

· 临床研究 ·

基质金属蛋白酶与食管鳞癌预后的关联研究

曹 靖, 许 晶, 于 跃, 李志华, 魏海星, 朱燚宁, 唐建伟, 潘 诚, 胡 硕, 潘相龙, 何志成, 吴卫兵, 陈 亮*
南京医科大学第一附属医院胸外科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的: 识别新的与食管鳞癌预后紧密相关的分子标志物, 构建预测效力更高的食管鳞癌预后模型。方法: 系统分析基质金属蛋白酶家族(matrix metalloproteinases, MMPs)中核心成员MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9及MMP10在食管鳞癌中的表达情况。采用免疫组织化学方法检测MMP3在315例(训练集197例;验证集118例)食管鳞癌患者癌组织及癌旁组织中的表达情况, Cox回归分析评价MMP3蛋白表达与食管鳞癌预后的关联。整合临床病理因素, 构建食管鳞癌预后预测模型。结果: MMP1、MMP3及MMP10在食管鳞癌组织中呈异常表达, 免疫组织化学分析结果表明MMP3蛋白在食管鳞癌组织表达显著高于癌旁组织。训练集中, MMP3阳性表达的患者总体存活率(22.22%)显著低于MMP3阴性表达患者(49.25%, HR=2.09, 95%CI: 1.45~3.03, $P < 0.001$), 这一结果在验证集及合并集中得到进一步验证。此外, 整合MMP3表达与临床病理信息构建的预后预测模型, 其预测能力显著优于TNM分期模型(AUC: 0.733 vs. 0.689)。结论: MMP3可作为食管鳞癌预后相关分子标志物, 整合临床病理因素构建的模型可更加准确地预测食管鳞癌患者的预后。

[关键词] 食管鳞状细胞癌; 基质金属蛋白酶; MMP3; 预后模型; 免疫组织化学

[中图分类号] R655.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)05-682-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20190511

Association between matrix metalloproteinases and the prognosis of esophageal squamous cell cancer

Cao Jing, Xu Jing, Yu Yue, Li Zhihua, Wei Haixing, Tang Jianwei, Pan Cheng, Hu Shuo, Pan Xianglong, He Zhicheng, Wu Weibing, Chen Liang*

Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to identify novel ESCC prognosis related biomarkers and construct novel prognostic predictive model for ESCC. **Methods:** Candidate gene strategy was adopted to analyse the expressions of key members of matrix metalloproteinases: MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9 and MMP10 in ESCC tissues. Immunohistochemistry was applied to detect MMP3 protein expression in 315 ESCC (Training: 197 cases, Validation: 118 samples) tissues. Cox proportional hazard regression model was used to evaluate the association between MMP3 expression and ESCC prognosis. Finally, we constructed ESCC prognosis predictive model by integrating MMP3 and clinicopathologic factors. **Results:** MMP1, MMP3 and MMP10 showed aberrant increased expression in ESCC tumor tissues. Expression of MMP3 protein in tumor tissues was significantly upregulated than that in adjacent tissues. In training dataset, the overall survival (OS) of MMP3 positive patients (22.22%) was significantly lower than patients with negative expression of MMP3 (49.25%, HR=2.09, 95% CI: 1.45-3.03, $P < 0.001$). Consistent results were further observed in validation and combined datasets. In addition, the predictive ability of model that integrated MMP3 and clinicopathologic factors was higher than that contained the TNM stage alone (AUC: 0.733 vs. 0.689). **Conclusion:** MMP3 acted as an ESCC prognosis related biomarker, predictive model that integrated MMP3 and clinicopathologic factors could predict the prognosis of ESCC patients accurately.

