

卵巢肿瘤 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-2 和细菌 L 型检测的意义

俞 岚¹, 汪万英², 王朝夫³, 姚 敏¹

[摘要] 目的: 探讨 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-2 和细菌 L 型感染在卵巢肿瘤中的表达及临床意义。方法: 采用免疫组化和革兰染色方法检测 120 例卵巢肿瘤中的 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-2 表达, 以及细菌 L 型的检出率, 并用 χ^2 检验进行统计学处理。结果: 卵巢乳头状癌中 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-2 的表达率均明显高于良性肿瘤 ($P < 0.005$)。MMP-2、MMP-9 在卵巢乳头状癌中临床分期 III、IV 期中的表达率明显高于 I、II 期, 随着病理分级增高而显著增加 ($P < 0.005$), 腹腔淋巴结有转移和有腹腔积液者均高于无腹腔淋巴结转移和无腹腔积液者 ($P < 0.05 \sim P < 0.005$)。而 TIMP-2 阳性表达与 MMP-2、MMP-9 阳性表达相反 ($P < 0.05 \sim P < 0.005$)。细菌 L 型检出率在恶性肿瘤与良性肿瘤差异无显著性 ($P > 0.05$), 但随病理分级、临床分期增高而显著增加 ($P < 0.005$), 腹腔淋巴结有转移和有腹腔积液者均明显高于无腹腔淋巴结转移和无腹腔积液者 ($P < 0.005$)。结论: MMP-2、MMP-9 及 TIMP-2 在卵巢肿瘤中不同程度异常表达及细菌 L 型检出率与肿瘤的临床分期、病理分级、有无腹腔淋巴结转移及有无腹腔积液者均有明显关系, L 型感染可能为诱发肿瘤因素之一, MMP-2、MMP-9 与 L 型感染可能有协同致瘤作用。TIMP-2 对卵巢肿瘤的进展可能也有促进作用。

[关键词] 卵巢肿瘤; 基质金属蛋白酶; 基质金属蛋白酶抑制剂; 细菌 L 型; 免疫组织化学

[中国图书资料分类法分类号] R 737.31 [文献标识码] A

Expression of MMP-2、MMP-9、TIMP-2 and infection of bacterial L-forms in ovarian neoplasms and its clinical significance

YU Lan¹, WANG Wan-ying², WANG Chao-fu³, YAO Min¹

(1. Department of Pathology, Bengbu Medical College, Bengbu 233003; 2. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004; 3. Affiliated Tumor Hospital of Fudan University, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To study the expression of MMP-2, MMP-9, TIMP-2 and infection of bacterial L-forms in ovarian neoplasms and to discuss the clinical significance. **Methods:** Immunohistochemical staining was used to detect the expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 in 120 case of ovarian tumors. Gram's staining was used to examine bacterial L-forms in these tissues. **Results:** The positive rates of MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 were higher in malignant tumors than that in benign ones ($P < 0.005$). The positive rates of MMP-2 and MMP-9 were higher in stage I-II than that in stage III, IV, and which increased with the grade ($P < 0.005$). The expression of these two proteinases were higher in patients with lymph node involvement and ascites than those without that ($P < 0.05$ to $P < 0.005$). The positive expression of TIMP-2 was opposite to MMP-2 and MMP-9 ($P < 0.05$ to $P < 0.005$). The positive rate of bacterial L-forms was not higher in malignant tumors than that in benign ones ($P > 0.05$), but it was increased with clinical stage and pathological grade ($P < 0.005$). The expression of L-forms was higher in patients with lymph node involvement and ascites than those without that ($P < 0.005$). **Conclusions:** In ovarian neoplasms, the abnormal expression of MMP-2, MMP-9, TIMP-2 and positive rate of bacterial L-forms have obvious relationship with clinical stage, pathological grade, lymph node involvement and ascites. Bacterial L-forms is maybe one of the inductive factors of the occurrence of tumor. MMP-2, MMP-9 and bacterial L-forms perhaps have the function of positive cooperativity during the course of the occurrence of ovarian neoplasms. TIMP-2 perhaps accelerate the development of ovarian neoplasms.

