

胃癌组织 MMP-2、MMP-9、Shh 蛋白的表达及与临床病理特征的关系

贺雄辉 邹科见 叶木林 蔡国豪 周卫平

摘要 目的 探讨胃癌组织基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、MMP-9及音猬因子(Shh)蛋白的表达及与临床病理特征的关系。方法 收集笔者医院54例胃癌组织与癌旁组织石蜡标本,应用免疫组化法检测MMP-2、MMP-9、Shh蛋白的表达,并分析与临床病理特征的关系。结果 胃癌组织中的MMP-2、MMP-9、Shh蛋白阳性表达比例明显高于癌旁组织($P < 0.05$)。MMP-2与MMP-9表达呈正相关($r = 0.633$),MMP-2与Shh表达呈正相关($r = 0.413$),MMP-9与Shh表达呈正相关($r = 0.527$)。胃癌组织MMP-2蛋白的表达与TNM分期、淋巴转移有关($P < 0.05$);MMP-9蛋白的表达与TNM分期、组织类型、淋巴转移有关($P < 0.05$);Shh蛋白的表达与TNM分期有关($P < 0.05$)。结论 MMP-2、MMP-9、Shh蛋白在胃癌组织中表达均上调,三者可能相互协同或调解对肿瘤的分化、侵袭与转移起作用。

关键词 胃癌 基质金属蛋白酶 音猬因子

中图分类号 R735

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.08.020

Expression of MMP-2, MMP-9 and Shh Proteins in Gastric Cancer Tissues and the Relationship with Clinicopathological Features. He Xionghui, Zhou Kejiang, Ye Mulin, et al. The First Department of General Surgery, People's Hospital of Hainan Province, Hainan 570311, China

Abstract Objective To explore the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9 and sonic hedgehog (Shh) protein in gastric cancer tissues and the relationship with clinicopathological features. **Methods** Paraffin specimens of 54 cases of gastric cancer and adjacent tissues were collected, and immunohistochemical staining was used to detect the expression of MMP-2, MMP-9 and Shh proteins. **Results** The positive rates of MMP-2, MMP-9 and Shh protein in gastric cancer tissues were significantly higher than those in adjacent tissues ($P < 0.05$). The expression of MMP-2 was positively correlated with the expression of MMP-9 ($r = 0.633$), and the expression of MMP-2 was positively correlated with the expression of Shh ($r = 0.413$), and the expression of MMP-9 was positively correlated with the expression of Shh ($r = 0.527$). The expression of MMP-2 protein in gastric carcinoma was related to TNM stage and lymph node metastasis ($P < 0.05$). The expression of MMP-9 protein was related to TNM staging, tissue type and lymph node metastasis ($P < 0.05$). The expression of Shh protein was related to TNM staging ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of MMP-2, MMP-9 and Shh protein were up-regulated in gastric carcinoma, and the three may play a role in tumor differentiation, invasion and metastasis cooperate or mediate each other.

Key words Gastric cancer; Matrix metalloproteinase; Sonic hedgehog

据国际癌症研究中心(IARC)统计结果表明,2012年全球胃癌新发人数达到95.2万,而我国达到40.5万,死亡人数达到32.5万,我国胃癌发生率与病死率均高于世界平均水平^[1]。胃癌的发生、发展是多因素、多基因共同作用的结果。细胞的迁移会首先降解细胞外基质(ECM),而基质金属蛋白酶(MMPs)即是用以降解ECM的一组蛋白酶。MMP-2与MMP-9作为MMPs家族的重要成员,其在肿瘤

的生长、浸润和转移中的作用受到关注。过去研究表明,音猬因子(Shh)的作用主要是通过调节细胞增殖与分化来促进人类胚胎发育,而近年又发现,其也与多种恶性肿瘤的发生、侵袭与转移有关^[2]。本研究旨在探讨胃癌组织MMP-2、MMP-9、Shh蛋白的表达及与临床病理特征的关系,为胃癌的早期诊断与治疗提供参考依据。

对象与方法

1. 研究对象:收集2015年6月~2017年6月54例手术切除胃癌组织石蜡标本,均经病理学证实为胃癌,且术前均无放疗及免疫治疗史,其中男性37

例,女性 17 例,患者年龄 43 ~ 77 岁,平均年龄 59.6 ± 9.4 岁,按国际临床肿瘤 TNM 分期标准: I 期 13 例, II 期 16 例, III 期 19 例, IV 期 6 例;组织类型:低分化 23 例,中分化 19 例,高分化 12 例。同时切除距肿瘤切缘 5cm 的正常组织作为癌旁组织。所有患者的临床资料完整,包括性别、年龄、肿瘤直径、TNM 分期、组织类型及有无淋巴转移等。

