

胃癌组织中 MMP-14 蛋白的表达及在腹腔转移中的临床意义

孙亚伟, 王一波, 薛文波, 奚 诚, 谭玉林*

(江苏大学附属武进医院普外科, 江苏 常州 213002)

[摘要] 目的:探讨 MMP-14 蛋白在胃癌组织中的表达及在腹腔转移中的临床意义。方法:应用 RT-PCR 法检查 98 例原发性胃癌腹腔冲洗液中 MMP-14 的表达,30 例良性病变患者腹腔冲洗液作为阴性对照。免疫组织化学 SP 法检测 98 例原发性胃癌和 20 例正常胃黏膜组织 MMP-14 表达。结果:腹腔冲洗液中 MMP-14 阳性表达率分别为 40.8% (40/98), 高于对照组的 3.33% (1/30) ($P < 0.01$)。胃癌组织中 MMP-14 的阳性表达率为 76.5% (58/98), 显著高于正常胃黏膜组织的 5% (1/20) ($P < 0.01$)。MMP-14 在胃癌组织中的阳性表达率与患者的性别、年龄、分化程度无相关性 ($P > 0.05$), 而 MMP-14 的阳性表达率与胃癌的肿瘤浸润深度、肿瘤大小、淋巴转移、大体分型、临床肿瘤分期有关 ($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:胃癌组织中 MMP-14 高表达, 结合在腹腔冲洗液中 MMP-14 mRNA 的高表达, MMP-14 参与了胃癌的发生发展和腹腔转移的过程。

[关键词] 胃癌; 基质金属蛋白酶-14; 腹腔转移

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)02-183-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140212

The expression of MMP-14 in gastric carcinoma and its clinical significance in peritoneal metastasis

Sun Yawei, Wang Yibo, Xue Wenbo, Xi Cheng, Tan Yulin*

(Department of General Surgery, Affiliated Wujin Hospital, Jiangsu University, Changzhou 213002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and clinical significance of MMP-14 in gastric carcinoma and its role in peritoneal metastasis. **Methods:** The mRNA expression of MMP-14 in peritoneal washing samples were detected by RT-PCR in gastric carcinoma (98 cases) and normal control (30 cases). Immunohistochemical staining S-P method was used to detect the expression of MMP-14 in gastric carcinoma (98 cases) and normal gastric mucosa (20 cases). **Results:** The expression rates of MMP-14 were 76.5% (58/98) in gastric cancer tissues and 5% (1/20) in normal gastric mucosa tissues, which were significantly higher than those in the normal tissues respectively ($P < 0.01$). The MMP-14 mRNA positive rate of peritoneal washing samples in gastric cancer was higher than that in normal control. The positive expression rate of MMP-14 was related to the depth of invasion, the size of tumor, lymph node metastasis, macroscopic type and clinical stage ($P < 0.05, 0.01$), but not related to age, gender and differentiation of tumor ($P > 0.05$). **Conclusion:** The high expression of MMP-14 in gastric carcinoma and peritoneal washing samples suggests that MMP-14 may be involved in the development of gastric cancer and peritoneal metastasis process.

[Key words] gastric carcinoma; matrix metalloproteinase-14; peritoneal metastasis

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(02): 183-187]

胃癌是我国人群中发病率和病死率均占第 1 位的恶性肿瘤, 目前住院病例中 90% 以上为进展期胃癌, 即使施行根治手术, 腹腔转移仍是胃癌无法手术根治的主要原因之一, 也是术后复发、治疗失败的主

要原因。大量研究证明, 瘤细胞侵袭转移能力与其诱导产生蛋白酶降解 ECM (extracellular matrix, ECM)、基底膜的能力密切相关。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 是其中最为重要的一组蛋白酶, 在肿瘤的侵袭和转移中有着重要的作用。本研究旨在观察胃癌组织以及腹腔内 MMP-14 的表达情况, 分析 MMP-14 与胃癌临床病理的关系, 探讨其在胃癌浸润和转移中的作用。