[Key words] ovarian neoplasms; matrix metalloproteinase; tissue inhibitor of metalloproteinase; bacterial L-forms; immunohistochemical

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 在妇科恶性肿瘤组织中的表达明显高于相应正常组织, 尤其是明胶酶 (MMP-2 和 MMP-9) 的

高表达与妇科恶性肿瘤的侵袭和转移密切相关。MMPs 为降解细胞外基质所必需, 它可以被基质金属蛋白酶抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMPs) 特异性地抑制。MMPs、TIMPs 调节失衡在肿瘤恶变与转移过程中起决定性作用。细菌 L 型感染极有可能成为诱发肿瘤因素之一。我们采用免疫组化 S-P 法检测卵巢肿瘤中 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-2 表达; 采用革兰染色检测细菌 L 型检出率, 以探讨他们在卵巢肿瘤发生、发展与浸润和转移的关系及其临床意义。

[收稿日期] 2004-11-14

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目 (2002kj226)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院病理学教研室, 安徽蚌埠 233003; 2. 蚌埠医学院附属医院病理科, 安徽蚌埠 233004; 3. 复旦大学附属肿瘤医院, 上海 200032

[作者简介] 俞 岚 (1979-), 女, 安徽蚌埠人, 硕士研究生。

1 材料与方法

1.1 标本 来源于我室 2000~2003 年外检档案中 120 例卵巢肿瘤蜡块,经重新切片复查,其中乳头状癌 97 例(I 级 22 例,II 级 39 例,III 级 36 例);良性肿瘤 23 例。每例连续切片数张,4 μm 厚,分别行免疫组化和革兰染色。

1.2 免疫组化 S-P 法 120 例卵巢肿瘤均行免疫组化染色,第一抗体 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-2 单克隆抗体(1:50),二抗及 S-P 复合物 1:100, DAB 显色(所有试剂均购自北京中山公司)。分别设阳性、阴性和省略对照。阳性为肿瘤细胞浆内棕黄色颗粒。

1.3 革兰染色 检测肿瘤组织中 L 型感染情况,用 10 \times 100 油镜观察并记数,每例随机观察 10 个视野,取 L 型菌平均数, L 型菌数 ≥ 30 个为阳性, < 30 个或未查见 L 型菌者为阴性。L 型形态多种多样,有矩形体、圆球体及原生小体等,尤其原生小体与病毒颗粒大小相似。

1.4 统计学方法 采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 不同类型卵巢肿瘤中 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-2 表达及细菌 L 型检出情况 卵巢乳头状癌中 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-2 的表达率明显高于良性肿瘤($P < 0.005$, 见图 1~3),细菌 L 型主要分布于肿瘤间质或肿瘤细胞质内(见图 4),而细菌 L 型的检出率在肿瘤的类型间差异无显著性($P > 0.05$)(见表 1)。

表 1 不同类型卵巢肿瘤中 MMP-2、MMP-9、TIMP-2 表达及细菌 L 型检出结果比较(n)

肿瘤类型	n	MMP-2	MMP-9	TIMP-2	细菌 L 型
乳头状癌	97	72	74	59	25
良性肿瘤	23	5	6	5	3
合计	120	77	80	64	28
χ^2	—	22.28	21.08	11.41	1.68
P	—	< 0.005	< 0.005	< 0.005	> 0.05

2.2 卵巢乳头状癌的组织学类型、临床分期和病理分级与 MMP-2、MMP-9、TIMP-2 表达及细菌 L 型感染的关系 97 例乳头状癌中 MMP-2、MMP-9、TIMP-2 表达及细菌 L 型感染在不同的组织学类型中差异均无显著性($P > 0.05$),临床分期 III、IV 期均高于 I、II 期($P < 0.05 \sim P < 0.005$)。97 例乳头状癌分级中, I 级、II 级和 III 级的 MMP-2 阳性表达率

分别为 40.9%、76.9%和 91.7%, MMP-9 阳性表达率分别为 40.9%、79.5%和 94.4%,两种蛋白酶阳性表达率均随着恶性肿瘤分级增高而显著增加($P < 0.005$),而 TIMP-2 阳性表达率均随着恶性肿瘤临床分期及病理分级增高而显著减低($P < 0.005$)。细菌 L 型检出率与病理分级、临床分期差异均有显著性($P < 0.005$)(见表 2,图 3)。

表 2 卵巢乳头状癌组织学类型、临床分期和病理分级与 MMP-2、MMP-9、TIMP-2 表达及细菌 L 型感染的关系(n)