2. 研究方法:(1)主要试剂:兔抗人多克隆抗体 MMP-2(美国 Santa Cruz 公司)、兔抗人多克隆抗体 MMP-9(美国 Santa Cruz 公司)、兔抗人多克隆抗体 Shh(北京博奥深公司)、DAB 显色剂(中山金桥公司)、免疫组化 SP 试剂盒(武汉博士德公司)。(2)检测方法:所有标本经甲醛固定、石蜡包埋,4 μ m 厚连续切片,按试剂盒说明书行免疫组化染色,依次完成脱蜡,修复,一抗孵育,二抗孵育,DAB 显色等,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。结果判读:在 200 倍显微镜下选 5 个视野,细胞质或细胞膜内出现棕黄色或棕褐色颗粒(2 ~ 3 分)表示阳性,计算每个视野中阳性细胞的比例,<25% 计 1 分,26% ~ 50% 计 2 分,51% ~ 75% 计 3 分,>75% 计 4 分,将着色得分与阳性细胞比例得分相乘,最后取 5 个视野的平均值,>2 分为阳性结果。

3. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 统计学软件对数据进行统计分析,计数资料比较采用 χ^2 检验,相关性采用 Spearman 秩相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. MMP-2、MMP-9、Shh 蛋白在胃癌与癌旁组织中的表达:胃癌组织中的 MMP-2、MMP-9、Shh 蛋白阳性表达比例明显高于癌旁组织($P < 0.05$,表 1)。MMP-2、MMP-9、Shh 蛋白阳性表达(图 1 ~ 图 3)。

表 1 MMP-2、MMP-9、Shh 蛋白在胃癌与癌旁组织中的表达

项目	MMP-2		MMP-9		Shh	
	+	-	+	-	+	-
胃癌组织	35	19	40	14	39	15
癌旁组织	11	43	7	47	7	41
χ^2	21.812		41.022		38.770	
P	0.000		0.000		0.000	

2. 胃癌组织 MMP-2、MMP-9、Shh 蛋白表达之间的相关性:MMP-2 与 MMP-9 表达呈正相关($r =$

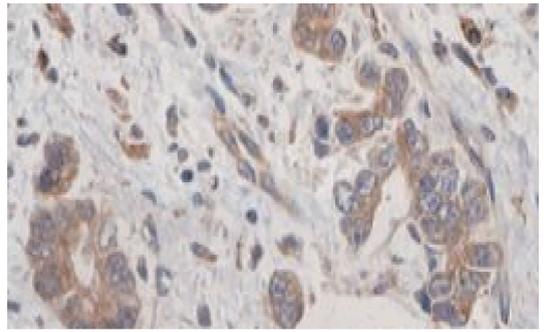


图 1 MMP-2 在胃癌中阳性表达(HE, x200)

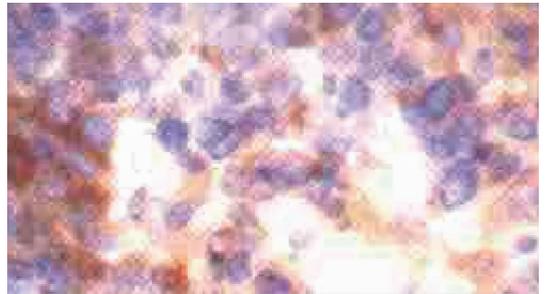


图 2 MMP-9 在胃癌中阳性表达(HE, x200)



图 3 Shh 在胃癌中阳性表达(HE, x200)

0.633, $P < 0.05$), MMP-2 与 Shh 表达呈正相关($r = 0.413, P < 0.05$), MMP-9 与 Shh 表达呈正相关($r = 0.527, P < 0.05$)。

3. 胃癌组织 MMP-2、MMP-9、Shh 蛋白的表达及与临床病理特征的关系:胃癌组织 MMP-2 蛋白的表达与 TNM 分期、淋巴转移有关($P < 0.05$);MMP-9 蛋白的表达与 TNM 分期、组织类型、淋巴转移有关($P < 0.05$);Shh 蛋白的表达与 TNM 分期有关($P < 0.05$);与性别、年龄、肿瘤直径均无关($P > 0.05$,表 2)。

讨 论

肿瘤的侵袭与转移是一个涉及基质降解、肿瘤血管形成等多个步骤的复杂过程。MMPs 是降解 ECM 的主要酶类,一般分为分泌型 MMPs 与膜型 MMPs,

表 2 胃癌组织 MMP-2、MMP-9、Shh 蛋白的表达及与临床病理特征的关系 ($\bar{x} \pm s$)

