

文章编号:1005-6947(2005)03-0173-05

· 胃癌专题研究 ·

胃癌组织中 PTEN, VEGF, MMP-9 的表达及相关性研究

贺荣芳, 胡忠良, 沈明, 文继舫

(中南大学湘雅医学院 病理学系, 湖南 长沙 410078)

摘要:目的 探讨胃癌中 PTEN, VEGF, MMP-9 的表达及其与胃癌生物学行为的关系。方法 应用免疫组织化学 SP 法检测 71 例胃癌组织及 37 例远癌胃黏膜中 PTEN, VEGF, MMP-9 的表达。结果 胃癌组织中 PTEN 蛋白表达(71.8%)显著低于远癌胃黏膜的表达(100%)($P < 0.01$),且与肿瘤的组织分化程度、浸润深度及淋巴结转移呈负相关(均 $P < 0.05$),而与年龄、性别等无关(均 $P > 0.05$)。VEGF 在胃癌中的表达(62.0%)显著高于远癌胃黏膜的表达(29.7%)($P < 0.01$),且与淋巴结转移呈正相关($P < 0.01$),而与年龄、性别、组织分化程度及肿块浸润深度无关(均 $P > 0.05$)。MMP-9 在胃癌中的表达(69%)显著高于远癌胃黏膜的表达(40.5%)($P < 0.01$),且与淋巴结转移呈正相关($P < 0.05$),而与年龄、性别、组织分化程度及癌组织浸润深度无关(均 $P > 0.05$)。PTEN 在胃癌中的表达与 VEGF 和 MMP-9 呈负相关($P < 0.05$)。结论 胃癌中 PTEN 蛋白表达降低,其表达与肿瘤的组织分化程度、浸润深度及淋巴结转移密切相关,且与 VEGF, MMP-9 表达呈负相关。联合检测 PTEN, VEGF, MMP-9 有助于提高胃癌侵袭转移能力的评估,对胃癌的预后判断具有重要的临床意义。

关键词:胃肿瘤/病理学; 癌基因蛋白表达; PTEN; VEGF, MMP-9

中图分类号:R735.2; R730.231

文献标识码:A

A study of the correlation and expression of PTEN, VEGF and MMP-9 in human gastric carcinoma

HE Rong-fang, HU Zhong-liang, SHEN Ming, WEN ji-fang

(Department of Pathology, Xiangya Medical School, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: Objective To identify the expression of PTEN, vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in gastric carcinoma and its relationship to the biological behavior of gastric carcinoma. **Methods** The expression of PTEN, VEGF and MMP-9 in 71 cases of gastric carcinoma tissue and 37 cases of gastric mucosa distant from carcinoma were detected by streptavidin peroxidase immunohistochemistry. **Results** The expression of PTEN in gastric carcinoma tissues (71.8%) was significantly lower than its expression in gastric mucosa distant from carcinoma (100%) ($P < 0.01$), and expression of PTEN was inversely correlated with the histologic differentiation of the tumor, depth of tumor infiltration and lymph node metastasis ($P < 0.05$, in all parameters), but was not related to age or sex of the patient ($P > 0.05$). The expression of VEGF in gastric carcinoma (62.5%) was significantly higher than in gastric mucosa distant from carcinoma (29.7%) ($P < 0.01$), The expression of VEGF was positively correlated with lymph node metastasis ($P < 0.01$), but was not related to age, sex of the patient, and the degree of histological differentiation or depth of tumor infiltration ($P > 0.05$). The expression of MMP-9 in gastric carcinoma (69%) was significantly higher than in gastric mucosa distant from carcinoma (40.5%) ($P < 0.01$) and was positively correlated with lymph node metastasis ($P < 0.05$), but not related to age, sex of the patient, and the degree of histological differentiation or depth of tumor infiltration ($P > 0.05$). The expression of PTEN in gastric carcinoma was inversely correlated with expression of VEGF and MMP-9 ($P < 0.05$). **Conclusions** Decreased expression of PTEN was found in gastric carcinoma and significantly correlated with histologic differentiation, depth of infiltration and lymph node metastasis of gastric carcinoma. Also, the expression of PTEN was inversely correlated with the expression of VEGF and MMP-9 in

收稿日期:2004-12-10; 修订日期:2005-01-12。

作者简介:贺荣芳(1980-),女,湖南永州人,中南大学湘雅医学院硕士研究生,主要从事胃肠道肿瘤方面的研究。

通讯作者:文继舫 电话:0731-2650400; E-mail:jifangwen@hotmail.com。

gastric carcinoma. The combined detection of PTEN, VEGF and MMP-9 may be of important clinical value to evaluate the infiltrative ability and prognosis of gastric carcinoma.