[基金项目] 常州市卫生局重大项目 [常卫科教(2008): ZD200814]

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: tyldoctor@163.com

1 对象和方法

1.1 对象

选择临床及病理资料完整的江苏大学附属武进医院普外科2008年1月~2009年12月手术切除并经病理证实为胃癌患者98例。所有患者术前及术后病理学检查均诊断为胃癌。其中男60例,女38例;平均(61.3±12.5)岁。其中高分化组8例,中分化组50例,低分化组40例。胃癌分期中I/II期36例,III/IV期62例。Borrmann分型为I/II型54例,III/IV型44例。肿瘤直径≥5 cm者33例,<5 cm者65例。肿瘤浸润深度局限在浆膜层及浆膜内者66例,累及浆膜层外者32例。腹腔内转移者28例,无转移者70例。腹腔冲洗液阴性对照组为30例良性病变。胃癌免疫组织化学法对照组例数为20例,为良性胃病变黏膜组织。所有胃癌病例均采集术前腹腔冲洗液,向腹腔内注入无菌生理盐水100 ml,收集后TRIzol法提取腹腔冲洗液标本中的总RNA,取少量RNA用于含量及纯度测定,其余分装后置-80℃保存待用。另收集30例良性病变腹腔冲洗液作为阴性对照。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量RT-PCR

采用TRIzol试剂提取组织RNA,检测RNA浓度及纯度。MMP-14 mRNA检测:β-actin作为内参基因,β-actin引物序列如下:5'-CAGTCGGTTGGAGC-GAGCAT-3'(上游),5'-GGACTTCCTGTAACAACG-CATCT-3'(下游),片段长度为115 bp;MMP-14引物序列如下:5'-CATTGGAGGAGACACCCACTTTG-3'(上游),5'-CCAGGAAGATGTCATTT-CCATTCAG-3'(下游),片段长度为83 bp;反应条件:95℃,2 min,95℃ 10 s,54℃ 20 s,72℃ 20 s,共35个循环。MMP-14表达水平的计算方法:在目的基因与内参照基因扩增效率相同的情况下,测定循环阈值(Ct值),计算ΔCt值,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示MMP-14的相对表达水平。

1.2.2 免疫组织化学方法

采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组化染色法(S-P法)检测胃癌组织中MMP-14表达。对照组用已知阳性的切片作为阳性对照,PBS缓冲液代替一抗作阴性对照。MMP-14一抗工作浓度为1:100。

结果判定:均以细胞浆内或细胞膜上出现黄色或棕黄色颗粒为阳性着色。每例随机观察5个高倍视野,结果采用半定量积分法,首先将染色强度打

分:0分为无色,1分为淡黄色,2分为棕黄色,3分为棕褐色(染色深浅需与背景着色相对比)。再将阳性细胞所占的百分比打分:0分为阴性,1分为阳性细胞<10%,2分为11%~50%,3分为51%~75%,4分为>75%。染色强度与阳性细胞百分比的乘积≥3分为阳性,<3分为阴性,以上评分由2位不知具体临床资料的病理专家单独进行评分。用PBS代替一抗作阴性对照,已知阳性切片作为阳性对照。

1.3 统计学方法

采用SPSS13.0软件进行统计学处理,MMP-14表达强度在不同病理分级和TNM分期期间的比较采用单因素方差分析,与临床、病理等的各项指标间差别检验均应用 χ^2 检验或者运用Fisher精确概率法进行统计。以 $P\leq 0.05$ 表示差别有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR检测MMP-14基因在腹腔冲洗液中的表达

应用RT-PCR方法检测了98例胃癌患者及正常对照组腹腔冲洗液中MMP-14 mRNA的表达,结果显示胃癌组阳性例数40/98(40.8%),对照组阳性例数1/30(3.33%),胃癌组腹腔冲洗液MMP-14 mRNA表达水平明显增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 MMP-14mRNA表达与胃癌腹膜转移相关临床病理因素比较