[Key words] esophageal squamous cell cancer; matrix metalloproteinases; MMP3; prognostic model; immunohistochemistry

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(05): 682-688]

[基金项目] 江苏省医学创新团队(CXTDA2017006), 江苏省重点研发计划(BE2018746), 江苏省333人才工程项目(BRA2017545), 江苏省自然科学基金(BK20181496), 江苏省青年医学重点人才项目(QNRC2016566)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 2434794740@qq.com

食管癌(esophageal cancer, EC)是常见的恶性肿瘤之一,根据国际癌症研究所(International Agency for Research on Cancer, IARC)的最新估计,2018年全球新发食管癌病例约为57.20万例,占所有肿瘤新发病例的3.2%;新增食管癌死亡病例约为50.86万例,占所有肿瘤死亡病例的5.3%。在我国,2018年新发食管癌病例约为30.74万例,死亡约为28.34万例,其发病与死亡人数分别位居各种肿瘤的第5位及第4位^[1]。与西方发达国家不同的是,我国的食管癌病例90%以上为食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell cancer, ESCC)。由此可见,食管鳞癌是威胁我国居民生命健康的重大医疗卫生问题,针对食管鳞癌的预后研究是改善食管癌患者预后的重要途径。

食管鳞癌患者目前的总体5年生存率为10%~30%,其较差的预后主要与相对晚期的诊断以及晚期患者缺乏有效的治疗方式相关^[2]。早期食管鳞癌患者症状不明显,大部分患者确诊时已处于中晚期。对于进展期食管鳞癌患者,根治性食管切除术和系统性淋巴结清扫术仍然是最有效的解决方案,但单纯手术后的患者生存率仍较低;即使Ib期的患者术后10年生存率也仅有50%^[3]。因此,如何准确评估食管鳞癌患者术后的预后情况,从而建立适当的后续干预治疗方案对食管鳞癌患者至关重要。目前,TNM分期是评估食管鳞癌患者预后和指导术后干预治疗的主要手段。然而,大量研究表明,食管鳞癌的进展及预后不仅与TNM分期有关,而且同时受到诸多遗传因素的影响^[4]。可见,探寻食管鳞癌预后的相关分子标志物,构建更为精准的食管鳞癌预后预测模型,对于食管鳞癌患者的临床治疗,具有重大的指导意义^[5-6]。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一类能够降解基底膜和细胞外基质的蛋白水解酶家族,主要参与组织重构、血管生成、细胞迁移及细胞凋亡等过程^[7]。既往研究表明,MMPs是恶性肿瘤生长与侵袭过程中的重要分子,其表达对肿瘤患者的预后产生重要影响^[8-10]。例如,MMP1在食管鳞癌组织中呈异常高表达,并且与淋巴结转移、TNM分期进展相关,MMP1高表达患者的生存时间较低表达患者显著缩短^[11];类似地,MMP2在肺癌组织中表达显著升高,其阳性表达与肺癌临床分期、淋巴结和远处转移及预后相关^[12]。此外,该家族的其他成员,如MMP3、MMP7、MMP8、MMP9等均被报道与肿瘤发生、进展相关^[13-14]。然而,既往研究大

多在DNA或RNA水平展开,且研究对象多为欧美人群,有关MMPs蛋白表达与中国人群食管鳞癌预后的研究有限,且样本量低,缺乏独立人群的验证^[15]。因此,本研究采用候选基因策略,针对该家族的核心成员MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9以及MMP10,整合RNA及蛋白表达,通过两阶段大样本的免疫组织化学检测,评价其蛋白水平与食管鳞癌预后的关联。

本研究采用GEO公共数据库中119例食管鳞癌-癌旁组织芯片基因表达数据进行基因差异表达分析,筛选出上述7个在食管鳞癌组织中呈显著差异表达的基因。采用免疫组织化学方法在2个独立的食管鳞癌队列(训练集包含197例食管鳞癌病例,验证集包含118例食管鳞癌病例)样本中进行检测分析,评价其蛋白表达与食管鳞癌预后的关联。最终,整合本研究发现的食管鳞癌预后分子标志物及临床病理信息,构建食管鳞癌预后预测模型,并对模型进行评价。

1 对象和方法

1.1 对象

本研究基因差异表达分析阶段所用样本数据来源于GEO数据库(GSE53624),共计119对食管鳞癌-癌旁组织基因表达芯片数据。免疫组织化学研究训练集阶段包含197例食管鳞癌样本,均为2005年1月—2007年12月于中国医学科学院肿瘤医院接受手术治疗的食管鳞癌患者。验证集队列包含118例食管鳞癌样本,来自2002年1月—2003年12月于南京医科大学第一附属医院胸外科接受手术治疗的食管鳞癌患者。所有患者均为组织病理学明确诊断的原发性食管鳞癌患者,且术前未接受放化疗治疗。本研究通过南京医科大学第一附属医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 筛选差异表达基因