Key words: STOMACH NEOPLASMS/pathol; ONCOGENE PROTEINS EXPRESSION; PTEN; VEGF; MMP-9

CLC number: R735.2; R730.231

Document code: A

PTEN (phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten) 基因为至今发现的第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因,在维持细胞的增殖与凋亡中起重要作用,并可能参与调节细胞黏附、肿瘤浸润与转移。浸润、转移是恶性肿瘤的重要特征,也是影响肿瘤患者预后的关键因素之一。而基膜的完整与否,肿瘤新生血管的形成是影响肿瘤发生浸润及转移与否的关键环节。笔者联合检测了胃癌组织中 PTEN、血管内皮生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)蛋白的表达情况,并分析 PTEN 蛋白的表达与胃癌的临床病理生物学行为的关系,旨在探讨 PTEN 在胃癌的发生发展及浸润转移中可能发挥的作用及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 胃癌组 71 例。均为中南大学湘雅医院病理科 2000~2002 年手术切除的胃癌石蜡包埋组织。男 48 例,女 23 例;年龄 29~76(平均 48.31)岁。高分化 9 例,中分化 8 例,低分化 54 例;淋巴结转移阴性 24 例,阳性 47 例。

1.1.2 远癌胃黏膜组 37 例。均取自胃癌行胃切除的近侧断端胃黏膜。所有断端均距癌组织 5 cm 以上,组织学检查为基本正常胃黏膜。

1.2 方法

所有手术切除标本均经 10% 甲醛固定,常规石蜡包埋后行 4 μm 连续切片,每例均行 HE 染色和 SP 法免疫组织化学染色,光镜观察。PTEN 用已知正常胃黏膜,MMP-9 与 VEGF 用已知阳性胃癌切片作阳性对照;用 0.01 M PBS (pH = 7.4) 液代替一抗作阴性对照。所用 PTEN 为兔抗人多克隆抗体、VEGF 与 MMP-9 均为鼠抗人单克隆抗体,羊抗兔、羊抗鼠 SP 试剂盒及 DAB 显色剂均购自北京中山生物技术公司。

1.3 结果判断

PTEN, VEGF, MMP-9 蛋白染色阳性均为在细胞膜或胞质内出现棕黄色颗粒,且其着色强度高于背景非特异性染色者(图 1~3)。每例切片随机选取 5 个高倍视野进行结果判定。按染色强度及阳性细胞数占肿瘤细胞总数的百分比综合计分。染色强度:无色计为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2

分,棕褐色为 3 分;阳性细胞数:小于总数的 5% 时计为 0 分,5%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,大于 50% 为 3 分。染色强度得分与阳性细胞数得分相乘,0 分计为阴性(-),1~3 分计为弱阳性(+),4~5 分计为中度阳性(++),大于或等于 6 分计为强阳性(+++)。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 11.0 统计软件进行分析,采用等级资料的秩和检验(Kruskal Wallis' of Nemenyis'), PTEN, MMP-9, VEGF 3 项指标阳性表达之间的关系采用 Spearman 等级相关性分析。检验水准:α = 0.05。

2 结果

2.1 PTEN, VEGF, MMP-9 在胃癌和断端胃黏膜组织中的表达

胃癌组织中 PTEN 蛋白阳性表达率为 71.8% (51/71),显著低于远癌胃黏膜的表达(100%, 37/37) ($P < 0.01$) (图 1)。VEGF 在胃癌组织中的阳性表达率为 62.0% (44/71),显著高于远癌胃黏膜(29.7%, 11/37) ($P < 0.01$) (图 2)。MMP-9 蛋白在胃癌中的表达率为 69.0% (49/71),显著高于远癌胃黏膜(40.5%, 15/37) ($P < 0.01$) (图 3, 4) (附表)。

