of colorectal cancer, 20 cases of colorectal adenoma and 20 cases of colorectal normal mucosa tissue by the immunohistochemical method. To analyze the relationship between their expression with the clinical indexes of sex, age, tumor location, tissue differentiation degree, infiltration and lymph node metastasis. Results The intensity of MMP-2 expression in the colorectal normal mucosa, adenoma and colorectal carcinoma in turn was increased, while the expression intensity of TIMP-2 in the three tissues in turn was reduced. The MMP-2 expression in deep infiltration was higher than that in shallow infiltration, low differentiation was higher than high differentiation and lymphatic metastasis was higher than non-lymphatic metastasis; while the TIMP-2 expression in deep infiltration was lower than that in shallow infiltration, low differentiation was lower than high differentiation and lymphatic metastasis was lower than non-lymphatic metastasis. The expression of MMP-2 and TIMP-2 in colorectal carcinoma had no obvious differences in patient's sex, age and tumor location. MMP-2 was negatively correlated with TIMP-2 in colorectal carcinoma. Conclusion The imbalance expression of MMP-2 and TIMP-2 is closely correlated with the infiltration and metastasis of colorectal carcinoma.

Key words: intestinal neoplasms; matrix metalloproteinases-2; tissue inhibitor of metalloproteinases-2; immunohistochemistry

目前大肠癌在西方国家恶性肿瘤的发病率居第 2 位^[1],而且近几年在我国的发病率也逐年上升,导致大肠癌患者死亡的主要原因是肿瘤细胞的浸润和转移。而基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)及其抑制剂组织金属蛋白酶抑制剂-2(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP-2)共同维持细胞外基质和细胞迁移的动态平衡,二者的平衡失控是导致肿瘤细胞浸润和转移的关键^[2]。本文旨在通过对大肠癌组织中 MMP-2 与 TIMP-2 表达的研究,从而为大肠癌的诊断、治疗及预后提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2011 年 12 月至 2012 年 12 月于承德医学院附属医院外三科行手术切除的大肠癌标本 52 份(大肠癌组),并选取 20 份距离大肠癌组织边缘大于 5 cm 处的正常大肠黏膜作为对照组,同时选取 20 份大肠腺瘤标本(大肠腺瘤组)。上述患者均排除合并其他部位恶性肿瘤者,术前行放化

疗者及系统性疾病者。大肠癌患者中男 29 例,女 23 例,平均年龄(54.23±11.06)岁。原发病灶部位:结肠 20 例,直肠 32 例;浸润深度:浸润未超过肌层 12 例,浸润到肌层或浆膜层 40 例;分化程度:低分化 15 例,中分化 27 例,高分化 10 例;淋巴结及远处转移:阴性 22 例,阳性 30 例。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 兔抗人 MMP-2 多克隆抗体购自北京中杉金桥公司,兔抗人 TIMP-2 多克隆抗体购自武汉博士德公司,即用型免疫组化 MaxVision 试剂盒羊抗鼠/兔购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.2.2 免疫组化检测 石蜡切片 3 μm,脱蜡至失水,3%过氧化氢室温孵育 10 min,蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min,微波炉加热 0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲液(pH6.0)至沸腾后,将上述组织切片放入,抗原热修复 15 min,室温放置 4 min,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。滴加 I 抗 50 μL (MMP-2 1:80 工作液;

TIMP-2 1 : 100 工作液), 4 ℃ 冰箱过夜。PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。滴加 II 抗(快捷型酶标羊抗鼠/兔 IgG 聚合物), 室温孵育 15 min。PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。DAB 显色 5 min, 蒸馏水冲洗。苏木素复染, 透明、封片、镜检。

1.2.3 免疫组化结果判断 MMP-2 与 TIMP-2 主要位于细胞质, 如果细胞质内出现棕黄色或棕褐色颗粒则定义为阳性染色细胞, 采用阳性染色强度及阳性细胞所占百分比综合进行判断。在 400 倍视野下, 每张切片随机观察 4 个视野, 将切片中平均阳性比例及染色深浅分别计 0~3 分, 切片中无阳性细胞计 0 分, 阳性细胞少于 25% 计 1 分, 25~75% 计 2 分, >75% 计 3 分; 染色强度以多数细胞为准, 无着色计 0 分, 淡黄色计 1 分, 黄色或深黄色计 2 分, 褐色或棕褐色计 3 分; 再按这两项指标的积分相加将结果分为 4 级: 0 分为 -, 1~2 分为 +, 3~4 分为 ++, 5~6 分为 +++。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 进行统计学分析, 等级资料采用秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 Spearman 等级相关分析 MMP-2 与 TIMP-2 的相关性。