观察项目	n	MMP-2	MMP-9	TIMP-2	细菌 L 型
组织学类型					
浆液性癌	87	65	68	54	22
黏液性癌	10	7	6	5	3
合计	97	72	74	59	25
χ^2	—	0.00	0.79	0.16	0.00
P	—	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05
临床分期					
I、II 期	53	31	32	38	6
III、IV 期	44	41	42	21	19
合计	97	72	74	59	25
χ^2	—	15.12	16.13	5.80	12.76
P	—	< 0.005	< 0.005	< 0.05	< 0.005
乳头状癌分级					
I	22	9	9	20	1
II	39	30	31	28	7
III	36	33	34	11	17
合计	97	72	74	59	25
χ^2	—	18.64	22.00	24.17	15.09
P	—	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005

2.3 各临床指标与 MMP-2、MMP-9、TIMP-2 表达及细菌 L 型感染的关系 卵巢乳头状癌中 MMP-2、MMP-9 阳性表达在有腹腔淋巴结转移及有腹腔积液者均高于无转移及无腹腔积液者($P < 0.05 \sim P < 0.005$),TIMP-2 阳性表达与 MMP-2、MMP-9 相反($P < 0.005$)。细菌 L 型检出率有腹腔淋巴结转移和有腹腔积液者均高于无转移及无腹腔积液者($P < 0.005$)。不同年龄组 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-2 阳性表达均无显著性($P > 0.05$)(见表 3)。

3 讨论

MMPs 是一类 Zn^{2+} 依赖的细胞外蛋白水解酶,它可以降解基底膜,促进恶性肿瘤细胞的侵袭和转移。MMP-2 和 MMP-9 是两种重要的 MMPs 蛋白。MMP-2 和 MMP-9 在肿瘤的发生发展,尤其在肿瘤

的侵袭和转移过程中起重要促进作用。MMP-2 可以降解 IV 型胶原和明胶, 还具有调节肿瘤细胞黏附作用, 因而成为研究肿瘤侵袭转移的热点^[1]。MMP-2 可通过选择性基质成分促进癌细胞失控性生长、突破基膜、迁移、黏附及肿瘤新生血管网形成, 与转移过程中癌细胞的存活以及细胞的恶性转化有关^[2]。Davidson 等^[3]通过对 MMPs 和血管生成因子与卵巢癌预后价值评价的关系研究表明, MMP-9 同时表达于卵巢肿瘤间质细胞和肿瘤细胞, 且 MMP-9 的过度表达与晚期卵巢癌的不良预后有关。

表 3 卵巢乳头状癌临床指标与 MMP-2、MMP-9、TIMP-2 表达及细菌 L 型感染的关系 (n)

观察项目	n	MMP-2	MMP-9	TIMP-2	细菌 L 型
年龄(岁)					
< 60	72	55	56	42	22
≥ 60	25	17	18	17	3
合计	97	72	74	59	25
χ^2	—	0.68	0.34	0.73	3.34
P	—	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05
腹腔转移					
有	45	42	42	20	22
无	52	30	32	39	3
合计	97	72	74	59	25
χ^2	—	16.02	13.48	9.45	23.45
P	—	< 0.005	< 0.005	< 0.005	< 0.005
腹腔积液					
有	28	25	26	7	18
无	69	47	48	52	7
合计	97	72	74	59	25
χ^2	—	4.67	5.97	21.20	30.52
P	—	< 0.05	< 0.05	< 0.005	< 0.005

而 TIMPs 与相应的 MMPs 酶原及其活化形式结合, 即 TIMP-2 与 MMP-2 结合, TIMP-1 与 MMP-9 结合, 从而抑制 MMPs 的产生及其活性, 是肿瘤发生恶性转化和转移的抑制因素。而 TIMP-2 是存在于机体内的组织型 MMP-2 抑制剂, 特异性与 MMP-2 酶原和活性酶 1:1 结合, 使之失活, TIMP-2/MMP 复合物与 MMP-2 结合, 可使之激活, 所以 MMP-2 与 TIMP-2 既相互拮抗, 又相互协同, 两者分布一致, 两者的平衡对维持基底膜的完整以及 MMP-2 的正常功能有重要意义。Murphy 等^[4]发现 TIMP-2 可抑制碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 刺激的人血管内皮细胞增生。此发现表明, TIMP-2 不仅可通过抑制金属蛋白酶降解来阻止肿瘤的浸润与转移, 而且还可以通过抑制 bFGF 所刺

