

# MMP-9、MMP-14、MMP-2 和 VEGF-C 在乳腺癌中的表达及意义

The Expressions of MMP-9, MMP-14, MMP-2 and VEGF-C in Breast Cancer and Their Significance

QIAN Hong, CAO Gui-ming, NIU Guo-liang, et al.

钱红<sup>1</sup>, 曹桂明<sup>1</sup>, 牛国梁<sup>1</sup>, 杨梅<sup>1</sup>, 黎晴<sup>2</sup>

(1. 南华大学附属南华医院, 湖南 衡阳 421000;

2. 广州市荔湾区人民医院, 广东 广州 510370)

**摘要:** [目的] 探讨 MMP-9、MMP-14、MMP-2 和 VEGF-C 在乳腺癌中的表达及意义。[方法] 用组织芯片和免疫组化技术检测乳腺良性病变及乳腺癌组织中 MMP-2、MMP-9、MMP-14、VEGF-C 的表达水平;用 D2-40 标记淋巴管并计数。[结果] MMP-9、MMP-14、MMP-2 与 VEGF-C 在乳腺癌组织中的表达率及表达强度远高于乳腺良性病变组织,并呈正相关关系( $r=0.27、0.35、0.27、0.26$ );浸润性乳腺癌 VEGF-C 阳性表达率有淋巴结转移者明显高于无淋巴结转移者,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。[结论] MMP-9、MMP-14、MMP-2 与 VEGF-C 的表达与乳腺癌淋巴管生成及淋巴结转移关系密切并呈正相关。

**关键词:** 乳腺肿瘤;基质金属蛋白酶;淋巴管密度;淋巴管形成;淋巴结转移;VEGF-C  
**中图分类号:** R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)03-0223-04

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 通过降解细胞外基质以及细胞间接触等方式促进上皮细胞周围组织分离,在乳腺癌中表达上调并促进癌细胞的侵袭和转移<sup>[1,2]</sup>,但乳腺癌转移中 MMPs 的特异性因子及其介导乳腺癌细胞运动、侵袭和转移的具体机制还有待研究。乳腺癌淋巴管生成能促进淋巴转移的发生,而血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 家族的一些成员在此过程中起到重要作用,其中包括如 VEGF-C、VEGF-D 及其受体 3 (VEGFR-3) 等。因此本实验通过检测自制组织芯片中乳腺癌 MMP-9、MMP-14、MMP-2 和 VEGF-C 的表达,进一步探讨其表达与乳腺癌淋巴管生成和淋巴结转移之间的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

收集南华大学附属南华医院 1998 年 12 月至

基金项目:湖南省卫生厅基金项目(B2006-122)和衡阳市科委项目(2007KS24)

通讯作者:黎晴,住院医师,硕士;广州市荔湾区人民医院病理室,广东省广州市荔湾区芳村大道明心路 3 号(510370); E-mail: gmcao415@163.com。

收稿日期:2012-06-28;修回日期:2012-10-27

2008 年 3 月以及附属第一医院 2006 年 7 月至 2008 年 7 月病理科乳腺组织石蜡标本 284 例,均按 2003 年乳腺肿瘤 WHO 组织学分类标准进行诊断、分型及分级,其中乳腺良性病变 32 例,术前未经放、化疗的浸润性乳腺癌 252 例(无淋巴结转移者 151 例,有淋巴结转移者 101 例);221 例有肿瘤体积资料,其中 $<2.5\text{cm}$  73 例, $\geq 2.5\text{cm}$  148 例;乳腺癌中导管癌 215 例,其中组织学 I 级 44 例、II 级 100 例、III 级 71 例;非导管癌 37 例。所有病例均为女性,年龄 27~76 岁,平均 49.7 岁。