对119例食管鳞癌-癌旁组织基因表达芯片数据(GSE53624)进行差异表达分析,筛选在食管鳞癌中呈异常高表达的基因。本研究中差异表达基因的筛选标准为在癌-癌旁组织差异表达倍数(fold change) ≥ 2 且 $P < 0.05$ 。

1.2.2 组织微阵列构建和免疫组织化学分析

食管鳞癌新鲜组织采用福尔马林固定、石蜡包埋制备组织微阵列。用二甲苯将微阵列切片脱蜡,再用梯度乙醇脱水;阻断内源性过氧化物酶,用3%

过氧化氢处理切片 25 min, 蒸馏水洗涤 5 min×3 次; 抗原修复: 置于柠檬酸水 95 °C 10 min; 0.01 mmol/L PBS 洗涤 5 min×3 次; 血清封闭: 滴加非免疫羊血清 (1:20), 盖玻片加封置于 7 °C 孵育 20 min; 去除盖玻片, 用滤纸吸去血清; 将一抗 MMP3 (1:200)、MMP1 (1:200)、MMP10 (1:200) 滴加后用盖玻片加封, 置于 4 °C 孵育过夜; 0.01 mmol/L PBS 洗涤 5 min×3 次; 滴加生物素标记羊抗鼠抗体 (1:200) 切片, 置于 37 °C 孵育 45 min; 0.01 mmol/L PBS 洗涤 5 min×3 次; 滴加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶复合物 (1:200), 加盖玻片置于 37 °C 孵育 45 min; 0.01 mmol/L PBS 洗涤 5 min×3 次; DAB 溶液显色后复染、脱水、透明、封片。

免疫组化结果由 2 名经验丰富的病理科医师利用显微镜对组织芯片进行盲法检测, 综合染色强度及阳性细胞密度判定染色结果, 具体判定方法如下: 染色强度分为 4 个等级, 0 (无)、1 (弱)、2 (中等)、3 (强); 根据阳性细胞密度分为 5 个等级, 0 (阳性细胞占比 ≤10%)、1 (阳性细胞占比 11%~25%)、2 (阳性细胞占比 26%~50%)、3 (阳性细胞占比 51%~75%)、4 (阳性细胞占比 >75%)。将染色强度及阳性细胞密度等级评分相乘, 结果 < 3 的样本判为阴性, 结果 ≥3 的样本判为阳性。

1.3 统计学方法

采用卡方检验比较分类变量的组间分布差异, 采用 *t* 检验比较连续型变量的组间差异。采用 Cox 比例风险回归模型评价蛋白标志物与食管鳞癌预后的关联, 调整年龄、性别、吸烟、TNM 分期、肿瘤分化程度及肿瘤部位等变量。采用 Graphpad prism 7 软件绘制基因差异表达图及 Kaplan-Meier 图, 并使用 Log-rank 检验对生存曲线进行比较。采用 R 语言 pROC 包构建并绘制受试者工作特征曲线, 并对曲线下面积 (area under the curve, AUC) 进行比较。所有检验均为双侧, 统计学显著水准定义为 $P \leq 0.05$ 。所有统计分析均使用 R 软件 (版本 3.2.3) 进行。

2 结果

2.1 差异表达基因筛选

本研究差异表达基因筛选阶段所用样本的基线信息及临床特征见表 1, 共计 119 对食管鳞癌-癌旁组织样本。7 个 MMPs 家族基因差异表达分析结果见表 2, 共有 3 个基因在食管鳞癌组织中呈异常高表达, 分别为 MMP1、MMP3 及 MMP10。值得注意的是, MMP3 基因表达与 MMP1 ($r=0.75$, $P < 0.001$, 图

1D) 及 MMP10 ($r=0.464$, $P < 0.001$, 图 1E) 存在高度相关, 提示 MMP3 与 MMP1 及 MMP10 在预测食管鳞癌预后中可能具有类似的价值。鉴于 MMP3 在食管鳞癌-癌旁组织中的差异表达最为显著, 且与 MMP1 及 MMP10 均存在高度共表达关系, 保留 MMP3 进行后续的免疫组织化学分析研究。

