

MMP-9、TIMP-2 在食管鳞状细胞癌的表达 及与术后复发转移和预后的关系

熊海科^{1,2}, 朱自江^{1,2}, 陈学忠², 薛继军², 朱小康², 赵海龙², 郑凤长²

[摘要] **目的:**探讨基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和基质金属蛋白酶抑制剂-2(TIMP-2)在食管癌中的表达及与食管癌术后复发或转移和预后之间的关系。**方法:**采用组织芯片技术,用免疫组织化学方法检测食管癌术后存活 5 年以上而无复发转移组(A 组)和术后 1 年内发生复发转移而病死组(B 组)食管鳞状细胞癌(ESCC)病例中的 MMP-9、TIMP-2 表达情况。**结果:**MMP-9、TIMP-2 在正常食管鳞状上皮中不表达或少量表达,在食管癌组织中有不同程度的表达。有淋巴结转移者 MMP-9 阳性表达明显高于无淋巴结转移者($P < 0.01$);TIMP-2 表达在分化程度和有无淋巴结转移间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。TIMP-2 表达与 MMP-9 表达无相关关系($P > 0.05$)。**结论:**MMP-9、TIMP-2 在食管癌组织中高表达,其表达情况与食管癌术后发生复发转移有明显的相关性,联合检测 MMP-9、TIMP-2 表达对预测 ESCC 术后发生复发转移和预后具有重要价值,可列为手术切除标本的常规检查项目,以指导术后治疗。

[关键词] 食管肿瘤;复发转移;基质金属蛋白酶-9;基质金属蛋白酶抑制剂-2

[中国图书资料分类法分类号] R 735.1 **[文献标志码]** A

Expressions of MMP-9 and TIMP-2 in ESCC and their association with the recurrence, metastasis and prognosis of the tumor

XIONG Hai-ke^{1,2}, ZHU Zi-jiang^{1,2}, CHEN Xue-zhong², XUE Ji-jun², ZHU Xiao-kang², ZHAO Hai-long², ZHENG Feng-zhang²

(1. Department of Clinical Medicine, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou Gansu 730000;

2. Department of Thoracic Surgery, Gansu Tumor Hospital, Lanzhou Gansu 730050, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expressions of matrix metalloproteinase-9(MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-2(TIMP-2) in esophageal carcinoma and their relation with the recurrence or metastasis after esophagectomy. **Methods:** The expressions of MMP-9 and TIMP-2 in patients with ESCC who survived over 5 years without recurrence or metastasis (group A) and those who died of recurrence or metastasis within 1 year (group B) were detected by immunohistochemistry with Tissue Chip technique. **Results:** There was no expression or little expression of MMP-9 and TIMP-2 in normal esophageal mucosa, but different degrees of expression in esophageal carcinoma. The expression of MMP-9 was significantly higher in patients with lymph node metastasis than in those without ($P < 0.01$); the expression of TIMP-2 was positively correlated with the tumor differentiation and lymph node metastasis ($P < 0.05$); the expression of MMP-9 was not correlated with the expression of TIMP-2 ($P > 0.05$). **Conclusions:** The MMP-9 and TIMP-2 express high in the esophageal carcinoma tissue, and the expression level is significantly correlated with the recurrence or metastasis of the tumor after esophagectomy. Determination of the expression of MMP-9 and TIMP-2 may be of prognostic value in predicting the recurrence or metastasis of the tumor. It is suggested that this detection be included in the routine examination item for the resected specimen to direct the postoperative treatment.

[Key words] esophageal neoplasms; recurrence and metastasis; matrix metalloproteinase-9; tissue inhibitor of metalloproteinase-2

食管癌术后发生复发或转移是极其复杂的多基因调控和多步骤发展过程,与肿瘤细胞自身的生物学特性、周围间质的相互作用、器官组织的微环境以及机体的免疫状态等密切相关,涉及肿瘤细胞、机

体、靶组织的相互作用和影响,以及一系列肿瘤相关基因的激活或失活。其中,基质金属蛋白酶(MMPs)是一类 Zn^{2+} 依赖的蛋白水解酶,现已发现至少 25 种 MMP,称为 MMP 家族。MMPs 具有以下功能:使肿瘤细胞周围的物理屏障遭到破坏;可重塑细胞黏附力以便肿瘤细胞向周围生长;作用于基质成分后,激发其他一些潜在的生物活性;参与肿瘤的免疫过程;通过对细胞外基质(ECM)的改建,促进肿瘤血管的形成。几乎所有肿瘤组织中均存在 MMPs 高表达及高活性的现象,大量研究^[1-4]表明

