



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.08.010
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.08.010
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(8):1107-1111.

· 基础研究 ·

MMP-2 和 MMP-9 在肝内胆管细胞癌组织中的表达及意义

徐靖¹, 易炜², 万百顺³, 尹碧辉⁴

(河南省肿瘤医院 1. 放疗科 3. 肝胆外科, 河南 郑州 450008; 2. 广州医科大学附属第一医院 放疗科, 广东 广州 510230; 4. 湖北省仙桃市第一人民医院 普通外科, 湖北 仙桃 433000)

摘要

目的: 探讨基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 与基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 在肝内胆管细胞癌 (ICC) 组织中的表达及其与 ICC 患者临床病理特征及预后的关系。

方法: 收集 2011 年 1 月—2014 年 12 月收治的 50 例 ICC 患者的癌组织与癌旁组织手术标本, 采用免疫组织化学方法及 RT-PCR 方法检测 MMP-2 和 MMP-9 在以上组织中的表达, 分析 MMP-2 和 MMP-9 表达与 ICC 患者临床病理参数以及术后生存率的关系。

结果: 免疫组织化学结果显示, ICC 组织中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白阳性表达率分别为 34.0% 和 32.0%, 而两者在癌旁组织中无阳性表达; RT-PCR 结果显示, ICC 组织中 MMP-2 和 MMP-9 的相对表达均明显高于癌旁组织 (均 $P < 0.05$)。MMP-2 和 MMP-9 表达与 ICC 患者是否存在淋巴结转移和肿瘤分化程度有关 (均 $P < 0.05$), 而与患者性别、年龄和肿瘤分期无关 (均 $P > 0.05$); MMP-2 和 MMP-9 阳性患者生存率明显低于各自阴性者, 而两者均阳性患者的生存率最低 (均 $P < 0.05$)。

结论: ICC 组织中 MMP-2 和 MMP-9 表达明显上调, 且两者的表达与 ICC 患者恶性临床病理特征及不良预后密切相关。

关键词

胆管肿瘤; 胆管, 肝内; 基质金属蛋白酶 2; 基质金属蛋白酶 9; 预后
中图分类号: R735.8

MMP-2 and MMP-9 expressions in intrahepatic cholangiocarcinoma tissue and the significance

XU Jing¹, YI Wei², WAN Baishun³, YIN Bihui⁴

(1. Department of Radiotherapy 3. Department of Hepatobiliary Surgery, Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450008, China; 2. Department of Radiotherapy, the First Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510230, China; 4. Department of General Surgery, Xiantao First People's Hospital, Xiantao, Hubei 433000, China)

Abstract

Objective: To investigate the expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and 9 (MMP-9) in intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) and their relations with the clinicopathologic features and prognosis of ICC patients.

Methods: The surgical specimens including tumor and tumor-adjacent tissue from 50 ICC patients treated between January 2011 and December 2014 were collected. The MMP-2 and MMP-9 expressions in these tissues were detected by immunohistochemical staining and RT-PCR method, and the relations of MMP-2 and MMP-9 expressions with clinicopathologic variables and postoperative survival of ICC patients were analyzed.

Results: Results of immunohistochemical staining showed that the positive expression rate of MMP-2 and MMP-

收稿日期: 2015-06-02; 修订日期: 2015-07-09。

作者简介: 徐靖, 河南省肿瘤医院主治医师, 主要从事肿瘤放射治疗方面的研究。

通信作者: 易炜, Email: wanmed@126.com

9 in ICC tissue was 34.0% and 32.0% respectively, but neither was positive in tumor-adjacent tissue; results of RT-PCR showed that both relative expression levels of MMP-2 and MMP-9 in ICC tissue were significantly higher than those in tumor-adjacent tissue (both $P < 0.05$). Both MMP-2 and MMP-9 expressions were significantly associated with the presence or absence of lymph node metastasis and degree of tumor differentiation of ICC patients (all $P < 0.05$), but were irrelevant to the gender, age and tumor stage of ICC patients (all $P > 0.05$); the survival rate in patients with positive MMP-2 or MMP-9 expression was significantly lower than that in patients with negative MMP-2 or MMP-9 expression, and those with both MMP-2 and MMP-9 positive expressions had lowest survival rate (all $P < 0.05$).

Conclusion: MMP-2 and MMP-9 expressions are increased in ICC tissue, and both expressions are closely related to the malignant clinicopathologic profiles and poor prognosis of ICC patients.