激的新生血管形成阻止原发性肿瘤的生长。

本研究表明, 恶性肿瘤中 MMP-2、MMP-9 及 TIMP2 的表达率均明显高于良性肿瘤 ($P < 0.005$)。Brown 等^[5]认为, 肿瘤中 MMPs 和 TIMPs 同时表达增多的现象与机体的防御平衡机制被破坏有关, 即 MMPs 的蛋白水解活性最终超过机体通过防御性反应表达的 TIMPs 活性, 导致了肿瘤周围组织的降解和重构, 并侵袭血管和淋巴管, 形成转移灶。Mannello 等^[6]认为, TIMP-1 和 TIMP-2 除能够抑制 MMPs 的活性、抑制肿瘤的生长、侵袭和转移外, 还有生长因子样作用, 能抑制血管生成并抑制细胞的程序性死亡, 后两者与抑制 MMPs 活性无关。

MMP-2、MMP-9 阳性表达率均随着恶性肿瘤的病理分级增高而显著增加 ($P < 0.005$), 临床分期愈晚表达愈高 ($P < 0.005$), 有腹腔淋巴结转移及有腹腔积液者均高于无腹腔淋巴结转移及无腹腔积液者 ($P < 0.05$)。MMP-2、MMP-9 阳性表达在判断卵巢恶性肿瘤的侵袭和转移, 以及恶性程度和预后估计上具有较为重要的临床意义。而 TIMP-2 阳性表达率与肿瘤临床分期、病理分级、有腹腔淋巴结转移及有腹腔积液者比无腹腔淋巴结转移及无腹腔积液者的关系与 MMP-2、MMP-9 相反, 说明 IV 胶原酶在促进卵巢恶性肿瘤浸润和转移的同时, TIMP-2 对卵巢恶性肿瘤浸润和转移起抑制作用, 提示 MMP-2、MMP-9、TIMP-2 与卵巢恶性肿瘤发生发展有关, 尤其在肿瘤的浸润和转移过程起重要促进作用, 也是评价卵巢恶性肿瘤预后的依据。

细菌 L 型是细菌的细胞壁发生不同程度缺损所致, 其生物学行为和致病特征与病毒有相似之处, 细菌 L 型的原生小体类似病毒颗粒, 可侵入细胞内生长、繁殖, 这样不断造成细胞和组织的损伤, 而损伤的组织可通过周围的组织增生来修复, 有可能引起体细胞增生和不典型增生以至癌变^[7]。同时 L 型引起的慢性炎症灶内巨噬细胞可分泌自由基活性氧, 引起细胞内产生小分子量的断裂因子, 导致 DNA 损伤, 断裂或使 DNA 发生错误修复^[8], 因此推断细菌 L 型感染可引起 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-2 过表达或伴有基因变异, 它们共同作用导致细胞无限蓄积, 以致发生恶性转化, 在卵巢肿瘤的发生发展和浸润及转移过程中起重要的促进作用。本组细菌 L 型检出率与肿瘤临床分期、病理分级、有腹腔淋巴结转移、有腹腔积液比无腹腔淋巴结转移、无腹腔积液者均有明显关系 ($P < 0.005$)。

(本文图 1~4 见封四)

[参 考 文 献]

[1] Boyd RS, Balkwill FR. MMP-2 release and activation in ovarian

[文章编号] 1000-2200(2005)03-0201-03

乳健安胶囊治疗乳腺增生病的实验研究

李 敏, 廖松岩, 李晓明, 祝晓光

[摘要] 目的: 观察乳健安胶囊对实验性大鼠乳腺增生病的治疗作用。方法: 复制动物乳腺增生模型, 灌乳健安, 观察功能学、组织细胞学变化和性激素水平变化。结果: 乳健安胶囊明显改善大鼠乳腺组织增生性病理形态学变化, 其主要表现为明显减少乳腺小叶数和腺泡数, 显著减小乳腺体积、腺泡腔直径及乳房直径。同时显著降低血清雌二醇水平和血清孕酮水平 ($P < 0.01$)。结论: 乳健安治疗乳腺增生病效果显著。