2.2 免疫组化训练集及验证阶段样本信息

如表 3 所示, 训练集包含 197 例食管鳞癌患者病例, 验证阶段包含 118 例食管鳞癌病例。训练集中, 有 117 例死亡, 验证集有 73 例死亡, 均为进展期食管鳞癌患者, T3~4 期晚期患者分别占训练集和验证集的 79.2% (156 例) 和 80.5% (95 例)。在训练集和验证集中, 分别有 111 例 (56.3%) 和 49 例 (41.5%) 发现有淋巴结转移 (N1~3 期)。Cox 回归分析显示, 淋巴结转移患者的总体存活率 (训练集 27.93%, 验证集 18.37%) 显著低于无淋巴结转移患者 (训练集 56.98%, 验证集 52.17%)。

2.3 MMP3 蛋白表达与食管鳞癌预后显著相关

如图 1F 所示, MMP3 蛋白在食管鳞癌组织中的表达显著高于癌旁组织。如表 3 所示, 训练集中, 共有 63 例 (31.98%) 食管鳞癌患者呈 MMP3 阳性表达, MMP3 阳性患者的总体存活率为 22.22%, 显著低于 MMP3 阴性患者 (总体存活率 49.25%, $HR=2.09$, 95%CI: 1.45~3.03, $P < 0.001$, 图 2A)。同样, 验证集中, 36 例 (30.51%) 患者呈 MMP3 阳性, MMP3 阳性患者的总体存活率为 13.89%, 显著低于 MMP3 阴性患者 (总体存活率 48.78%, $HR=3.73$, 95%CI: 2.32~5.99, $P < 0.001$, 图 2B)。合并训练集及验证集样本, MMP3 阳性表达患者的总体存活率显著低于 MMP3 阴性患者 (图 2C)。

2.4 食管鳞癌预后模型的构建及评价

根据筛选出的食管鳞癌预后相关分子标志物, 整合临床病理因素, 构建 3 种食管鳞癌预后预测模型 (表 4), 分别为: TNM 分期模型, 包含 TNM 分期及年龄、性别、吸烟等变量; MMP3 模型, 包含 MMP3 及年龄、性别、吸烟等变量; 整合模型, 包含 TNM 分期, MMP3 及其他临床病理因素。在训练集中, MMP3 模型预测效力 (AUC=0.663, 95%CI: 0.583~0.733) 与 TNM 分期模型 (AUC=0.676, 95%CI: 0.602~0.751) 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示 MMP3 具有与 TNM 分期相近的食管鳞癌预后预测能力。整合模型的预测能力 (AUC=0.717, 95%CI: 0.647~0.784, $P=0.004$) 显著高于 TNM 分期模型, 提示 MMP3 的引入能够显著提高对于食管鳞癌预后的预测能力。同

表1 差异表达分析所用样本基线及临床病理信息

Table 1 The baseline and clinical pathology information of samples with different gene expression

特征	死亡(n=73)	存活(n=46)	总存活率(%)	HR(95%CI)	P值
性别					
男	58(79.5)	40(87.0)	40.80	1	
女	15(20.5)	6(13.0)	28.60	1.22(0.69~2.15)	0.505
年龄					
≤60岁	38(52.1)	31(67.4)	44.90	1	
>60岁	35(47.9)	15(32.6)	30.00	1.56(0.99~2.48)	0.059
吸烟					
从不吸烟	26(35.6)	13(28.3)	33.30	1	
吸烟	47(64.4)	33(71.7)	41.20	0.87(0.54~1.40)	0.563
饮酒					
从不饮酒	28(38.4)	17(37.0)	37.80	1	
饮酒	45(61.6)	29(63.0)	39.20	1.05(0.65~1.68)	0.854
家族史					
无	58(79.5)	40(87.0)	40.80	1	
有	15(20.5)	6(13.0)	28.60	1.46(0.83~2.58)	0.208
T分期					
T1~2	18(24.7)	10(21.7)	35.70	1	
T3~4	55(75.3)	36(78.3)	39.60	0.97(0.57~1.64)	0.898
N分期					
N ₀	24(32.9)	30(65.2)	55.60	1	
N ₊	49(67.1)	16(34.8)	24.60	2.16(1.32~3.53)	0.002
分化程度					
高分化	14(19.2)	9(19.6)	39.10	1	
中分化	36(49.3)	28(60.8)	43.80	0.87(0.47~1.61)	0.655
低分化	23(31.5)	9(19.6)	28.10	1.36(0.70~2.66)	0.360
部位					
上段	11(15.1)	3(6.5)	21.40	1	
中段	40(54.8)	29(63.0)	42.00	0.64(0.33~1.25)	0.193
下段	22(30.1)	14(30.5)	38.90	0.71(0.35~1.48)	0.365