[收稿日期] 2013-07-08

[作者单位] 1. 甘肃中医学院 临床医学院,甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省肿瘤医院 胸外科,甘肃 兰州 730050

[作者简介] 熊海科(1982-),男,硕士研究生,主治医师。

[通信作者] 朱自江,博士,硕士研究生导师,主任医师. E-mail: zhuzijian 2008@163.com

MMPs 在肿瘤的侵袭和复发转移中起重要作用。基质金属蛋白酶抑制剂 (TIMPs) 是一组能特异性抑制 MMPs 活性的多功能因子, 有些患者术后能长期生存无复发转移而有些患者术后由于短期内发生复发转移而死亡, MMP-9/TIMP 的表达是否能揭示其中的规律目前尚未有相关研究。本研究利用免疫组织化学方法检测生存 5 年以上而无复发或转移, 以及生存 1 年内死于复发或转移的食管鳞状细胞癌 (ESCC) 患者组织中 MMP-9、TIMP-2 表达情况, 以探讨其与食管癌复发转移及预后的关系, 旨在为预测食管癌术后发生复发转移潜能和评估预后寻求一个有效的生物学指标。

1 资料与方法

1.1 病例收集 随访甘肃省肿瘤医院 1997 年 10 月

表 1 2 组患者一般资料比较

分组	n	年龄/岁		性别		肿瘤部位			肿瘤长度			吻合部位			分化程度			吻合方式		根治程度	
		<65	≥65	男	女	上段	中段	下段	<3 cm	3~5 cm	>5 cm	颈部	弓上	弓下	高	中	低	手工吻合	器械吻合	根治切除	姑息切除
A 组	124	102	22	105	19	11	82	31	47	49	28	12	86	26	42	45	37	104	20	112	12
B 组	62	45	17	56	6	2	42	18	11	22	29	3	48	11	9	37	16	53	9	29	33
合计	186	147	39	161	25	13	124	49	58	71	57	15	134	37	51	82	53	157	29	141	45
χ^2	—	2.34		1.13		2.16			13.46			1.79			11.01			0.08		42.71	
P	—	>0.05		>0.05		>0.05			<0.01			>0.05			<0.01			>0.05		<0.01	

分组	n	有无化疗		有无放疗		有无淋巴结转移		残端情况		T 分期				淋巴结转移数			病理分期				
		有	无	有	无	有	无	阳性	阴性	Tis-T1	T2	T3	T4	0 个	1~3 个	>3 个	0-I	IIa	IIb	III	IV
A 组	124	68	56	32	92	19	105	6	118	18	46	48	12	107	15	2	18	75	6	25	0
B 组	62	38	24	21	41	45	17	8	54	0	6	16	40	15	32	15	1	7	3	47	4
合计	186	106	80	53	133	64	122	14	172	18	52	64	52	122	47	17	19	82	9	72	4
χ^2	—	0.20		1.32		60.04		2.79		20.72				72.90			8.05 [△]				
P	—	>0.05		>0.05		<0.01		>0.05		<0.01				<0.01			<0.01				

△示 u_c 值

1.3 组织芯片的制备 (1) 蜡块选取和定位: 186 例 ESCC 和 62 例正常食管组织均用 4% 中性甲醛固定、石蜡包埋, 切片厚 4 μm , HE 染色, 显微镜下观察。ESCC 病例选取肿瘤细胞形态完整、具有代表性的癌组织结构, 正常食管组织选取鳞状上皮, 用记号笔进行定位, 然后分别对照相应供体蜡块进行定位, 并标记 (在目标组织区域周围画圈)。(2) 载体蜡块的制备: 将市售石蜡溶化后, 注入模具内, 制取大小为 35 mm \times 27 mm \times 9 mm 的载体蜡块。(3) 组织微阵列的设计: 在载体石蜡上用组织芯片制备仪 (北京博医康实验仪器有限公司) 的打孔针打出间距为 1.0 mm, 直径 0.6 ~ 0.8 mm, 深度为 4 mm 的孔, 设计成 9 \times 7 阵列。用采样针从已标记好的组织