[关键词] 乳腺增生; 乳腺, 动物; 大鼠模型; 乳健安; 雌二醇; 孕酮

[中国图书资料分类法分类号] R 655.8 [文献标识码] A

Experimental study of the therapeutic effect of Rujianan capsule on hyperplasia of mammary gland

LI Min, LIAO Song-yan, LI Xiao-ming, ZHU Xiao-guang

(Department of Pharmacology, Bengbu Medical College, Bengbu 233003, China)

[Abstract] **Objective** To study the therapeutic effect of Rujianan capsule (RJAC) on mammary hyperplasia in rats. **Methods**: RJAC, a traditional Chinese medicine, was given to hyperplasia model of rats by per oral. The changes of mammary histocytes, function and sex hormone were observed. **Results**: RJAC can mend hyperplastic pathologic changes. It can reduce the volume and diameter of mammary gland, the number of breast leaflets and acini. The serum estrogen (E_2) level and the serum progesterone (P) level were decreased ($P < 0.01$). **Conclusions**: RJAC is effective in treatment of hyperplasia of mammary gland.

[Key words] hyperplasia of mammary glands; mammary glands, animal; rat model; Rujianan; estradiol; progesterone

乳腺增生病是最常见的乳腺疾病, 可发生于青春开始以后的任何年龄妇女, 约占全部乳腺疾病的 75%。现代医学认为, 乳腺增生病的发生与内分泌功能紊乱、卵巢功能失调致使体内雌激素水平增高或活性增强、孕激素水平降低、孕激素与雌激素比例失调有关。西医治疗此病主要采用性激素疗法和内分泌疗法。使用中医药治疗本病, 疗效可靠, 副作用少, 已逐渐被临床广泛采用。乳健安是我院药物研究所研制的中药制剂, 本实验通过制备大鼠乳腺增生模型进行乳健安药效学研究, 为其临床治疗乳腺增生病提供可靠的实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物 Wistar 大鼠 60 只, 健康雌性未孕, 75 ~ 85 日龄, 体重(210 ± 13) g。由河南医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号: 医动字第 410116 号。

1.2 药物 乳健安胶囊, 蚌埠医学院药物研究所提供, 批准号为 030720; 乳增宁胶囊, 由安徽新力药业股份有限公司蚌埠涂山制药厂提供, 国药准字 Z10950011; 苯甲酸雌二醇注射液为上海通药业股份有限公司产品, 批准号: 020402; 黄体酮注射液为上海通药业股份有限公司产品, 批准号: 020404。测定激素所用的放免试剂盒均由天津九鼎医学生物工程有限公司提供。

1.3 造模、分组、给药 将大鼠随机分为 6 组, 每组 10 只, 其中 1 组作正常对照组, 肌肉注射生理盐水

[收稿日期] 2004-09-02

[作者单位] 蚌埠医学院药系, 安徽蚌埠 233003

[作者简介] 李 敏(1978-), 女, 安徽蚌埠人, 助教。

carcinoma: The role of fibroblasts[J]. *Br J Cancer*, 1999, 80(3-4): 315 ~ 321.

[2] Elson BAR, Finleton B, Rothenberg NL, et al. Matrix metalloproteinases: Biologic activity and clinical implications[J]. *J Clin*, 2000, 18(5): 1 135 ~ 1 149.

[3] Davidson B, Goldberg I, Gotlieb WH, et al. The prognostic value of metalloproteinases and angiogenic factors in ovarian carcinoma[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 187(1-2): 39 ~ 45.

[4] Murphy AN, Unsworth EJ, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF induced human microvascular

endothelial cell proliferation[J]. *J Cell Physiol*, 1993, 157(2): 351 ~ 358.

[5] Brown PD. Matrix metalloproteinase inhibitors[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1998, 52(1-3): 125 ~ 136.

[6] Mannello F, Gazzanelli G. Tissue inhibitors of metalloproteinases and programmed cell death: Conundrums, controversies and potential implications[J]. *Apoptosis*, 2001, 6(6): 479 ~ 482.

[7] 汪万英, 郁 佳, 李永昊. 细菌 L 型感染小鼠致体细胞增生和诱发肿瘤的研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(6): 37 ~ 39.

