

文章编号:1005-6947(2007)09-0919-04

· 简要论著 ·

# 胆囊腺癌基质调控蛋白的表达及其临床病理意义

杨乐平, 杨竹林, 付汐, 苗雄鹰

(中南大学湘雅二医院 肝胆疾病研究室, 湖南长沙 410011)

**摘要:**采用 S-P 免疫组化法检测 108 例胆囊腺癌、46 例癌旁组织、35 例慢性胆囊炎切除标本的 EMMPRIN, MMP<sub>1</sub> 和 TIMP<sub>1</sub> 表达。结果显示, 胆囊腺癌 EMMPRIN 和 MMP<sub>1</sub> 表达阳性率及其评分明显高于癌旁组织、慢性胆囊炎和胆囊结石组织 ( $P < 0.01$ ), 而 TIMP<sub>1</sub> 则相反 ( $P < 0.01$ ); 胆囊腺癌癌变或高分化腺癌、肿块最大径  $< 2$  cm、无淋巴结转移及未侵犯周围组织的病例其 EMMPRIN 和 MMP<sub>1</sub> 阳性表达率及评分明显低于低分化腺癌、肿块最大径  $\geq 2$  cm、淋巴结转移及侵犯周围组织的者 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 而 TIMP<sub>1</sub> 则相反 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 胆囊腺癌 EMMPRIN 与 MMP<sub>1</sub> 表达呈正相关 ( $r = 0.79, P < 0.01$ ), TIMP<sub>1</sub> 与 EMMPRIN ( $r = -0.64, P < 0.01$ ) 和 MMP<sub>1</sub> ( $r = -0.73, P < 0.01$ ) 均呈负相关。提示: EMMPRIN, MMP<sub>1</sub> 和 TIMP<sub>1</sub> 表达可反映胆囊癌发生、进展、生物学行为、侵袭或转移潜能, 均为反映胆囊癌预后的重要生物学标记物; EMMPRIN 诱导胆囊癌细胞产生 MMP<sub>1</sub>, 但抑制 TIMP<sub>1</sub> 的产生, TIMP<sub>1</sub> 可能抑制 EMMPRIN 和 MMP<sub>1</sub> 的活性。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(9): 919-922]

**关键词:** 胆囊肿瘤; 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子; 基质金属蛋白酶类; 金属蛋白酶组织抑制因子类; 免疫组织化学

中图分类号: R 735.7

文献标识码: B

基质金属蛋白酶类 (matrix metalloproteinases, MMPs) 通过降解基质蛋白的作用参与恶性肿瘤的侵袭和转移<sup>[1]</sup>。金属蛋白酶组织抑制因子 (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs) 具有抑制 MMPs 的功能<sup>[1]</sup>。而细胞外基质金属蛋白酶诱导因子 (extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN) 具有诱导 MMPs 生成的作用, 是否抑制 TIMPs 产生未见文献报道<sup>[2-5]</sup>。三者通过调控基质金属蛋白酶的合成和降解影响恶性肿瘤的侵袭和转移潜能。作者应用 S-P 免疫组化法研究 108 例胆囊癌、15 例慢性胆囊炎和 20 例胆囊结石组织中 EMMPRIN, MMP<sub>1</sub> 和 TIMP<sub>1</sub> 表达水平, 探讨它们的临床病理意义及在胆囊癌中相互关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源及分组

1.1.1 胆囊癌组 收集本院、湘雅医院和湖南省人民医院 1996 年 6 月—2006 年 6 月胆囊癌切除标本 108 例。男 31 例 (28.7%), 女 77 例 (71.3%); 年龄 32~78 (平均  $51.2 \pm 11.6$ ) 岁, 其中  $\leq 45$  岁 24 例 (22.2%),  $> 45$  岁 84 例 (77.8%)。病理类型均为腺癌; 其中腺癌癌变 9 例 (8.2%), 高分化腺癌 29 例 (26.9%), 中分化腺癌 29 例 (26.9%), 低分化腺癌 30 例 (27.8%), 黏液腺癌 11 例 (10.2%)。侵犯胆囊外周围组织器官者 59 例 (54.6%), 未侵犯 49 例 (45.4%)。59 例发生区域淋巴结转移 (54.6%); 58 例伴有胆囊结石 (53.7%)。手术方式包括根治性切除 34 例 (31.5%), 姑息性手术 48 例 (44.4%) 和因广泛转移不能手术 26 例 (24.1%)。

