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 xpression 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。过去研究表示,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,且术前均无放化疗及免疫治疗史,其中男性 37

基金项目:海南省自然科学基金资助项目(2013－813203)

作者单位:571001　海口,海南省人民医院胃肠外二科

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，4μm 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（$r=0.633$，$P<0.05$），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（$r=0.527$，$P<0.05$）。

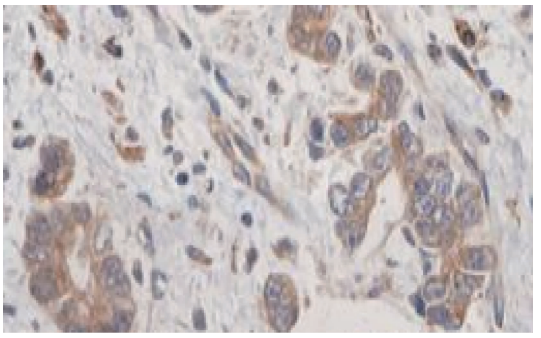


图 1　MMP－2 在胃癌中阳性表达（HE，×200）

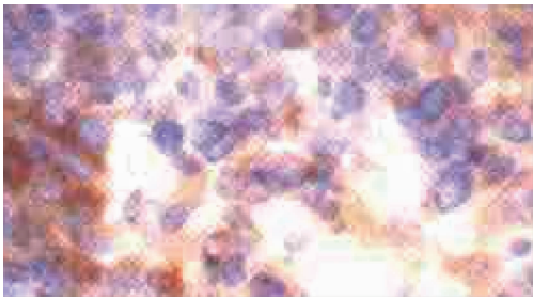


图 2　MMP－9 在胃癌中阳性表达（HE，×200）

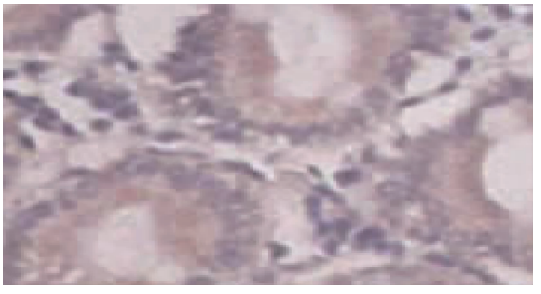


图 3 Shh 在胃癌中阳性表达（HE，×200）

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	

既往研究表示，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，研究表示，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，提示三者在胃癌的发生、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 信号通路与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 Clini 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 例重症脓毒症患者分为 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 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:yinglj6666@163.com