Key words

Bile Duct Neoplasms; Bile Ducts, Intrahepatic; Matrix Metalloproteinase 2; Matrix Metalloproteinase 9; Prognosis

CLC number: R735.8

胆管癌 (cholangiocarcinoma, CCA) 是常见的恶性肿瘤之一, 主要起源于肝内胆管上皮和肝外胆管上皮, CCA 常见于中老年人, 且男性比女性更易发病^[1-2]。CCA 中有 20%~25% 为肝内胆管细胞癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)^[3-4], ICC 是第二常见的原发性肝癌, 占肝恶性肿瘤的 5%~15%。尽管临床诊断水平在不断的进步, 然而 ICC 患者的生存率并未得到明显的改善^[5-6]。据此, 研究者迫切希望寻找到一种新的有效治疗方法以改善 ICC 患者的生存期和预后。文献^[7-9]报道, 在 ICC 潜在的治疗靶向分子中, 基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinases 2, MMP-2) 和基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 存在明显的表达异常。然而, 目前关于 MMP-2 和 MMP-9 在 ICC 患者中的表达与 ICC 患者临床病理特征的关系, 以及 MMP-2 和 MMP-9 的表达对 ICC 患者生存期的影响目前还很少有文献报道。为阐明这些分子的生物学意义和这些分子作为治疗靶标的可能性, 笔者观察 50 例 ICC 患者癌组织 MMP-2 和 MMP-9 的表达情况, 分析其与 ICC 患者临床病理特征的关系及 MMP-2 和 MMP-9 的表达对 ICC 患者生存期的影响。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集 2011 年 1 月—2014 年 12 月于我院手术的 ICC 患者 50 例, 并同时收取癌旁组织作为对照。所有患者术后组织标本均经 HE 染色后由病理科

至少 2 名经验丰富的病理医师诊断确诊为 ICC。所有患者术前均未行放射治疗、化学治疗。其中男 34 例, 女 16 例; 年龄 44~71 岁; 病理分级: 高分化 8 例, 中分化 13 例, 低分化 29 例; 伴有淋巴结转移 20 例。所有患者均进行定期随访, 随访期限为 150 个月

1.2 免疫组化实验

鼠抗人 MMP-2 和 MMP-9 单克隆抗体及 Ultrase nsitive SP 试剂盒购自美国 Maxim 公司。上述标本经 HE 染色和 MMP-2、MMP-9 染色。抗原修复采用微波修复法, 参照试剂说明书进行免疫组化 SP 法检测。

1.3 RT-PCR 实验

1.3.1 引物 MMP-2 上游: 5'-TCC GCT CGA GAT GGA GGC ACG ATT GGT CTG-3', 下游: 5'-ATG GGG TAC CTC AGC AGC CCA GCC AGT CC-3'; MMP-9 上游: 5'-CTT GCA TAA GGA CGA CGT GA-3', 下游 5'-CAG AGA ATC GCC AGT ACT TC-3'。

1.3.2 反应条件 94 °C 预变性 5 min, 进入下列循环: 94 °C 30 s, 60 °C 40 s, 72 °C 40 s, 共 40 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。在 DNA 扩增仪上扩增相应的靶基因片段, 并以扩增 GAPDH 片段为内参照。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计学软件进行数据分析。MMP-2 和 MMP-9 阳性率比较采用 χ^2 检验, 生存分析采用 Kaplan-Meier 检验方法, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 MMP-2 和 MMP-9 蛋白在 ICC 组织中的表达

在 ICC 组织中可检测 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的

表达, 而在癌旁组织中未检测到 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达 (图 1); 50 例 ICC 组织中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达阳性的分别为 17 例 (34.0%) 和 16 例 (32.0%)。