1.1.2 癌旁组织组 从上述 108 例胆囊腺癌中随机选择 46 例切取癌旁组织 (距离癌组织

收稿日期: 2007-04-24; 修订日期: 2007-08-08。

作者简介: 杨乐平, 男, 湖南长沙人, 中南大学湘雅二医院副教授, 主要从事肝胆胰方面的研究。

通讯作者: 杨竹林 E-mail: yangzhulin8@sina.com

≥3mm);病理检查显示,黏膜正常者10例,轻度不典型增生10例,中度不典型增生12例和重度不典型增生14例。

1.1.3 慢性胆囊炎组 收集35例慢性胆囊炎组织(单纯慢性胆囊炎15例,慢性胆囊炎伴胆囊结石20例)的胆囊黏膜组织标本作为对照。

上述标本均经4%甲醛固定后常规制作石蜡包埋切片,切片厚4μm。

## 1.2 主要试剂

兔抗人 MMP<sub>1</sub> 和 TIMP<sub>1</sub> 多克隆抗体、鼠抗人 EMMPRIN 单克隆抗体、兔 S-P 试剂盒、鼠 S-P 试剂盒及 DAB-Hcl 显色试剂盒均购自北京中杉生物技术公司。

## 1.3 实验方法及评分标准

EMMPRIN, MMP<sub>1</sub> 和 TIMP<sub>1</sub> 染色方法均采用 S-P 免疫组织化学法,检测方法按试剂说明书进行,以北京中杉生物技术公司提供的阳性切片作为阳性对照;以 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)(pH 7.4)替代一抗作为阴性对照。细胞浆内含浅棕黄色至深棕黄色颗粒者为 EMMPRIN, MMP<sub>1</sub>

和 TIMP<sub>1</sub> 阳性细胞(图 1-3)。按文献标准<sup>[6]</sup>评分。细胞浆着色强度评分:无为 0 分;弱为 1 分;中为 2 分;强为 3 分。切片中阳性细胞率评分:≤5% 为 0 分;6%~10% 为 1 分;11%~20% 为 2 分;21~50% 为 3 分;>50% 为 4 分。着色强度和阳性率评分之和为该病例评分值。将评分值 ≤2 分定为阴性表达,≥3 分定为阳性表达。

## 1.4 统计学处理

将所得数据输入 SPSS 11.0 统计软件包中,进行 F 检验、t 检验、检验及 Fisher 精确概率法统计;相关分析用 Spearman 等级相关分析法。

## 2 结果

### 2.1 3 种蛋白在胆囊腺癌、癌旁组织和慢性胆囊炎组织中的表达

胆囊腺癌组织 EMMPRIN 和 MMP<sub>1</sub> 阳性表达率及其评分均明显高于癌旁组织和慢性胆囊炎的胆囊黏膜组织,差异均有高度显著性(均为  $P < 0.01$ );TIMP<sub>1</sub> 的表达则相反( $P < 0.01$ )(表 1)。

表 1 胆囊腺癌、癌旁组织和慢性胆囊炎组织中 EMMPRIN, MMP<sub>1</sub> 和 TIMP<sub>1</sub> 的表达

组织类型	总例数	EMMPRIN		MMP1		TIMP1	
		阳性例数(%)	评分( $\bar{x} \pm s$ )	阳性例数(%)	评分( $\bar{x} \pm s$ )	阳性例数(%)	评分( $\bar{x} \pm s$ )
胆囊癌	108	62(57.4)	2.26 ± 1.91	66(61.1)	3.24 ± 1.52	56(51.9)	2.03 ± 1.92
癌旁组织	46	8(17.4) <sup>†</sup>	1.12 ± 1.06 <sup>†</sup>	9(19.6) <sup>†</sup>	1.21 ± 1.09 <sup>†</sup>	39(84.8) <sup>†</sup>	4.15 ± 1.02 <sup>†</sup>
慢性胆囊炎	35	4(11.4) <sup>†</sup>	0.64 ± 1.36 <sup>†</sup>	5(14.3) <sup>†</sup>	0.69 ± 1.38 <sup>†</sup>	30(85.7) <sup>†</sup>	4.72 ± 1.36 <sup>†</sup>

注:†与胆囊癌比较, $P < 0.01$ ; 病理类型组内比较:EMMPRIN,  $F = 14.44, P < 0.01$ ; MMP<sub>1</sub>,  $F = 9.28, P < 0.01$ ; TIMP<sub>1</sub>,  $F = 10.93, P < 0.01$

### 2.2 3 种蛋白表达与胆囊腺癌临床病理特征的关系

EMMPRIN 和 MMP<sub>1</sub> 在腺癌癌变或高分化腺癌,肿块最大径 < 2 cm,无淋巴结转移和未侵犯周围组织器官病例的表达阳性率及其评分明显低于低分化腺癌,肿块最大径 ≥ 2 cm,淋巴结转移和侵犯周围组织器官的病例( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );TIMP<sub>1</sub> 的表达则相反( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )(表 2)。