通过统计分析可见,在胃癌腹腔液中MMP-14的表达阳性率随着肿瘤浸润深度的加深而显著增加($P < 0.01$);MMP-14 mRNA表达的阳性率还与腹腔内是否转移有关,腹腔内转移者明显高于无腹腔内转移者($P < 0.01$);并与胃癌的大体类型有关,Borr3+Borr4型明显高于Borr1+Borr2型($P < 0.01$,表1)。

2.3 胃癌组织MMP-14蛋白免疫组织化学染色结果

蛋白在胃癌组织、胃正常上皮组织中的表达:胃癌组MMP-14为细胞质内表达,镜下观察肿瘤细胞质出现黄色、棕黄色、棕褐色细小颗粒状,染色明显高于背景为阳性。对照组绝大多数未见表达,极少数呈散在性弱表达(图1、2)。MMP-14在胃癌组织中的阳性表达率为76.5%(58/98),明显高于在非肿瘤胃黏膜组织中的表达5%(1/20),二者的差异有统计学意义(χ^2 值=11.704, $P < 0.01$,表2)。

2.4 胃癌组织中MMP-14表达与临床病理特征的相关性

表 1 MMP-14 表达与胃癌腹腔转移相关临床病理因素分析

Table 1 Analysis between the expressions and peritoneal metastasis of MMP-14

临床病理特征	n	MMP-14 阳性[n(%)]	P 值
肿瘤浸润深度			
M、SM、MP	30	6(20.0)	
SS	42	10(23.8)	
SE、SI	26	24(92.3)	<0.01
腹腔内转移			
无	70	12(17.1)	
有	28	28(100.0)	<0.01
大体分型			
Borr1+Borr2	54	2(3.7)	
Borr3+Borr4	44	38(86.4)	<0.01

M:黏膜层;SM:黏膜下层;MP:肌层;SS:浆膜下层;SE:透浆膜层;SI:侵及浆膜层外。

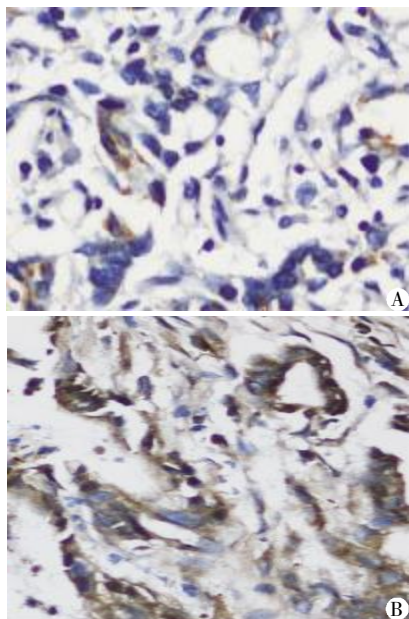


图 1 MMP-14 蛋白阴性表达(A)与阳性表达(B)(免疫组化, ×400)

Figure 1 The negative and positive results of MMP-14 expressions detected by immunohistochemical stain (×400)

表 2 非肿瘤胃黏膜组织与胃癌组织中 MMP-14 的表达

Table 2 The expression in non-tumor mucosal tissue and gastric cancer tissues of MMP-14

组别	n	MMP-14 阳性[n(%)]	χ ² 值	P 值
非肿瘤胃黏膜组	20	1(5.0)	11.704	0.001
胃癌组	98	75(76.5)		

98 例男性胃癌患者中 68 例 MMP-14 表达阳性, MMP-14 的阳性率为 76.5%, 在胃癌组织中的阳性表达率与患者的性别 ($\chi^2 = 0.280, P = 0.597$)、年