至 2002 年 10 月的食管癌病例, 筛选出生存时间 > 5 年和 < 1 年者, 收集病理科存档的食管癌石蜡标本, 由资深病理学教授带领复习 HE 切片, 明确病理学诊断, 按照 2000 年 WHO 食管肿瘤组织学分类中鳞状细胞癌及其亚型的诊断标准, 筛选出符合要求的病例 186 例 (生存时间 > 5 年者 124 例, A 组; 生存时间 < 1 年者 62 例, B 组)。确定其分级, 对其浸润深度、有无淋巴结转移进行评定。所有患者术前未接受过任何放化疗。2 组患者肿瘤长度、分化程度、根治程度、有无淋巴结转移、T 分期、病理分期和淋巴结转移数差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 其余各项病理资料差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 1)。另收集 62 例距食管肿瘤 ≥ 3 cm 的正常食管组织手术标本作正常对照。

中获取直径为 0.6 ~ 0.8 mm 的组织块, 并将其压入已打好孔的载体石蜡中, ESCC 与正常食管组织标本随机排列, 左上角留一空白孔作为坐标标识。每例肿瘤组织取 3 ~ 5 个点, 共 844 点, 每例正常组织取 3 个点, 共 186 点, 总共制备 1 030 个观测点。(4) 将制备好的载体石蜡连续切片, 厚 4 μm , 1 张 HE 染色, 其余用 3-氨基基 - 三乙氧基硅烷 (APES, SIGMA) 硅化的载玻片裱片, 置于 56 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中烘烤 48 h 用作免疫组织化学染色。

1.4 免疫组织染色

1.4.1 主要仪器、设备 CS101-2EB 型电热鼓风干燥箱 (重庆四达实验仪器有限公司恒达仪器厂); BCD-1857 型 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 (海尔集团); S25-2 型恒温磁

力搅拌机(上海司乐仪器有限公司);WGP-450 型隔水式电热恒温培养箱(北京广开源科贸有限公司);TS-1 型脱色摇床(江苏海门麒麟医用仪器厂);湿盒(协力塑料制品厂);GL-88B 型旋涡混合器(江苏海门麒麟医用仪器厂);WP800TL23-K3 型电磁炉(广东格兰仕集团有限公司);YS223FA 型高压锅(苏泊尔);HH. W21 型电子恒温水箱(北京中兴伟业仪器有限公司);CH-2 型显微镜(Olympus)。

1.4.2 试剂 MMP-9 与 TIMP-2 第一抗体分别选择兔抗人多克隆抗体和鼠抗人多克隆抗体;LsAB 法所用封闭血清及二三抗分别为 SP-9001 试剂盒、SP-9002 试剂盒;上述试剂及浓缩型 DAB 试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。阳性对照分别为乳腺癌组织和结肠癌组织。空白对照为 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)。

1.4.3 操作步骤 MMP-9、TIMP-2 采用 LsAB 法。微阵列切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,3% 过氧化氢处理切片,25 min,阻断内源性过氧化物酶。蒸馏水洗,摇床,5 min × 2 次,抗原修复:选择 EDTA 高压锅煮沸的方法进行修复,将切片置于 pH 9.0 的 EDTA 缓冲液中,待煮沸后高压加热 8 min。自然冷却至室温,0.01 mol/L PBS 洗,摇床,5 min × 2 次,血清封闭:PAP 笔画圈,滴加血清,用盖玻片加封,37 °C 孵育 20 min。检测 MMP-9、TIMP-2 的切片用非免疫羊血清(稀释度 1:20),小心除去盖玻片,用滤纸吸去血清,滴加第一抗体,用盖玻片加封,37 °C 孵育 2 h,用 PBS 冲去盖玻片,0.01 mol/L PBS 洗,摇床,5 min × 2 次,检测 MMP-9 的切片滴加生物素标记的羊抗兔抗体(稀释度 1:200),检测 TIMP-2 的切片滴加生物素标记的羊抗鼠抗体(稀释度 1:200),加盖玻片,37 °C 孵育 45 min,用 PBS 冲去盖玻片,0.01 mol/L PBS 洗,摇床,5 min × 2 次,滴加辣根过氧化物酶标记的链亲和素复合物(稀释度 1:200),加盖玻片,37 °C 孵育 45 min,用 PBS 冲去盖玻片,0.01 mol/L PBS 洗,摇床,5 min × 2 次,新鲜配置的 DAB 液显色,镜下适时终止,自来水冲洗,苏木素复染,室温,4 min,1% 盐酸乙醇分化数秒,自来水冲洗返蓝 15 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.4.4 染色结果判断 对于每个观察点选取染色质量较好的区域,随机选择 5 个高倍视野,分别由 3 位病理医师对染色强度作评估,再综合其结果进行评分。MMP-9、TIMP-2 均定位于细胞质,评分标准为:0 分,阴性(-);1 分,弱阳性(1+);2 分,中