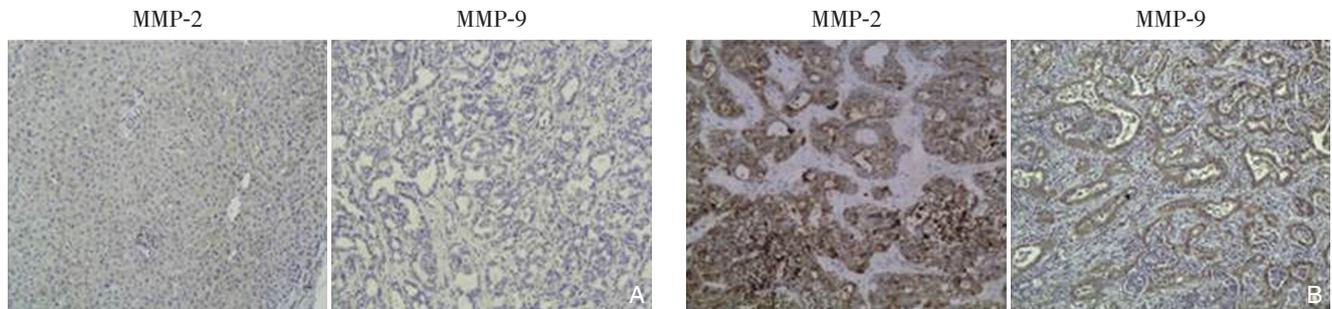


图 1 免疫组化检测 MMP-2 和 MMP-9 的表达 (×400) A: 癌旁组织; B: ICC 组织
Figure 1 Immunohistochemical staining for MMP-2 and MMP-9 expressions (×400) A: Tumor-adjacent tissue; B: ICC tissue

2.2 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 在 ICC 组织中的表达

RT-PCR 结果显示, ICC 组织有明显的 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 表达, 而两者癌旁组织中仅有

微弱表达; 半定量分析结果显示。在 ICC 组织中 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 的相对表达量明显高于癌旁组织, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (图 2)。

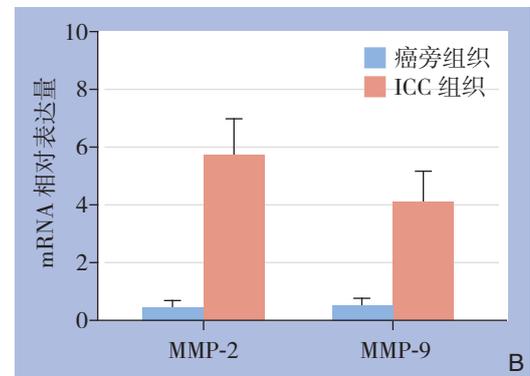
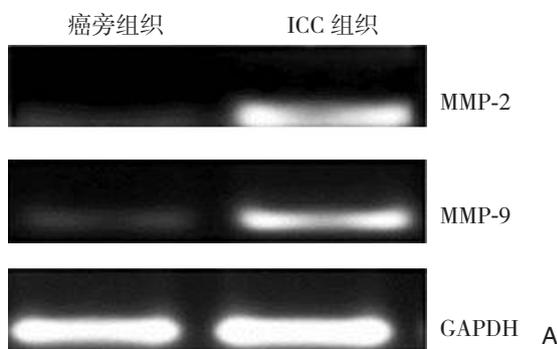


图 2 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 的表达检测 A: RT-PCR 结果; B: MMP-2 和 MMP-9 mRNA 在 ICC 组织与癌旁组织中的相对表达量
Figure 2 Determination of the MMP-2 and MMP-9 mRNA expressions A: Results of RT-PCR; B: Relative expression levels of MMP-2 and MMP-9 mRNA in ICC and tumor-adjacent tissue

2.3 MMP-2 和 MMP-9 表达与 ICC 临床病理参数之间的关系

相关临床参数的统计分析结果显示, MMP-2 和 MMP-9 表达在淋巴结转移组的阳性表达率明显高于非转移组 ($P < 0.05$), 在高/中分化型胆管癌组织的表达明显低于低分化组 ($P < 0.05$); 而两者均与患者性别、年龄和肿瘤分期无明显关系 (均 $P > 0.05$) (表 1)。

2.4 MMP-2 和 MMP-9 与 ICC 术后生存期之间的关系

绘制 Kaplan-Meier 生存曲线, 采用 Log-rank 单因素检验分析 MMP-2 和 MMP-9 表达情况与 50 例 ICC 患者术后生存期之间的关系, 结果显示: MMP-2 和 MMP-9 阳性者术后生存时间明显低于 MMP-2 和 MMP-9 阴性者, 且 MMP-2 和 MMP-9 双阳性者术后生存时间进一步降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 3)。

表1 MMP-2和MMP-9表达与ICC临床病理参数之间的关系 [n (%)]

Table 1 Relations of MMP-2 and MMP-9 expressions with the clinicopathologic variables in ICC patients [n (%)]