龄 ($\chi^2 = 0.390, P = 0.532$)、分化程度 ($\chi^2 = 0.611, P = 0.434$) 无相关性, 而 MMP-14 的阳性表达率与胃癌的肿瘤浸润深度 ($\chi^2 = 4.665, P = 0.031$)、肿瘤大小 ($\chi^2 = 5.100, P = 0.024$)、淋巴转移 ($\chi^2 = 4.843, P = 0.028$)、大体分型 ($\chi^2 = 5.636, P = 0.018$)、临床肿瘤分期 ($\chi^2 = 12.071, P = 0.001$) 有关(表 3)。

表 3 胃癌组织中 MMP-14 的表达与临床病理特征的相关性

Table 3 Correlation between the expressions and clinical pathologic features of MMP-14

临床病理特征	n	MMP-14 阳性[n(%)]	χ ² 值	P 值
性别				
男	60	47(78.3)	0.280	0.597
女	38	28(73.7)		
年龄(岁)				
≥60	46	36(78.3)	0.390	0.532
<60	52	40(76.9)		
肿瘤大小				
≥5 cm	33	30(90.9)	5.100	0.024
<5 cm	65	46(70.8)		
肿瘤浸润深度				
未及浆膜	66	47(71.2)	4.665	0.031
浆膜及以上	32	29(90.6)		
淋巴结转移				
无	71	51(71.8)	4.843	0.028
有	27	25(92.6)		
分化程度				
高中分化	58	46(79.3)	0.611	0.434
低分化	40	30(75.0)		
大体分型				
Borr1+Borr2	54	37(68.5)	5.636	0.018
Borr3+Borr4	44	39(88.6)		
肿瘤分期				
I、II 期	36	21(58.3)	12.071	0.001
III、IV 期	62	55(88.7)		

3 讨论

胃癌浸润和转移是难以治疗的重要原因之一, 其发生是多阶段的。Liu 等^[1]研究表明癌细胞可产生大量溶解酶降解基质或基底膜, 这些溶解酶与侵袭转移能力显著相关, 溶解酶系统由一庞大的蛋白溶解酶家族构成, 被称为 MMPs^[2], 是一多基因家族, 是人体内降解 ECM 的主要酶类, 是一类与肿瘤浸润和转移密切相关的生物酶, MMPs 可以通过降解 ECM、调节细胞凋亡、增加细胞黏附能力、促进新血管生成来促进肿瘤细胞的生长、侵袭和转移, 改变肿瘤细胞的微环境, 从而参与肿瘤演进等众多生理和病理过程^[3], 促进肿瘤的侵袭和转移^[4-6]。MMP-14 是

MT-MMP 家族中首位被发现的成员,其可启动细胞表面多个蛋白级联反应^[7]。MMP-14 属于膜型基质金属蛋白酶,膜型 MMP 分子均有前肽高度保守序列、Zn²⁺结合位点、富含脯氨酸的铰链区及 3 个独特的插入序列。多数膜型 MMP 既是 MMP 的受体,也是 MMP 的激活剂,而且可降解 I、II、IV 型胶原和纤维黏连蛋白。MMP-14 和 MMP-2 有着密切关系,MMP-14 可以激活细胞膜上的 MMP-2,从而促进肿瘤生长^[8]。有研究证实 MMP-14 和 MMP-2 可通过多种机制改变肿瘤细胞生长的微环境,进而促进肿瘤的侵袭、转移^[9]。Shim 等^[10]研究发现,胃癌与正常胃组织中的 MMP-14 mRNA 比值与淋巴结转移和肿瘤分期有关。Zheng 等^[11]通过抑制 MMP-14 基因的表达,从而抑制胃癌细胞迁移,侵袭和血管生成。