等强度阳性(2+);3 分,强阳性(3+)。为了方便统计,根据染色评分结果将试验对象分为低表达(-及 1+)与高表达(2+及 3+)。

1.5 统计学方法 采用 χ^2 检验、秩和检验和等级相关分析。

2 结果

肿瘤细胞 MMP-9、TIMP-2 阳性定位于细胞质,在正常鳞状上皮中不表达或在基底层少量表达。

2.1 2 组患者肿瘤组织 MMP-9 的表达水平及与临床病理特征关系 A 组患者肿瘤组织中 MMP-9 表达率为 57.3%,高表达率为 23.4%;B 组患者肿瘤组织中 MMP-9 表达率 79.0%,高表达率为 46.4%。2 组肿瘤组织中 MMP-9 的表达水平差异有统计学意义($P < 0.01$)(见表 2 和图 1)。

有淋巴结转移和组织残端阳性者 MMP-9 阳性表达均高于无淋巴结转移和组织残端阴性者($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$);而在性别、年龄、肿瘤位置、肿瘤长度、分化程度和 T 分期期间差异无统计学意义($P > 0.05$)(见表 3)。

表 2 2 组肿瘤组织中 MMP-9 的表达水平比较(n)

分组	n	-	1+	2+	3+	u_c	P
A 组	124	53	42	24	5		
B 组	62	13	21	23	5	3.42	<0.01
合计	186	66	63	47	10		

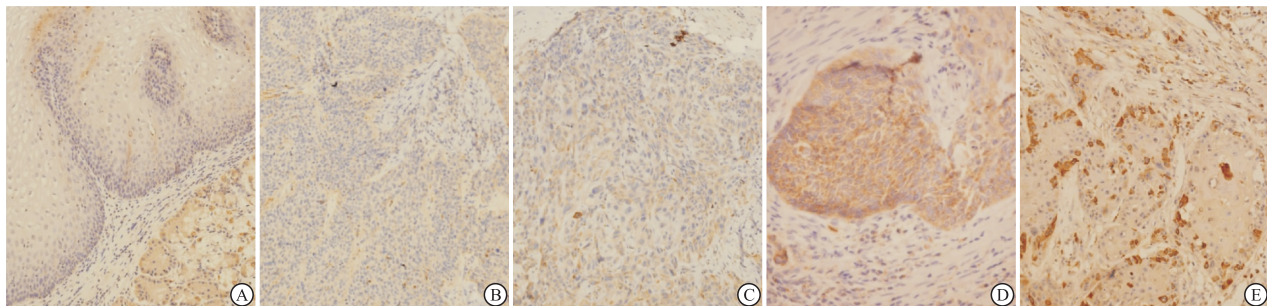
2.2 2 组患者临床病理特征与肿瘤组织 TIMP-2 的表达水平关系 2 组患者肿瘤组织中 TIMP-2 的表达水平差异有统计学意义($P < 0.05$)(见表 4 和图 2)。

TIMP-2 阳性表达在分化程度和有无淋巴结转移间差异均有统计学意义($P < 0.05$),而在性别、年龄、肿瘤位置、肿瘤长度、T 分期和残端情况间差异均无统计学意义($P > 0.05$)(见表 5)。

2.3 MMP-9 与 TIMP-2 表达结果的相关性 患者 MMP-9 与 TIMP-2 表达一致性为 30.65%,二者表达结果无相关关系($P > 0.05$)(见表 6)。

3 讨论

肿瘤细胞浸润和复发转移至远处器官是个复杂的过程,大量实验^[1-5]证明,瘤细胞浸润转移能力与其诱导产生蛋白酶降解 ECM、基膜的能力密切相关。MMPs 是其中最为重要的一组蛋白酶,在肿瘤



A:正常食管鳞状上皮基底层不表达;B:生存时间>5年组不表达;C:生存时间>5年组呈弱阳性表达;D:生存时间<1年呈中等强度表达;E:生存时间<1年呈强阳性表达

图1 各组MMP-9表达情况

表3 患者临床病理特征与 MMP-9 表达关系(n)