2.2 PTEN, VEGF, MMP-9 表达与年龄、性别、组织分化程度、浸润深度及淋巴结转移的关系

胃癌组织中 PTEN 的表达与组织分化程度、浸润深度及淋巴结转移有关(均 $P < 0.05$),但与年龄和性别等无关(均 $P > 0.05$)。胃癌组织中 VEGF 的高表达与淋巴结转移有关($P < 0.05$),但与组织分化程度、浸润深度、年龄和性别等无关(均 $P > 0.05$)。MMP-9 的高表达亦与淋巴结转移有关($P < 0.05$),而与组织分化程度、浸润深度、年龄和性别等无关(均 $P > 0.05$) (附表)。

2.3 胃癌组织中 PTEN, VEGF, MMP-9 中的相关性分析

PTEN 与 VEGF, MMP-9 蛋白的表达均呈负相关($r = -0.217, P = 0.024; r = -0.235, P = 0.014$)。

图1 远癌胃黏膜 PTEN 呈强阳性表达(+ + +) (SP × 200)

图2 胃中分化腺癌 VEGF 呈强阳性表达(+ + +) (SP × 200)

图3 胃低分化腺癌 MMP-9 呈强阳性表达(+ + +) (SP × 200)

图4 远癌胃黏膜 VEGF ,MMP-9 阴性表达(SP × 200)

附表 PTEN , VEGF , MMP-9 与各临床病理参数之间的关系

项目	n	PTEN					VEGF					MMP-9								
		(-)	(+)	(++)	(+++)	χ^2	P	(-)	(+)	(++)	(+++)	χ^2	P	(-)	(+)	(++)	(+++)	χ^2	P	
组织类型																				
肿块	71	20	41	10	0	-6.618	0.0000	27	20	22	2	-3.306	0.001	22	20	25	4	-2.774	0.006	
远癌	37	0	8	23	6			26	7	4	0			22	8	5	2			
组织分化																				
高	9	2	4	3	0			2	3	4	0			4	4	1	0			
中	8	0	5	3	0	8.050	0.018	3	3	2	0	0.891	0.641	1	1	6	0	4.897	0.086	
低	54	18	32	4	0			22	14	16	2			17	15	18	4			
年龄(岁)																				
<40	18	3	14	1	0			10	6	1	1			8	4	4	2			
40~60	37	11	19	7	0	0.667	0.717	12	9	15	1	4.685	0.096	10	11	15	1	0.9	0.638	
>60	16	6	8	2	0			5	5	6	0			4	5	6	1			
性别																				
男	48	14	27	7	0	-0.118	0.906	19	12	16	1	-0.072	0.943	12	13	20	3	-1.822	0.069	
女	23	6	14	3	0			8	8	6				10	7	5	1			
浸润																				
黏膜	4	1	1	2	0			1	3	0	0			1	2	1	0			
肌层	23	3	15	5	0	6.705	0.035	8	6	7	2	0.711	0.701	10	6	6	1	2.699	0.259	
浆膜	44	16	25	3	0			18	11	15	0			11	12	18	3			
转移																				
有	47	15	31	1	0	-0.2707	0.007	15	9	21	2	-2.894	0.004	12	10	21	4	-2.608	0.009	
无	24	5	10	9	0			12	11	1	0			10	10	4	0			

3 讨论

研究证实人类多种肿瘤的发生发展均与 PTEN 表达异常有关。PTEN 主要通过通过对 PI3K 的脂质产物 ptdIns - 3, 4, - p2 及 ptdIns - 3, 4, 5 - p3 (即 PIP3) 去磷酸化, 拮抗 PI3K/AKT 通路发挥肿瘤抑制作用。现已明确 AKT 为 PTEN 重要的效应分子^[1,2]。此外 PTEN 还具有蛋白磷酸酶功能, 可使 FAK、SHC 去磷酸化。该作用与 PTEN 调控细胞的黏附及转移有关; 与调控多种细胞存活的相关途径有关, 如 MAPK 通路^[3]。在胚系细胞中 PTEN 基因的突变与多种具肿瘤倾向的遗传性疾病, 如 Cowden's 综合征, Bannayan-Zonana 综合征, Lhermitte-Duclos 病等有关。而体细胞 PTEN 基因的突变可见于各种散发性肿瘤, 如神经胶质瘤、前列腺癌、子宫内膜癌、甲状腺癌、乳腺癌、黑色素瘤、胃肠道肿瘤等。PTEN 的完全失活与绝大多数肿瘤的恶性程度高、浸润性生长及远处转移有关, PTEN 基因突变常预示着较短的生存期, 因此多数学者认为在肿瘤发生中 PTEN 基因突变属晚期事件。在前列腺癌中 PTEN 甚至可作为肿瘤转移的标志物之一。本组研究结果显示, 胃癌组织中 PTEN 蛋白表达显著低于远癌胃黏膜的表达, 且与肿瘤的组织分化程度、浸润深度及淋巴结转移密切相关, 提示该基因在胃癌发生发展及浸润转移过程中起重要作用。