### 1.2 方法

自制 98 点列阵(含 marker)组织芯片蜡块(Figure 1),涵括 284 例乳腺组织。

免疫组化染色采用 SP 法,每项指标均设置阴性及阳性对照(所用一抗和试剂盒均购自福州迈新生物技术有限公司)。MMP-2、MMP-9、MMP-14 及 VEGF-C 阳性均定位于细胞质内,呈棕黄色颗粒(Figure 2),按 Shimizu 方法<sup>[3]</sup>进行阳性细胞着色程度及着色细胞百分率计分:0 分不着色,1 分浅棕色,2 分深棕色;着色细胞 $<5\%$ 为 0 分, $5\% \sim 25\%$ 为 1 分, $26\% \sim 50\%$ 为 2 分, $>50\%$ 为 3 分;两种分值相乘,0 分为(-),1 分为(+),2~3 分为(++),4~6 分为(+++);

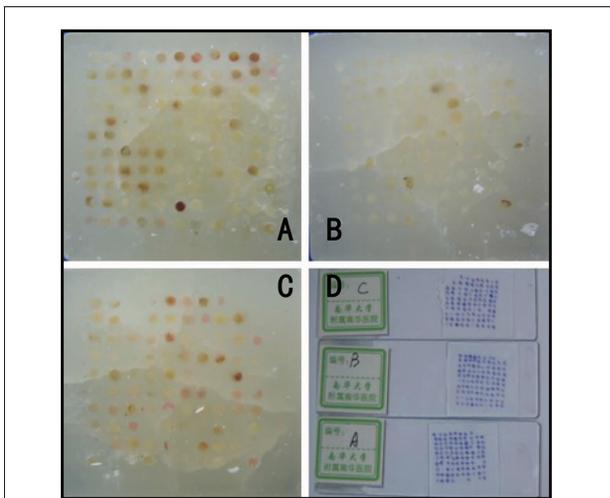
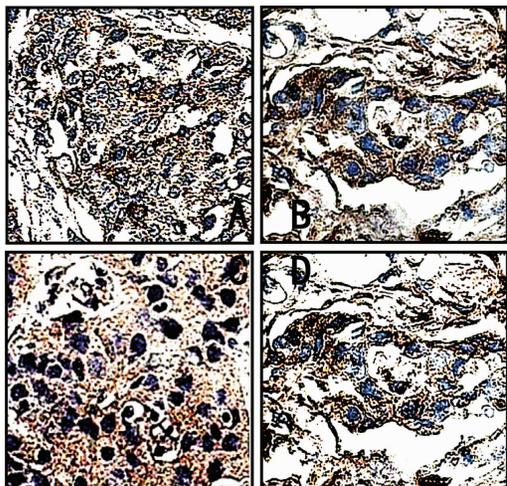


Figure 1 Paraffin blocks of hiso-array and microtome sections



A: MMP-2; B: MMP-9; C: MMP-14; D: VEGF-C

Figure 2 Positive expression of MMP-2, MMP-9, MMP-14 and VEGF-C in breast cancer (SP x400)

(++)~(+++)视为阳性,(-)~(+)视为阴性。被 D2-40 染成棕黄色的、不含红细胞的微小管腔或管腔样结构或内皮细胞簇视为一个 D2-40 阳性淋巴管。并按 Weidner 法<sup>[4]</sup>分别计算乳腺良性病变和乳腺癌中心区、周边区的淋巴管密度 (lymphatic vessel density, LVD)。

1.3 统计学处理

所有数据采用 SPSS 16.0 软件作统计学分析,运用  $\chi^2$  检验、t 检验及 Spearman 等级相关分析方法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺病变中 VEGF-C 和 LVD 的分布特点

VEGF-C 主要定位于癌细胞胞质中,呈橙黄色颗粒状。252 例浸润性乳腺癌患者中,VEGF-C 阳性 143 例,阳性率为 56.7%;32 例乳腺良性病变中 VEGF-C 阳性率为 0,两者差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。有淋巴结转移的 101 例中,其 VEGF-C 阳性 78 例,阳性率为 77.2%;无淋巴结转移的 151 例中,63 例 VEGF-C 阳性,阳性率为 41.7%,两组间差异有显著性 ( $P < 0.01$ );组织学分级为 II、III 级患者 VEGF-C 的阳性率明显高于 I 级患者 ( $P < 0.01$ ) (Table 1)。