项目	n	MMP-2		P	MMP-9		P	Shh		P
		+	-		+	-		+	-	
性别										
男性	37	26	11	0.215	28	9	0.691	26	11	0.635
女性	17	9	8		12	5		13	4	
年龄(岁)										
<60	31	21	10	0.601	21	10	0.217	23	8	0.707
≥60	23	14	9		19	4		16	7	
肿瘤直径(cm)										
≤5	36	24	12	0.686	27	9	0.826	27	9	0.519
>5	18	11	7		13	5		12	6	
TNM 分期										
I ~ II	29	14	15	0.006	11	18	0.004	17	12	0.016
III ~ IV	25	21	4		19	6		22	3	
组织类型										
低分化	23	14	9	0.638	9	14	0.036	14	9	0.108
中高分化	31	21	10		21	10		25	6	
淋巴转移										
无	33	17	16	0.01	21	12	0.028	24	9	0.917
有	21	18	3		19	2		15	6	

既往研究表明,分泌型 MMPs 表达越强,其降解 ECM 与基膜的能力越强,肿瘤发生转移的危险越大^[3]。MMP-2 与 MMP-9 即属于分泌型 MMPs,二者能够降解 IV 型胶原,而 IV 型胶原正是组成血管基膜的重要成分。此外,二者还能促进新生血管形成,这无疑对肿瘤的侵袭与转移起到了推波助澜的作用^[4,5]。本结果显示,胃癌组织中的 MMP-2、MMP-9 蛋白阳性表达比例明显高于癌旁组织,且 TNM 分期越高以及伴随淋巴转移,MMP-2 蛋白阳性表达越高,提示 MMP-2 蛋白高表达对胃癌的浸润与转移有促进作用;而 TNM 分期越高、低分化以及伴随淋巴转移,MMP-9 蛋白阳性表达越高,提示 MMP-9 蛋白的表达对肿瘤的分化程度、侵袭与转移有影响^[6]。不过有研究显示,MMP-2 蛋白表达与胃癌的远处转移有关,而与淋巴转移无关。

Hedgehog 信号通路除了与胚胎发育有关外,近年研究发现,其还对肿瘤的发生、发展中起重要作用,肝癌、胃肠道恶性肿瘤、肺小细胞癌、前列腺癌等的发生都与 Hedgehog 信号通路的异常激活有关,可能参与肿瘤干细胞自我更新、细胞分化及侵袭转移等过程^[7,8]。Shh 是 Hedgehog 信号的上游分子,研究表明,其异常表达可增强肿瘤细胞的侵袭与黏附能力^[9,10]。本结果显示,胃癌组织中的 Shh 蛋白阳性表达比例明显高于癌旁组织,且随 TNM 分期的增高而增加,提示 Shh 蛋白可能参与到胃癌的侵袭与转移。

相关性分析发现,MMP-2、MMP-9、Shh 蛋白间存在明显的线性相关,提示三者 in 胃癌的发生、发展及转移中可能相互协同或调节。研究发现,Shh 信号激活后可通过重组 N-末端肽提高肝癌细胞的侵袭与黏附能力,而这个过程可被 MMP2 的特异性抑制剂阻断,此外重组 N-末端肽能介导 MMP-2 使 FAK/AKT 信号通路活化,故而可推测 Shh 可能通过 FAK/AKT 信号通路上调 MMP-2 的表达而提高肿瘤细胞侵袭与黏附能力^[11-13]。而另有研究发现,Shh 信号可通过 TGF- β 信号上调 MMP-2、MMP-9 而促进胃癌细胞迁移,也可能通过 Rho-ROCK 调节骨桥蛋白与 MMP-9 而促进毛细血管形态发生^[14,15]。

本研究存在一定不足之处,首先蛋白检测的金标准是 Western blot 法可以通过实验估算出相关蛋白质的相对含量,属于半定量方法,本研究采用定性方法可以判断出有无,但是对于具体含量判断存在一定局限性。此外,本研究可能因为样本量小,代表性不足,统计学意义判断存在一定的局限性,作为具有实际意义判断依据存在不足。因此下一步主要目标就是对各相关蛋白进行定量分析,具体掌握个蛋白的具体剂量值等,以及通过增加样本或者多中心的实验进行更叫具有代表性的研究。综上所述,MMP-2、MMP-9、Shh 蛋白在胃癌组织中表达上,三者可能相互协同或调解对肿瘤的分化、侵袭与转移起作用,但其中的具

体机制还有待深入研究, 以期为胃癌的诊治提供新的思路与靶点。

参考文献

1 操珍, 苏文. 胃癌相关细胞因子研究进展[J]. 中国肿瘤, 2016, 25(2):125-131

2 赵志龙, 张丽芳, 张佳, 等. Shh 与 MMP2 在人食管鳞癌组织中的表达及意义[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(7):1008-1011