临床病理特征	n	MMP-9 表达		χ^2	P
		阳性	阳性率/%		
年龄					
<65 岁	147	96	5.3	0.19	>0.05
≥65 岁	39	24	61.5		
性别					
男	161	102	63.4	0.71	>0.05
女	25	18	72.0		
肿瘤部位					
上段	13	6	46.2	2.71	>0.05
中段	124	84	6.7		
下段	49	30	61.2		
肿瘤长度					
<3 cm	58	39	67.2	0.27	>0.05
3~5 cm	71	45	63.4		
>5 cm	57	36	63.2		
分化程度					
高	51	30	58.8	2.82	>0.05
中	82	51	62.2		
低	53	39	73.6		
T 分期					
Tis-T1	18	10	55.6	1.27	>0.05
T2	52	34	65.4		
T3	64	40	62.5		
T4	52	36	69.2		
有无淋巴结转移					
有	64	51	79.7	9.81	<0.01
无	122	69	56.6		
残段情况					
阳性	14	13	92.9	4.06	<0.05
阴性	172	107	62.2		

表4 2组患者肿瘤组织中 TIMP-2 的表达水平比较(n)

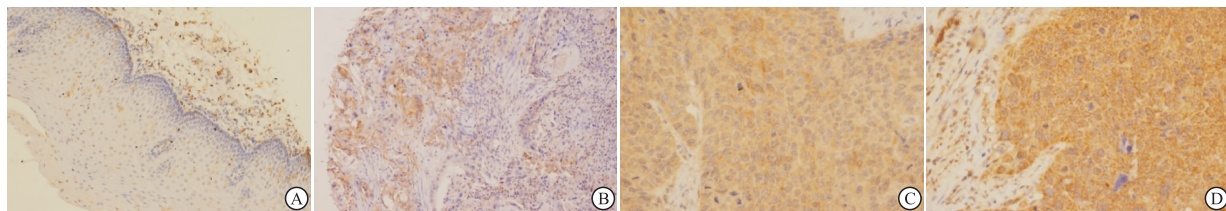
分组	n	-	1+	2+	3+	u_c	P
A 组	124	16	83	25	0	3.68	<0.01
B 组	62	1	36	20	5		
合计	186	17	119	45	5		

表5 患者临床病理特征与 TIMP-2 表达关系(n)

临床病理特征	n	TIMP-2 表达		χ^2	P
		阳性	阳性率/%		
年龄					
<65 岁	147	135	91.8	0.34	>0.05
≥65 岁	39	34	87.2		
性别					
男	161	147	91.3	0.03	>0.05
女	25	22	88.0		
肿瘤部位					
上段	13	11	84.6	1.70*	>0.05
中段	124	115	92.7		
下段	49	43	87.8		
肿瘤长度					
<3 cm	58	55	94.8	2.78	>0.05
3~5 cm	71	65	91.5		
>5 cm	57	49	86.0		
分化程度					
高	51	48	94.1	8.44	<0.05
中	82	78	95.1		
低	53	43	81.1		
T 分期					
Tis-T1	18	15	83.3	2.35*	>0.05
T2	52	46	88.5		
T3	64	60	93.8		
T4	52	48	92.3		
有无淋巴结转移					
有	64	54	84.4	4.94	<0.05
无	122	115	94.3		
残段情况					
阳性	14	12	85.7	-	0.089 Δ
阴性	172	167	97.1		

* 示 u_c 值; Δ 四格表确切概率法

的浸润和复发转移中有着重要的作用。TIMPs 是 MMPs 的天然抑制剂。TIMPs 与 MMPs 之间的平衡关系在 ECM 的代谢调节中起着重要作用,从而对食管癌患者发生复发转移起重要的作用。



A:正常食管鳞状上皮基底层不表达;B:生存时间>5年组呈弱阳性表达;C:生存时间<1年组呈中等强度表达;D:生存时间<1年组呈强阳性表达

图2 各组TIMP-2表达情况

表6 MMP-9 与 TIMP-2 表达水平的相关性(n)

MMP-9 表达	TIMP-2 表达				合计	r'_s	P
	-	1+	2+	3+			
-	5	54	6	1	66	0.191	>0.05
1+	6	35	21	1	63		
2+	4	27	15	1	47		
3+	2	3	3	2	10		
合计	17	119	45	5	186		