基于GEO数据库(GSE53624数据库)。

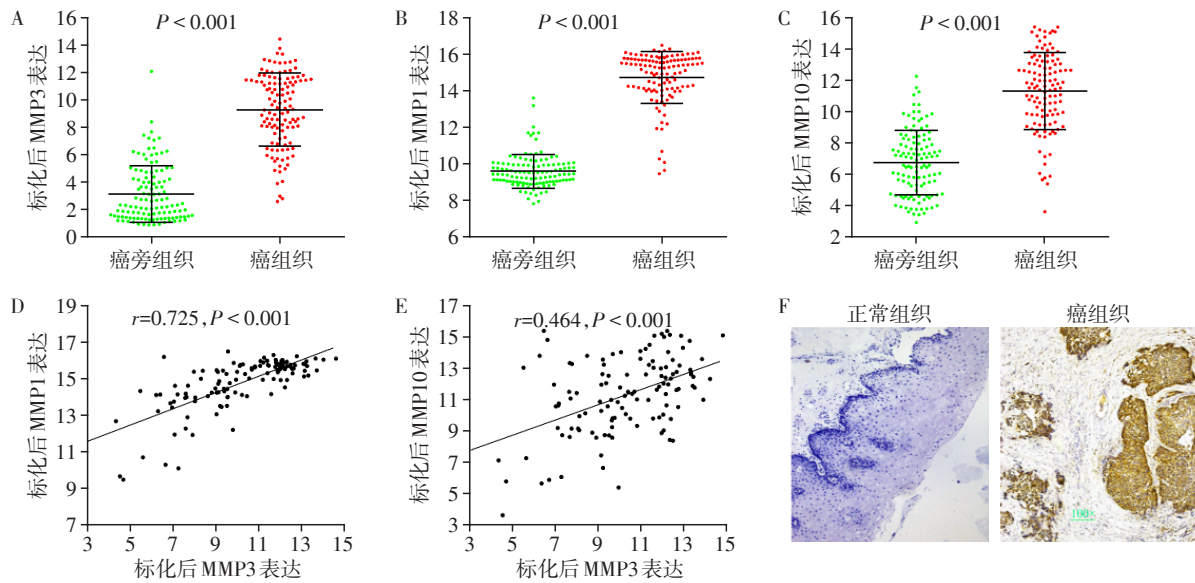
表2 MMPs家族基因差异表达分析结果

Table 2 The analysis of different expression among MMPs

基因名	转录本号	探针号	癌组织基因表达	癌旁基因表达	差异表达分析	P值
MMP3	ENST00000299855	CB_011396	10.30 ± 2.31	4.08 ± 1.79	5.38	1.72E-21
MMP1	ENST00000315274	CB_011395	15.27 ± 1.41	9.43 ± 0.91	5.14	2.92E-21
MMP10	ENST00000279441	CB_011399	11.50 ± 2.45	6.56 ± 2.07	4.54	6.39E-21
MMP2	ENST00000437642	CB_013409	11.94 ± 1.58	10.64 ± 1.51	1.31	1.86E-14
MMP8	ENST00000236826	CB_011398	4.46 ± 1.20	3.13 ± 0.62	1.16	1.39E-15
MMP9	ENST00000372330	CB_013874	12.36 ± 0.80	11.25 ± 0.57	0.98	3.64E-15
MMP7	ENST00000260227	CB_011397	13.01 ± 1.97	12.59 ± 2.70	0.75	2.30E-02

样,验证集中整合模型(AUC=0.737,95%CI:0.643~0.822)对于食管鳞癌患者预后的预测效力显著优于TNM分期模型(AUC=0.690,95%CI:0.589~0.772),