胃癌根治术后腹膜转移是复发及死亡的主要原因之一,严重影响预后,腹腔脱落细胞的存在是腹膜转移发生的先决条件之一。因此,发生腹膜转移者其腹水中必存在大量脱落癌细胞。在本研究中,采用 RT-PCR 方法,对 98 例胃癌患者的腹腔冲洗液进行 MMP-14 mRNA 表达的并行检测,并取 30 例良性病变腹腔冲洗液作为阴性对照。结果显示,98 例胃癌腹腔冲洗液中,MMP-14 mRNA 阳性率为 40.8% (40/98),而阴性对照组为 1/30 (3.33%),胃癌组远高于对照组,统计学有差异 ($P < 0.01$),显示了良好的敏感性,间接证明了大量脱落癌细胞的存在。通过统计分析可见,在胃癌腹腔液中 MMP-14 的表达阳性率与胃癌生长方式有关,随着肿瘤浸润深度的加深而显著增加 ($P < 0.01$),亦随着浆膜类型的恶变而显著增加 ($P < 0.05$);MMP-14 mRNA 表达的阳性率还与腹腔内是否转移有关,腹膜转移者明显高于无腹膜转移者 ($P < 0.01$);并与胃癌的大体类型有关,Borr3+Borr4 型要明显高于 Borr1+Borr2 型 ($P < 0.01$)。本研究还进一步分析了胃癌腹腔液中 MMP-14 的表达与胃癌腹膜转移的关系。这种标志物的表达随着肿瘤浸润深度的增加而显著增加,亦随着浆膜类型的恶变而显著性增加,说明这种标志物与胃癌腹膜转移过程密切相关,提示该方法适用于胃癌腹膜转移的预测和亚临床转移的筛检。

胃癌组 MMP-14 为细胞质内表达,镜下观察肿瘤细胞胞质出现黄色、棕黄色、棕褐色细小颗粒状,染色明显高于背景为阳性。对照组绝大多数未见表达,极少数呈散在性弱表达。MMP-14 在胃癌组织中的阳性表达率为 76.5% (58/98),明显高于在非肿瘤胃黏膜组织中的表达率 5% (1/20),二者的差异有

统计学意义 ($P < 0.01$)。98 例男性胃癌患者中 68 例 MMP-14 表达阳性,MMP-14 的阳性率为 76.5%,在胃癌组织中的阳性表达率与患者的性别、年龄、分化程度无相关性 ($P > 0.05$),而 MMP-14 的阳性表达率与胃癌的肿瘤浸润深度、肿瘤大小、淋巴转移、大体分型、临床肿瘤分期有关 ($P < 0.05, P < 0.01$)。Yoshikawa 等^[12]研究证实了在多种肿瘤组织中均有 MMP-14 蛋白及 mRNA 的过度表达,如在肺癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、甲状腺癌、和神经母细胞瘤等肿瘤组织中均高表达,且与 MMP-2 的表达呈正相关,促进肿瘤的发生发展、浸润转移。

本文所研究的 MMP-14 是基质金属蛋白酶家族的重要成员,它能激活前 MMP-2,使之转变为活性形式,同时能直接降解细胞外基质,导致肿瘤的浸润和转移^[13-14],而 MMP-2 的作用底物是 IV 型胶原,它能直接分解基底膜中的纤维连接蛋白和层粘连蛋白,在肿瘤细胞突破基底膜屏障引起浸润转移中起重要作用,这提示 MMP-14 参与了胃癌的直接浸润和淋巴结转移。以上结果均提示 MMP-14 高表达与胃癌的浸润深度、区域淋巴结转移、TNM 分期、淋巴管浸润及较高淋巴结转移率有关,MMP-14 可能参与了胃癌的浸润和腹腔转移的过程。综上所述,MMP-14 基因与胃癌浸润转移的生物学行为相关,能反映胃癌的浸润、转移潜能,可望作为新的肿瘤生物学标志物,为胃癌患者的预后判断提供帮助,利用 RT-PCR 及免疫组化检测胃癌中 MMP-14 的表达来判断肿瘤的恶性程度及预后,指导手术及术后综合治疗,具有一定的临床意义。

[参考文献]