肿瘤的生长与转移是一个多因素多步骤的复杂过程, 而肿瘤的血管形成在肿瘤生长、浸润及转移过程中发挥了极其重要的作用。在众多血管生成因子中, VEGF 的作用尤为突出。VEGF 是血管内皮特异性的有丝分裂原, 可特异地促进内皮细胞生长及血管生成, 并能增加血管的通透性, 促进血管内物质的泄漏, 为血管内皮的迁移和肿瘤细胞的转移提供基质^[4]。研究证实, 恶性肿瘤细胞能分泌大量 VEGF, 促进肿瘤的新生血管形成及间质产生。王天宝^[5]的研究提示 VEGF C 表达与胃癌分化分期及转移密切相关。本研究表明, 胃癌细胞及一些血管内皮细胞呈高水平的 VEGF 表达, 胃癌组织中 VEGF 阳性表达显著高于远癌胃黏

膜 ($P < 0.05$), 且与淋巴结转移关系密切。提示胃癌的发生发展与癌细胞大量表达 VEGF 及 VEGF 促进血管生成关系密切。Chen 等^[6]认为在前列腺癌中 PTEN 参与调控 VEGF/VEGFR-2 通路而抑制肿瘤细胞的黏附与增殖。Zhang 等^[7]的研究亦提示在肝癌中 PTEN 与 VEGF 表达呈负相关。但也有研究^[8,9]发现 PTEN 与肿瘤的血管生成及 VEGF 的表达无关。本研究中 PTEN 蛋白表达与 VEGF 呈负相关 ($P < 0.05$), 这与 Zhang^[7]的报道一致, 提示在胃癌中 PTEN 可能通过下调 VEGF 的表达而发挥抑制肿瘤浸润转移的作用。

除了肿瘤的血管形成外, 基膜的完整与否也是影响肿瘤发生浸润与转移的关键环节, MMPS 是一组与锌结合的主要分解细胞外基质的蛋白酶, 与肿瘤的侵袭和转移关系十分密切, MMP-9 是其中重要的一员。MMP-9 主要降解 IV 型胶原 - 基底膜的主要成分。具有转移倾向的癌细胞可自身分泌或诱导其他细胞分泌大量的 MMP-9, 使基底膜的完整性遭到破坏, 促进肿瘤转移的发生^[10]。本实验结果表明, 胃癌中 MMP-9 的表达水平明显高于远癌胃黏膜, 且其高表达与淋巴结转移密切相关。激素、生长因子和细胞因子等可通过多种信号传导途径, 直接或间接作用于 MMPs 基因启动区活化蛋白 - 1 (AP-1) 位点, 调控 MMPs 的转录率。Moon 等^[11]在血管内皮细胞中证实 PTEN 可能通过 NF-KB 及 AP-1 而下调 MMP-9 的表达。本研究中 PTEN 的表达与 VEGF 的表达呈负相关 ($P < 0.05$), 这与 Moon^[11]的报道一致, 提示 PTEN 在胃癌中可能通过下调 MMP-9 的表达而抑制肿瘤的浸润及转移。

本组研究结果显示, PTEN 蛋白在胃癌组织中表达降低且与胃癌的分化程度, 浸润深度及淋巴结转移密切相关, 并与 VEGF, MMP-9 蛋白表达呈显著负相关。提示联合检测 PTEN, VEGF 和 MMP-9 可作为判定胃癌侵袭转移能力的客观参考指标, 对胃癌的预后判断具有一定的意义。

参考文献:

[1] Stocker H, Andjelkovic M, Oldham S, et al. Living with le-

- thal PIP3 levels: viability of flies lacking PTEN restored by a PH domain mutation in AKT/PKB [J]. *Science*, 2002, 1295(5562):2088-2091.
- [2] Maehama T, Taylor GS, Dixon JE, *et al.* PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases [J]. *Ann Rev Biochem*, 2001, 70(1):247-249.
- [3] Kang-Park S, Lee YI, L YI, *et al.* PTEN modulates insulin-like growth factor II (IGF-II)-mediated signaling: the protein phosphatase activity of PTEN downregulates IGF-II expression in hepatoma cells [J]. *FEBS LETT*, 2003, 545(2-3):203-208.
- [4] Li J, Zhang YP, Kirsner RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix [J]. *Micro Res Tech*, 2003, 60(1):107-114.
- [5] 王天宝,董文广,李兆亭. 血管内皮生长因子 C 在胃癌中表达的意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(9):701-702.
- [6] Chen J, De S, Brainard J, *et al.* Metastatic properties of prostate cancer cells are controlled by VEGF [J]. *Cell Commun Adhes*, 2004, 11(1):1-11.
- [7] Zhang TY, An JL, Gu JY, *et al.* Expression of PTEN, Cx43, and VEGF in hepatocellular carcinoma [J]. *Ai Zheng*, 2004, 23(6):662-666.
- [8] Idoate MA, Soria E, Lozano MD, *et al.* PTEN protein expression correlates with PTEN gene molecular changes but not with VEGF expression in astrocytomas [J]. *Diagn Mol Pathol*, 2003, 12(3):160-165.
- [9] Chung MJ, Jung SH, Lee BJ, *et al.* Inactivation of the PTEN gene protein product is associated with the invasiveness and metastasis, but not angiogenesis, of breast cancer [J]. *Pathol Int*, 2004, 54(1):10-15.
- [10] Kabashima A, Maehara Y, Kakeji, *et al.* Clinicopathological features and overexpression of matrix metalloproteinases in intramucosal gastric carcinoma with lymph node metastasis [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(9):3581-3584.
- [11] Moon SK, Kim HM, Kim CH. PTEN induces G1 cell cycle arrest and inhibits MMP-9 expression via the regulation of NF-kappaB and AP-1 in vascular smooth muscle cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 421(2):267-276.

文章编号:1005-6947(2005)03-0177-01

· 病例报告 ·

直肠系膜巨大囊肿 1 例

向异

(广东省从化市太平镇医院 外科, 广东 从化 510990)

关键词:直肠肿瘤; 囊肿; 病例报告

中图分类号:R735.37; R730.269

文献标识码:D

患者 女, 20 岁。因停经 40d, B 超发现盆腔内包块 1d, 于 2004 年 7 月 22 日入住妇产科。体查:腹平坦, 未见肠型及蠕动波, 无压痛, 反跳痛及肌紧张; 脾脏无肿大; 腹部闻扪及包块, 肠鸣音正常。妇科检查情况: 外阴发育正常, 未产型, 阴道通畅, 宫颈显示不清,

前位子宫, 增大如孕 40d, 活动无压痛, 双侧附件扪不清, 于直肠前方扪及 10cm × 10cm × 10cm 大小包块, 质软, 无触痛, 不活动, 突向阴道方向。B 超诊断: (1) 早孕, 宫内妊娠 6 周; (2) 盆腔内囊性包块; (3) 双侧附件未见明显异常。CT 检查(决定药流后): 盆腔内囊性包块。2004 年 7 月 23 日在硬膜外麻醉下行剖腹探查, 囊肿切除术。术中见子宫如孕 40d 大小, 双侧附件正常, 于子宫颈及阴道后壁的后方扪及 10cm × 10cm × 10cm 大小囊性包

块, 边界清楚, 考虑直肠系膜囊肿, 请外科会诊, 协助手术。横行剪开子宫腹膜返折, 上推腹膜、切开骶韧带, 钝性分离直达囊壁, 用注射器穿刺抽出清亮液体, 证实为囊肿, 切开, 吸尽液体约 500mL, 囊壁内膜剥离切除。分离时注意避免损伤直肠壁, 彻底止血, 冲洗囊腔。置乳胶管 1 根另打孔引出腹腔, 腔底冲洗后再腹膜化, 逐层关腹。术后转外科住院治疗。于 2004 年 8 月 2 日痊愈出院。病理检查: 直肠系膜单纯性囊肿。

收稿日期:2004-12-21;

作者简介:向异(1965-), 男, 贵州遵义人, 广东省从化市太平镇医院主治医师, 主要从事胃肠外科临床方面的研究。

通讯作者:向异 电话:13544514369(手机)。