特征	n	MMP-2		χ^2	P	MMP-9		χ^2	P
		(-)	(+)			(-)	(+)		
性别									
男	34	24 (70.59)	10 (29.41)	0.997	0.318	23 (67.65)	11 (32.35)	0.006	0.938
女	16	9 (56.25)	7 (43.75)			11 (68.75)	5 (31.25)		
年龄 (岁)									
< 60	28	17 (60.71)	11 (39.29)	0.792	0.373	20 (71.43)	8 (28.57)	0.344	0.558
≥ 60	22	16 (72.72)	6 (27.27)			14 (63.64)	8 (36.36)		
分化程度									
高/中	21	18 (85.71)	3 (14.29)	6.271	0.012	18 (85.71)	3 (14.29)	5.221	0.022
低	29	15 (51.72)	14 (48.28)			16 (55.17)	13 (44.83)		
分期									
T ₁ /T ₂	24	17 (70.83)	7 (29.17)	0.480	0.488	14 (58.33)	7 (29.17)	0.009	0.927
T ₃	26	16 (61.53)	10 (38.46)			17 (65.38)	9 (34.62)		
淋巴结转移									
无	30	25 (83.33)	5 (16.67)	10.042	0.002	26 (86.67)	4 (13.33)	12.010	0.001
有	20	8 (40.00)	12 (60.00)			8 (40.00)	12 (60.00)		

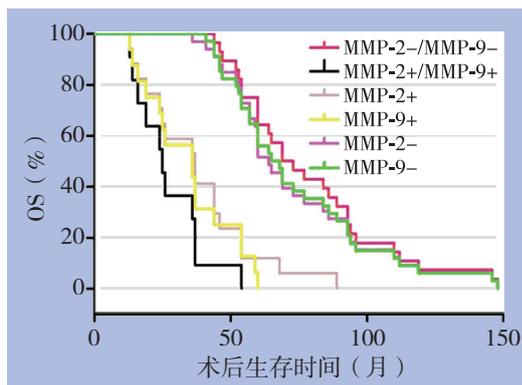


图3 不同MMP-2和MMP-9表达ICC患者生存曲线

Figure 3 Survival curves of ICC patients with different MMP-2 and MMP-9 expression statuses

3 讨论

基质金属蛋白酶 (MMPs) 介导的蛋白酶降解在细胞体内平衡的调节中发挥关键作用。McDonne等^[10]通过研究发现, MMPs基因表达与肿瘤的转移性能成正比。MMPs介导的细胞外基质降解可导致肿瘤细胞的侵袭和转移^[11]。MMP-2和MMP-9是MMPs家族中的重要成员, 属于明胶酶。文献^[12]报道, 敲低肿瘤抑制基因Wnk2可通过上调MMP-2表达促进胶质瘤进展。在结肠腺癌组织中, MMP-2的表达存在明显的异常, 且异常表达的MMP-2与结肠腺癌的预后密切相关^[13]。

同时, 国内外的许多研究^[14]表明, MMP-9与肿瘤的浸润、转移关系密切, 并且研究^[15-16]发现: MMP-9在消化道等多种肿瘤组织中表达均显著升高, 参与了多种肿瘤的发生及浸润。

文献^[17-19]报道, 在ICC组织中, MMP-2和MMP-9存在明显的表达异常。然而, 目前关于MMP-2和MMP-9表达情况与ICC患者临床病理特征的关系, 以及MMP-2和MMP-9的表达对CCA患者生存期的影响目前还很少有文献报道。本研究观察了50例ICC患者癌组织MMP-2和MMP-9的表达情况, 分析这些分子与ICC患者临床病理特征的关系及MMP-2和MMP-9的表达对CCA患者生存期的影响。结果发现, ICC组织中MMP-2和MMP-9的蛋白和mRNA表达水平与癌旁组织相比均显著升高 ($P < 0.01$)。MMP-2和MMP-9表达情况与ICC患者临床病理特征关系分析结果显示, MMP-2和MMP-9表达与ICC是否存在淋巴结转移相关, 还与肿瘤分化程度相关 ($P < 0.01$)。生存分析结果显示, MMP-2和MMP-9阳性患者生存率明显低于阴性者 ($P < 0.05$)。

综上所述, 本研究结果提示ICC组织中上调表达的MMP-2和MMP-9与ICC的发生发展密切相关, 然而, 关于MMP-2和MMP-9是否通过调解ICC细胞增、凋亡、侵袭参与ICC发生和发展, 以及相关机制还需进一步的深入研究。