3.1 MMP-9 表达与 ESCC 浸润和复发转移的关系

研究^[5-6]证实,Ⅳ型胶原是 ECM 和基膜的主要结构蛋白,MMP-9 可分解明胶蛋白、Ⅳ型胶原、蛋白聚糖、弹性蛋白、粘连蛋白等构成 ECM 的重要成分。此外,MMP-9 在肿瘤新生血管过程中起着重要作用,MMP-9 表达的升高在肿瘤复发转移、侵袭生长中也有重要作用^[1-4]。本研究发现,食管癌组织 MMP-9 阳性表达在有淋巴结转移者高于无淋巴结转移者($P < 0.01$),而在分化程度、浸润深度和肿瘤长度等临床病理特征间其表达差异均无统计学意义($P > 0.05$),说明 MMP-9 的表达水平可以反映肿瘤复发或转移潜能,但不能反映食管癌的生物特性。

3.2 MMP-9 与 TIMP-2 的表达及对 ESCC 的预后

食管癌的侵袭转移是一个复杂、连续的过程,不少学者提出了多基因协同假设,认为肿瘤的发生、发展和转移的各个阶段有多个功能不同的异常激活的癌基因各自发挥着不同作用,并在时间和空间上相互配合,协同促进了肿瘤的复发转移。正常情况下,MMPs 的降解潜能和活性受 TIMP-2 的抑制^[7],TIMP-2 很少受细胞因子的诱导。正常人体中 MMP 与 TIMP 存在着一种动态平衡,保证了体内生理状态下细胞迁移和 ECM 重建,从而保证基膜的完整性,限制了肿瘤的侵袭,一旦调节失控,可导致肿瘤细胞的侵袭和转移^[8],而影响生存期。提示在食管癌组织中,MMP 与 TIMP 的平衡被打破是基膜降解的主要原因,癌细胞的浸润与转移是 MMP 过度分泌的结果。本研究结果显示,MMP 高表达的患者,术后更容易发生复发或转移。肿瘤细胞可能通过一

系列信号传导机制(肿瘤细胞与基质细胞的信号传导)抑制基质细胞产生 TIMP,为肿瘤浸润与转移提供有利的条件^[9]。

3.3 联合检测 MMP-9、TIMP-2 表达对预测 ESCC 术后发生复发转移的价值

随着免疫组织化学技术在临床上应用的普及,可以术后常规对食管癌做 MMPs 表达的检测。如果 MMP-9 表达阳性的病例,术后早期应加强各种治疗和检查。另外,则可将 MMPs 表达阳性食管癌患者作为抗癌治疗的一个新靶点。本研究中发现,选择性的 MMP-9、TIMP-2 联合检测对于食管癌侵袭转移等生物学行为的判定具有重要的临床实用价值,检测食管癌中 MMP-9 的异常表达,可作为食管癌生物学行为和预后的一个参考指标。

[参 考 文 献]

- [1] Herszényi L, Hritz I, Lakatos G, *et al.* The behavior of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer[J]. *Int J Mol Sci*,2012,13(10):13240-13263.
- [2] Martínez-Poveda B, Chavarria T, Sánchez-Jiménez F, *et al.* An *in vitro* evaluation of the effects of homocysteine thiolactone on key steps of angiogenesis and tumor invasion[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2003,311(3):649-653.
- [3] Murray GI. Matrix metalloproteinases: a multifunctional group of molecules[J]. *J Pathol*,2001,195(2):135.
- [4] Chakraborti S, Mandal M, Das S, *et al.* Regulation of matrix metalloproteinases: an overview[J]. *Mol Cell Biochem*,2003,253(1/2):269-285.
- [5] 王小军,杨文平. bFGF、MMPs 和 TIMPs 在肿瘤临床研究中的进展[J]. *中国现代医药杂志*,2012,14(2):126-128.
- [6] Sun XM, Dong WG, Yu BP, *et al.* Detection of type Ⅳ collagenase activity in malignant ascites[J]. *World J Gastroenterol*,2003,9(11):2592-2595.
- [7] Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase activity[J]. *Ann NY Acad Sci*,1994,732(1):31.
- [8] Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitor of metalloproteinases: evolution, structure, and function[J]. *Biochem Biophys Acta*,2000,1477(1):267-283.
- [9] Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, *et al.* Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in esophageal cancer[J]. *J Pathol*,1998,185(3):256-261.