2 结 果

2.1 MMP-2 与 TIMP-2 在对照组、大肠腺瘤组和大肠癌组中的表达 MMP-2 与 TIMP-2 在 3 组中均有阳性表达, MMP-2 的表达强度依次增加, 3 组之间阳性表达率差异均有统计学意

义($P < 0.05$); 而 TIMP-2 的表达强度则依次减低, 而且大肠癌组中 TIMP-2 的阳性表达率低于对照组及大肠腺瘤组($P < 0.05$), 但对照组与大肠腺瘤组的 TIMP-2 的阳性表达率差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 1、图 1。

2.2 大肠癌中 MMP-2、TIMP-2 与临床病理参数的关系

2.2.1 大肠癌中 MMP-2 与临床病理参数的关系 大肠癌组织中浸润程度深的 MMP-2 表达高于浸润程度浅的($P < 0.01$); 低分化的 MMP-2 表达高于中高分化的($P < 0.01$); 有淋巴结转移的 MMP-2 表达高于无淋巴结转移的($P < 0.05$)。不同性别、年龄及肿瘤发生部位 MMP-2 的表达则差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 2。

2.2.2 大肠癌中 TIMP-2 与临床病理参数的关系 大肠癌组织中浸润程度深的 TIMP-2 表达低于浸润程度浅的($P < 0.01$); 低分化的 TIMP-2 表达低于中高分化的($P < 0.01$); 有淋巴结转移的 TIMP-2 表达低于无淋巴结转移的($P < 0.05$)。不同性别、年龄及肿瘤发生部位 TIMP-2 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 2。

2.3 MMP-2 与 TIMP-2 在大肠癌中表达的相关性 采用 Spearman 等级相关分析, MMP-2 与 TIMP-2 呈负相关($r = -0.522, P < 0.01$), 见表 3。

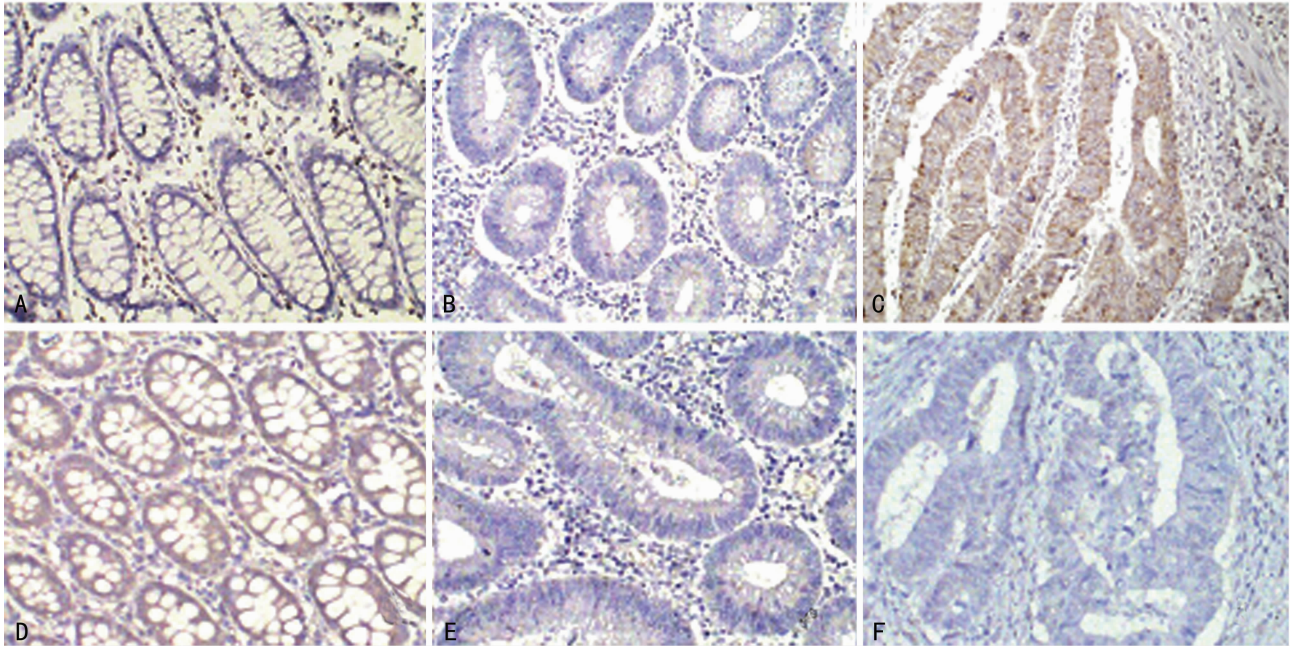
表 1 MMP-2 与 TIMP-2 在对照组、大肠腺瘤组及大肠癌组中的表达 (n)