P=0.031。整合两阶段样本,整合模型的曲线下面积为0.733,仍显著高于TNM分期模型的0.689(P=0.006)。



A、B、C: MMP3、MMP1及MMP10在食管鳞癌-癌旁组织的表达情况; D、E: MMP3与MMP1及MMP10表达相关情况; F: MMP3蛋白在食管鳞癌及癌旁组织中的表达情况(免疫组化, ×100)。

图1 MMP3、MMP1及MMP10在食管鳞癌组织表达情况

Figure 1 Expression of MMP3, MMP1 and MMP10 in ESCC tissues

表3 训练及验证阶段样本信息及与食管鳞癌预后的单变量Cox回归分析

Table 3 Information of training set and validation set is associated with prognosis of ESCC

特征	训练集(n=197)					验证集(n=118)				
	死亡 (n=117)	存活 (n=80)	总生存 率(%)	HR(95%CI)	P值	死亡 (n=73)	存活 (n=45)	总生存 率(%)	HR(95%CI)	P值
性别										
男	94(80.34)	66(82.50)	41.25	1		46(63.01)	30(66.67)	39.47	1	
女	23(19.66)	14(17.50)	37.84	1.11(0.70~1.75)	0.658	27(36.99)	15(33.33)	35.71	1.12(0.69~1.80)	0.652
年龄										
≤60岁	54(46.15)	52(65.00)	49.06	1		34(46.58)	22(48.89)	39.29	1	
>60岁	63(53.85)	28(35.00)	30.77	1.65(1.15~2.38)	0.007	39(53.42)	23(51.11)	37.10	1.03(0.65~1.64)	0.886
T分期										
T1~2	21(17.95)	20(25.00)	48.78	1		10(13.70)	13(28.89)	56.52	1	
T3~4	96(82.05)	60(75.00)	38.46	1.30(0.82~2.10)	0.184	63(86.30)	32(71.11)	33.68	1.95(1.00~3.79)	0.035
N分期										
N ₀	37(31.62)	49(61.25)	56.98	1		33(45.21)	36(80.00)	52.17	1	
N ₁	80(68.38)	31(38.75)	27.93	2.09(1.41~3.09)	<0.001	40(54.79)	9(20.00)	18.37	2.76(1.74~4.40)	<0.001
分化程度										
高分化	18(15.38)	17(21.25)	48.57	1		27(36.99)	19(42.22)	41.30	1	
中分化	61(52.14)	49(61.25)	44.55	1.10(0.65~1.86)	0.719	37(50.68)	23(51.11)	38.33	1.05(0.64~1.72)	0.849
低分化	38(32.48)	14(17.5)	26.92	1.76(1.00~3.09)	0.049	9(12.33)	3(6.67)	25.00	1.98(0.93~4.21)	0.078
部位										
上段	18(15.38)	7(8.75)	28.00	1		4(5.48)	1(2.22)	20.00	1	
中段	48(41.03)	33(41.25)	40.74	0.64(0.37~1.10)	0.108	18(24.66)	12(26.67)	40.00	0.47(0.16~1.41)	0.179
下段	51(43.59)	40(50.00)	43.96	0.58(0.34~0.99)	0.045	51(69.86)	32(71.11)	38.50	0.48(0.17~1.34)	0.161
MMP3										
阴性	68(58.12)	66(82.50)	49.25	1		42(57.53)	40(88.89)	48.78	1	
阳性	49(41.88)	14(17.50)	22.22	2.09(1.45~3.03)	<0.001	31(42.47)	5(11.11)	13.89	3.73(2.32~5.99)	<0.001