[8] 汪万英, 何 杰, 张世馥, 等. 金葡菌及其 L 型感染荷瘤小鼠的实验研究[J]. 中国微生态学杂志, 1996, 8(5): 38 ~ 39.

卵巢肿瘤 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-2 和细菌 L 型检测的意义(正文见 198 页)

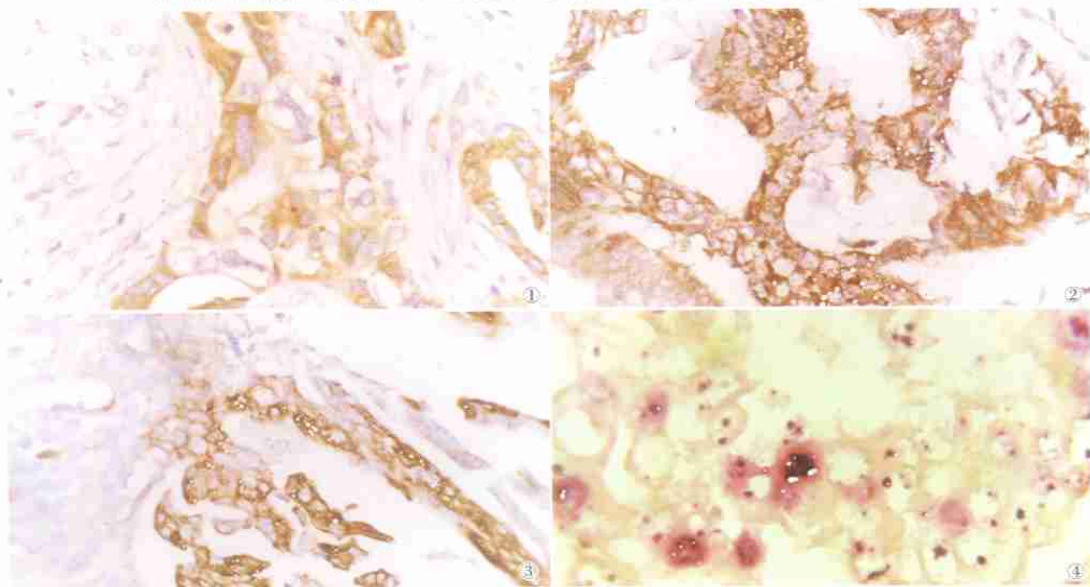


图 1-3 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-2 在卵巢浆液性乳头状囊腺癌中的阳性表达(S-P 法 ×400) 图 4 细菌 L 型主要分布于卵巢浆液性乳头状囊腺癌细胞质或间质内

67kDa 层粘连蛋白受体在胆囊癌中的表达及意义(正文见 203 页)



图 1 胆囊腺癌 II 级,67LR 胞质阳性 ×100 图 2 胆囊腺癌,67LR 胞质阳性 ×100 图 3 慢性胆囊炎,67LR 染色阴性 ×100

蚌埠医学院学报

双月刊(1976 年 3 月创刊)
2005 年 第 30 卷 第 3 期(总第 135 期)
2005 年 5 月 15 日出版

主管单位:安徽省教育厅
主办单位:蚌埠医学院
主 编:祝 延
编辑出版:蚌埠医学院学报编辑部
(安徽省蚌埠市治淮路 801 号 233003)
电话:(0552)3066412-2061

电子信箱:bang@chinajournal.net.cn
印 刷:蚌埠市光大彩色制印有限公司
国内订阅:全国各地邮政局
国内总发行:蚌埠市邮政局
国外总发行:中国国际图书贸易总公司
(北京 399 信箱)

Journal of Bengbu Medical College

Bimonthly(Founded in March 1976)
2005, Vol. 30, No. 3(Sum 135)
May 15, 2005

Responsible Institution The Education Department of Anhui Province
Sponsored by Bengbu Medical College
Editor in Chief ZHU Yan
Edited and Published by The Editorial Board of Journal of
Bengbu Medical College (801 Zhihuai Road, Bengbu,
Anhui 233003, China) Tel: (0552)3066412-2061
E-mail bang@chinajournal.net.cn
Printed by Bengbu Guangda Color Printing Co. Ltd
Domestic Subscription Local Post Offices
Domestic Distribution Bengbu Post Office
Foreign Distribution China International Book Trading Corporation
(P. O. Box 399, Beijing, China)