3 冯宁, 伍晓汀, 高海德, 等. 胃癌组织中 E-钙黏蛋白、MMP-2 蛋白和 MMP-9 蛋白的表达及意义[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2013, 27(12):21-22

4 陈陆霞, 张诗武, 孙保存, 等. MMP-2、MMP-9 的表达与脉络膜黑色素瘤微血管密度及肿瘤转移的关系[J]. 眼科新进展, 2007, 27(8):565-567

5 冯亚光, 魏正强. Shh、Gli1、Foxm1 蛋白在胃癌中的表达及临床意义[J]. 广东医学, 2011, 32(19):2536-2538

6 欧阳小波, 王立. Hedgehog 信号通路在肿瘤侵袭转移作用的研究进展[J]. 肿瘤, 2011, 31(2):173-177

7 李韵秋, 匡志鹏, 吴继宁, 等. Hedgehog 信号通路分子 Shh、Ptch 和 Smo 在化学诱导小鼠肝癌模型过程中的动态表达[J]. 医学研究杂志, 2014, 43(5):65-69

8 Chen JS, Huang XH, Wang Q, et al. Sonic hedgehog signaling pathway induces cell migration and invasion through focal adhesion kinase/AKT signaling - mediated activation of matrix metalloproteinase (MMP) - 2 and MMP - 9 in liver cancer[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(1):9-10

9 欧阳小波, 郝亚琴, 王立. Hedgehog 信号通路阻断对人胃癌细胞 SGC-7901 侵袭和血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(8):935-938

10 虞玲华, 殷新光, 邬万新, 等. 胆囊癌中 Hedgehog 信号通路效应蛋白的表达及临床意义[J]. 中华普通外科杂志, 2013, 28(12):968-969

11 欧阳小波, 郝亚琴, 王立. Shh、Gli1 和 MMP-9 在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(9):1098-1101

12 Zhang DY, Wang J, Zhang GQ, et al. Correlations of MMP-2 and TIMP-2 gene polymorphisms with the risk and prognosis of gastric cancer[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11):20391

13 Che YL, Luo SJ, Li G, et al. The C3G/Rap1 pathway promotes secretion of MMP-2 and MMP-9 and is involved in serous ovarian cancer metastasis[J]. Cancer Letters, 2015, 359(2):241-249

14 Li W, Li S, Deng L, et al. Decreased MT1-MMP in gastric cancer suppressed cell migration and invasion via regulating MMPs and EMT[J]. Tumor Biol, 2015, 36(9):6883-6889

15 Donizy P, Rudno-Rudzinska J, Kaczorowski M, et al. Disrupted balance of MMPs/TIMPs in gastric carcinogenesis - paradoxical low MMP-2 expression in tumor and stromal compartments as a potential marker of unfavorable outcome[J]. Cancer Investigation, 2015, 33(7):286

(收稿日期:2017-11-01)

(修回日期:2017-11-14)

CBP 治疗对重症脓毒症患者外周血单核细胞 mCD14 的影响

李智鑫 应利君 金烈洲 吕 铁 严一核

摘要 **目的** 探讨连续性血液滤过技术(CBP)治疗对重症脓毒症患者外周血单核细胞 mCD14 的影响及其治疗脓毒症的机制。**方法** 将笔者医院重症医学科收治的 60 例重症脓症患者分为 CBP 组及非 CBP 组。在两组患者治疗过程的 0、12、24、48、72h 时相点, 留取外周血标本, 检测其 mCD14 及白细胞弹性蛋白酶表达量的变化。将治疗 24h 后的两组患者分离出外周血单核细胞, 并于体外培养, 以 LPS 刺激后, 在 4、8、12、24、48h 时相点检测单核细胞中 mCD14 表达量的变化; 同时用 ELISA 法检测单核细胞培养液中 TNF- α 、IL-6、IL-10 水平。**结果** 随着治疗的进行, CBP 组白细胞弹性蛋白酶水平较非 CBP 组下调更显著, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 而非 CBP 组 mCD14 水平较非 CBP 组上调亦更显著, 差异有统计学意义($P < 0.05$); CBP 组在孵育前及孵育后 4、8h 时相点 mCD14 水平明显高于同时相的脓毒症组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 其单核细胞接受 LPS 再刺激后对炎性反应能力也较脓毒症组强。**结论** CBP 治疗可通过高效清除循环中的炎性因子及白细胞弹性蛋白酶, 使 mCD14 水平上调, 使部分免疫细胞免疫功能得到一定的恢复, 从而改善机体内环境, 参与重建机体免疫内稳状态。

关键词 重症脓毒症 连续性血液滤过 mCD14 白细胞弹性蛋白酶

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2015ZDA030)

作者单位:312000 绍兴市人民医院重症医学科

通讯作者:应利君, 主任医师, 电子信箱:ylingj6666@163.com