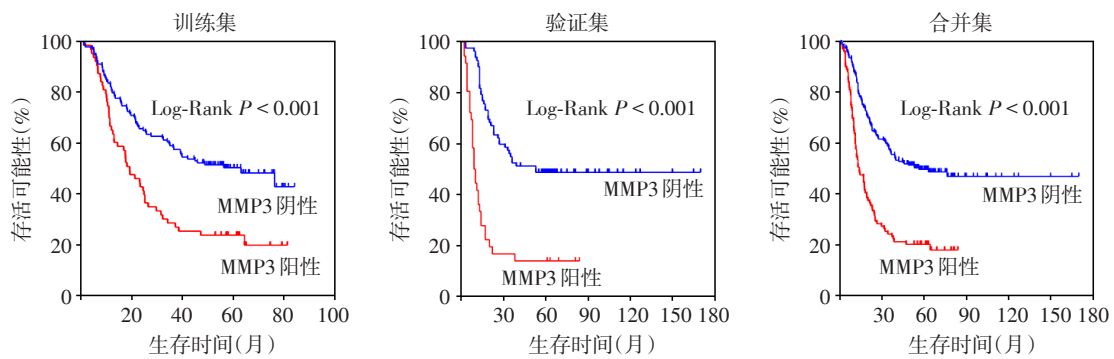


图2 MMP3蛋白表达与食管鳞癌预后显著相关

Figure 2 MMP3 protein expression is significantly associated with the prognosis of ESCC

表4 食管鳞癌预后预测模型评价

Table 4 The valuation of prognosis prediction model for ESCC

数据集	模型	AUC	95%CI	P值
训练集	TNM 分期	0.676	0.602~0.751	参考
	MMP3	0.663	0.583~0.733	0.562
	TNM+MMP3	0.717	0.647~0.784	0.004
验证集	TNM 分期	0.690	0.589~0.772	参考
	MMP3	0.658	0.559~0.755	0.472
	TNM+MMP3	0.737	0.643~0.822	0.031
合并集	TNM 分期	0.689	0.631~0.748	参考
	MMP3	0.672	0.612~0.733	0.547
	TNM+MMP3	0.733	0.679~0.785	0.006

TNM分期模型包含TNM分期、年龄、性别、吸烟、肿瘤家族史、肿瘤部位、肿瘤分化程度;MMP3模型包含MMP3、年龄、性别、吸烟、肿瘤家族史、肿瘤部位、肿瘤分化程度。

3 讨论

食管鳞癌预后与TNM分期密切相关,然而大量研究表明,仅仅以TNM分期来预测食管鳞癌患者的预后并不能达到十分准确的效果,无法满足当前精准医疗的需要^[16-17]。因此,迫切需要识别食管鳞癌预后相关的新型分子生物标志物。本研究基于候选基因策略,分析了MMPs家族中的核心基因与食管鳞癌预后的关联,发现MMP3蛋白表达与食管鳞癌患者预后显著相关,可作为预测食管鳞癌患者预后的分子标志物。

MMPs是一种重要的蛋白水解酶家族,可降解细胞外基质和基底膜以及一些非基质成分,继而改变肿瘤细胞微环境,以促进肿瘤的侵袭和转移^[10,18]。然而中国人群中MMPs蛋白家族与食管鳞癌预后关联研究有限,且大多样本量较小。本研究发现,MMPs家族中的MMP1、MMP3及MMP10在食管鳞癌组织中呈高表达,提示MMP1、MMP3、MMP10在食

管鳞癌的发生、进展过程中可能发挥重要作用^[11,19]。进一步的免疫组织化学分析检测表明,MMP3蛋白在食管鳞癌组织中的表达显著高于癌旁组织。生存分析结果显示,MMP3蛋白表达阳性的食管鳞癌患者总体存活率显著低于MMP3阴性表达的患者,这一结果在验证样本及整合样本中均得到验证。

基于筛选出的MMP3及患者的临床病理信息,本文构建了食管鳞癌预后预测模型。在训练集中,MMP3模型预测效能与TNM分期模型无显著差异,表明MMP3具有与TNM分期相近的食管鳞癌预后预测能力。整合MMP3、TNM及临床信息,预测模型AUC达到0.717,显著高于TNM分期模型,表明MMP3的引入能够显著提高对食管鳞癌预后的预测能力。进一步在独立的验证样本中进行验证,发现整合模型的AUC为0.737,高于TNM分期的0.690。整合训练集及验证阶段样本,整合模型的预测能力稳定在0.733,仍优于传统的TNM分期模型。上述结果均表明,整合本研究发现的MMP3,能够更加准确地预测食管鳞癌患者的预后,为食管鳞癌患者的临床诊疗提供指导。与既往研究构建的模型相比,本研究构建的模型具有以下优势:①更准确地预测食管鳞癌患者的预后,本研究构建的模型AUC为0.733,优于有报道建立的模型^[20-22];②在独立的食管鳞癌人群中得到验证。