参考文献

- [1] 程树群, 李楠, 吴孟超. 门静脉癌栓分型与治疗选择[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2012, 19(3):240-242.
- [2] Catena M, Aldrighetti L, Finazzi R, et al. Treatment of non-endemic hepatolithiasis in a Western country. The role of hepatic resection[J]. Ann R Coll Surg Engl, 2006, 88(4):383-389.
- [3] Liu ZY, Zhou YM, Shi LH, et al. Risk factors of intrahepatic cholangiocarcinoma in patients with hepatolithiasis: a case-control study[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2011, 10(6):626-631.
- [4] Tyson GL, El-Serag HB. Risk factors for cholangiocarcinoma[J]. Hepatology, 2011, 54(1):173-184.
- [5] Baheti AD, Tirumani SH, Rosenthal MH, et al. Diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma: a comprehensive update for the radiologist[J]. Clin Radiol, 2014, 69(12): e463-470.
- [6] Adisakwattana P, Suwandittakul N, Petmitr S, et al. ALCAM is a Novel Cytoplasmic Membrane Protein in TNF- α Stimulated Invasive Cholangiocarcinoma Cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(9):3849-3856.
- [7] Zhang C, Bai DS, Huang XY, et al. Prognostic significance of Capn4 overexpression in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. PLoS One, 2013, 8(1):e54619. doi: 10.1371/journal.pone.0054619.
- [8] Shi RY, Yang XR, Shen QJ, et al. High expression of Dickkopf-related protein 1 is related to lymphatic metastasis and indicates poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma patients after surgery[J]. Cancer, 2013, 119(5):993-1003.
- [9] Zeng B, Li Z, Chen R, et al. Epigenetic regulation of miR-124 by hepatitis C virus core protein promotes migration and invasion of intrahepatic cholangiocarcinoma cells by targeting SMYD3[J]. FEBS Lett, 2012, 586(19):3271-3278.
- [10] McDonnell S, Fingleton B. Role of matrix metalloproteinases in invasion and metastasis: biology, diagnosis and inhibitors[J]. Cytotechnology, 1993, 12(1/3):367-384.
- [11] Liu J, Ping W, Zu Y, et al. Correlations of lysyl oxidase with MMP2/MMP9 expression and its prognostic value in non-small cell lung cancer[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(9):6040-6047.
- [12] Costa AM, Pinto F, Martinho O, et al. Silencing of the tumor suppressor gene WNK2 is associated with upregulation of MMP2 and JNK in gliomas[J]. Oncotarget, 2015, 6(3):1422-1434.
- [13] Artaş G, Ozercan HI. The expression of STAT3, BCL-XL and MMP-2 proteins in colon adenocarcinomas and their relationship with prognostic factors[J]. Turk Patoloji Derg, 2014, 30(3):178-183.
- [14] Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis[J]. J Pathol, 1999, 189(3):300-308.
- [15] 范玉晶, 韩明子. 基质金属蛋白酶和消化道肿瘤的相关性[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(9):2174-2176.
- [16] 秦蓁, 罗彬, 王旭东. 肺癌MMP-9和VEGF的表达及意义[J]. 中现代医药杂志, 2009, 11(2):21-23.
- [17] Xiao M, Zhou NX, Huang ZQ, et al. The ratio of MMP-2 to TIMP-2 in hilar cholangiocarcinoma: a semi-quantitative study[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2004, 3(4):599-602.
- [18] Zeng B, Li Z, Chen R, et al. Epigenetic regulation of miR-124 by hepatitis C virus core protein promotes migration and invasion of intrahepatic cholangiocarcinoma cells by targeting SMYD3[J]. FEBS Lett, 2012, 586(19):3271-3278.
- [19] Zhuang PY, Zhang JB, Zhu XD, et al. Two pathologic types of hepatocellular carcinoma with lymph node metastasis with distinct prognosis on the basis of CK19 expression in tumor[J]. Cancer, 2008, 112(12):2740-2748.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 徐靖, 易炜, 万百顺, 等. MMP-2和MMP-9在肝内胆管细胞癌组织中的表达及意义[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(8):1107-1111. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.08.010

Cite this article as: XU J, YI W, WAN BS, et al. MMP-2 and MMP-9 expressions in intrahepatic cholangiocarcinoma tissue and the significance[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(8):1107-1111. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.08.010