- [1] Liu HQ, Song S, Wang JH, et al. Expression of MMP-3 and TIMP-3 in gastric cancer tissue and its clinical significance[J]. *Oncol Lett*, 2011, 2(6): 1319-1322
- [2] Verma P, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical biological functions and (Q)SARs [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15(6): 2223-2268
- [3] Hwang TL, Lee LY, Wang CC, et al. Claudin-4 expression is associated with tumor invasion, MMP-2 and MMP-9 expression in gastric cancer[J]. *Exp Ther Med*, 2010, 1(5): 789-797
- [4] Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 69(3): 562-573
- [5] 江州华, 俞继卫, 姜波健. 基质金属蛋白酶对胃癌微环境调控作用的研究进展 [J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2009, 16(9): 768-772

- [6] Alakus H, Afriani N, Warnecke-Eberz U, et al. Clinical impact of MMP and TIMP gene polymorphisms in gastric cancer[J]. *World J Surg*, 2010, 34(12): 2853-2859
- [7] Mroczko B, Lukaszewicz-Zajac M, Groblewska M, et al. Expression of tissue inhibitors of metalloproteinase 1 (TIMP-1) in gastric cancer tissue[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2009, 47(3): 511-516
- [8] Mroczko B, Groblewska M, Okulczyk B, et al. The diagnostic value of matrix metalloproteinase 9(MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 (TIMP-1) determination in the sera of colorectal adenoma and cancer patients[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2010, 25(10): 1177-1184
- [9] Bourboulia D, Stetler Stevenson WC. Matrix metalloproteinases(MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): positive and negative regulators in tumor cell adhesion[J]. *Semin Cancer Biol*, 2010, 20(3): 161-168
- [10] Shim KN, Jung SA, Joo YH, et al. Clinical significance of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gastric cancer[J]. *J Gastroenterol*, 2007, 42(2): 120-128
- [11] Zheng LD, Li D, Xiang X, et al. Methyl jasmonate abolishes the migration, invasion and angiogenesis of gastric cancer cells through down-regulation of matrix metalloproteinase 14[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13(1): 74-87
- [12] Yoshikawa T, Yanoma S, Tsuburaya A, et al. Expression of MMP-7 and MT1-MMP in peritoneal dissemination of gastric cancer [J]. *Hepatogastroenterology*, 2006, 53 (72): 964-967
- [13] Wang CS, Wu TL, Tsao KC, et al. Serum TIMP-1 in gastric cancer patients: a potential prognostic biomarker[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2006, 36(1): 23-30
- [14] Jung K, Laube C, Lein M, et al. kind of sample as preanalytical determinant of matrix metalloproteinase 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in blood[J]. *Clin Chem*, 1998, 44(5): 1060-1062

[收稿日期] 2013-08-17

参考文献著录原则和方法

1. 为了反映论文的科学依据和作者尊重他人研究成果的严肃态度,以及读者提供有关信息的出处,应在论文的结论(无致谢段时)或致谢之后列出参考文献。
2. 参考文献列出的一般应限于作者直接阅读过的、最主要的、发表在正式出版物上的文献。私人通信和未公开发表的资料,一般不宜列入参考文献,可紧跟在引用的内容之后注释或标注在当页的地脚。
3. 参考文献著录应执行 GB7714-2005 的规定,建议采用顺序编码制。
4. 顺序编码制的要求如下:
 - (1) 在引文处按论文中引用文献出现的先后,用阿拉伯数字连续编序,将序号置于方括号内,并视具体情况把序号作为上角标,或作为语句的组成部分。如“张xx[1] 研究发现……”,“李xx等[2]认为……”,“模型构建参考文献[3]”。
 - (2) 参考文献的每条文献著录项目应齐全,著录格式为:
主要责任者. 题名:其他题名信息[文献类型标志]. 其他责任者. 版本项. 出版地:出版者,出版年,引文页码[引用日期]. 获取和访问路径
 - (3) 论文中若同一篇参考文献出现引用多次的情况,则不需重复著录,按参考文献首次出现的顺序标注上角即可。

(本刊编辑:接雅俐)