### 2.3 3 种基因表达在胆囊癌中的相互关系

62 例 EMMPRIN 阳性表达病例中 MMP<sub>1</sub> 阳性表达 54 例, TIMP<sub>1</sub> 阳性表达 23 例, EMMPRIN 表达阳性病例与 MMP<sub>1</sub> 具有高度一致性( $\chi^2 = 41.63,$

$P < 0.01$ ), 与 TIMP<sub>1</sub> 具有高度不一致性( $\chi^2 = 12.68, P < 0.01$ )。EMMPRIN 与 MMP<sub>1</sub> 表达评分呈高度正相关( $r = 0.79, P < 0.01$ ), 但 TIMP<sub>1</sub> 与 EMMPRIN ( $r = -0.64, P < 0.01$ ) 和 MMP<sub>1</sub> ( $r = -0.73, P < 0.01$ ) 呈高度负相关。

## 3 讨论

肿瘤的侵袭和转移是导致治疗失败乃至死亡的主要原因。因此,探讨其机制和为临床防治提供更直接的指导是学者们潜心研究的重要课题。基质蛋白酶的作用作为其中的关键之一备受关注。

表2 胆囊腺癌临床病理特征与 EMMPRIN, MMP<sub>1</sub> 和 TIMP<sub>1</sub> 表达的关系

临床病理特征	总例数	EMMPRIN				TIMP1				MMP1			
		阳性病例(%)	P值	评分( $\bar{x} \pm s$ )	P值	阳性病例(%)	P值	评分( $\bar{x} \pm s$ )	P值	阳性病例(%)	P值	评分( $\bar{x} \pm s$ )	P值
性别													
男	31	19(61.3)	>0.05	2.26 ± 1.93	>0.05	16(51.6)	>0.05	3.08 ± 1.88	>0.05	16(51.6)	>0.05	1.94 ± 1.88	>0.05
女	77	43(55.8)		2.06 ± 1.87		50(64.9)		3.31 ± 1.92		40(51.9)		2.06 ± 1.89	
年龄(岁)													
≤45	24	11(45.8)	>0.05	1.63 ± 1.71	>0.05	14(58.3)	>0.05	2.98 ± 1.93	>0.05	14(58.3)	>0.05	2.38 ± 1.91	>0.05
>45	84	51(60.7)		2.26 ± 1.91		52(61.9)		3.28 ± 1.92		42(50.0)		1.93 ± 1.86	
病理类型													
腺瘤癌变	9	2(22.2) <sup>†</sup>	>0.05	0.63 ± 1.00 <sup>†</sup>	>0.05	3(33.3) <sup>†</sup>	>0.05	1.50 ± 1.32 <sup>†</sup>	>0.05	9(100) <sup>†</sup>	>0.05	3.89 ± 0.78 <sup>†</sup>	>0.05
高分化	29	5(17.2) <sup>†</sup>		1.38 ± 1.59 <sup>†</sup>		12(41.4) <sup>†</sup>		2.25 ± 1.63 <sup>†</sup>		20(69.0) <sup>†</sup>		2.83 ± 1.81 <sup>†</sup>	
中分化	29	13(44.8)		1.66 ± 1.78		19(65.5)		3.20 ± 1.66		17(58.6)		2.21 ± 1.76	
低分化	30	27(90.0)		3.80 ± 1.35		24(80.0)		4.34 ± 1.32		5(16.7)		0.60 ± 1.25	
黏液腺癌	11	6(54.5)		2.18 ± 1.47		8(72.7)		3.89 ± 1.38		5(45.5)		1.81 ± 1.89	
肿块最大径(cm)													
<2cm	31	10(32.3)	<0.01	1.24 ± 1.52	<0.01	13(41.9)	<0.05	2.52 ± 1.48	<0.05	22(71.0)	<0.05	3.12 ± 1.28	<0.01
≥2cm	77	52(67.5)		2.46 ± 1.43		53(68.8)		3.55 ± 1.77		34(44.2)		1.58 ± 1.63	
淋巴结转移													
无	49	8(16.3)	<0.01	0.96 ± 1.50	<0.01	20(40.8)	<0.01	2.21 ± 1.50	<0.01	42(85.7)	<0.01	3.33 ± 1.48	<0.01
有	59	45(76.3)		3.09 ± 1.60		46(78.0)		4.10 ± 1.64		14(23.7)		0.95 ± 1.44	
侵犯周围组织													
无	49	14(28.6)	<0.01	1.02 ± 1.52	<0.01	19(38.8)	<0.01	2.35 ± 1.61	<0.01	39(79.6)	<0.01	3.16 ± 1.55	<0.01
有	59	48(81.4)		3.03 ± 1.65		47(79.7)		3.98 ± 1.46		17(28.8)		1.08 ± 1.59	
胆囊结石													
无	50	26(52.0)	>0.05	2.28 ± 1.76	>0.05	32(64.0)	>0.05	3.35 ± 1.81	>0.05	23(46.0)	>0.05	1.84 ± 1.84	>0.05
有	58	27(46.6)		1.98 ± 1.98		34(58.6)		3.12 ± 1.88		33(56.9)		2.19 ± 1.91	