组别	n	MMP-2					TIMP-2				
		-	+	++	+++	平均秩	-	+	++	+++	平均秩
对照组	20	17	2	1	0	20.08	0	1	5	14	68.05
大肠腺瘤组	20	7	7	5	1	39.95 ^a	0	3	10	7	54.03 ^a
大肠癌组	52	5	14	18	15	59.18 ^{ab}	5	20	21	6	35.32 ^{ab}

^a: $P < 0.01$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.01$, 与大肠腺瘤组比较。

表 2 MMP-2 与 TIMP-2 在不同临床病理参数的大肠癌中的表达 (n)

病理参数	n	MMP-2					P	TIMP-2					P
		-	+	++	+++	平均秩		-	+	++	+++	平均秩	
浸润程度													
未超过肌层	12	4	4	2	2	17.42	<0.01	1	2	4	5	35.46	<0.01
肌层或浆膜层	40	1	10	16	13	29.23		4	18	17	1	23.81	
分化程度													
中高分化	37	5	13	14	5	21.66	<0.01	0	14	19	4	29.70	<0.01
低分化	15	0	1	4	10	28.43		5	6	2	2	18.60	
淋巴结转移													
无转移	22	1	10	8	3	22.32	<0.05	1	3	12	6	35.39	<0.01
有转移	30	4	4	10	12	29.57		4	17	9	0	32.75	
年龄(岁)													
≤60	22	2	5	6	9	29.30	>0.05	3	7	10	2	26.20	>0.05
>60	30	3	9	12	6	24.45		2	13	11	4	26.72	
性别													
男	29	4	7	10	8	25.67	>0.05	1	11	14	3	28.48	>0.05
女	23	1	7	8	7	27.54		4	9	7	3	24.00	
肿瘤位置													
结肠	20	3	6	3	8	26.48	>0.05	2	7	9	2	26.88	>0.05
直肠	32	2	8	15	7	26.52		3	13	12	4	26.27	



A: MMP-2 在对照组中阴性表达; B: MMP-2 在大肠腺瘤组中阴性表达; C: MMP-2 在大肠癌组中阳性表达; D: TIMP-2 在对照组中阳性表达; E: TIMP-2 在大肠腺瘤组中阴性表达; F: TIMP-2 在大肠癌组中阴性表达。

图 1 MMP-2 与 TIMP-2 在对照组、大肠腺瘤组及大肠癌组中的表达 ($\times 200$)

表 3 MMP-2 与 TIMP-2 在大肠癌组表达的相关性 (n)

MMP-2	TIMP-2		r	P
	阳性	阴性		
阳性	44	3	-0.522	<0.01
阴性	3	2		

3 讨 论

恶性肿瘤患者的主要死因是肿瘤细胞的浸润和转移,而基底膜的破坏被认为是肿瘤细胞浸润和扩散的开始。基底膜的主要成分为 IV 型胶原,而基质金属蛋白酶家族的重要成员之一 MMP-2,因其对 IV、V 型胶原和层粘连蛋白的降解作用,又被称为 IV 型胶原酶。有研究表明,MMP-2 通过降解细胞外基质、增强上皮细胞运动能力及影响肿瘤血管形成促进肿瘤的浸润和转移^[3]。

本研究表明,与大肠正常黏膜及大肠腺瘤相比,大肠癌组织中 MMP-2 的表达较高 ($P < 0.01$)。而在大肠癌中 MMP-2 的表达水平,有淋巴结转移组高于无淋巴结转移组 ($P < 0.05$);浸润到肌层或浆膜层组高于浸润未超过肌层组 ($P < 0.01$);低分化组高于中高分化组 ($P < 0.01$)。Guo 等^[4]研究发现,MMP-2 的高表达与肺癌的组织学分型、肿瘤组织的低分化及其远处转移有关。而 Lemieux 等^[5]则发现,大肠癌患者中 MMP-2 呈现高表达,而且其高表达与大肠癌的浸润与转移密切相关。上述结果与本研究结果一致,提示 MMP-2 的表达与大肠癌的发生、发展及大肠癌的浸润和转移密切相关。

但是由于肿瘤细胞可产生组织基质金属蛋白酶抑制剂抑制基质金属蛋白酶的活性,因此二者表达的不平衡最终导致了肿瘤细胞的浸润和转移^[6]。MMP-2 的特异性抑制剂 TIMP-2 能与 MMP-2 形成复合物,抑制 MMP-2 的胶原分解活性,从而抑制肿瘤的浸润和转移^[7]。