本研究基于候选基因的筛选策略,分析了基质金属蛋白酶家族核心基因在食管鳞癌中的表达,进一步利用两个独立的食管鳞癌患者队列进行免疫组织化学分析,发现MMP3蛋白在食管鳞癌组织中呈高表达,且与食管鳞癌预后显著相关。整合MMP3、TNM分期及常见的临床病理因素,构建食管鳞癌预后预测模型,其预测能力显著优于传统的TNM分期。本研究发现的食管鳞癌预后相关分子标志物及构建的预后预测模型,将为食管鳞癌患者

的术后治疗及临床管理提供重要参考。

[参考文献]

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6):394-424
- [2] Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries [J]. *Lancet*, 2018, 391(10125):1023-1075
- [3] Zeng Y, Liang W, Liu J, et al. Endoscopic treatment versus esophagectomy for early-stage esophageal cancer: a population-based study using propensity score matching [J]. *J Gastrointest Surg*, 2017, 21(12):1977-1983
- [4] Jiang D, He Z, Wang C, et al. Epigenetic silencing of ZNF132 mediated by methylation-sensitive Sp1 binding promotes cancer progression in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 10(1):1
- [5] Jang HJ, Lee HS, Burt BM, et al. Integrated genomic analysis of recurrence-associated small non-coding RNAs in oesophageal cancer [J]. *Gut*, 2017, 66(2):215-225
- [6] Gao YB, Chen ZL, Li JG, et al. Genetic landscape of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Nat Genet*, 2014, 46(10):1097-1102
- [7] 刘明明, 李爱玲, 修瑞娟. 基质金属蛋白酶的研究进展 [J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(10):1914-1920
- [8] Yadav L, Puri N, Rastogi V, et al. Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(3):1085-1091
- [9] Radisky ES, Radisky DC. Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets [J]. *Front Biosci(Landmark Ed)*, 2015, 20:1144-1163
- [10] Merchant N, Nagaraju GP, Rajitha B, et al. Matrix metalloproteinases: their functional role in lung cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2017, 38(8):766-780
- [11] Liu M, Hu Y, Zhang MF, et al. MMP1 promotes tumor growth and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2016, 377(1):97-104
- [12] Houghton AM. Matrix metalloproteinases in destructive lung disease [J]. *Matrix Biol*, 2015, 44-46:167-174
- [13] Lievre A, Milet J, Carayol J, et al. Genetic polymorphisms of MMP1, MMP3 and MMP7 gene promoter and risk of colorectal adenoma [J]. *BMC Cancer*, 2006, 6:270
- [14] Chen SW, Zhang Q, Xu ZF, et al. HOXC6 promotes gastric cancer cell invasion by upregulating the expression of MMP9 [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(4):3261-3268
- [15] Shuman Moss LA, Jensen-Taubman S, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis [J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(6):1895-1899
- [16] Tan H, Zhang H, Xie J, et al. A novel staging model to classify oesophageal squamous cell carcinoma patients in China [J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(8):2109-2115
- [17] Lagergren J, Smyth E, Cunningham D, et al. Oesophageal cancer [J]. *Lancet*, 2017, 390(10110):2383-2396
- [18] Zhang J, Jin X, Fang S, et al. The functional SNP in the matrix metalloproteinase-3 promoter modifies susceptibility and lymphatic metastasis in esophageal squamous cell carcinoma but not in gastric cardiac adenocarcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(12):2519-2524
- [19] Uraoka N, Oue N, Sakamoto N, et al. NRD1, which encodes nardilysin protein, promotes esophageal cancer cell invasion through induction of MMP2 and MMP3 expression [J]. *Cancer Sci*, 2014, 105(1):134-140
- [20] Sun LL, Wu JY, Wu ZY, et al. A three-gene signature and clinical outcome in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(6):E569-E577
- [21] Zhan XH, Jiao JW, Zhang HF, et al. A three-gene signature from protein-protein interaction network of LOXL2- and actin-related proteins for esophageal squamous cell carcinoma prognosis [J]. *Cancer Med*, 2017, 6(7):1707-1719
- [22] Cao HH, Zhang SY, Shen JH, et al. A three-protein signature and clinical outcome in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(7):5435-5448

[收稿日期] 2019-01-07