注:† 与低分化癌比较, P < 0.01

人类 EMMPRIN 基因位于 19P<sup>13,3</sup>, 编码产生一个由 248 个氨基酸组成的蛋白质。最近, 国外学者<sup>[2-5]</sup> 研究发现, 多数恶性肿瘤细胞能自分泌 EMMPRIN, 恶性肿瘤细胞表达 EMMPRIN 的患者血清 EMMPRIN 明显增高, 而其相应来源的良性病变和正常细胞为低表达或不表达。已证实 EMMPRIN 能诱导肿瘤细胞和肿瘤基质细胞合成和分泌 MMPs<sup>[2-5]</sup>。Zucker 等将转移 EMMPRIN C<sub>DNA</sub> 的人类乳腺癌细胞株注射至雌鼠体内, 与离体的人类乳腺癌和移植小鼠体内的人类乳腺癌相比, 前者更具病源性和侵袭性<sup>[7]</sup>。说明 EMMPRIN 通过增加 MMPs 的产生在乳腺癌进展中起着重要作用。国外绝大多数文献发现, EMMPRIN 通过诱导 MMPs 的产生而影响恶性肿瘤的生物学行为、侵袭或转移潜能和预后, 阳性表达者多恶性度高、易扩散或转移及预后差<sup>[2-5]</sup>。本组资料发现, 胆囊腺癌 EMMPRIN 表达率及其评分明显高于慢性胆囊炎和胆囊结石组织, 腺瘤癌变或高分化腺癌、肿块最大径 ≤ 3 cm、无淋巴结转移及未侵犯周围组织病例的 EMMPRIN 表达率及其评分明显低于同一病理特征的另一分组。本结果与国外文献报道较一致。说明 EMMPRIN 表达可能是反映

胆囊癌发生发展、生物学行为及评估预后的重要生物学标记物, 其机制除诱导癌细胞和癌基质细胞合成和产生 MMPs 之外仍不甚清楚。

MMPs 是一组具有许多共同生化性质的、可降解细胞外基质的酶类, 目前至少已发现 14 种; 它们能在中性 pH 环境中发挥作用, 能协同地降解细胞外基质的绝大多数生物大分子, 其中 MMP<sub>1</sub>, MMP<sub>2</sub> 和 MMP<sub>9</sub> 为最重要的代表<sup>[1,8-9]</sup>。近年研究表明, MMPs 与肿瘤侵袭潜能和转移密切相关, 阳性表达恶性肿瘤侵袭和转移潜能明显高于阴性表达者, 且预后明显较差<sup>[1,8-9]</sup>。本组结果支持这一观点。本实验发现胆囊腺癌 MMP<sub>1</sub> 表达阳性率及其评分明显高于慢性胆囊炎和胆囊结石组织; 腺瘤癌变或高分化腺癌、肿块最大径 ≤ 3 cm、无淋巴结转移及未侵犯周围组织的病例 MMP<sub>1</sub> 表达率及其评分明显低于相对应的另一分组。是 MMP<sub>1</sub> 的评分与 EMMPRIN 评分呈高度正相关。说明 MMP<sub>1</sub> 表达与胆囊癌发生、进展、生物学行为及其预后密切相关; 胆囊癌细胞 MMP<sub>1</sub> 的合成和分泌可能受 EMMPRIN 的诱导和调控。

MMPs 的活性可被特异的 TIMPs 抑制。目前至少发现 4 种以上 TIMP, 对其性质了解较明确的有 TIMP<sub>1</sub> 和 TIMP<sub>2</sub>。TIMP<sub>1</sub> 分子质量为 28 kD, 能与