但是目前大肠癌中 TIMP-2 的表达存在较大的争议,有些研究表明大肠癌中 TIMP-2 的表达降低,有些研究则与上述结

果相反^[8-9]。本研究结果表明,与大肠正常黏膜及大肠腺瘤相比,大肠癌组织中 TIMP-2 的表达较低 ($P < 0.01$)。而在大肠癌中 TIMP-2 的表达水平,有淋巴结转移组低于无淋巴结转移组 ($P < 0.01$);浸润到肌层或浆膜层组低于浸润未超过肌层组 ($P < 0.01$);低分化组低于中高分化组 ($P < 0.01$)。本研究还发现,大肠癌组织中 MMP-2 与 TIMP-2 的表达呈负相关。上述研究结果提示本组病例的 TIMP-2 抑制 MMP-2 分泌及活性的作用较弱,MMP-2 在大肠癌中表达增高,但是组织中却没有足够的 TIMP-2 抑制 MMP-2 的活性,而活化的 MMP-2 降解细胞外基质导致肿瘤细胞扩散,并通过血液及淋巴向远处转移,提示二者表达比例的失衡与肿瘤的浸润和转移密切相关^[10]。

综上所述,MMP-2 在大肠癌组织中的表达增高,而 TIMP-2 则表达下降,表明二者在大肠癌的发生和发展过程起到了重要作用,增强大肠癌中 TIMP-2 的表达可能会抑制 MMP-2 的活性,从而抑制肿瘤的浸润和转移,为大肠癌的基因治疗提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics 2013 [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting [J]. FEBS J, 2011, 278(1): 16-27.
- [3] Gerg M, Kopitz C, Schaten S, et al. Distinct functionality of tumor cell-derived gelatinases during formation of liver metastases [J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(3): 341-351.
- [4] Guo CB, Wang S, Deng C, et al. Relationship between matrix metalloproteinase-2 and lung cancer progression [J]. Mol Diagn Ther, 2007, 11(3): 183-192.
- [5] Lemieux E, Bergeron S, Durand V, et al. Constitutively active MEK1 is sufficient to induce epithelial (下转第 2011 页)

分子质量较大,呈碱性,其基因被定位在染色体 12q。主要的人类 CK 基因在单倍体基因组中只有 1 个拷贝^[6]。CK13 是 CK 的 1 种,属于 I 型 CK,是鳞状上皮转化和分化的标志,相对分子质量 54×10^3 ,CK13 基因全长 4 601 bp,有 8 个外显子,定位于 17q12~17q21.2^[7]。

林心强等^[2]学者通过免疫组化染色法检测鼻息肉组(29 例)和下鼻甲组(11 例)上皮细胞 CK14、CK18 和 CK13 蛋白的表达证明,鼻息肉上皮 CK13 区域性高表达,非角化鳞状上皮 CK13 高表达,过渡性上皮 CK13 弱表达,假复层纤毛柱状上皮 CK13 无表达,显示鼻息肉多种上皮成分的动态变化^[8]。另有学者研究表明,通过对 38 例鼻息肉石蜡及冰冻切片进行免疫组化染色,观察其上皮细胞角蛋白的表达发现,CK13 特异性表达在假复层柱状上皮基底细胞以及非角化复层鳞状上皮的棘状细胞,在过渡性上皮 CK13 的表达出现变化^[9]。

糖皮质激素是目前治疗鼻息肉较有效的药物之一。大量研究表明,炎症反应是上皮增生的主要原因,而糖皮质激素受体可影响鼻息肉产生的多个环节,一方面直接作用于炎性细胞(如嗜酸性粒细胞等),抑制其产生和分化、促进其凋亡;另一方面,通过对炎性细胞及由它们活化产生的细胞因子、黏附分子和炎症介质的抑制,减少炎性细胞浸润、减轻细胞毒性作用,从多个方面综合作用,最终抑制鼻息肉的产生^[1,10]。本实验选取 10 例正常中鼻甲黏膜原因在于,鼻腔的后 2/3 为假复层纤毛柱状上皮,而鼻息肉大都发生于中鼻道附近、钩突或筛泡表面及隐窝裂隙。中鼻甲正好处于此区域,并与钩突、筛泡等基本位于同一冠状面。所以选取本身上皮为假复层纤毛柱状上皮,且属于鼻息肉好发部位的中鼻甲作为阴性对照组。这一结果也与研究表明的 CK13 在纤毛柱状上皮上无表达相一致^[11]。