无活性明胶酶 B 形成可逆性复合物从而使 TIMP<sub>1</sub> 能特异地抑制 MMP<sub>1</sub> 活性。至于 EMMPRIN 是否抑制 TIMP<sub>1</sub> 的产生尚不明了。近年研究发现, TIMP<sub>1</sub> 表达与恶性肿瘤侵袭和转移潜能密切相关, 阳性表达者侵袭和转移潜能明显低于阴性表达者。本组资料显示, 胆囊腺癌 TIMP<sub>1</sub> 表达率及其评分明显低于慢性胆囊炎和胆囊结石组织; 腺癌癌变或高分化腺癌、肿块最大径 ≤ 3 cm、无淋巴结转移和未侵犯周围组织病倒 TIMP<sub>1</sub> 表达率及其评分高于同一病理特征的另一组, 且 TIMP<sub>1</sub> 与 EMMPRIN 和 MMP<sub>1</sub> 评分均呈高度负相关。此结果与国内外文献报道一致。说明 TIMP<sub>1</sub> 具有抑制胆囊腺癌发生发展及转移的作用。癌细胞中 EMMPRIN 与 TIMP<sub>1</sub> 的产生可能同时相互抑制, 但其确切机制尚需深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Birkedal-Hansen B, Pavelic IP, Gluckman JL, *et al*. MMP and TIMP gene expression in head and neck squamous cell carcinomas and adjacent tissue [J]. *Oral Dis*, 2000, 6 (4): 376 - 382.
- [2] Zheng HC, Takahashi H, Murai Y, *et al*. Up-regulated EMMPRIN/CD147 might contribute to growth and angiogenesis of gastric carcinoma: a good marker for local invasion and prognosis [J]. *Br J cancer*, 2006, 95 (10): 1371 - 1378.
- [3] Cheg MF, Tzao C, Tsai WC, *et al*. Expression of EMMPRIN and matrilysin in esophageal squamous cell carcinoma: correlation with clinicopathological parameters [J]. *Dis Esophagus* 2006, 19 (6): 482 - 486.
- [4] Tsai WC, Chao YC, Lee WH, *et al*. Increasing EMMPRIN and matrilysin expression in hepatocellular carcinoma: tissue microarray analysis of immunohistochemical scores with clinicopathological parameters [J]. *Histopathology*, 2006, 49 (4): 388 - 395.
- [5] Toole BP. EMMPRIN (CD14), a cell surface regulator of matrix metalloproteinase production and function [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2003, 54 (4): 371 - 389.
- [6] 胡凉岭, 喻伦银, 陈法基, 等. 大鼠试验性肺癌癌变各阶段微血管密度及 VEGF, FIK-1 表达的动态变化 [J]. *癌症*, 2001, 20 (11): 713 - 717.
- [7] Zucker S, Hymowitz M, Rollo EE, *et al*. Tumorigenic potential of extracellular matrix metalloproteinase inducer [J]. *Am J Pathol*, 2001, 158 (6): 1921 - 1928.
- [8] Hard I, Miyake H, Hara S, *et al*. Significance of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in the recurrence of superficial transitional cell carcinoma of the bladder [J]. *J Urol*, 2001, 165 (5): 1769 - 1772.
- [9] Yamamoto H, Itoh F, Jku S, *et al*. Expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinase in human pancreatic adenocarcinoma, as clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression [J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19 (4): 1118 - 1127.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 关于一稿两投和一稿两用问题处理的声明

近来本刊编辑部发现仍有个别作者一稿两投和一稿两用, 为了维护本刊的声誉和广大读者的利益, 本刊就一稿两投和一稿两用问题的处理声明如下。

1. 一稿两投和一稿两用的认定: 凡属原始研究的报告, 同语种一式两份投寄不同的杂志, 或主要数据和图表相同、只是文字表达可能存在某些不同之处的两篇文稿, 分别投寄不同的杂志, 属一稿两投; 一经为两杂志刊用, 则为一稿两用。会议纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿分别投寄不同的杂志, 以及在一种杂志发表过摘要而将全文投向另一杂志, 不属一稿两投。但作者若要重复投稿, 应向有关杂志编辑部作出说明。

2. 作者在接收到稿回执后满 3 个月未接到退稿通知, 表明稿件仍在处理中, 若欲投他刊, 应先与本刊编辑部联系。

3. 编辑部认为文稿有一稿两投或两用嫌疑时, 应认真收集有关资料并仔细核对后再通知作者, 在作出处理决定前请作者就此问题作出解释。编辑部与作者双方意见发生分歧时, 由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。

4. 一稿两投一经证实, 则立即退稿, 对该作者作为第一作者所撰写的论文, 2 年内将拒绝在本刊发表; 一稿两用一经证实, 将择期在杂志中刊出作者姓名、单位以及该论文系重复发表的通告, 对该作者作为第一作者所撰写的论文, 2 年内拒绝在本刊杂志发表。本刊将就此事向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。