通过免疫组化对 60 例鼻息肉组织中 CK13 的表达研究发现,CK13 在鼻息肉组织中具有阳性表达,且在不同上皮的表达程度有所差异。

CK13 与鼻息肉的发生、发展有着密切关系,CK13 将可能成为疾病治疗的一个新靶点,CK13 的中和性抗体已在许多动物或临床实验中取得良好的疗效。但是,尚存在许多需进一步明确的问题:(1)进一步研究 TGF 与 CK13 之间的关系,是对鼻息肉的形成过程的进一步认识;(2)通过运用 CK13 中和性抗体是否对鼻息肉手术患者术后鼻腔的功能恢复有所帮助;(3)CK13 中和性抗体的运用是否能增加糖皮质激素在治疗鼻

息肉中的敏感性仍需进一步研究。

本实验通过免疫组织化学法,对鼻息肉组织上皮细胞中 CK13 表达的研究表明:(1)CK13 在鼻息肉组织中不同上皮表达程度的差异,反映了鼻息肉在发生发展过程中的动态变化;(2)使用糖皮质激素后鼻息肉组织中 CK13 蛋白表达有所下降,说明糖皮质激素对鼻息肉的增生、分化有抑制作用。

参考文献:

- [1] 朱秉婧,陈玮伦.糖皮质激素治疗鼻息肉作用机制研究进展[J]. 同济大学学报,2006,27(9):75-78.
- [2] 林心强,王挥戈,杨丹娜.鼻息肉上皮细胞的分化[J]. 中国耳鼻喉颅底外科杂志,2008,14(3):177-180.
- [3] 王世飞,蒋正举,安伟,等. VEGF、COX-2 在复发性鼻息肉中的表达及意义[J]. 贵州医药,2009,33(6):493-495.
- [4] 邱元正,文忠,林功标,等. CK13 基因与 EB 病毒 DNA 在鼻咽癌中的表达及临床意义[J]. 中国耳鼻喉颅底外科杂志,2001,7(1):18-20.
- [5] 贺光,富伟能,邱广斌,等. 细胞角蛋白基因 13 在喉鳞状细胞癌中缺失和表达的研究[J]. 遗传学报,2002,29(5):390-395.
- [6] 初培国. 细胞角蛋白染色在肿瘤诊断中的应用[J]. 中华病理学杂志,2004,33(3):273-276.
- [7] Waseem A, Alam Y, Dogan B, et al. Isolation, sequence and expression the gene encoding human keratin 13[J]. Gene,1998,215(2):269-279.
- [8] 卓明英,易自翔,王德钦,等. 鼻息肉上皮的多种改变及其诊断问题[J]. 临床耳鼻喉科杂志,1995,9(2):79-82.
- [9] 卓明英,杨军. 鼻息肉上皮细胞角蛋白的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志,1995,11(3):213-214.
- [10] 左成昌,张志钢. 上皮细胞增殖在鼻息肉发病机理中的意义[J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志,2001,9(3):116-118.
- [11] 郑世信,姚利. 糖皮质激素对鼻息肉组织中嗜酸粒细胞的调控作用[J]. 中国基层医药,2006,13(2):195-196.

(收稿日期:2013-11-02 修回日期:2014-01-19)

(上接第 2008 页)

to mesenchymal transition in intestinal epithelial cells and to promote tumor invasion and metastasis[J]. Int Cancer, 2009,125(7):1575-1586.

- [6] Moore CS, Crocker SJ. An alternate perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology [J]. Am J Pathol,2012,180(1):12-16.
- [7] Kim MH, Bodenshtein TM, Sumerel LA, et al. Tissue inhibition of metalloproteinases-2 improves antitumor efficacy of a replicating adenovirus in vivo[J]. Cancer Biol Ther, 2006,5(12):1647-1653.
- [8] Moran A, Iniesta P, Garcia-Aranda C, et al. Clinical relevance of MMP-9, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 in color-

rectal cancer[J]. Oncol Rep,2005,13(1):115-120.

- [9] Hilska M, Roberts PJ, Collan YU, et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinases-1,-2,-7 and -13 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1,-2,-3 and -4 in colorectal cancer[J]. Int J Cancer,2007,121(4):714-723.
- [10] Davidson B, Givant-Horwitz V, Lazarovici P, et al. Matrix metalloproteinases(MMP), EMMPRIN(extracellular matrix metalloproteinase inducer) and mitogen-activated protein kinases(MAPK): co-expression in metastatic serous ovarian carcinoma[J]. Clin Exp Metastasis,2003,20(7):621-631.

(收稿日期:2013-11-28 修回日期:2014-02-25)