乳腺癌周边区 LVD 均值明显高于癌中心区 ( $P < 0.01$ ),均高于良性病变中的 LVD 均值 ( $0.77 \pm 1.81$ ) ( $P < 0.01$ )。乳腺癌周边区 LVD 在有淋巴结转移者中均值明显高于无淋巴结转移者 ( $P < 0.01$ ),并且在组织学 II、III 级导管癌中明显高于 I 级导管癌 ( $P < 0.05$ ) (Table 1)。

2.2 MMP-9、MMP-14、MMP-2 与乳腺癌周边区 LVD 的关系

乳腺良性病变中 MMP-9、MMP-14、MMP-2 呈阴性或弱阳性表达,在乳腺癌细胞胞质中呈强阳性表达,胞质染成棕黄色细颗粒,均匀分布,其表达率及表达强度远高于乳腺良性病变,组间比较均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。乳腺癌中 MMP-9、MMP-14、MMP-2 的表达与患者年龄差异无统计学

Table 1 The relationship between VEGF-C and LVD expressions and clinicopathology of breast cancer

Parameters	n	VEGF-C		LVD	
		Positive rate(%)	P	$\bar{x} \pm s$	P
Benign breast disease	32	0		$0.77 \pm 1.81$	
Invasive breast cancer	252	56.7	$< 0.01$		
Peripheral zone in cancer				$8.99 \pm 5.45$	
Cancer center				$3.24 \pm 1.92$	$< 0.01$
Lymphatic metastasis					
Without	151	41.7		$5.78 \pm 3.02$	
With	101	77.2	$< 0.01$	$11.21 \pm 4.06$	$< 0.01$
Histological grading					
I	44	13.6		$7.45 \pm 3.23$	
II、III	171	52.0	$< 0.01$	$9.22 \pm 4.67$	$< 0.05$

意义( $P>0.05$ ),而与肿瘤体积、组织学分级及淋巴结转移有关。MMP-9、MMP-14、MMP-2 的表达在 $<2.5\text{cm}$  乳腺癌中(56.16%、50.68%、52.34%)明显低于 $\geq 2.5\text{cm}$  乳腺癌(77.03%、88.51%、80.13%),在 I 级导管癌中(56.82%、54.55%、50.37%)明显低于 II、III 级导管癌(72.51%、83.62%、79.26%),在无淋巴结转移组(61.39%、60.40%、60.33%)明显低于有淋巴结转移组(74.17%、84.11%、78.51%),差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。乳腺癌中 MMP-9、MMP-14、MMP-2 的表达与癌中心区 LVD 数量无关( $P>0.05$ ),而与癌周边区 LVD 关系密切,其表达阳性组癌周边区 LVD 的均值( $10.58\pm 4.67$ 、 $10.55\pm 4.86$ 、 $10.82\pm 4.39$ )均高于表达阴性组( $5.30\pm 3.00$ 、 $6.56\pm 3.79$ 、 $5.93\pm 3.17$ ),差别均有统计学意义( $P<0.01$ )(Table 2)。

### 2.3 MMP-9、MMP-14 与 MMP-2、VEGF-C 表达之间的关系

Spearman 等级相关分析显示 MMP-9、MMP-14 与 MMP-2、VEGF-C 在乳腺癌组织中的表达呈正相关关系, $r$  分别为 0.27、0.35、0.27、0.26(Table 3)。

**Table 2 The relationship between MMP-2, MMP-9, MMP-14 and LVD in breast cancer ( $\bar{x}\pm s$ )**

Groups	n	LVD (peripheral zone in cancer)		P	LVD (cancer center)		P
		$\bar{x}\pm s$	$\bar{x}\pm s$		$\bar{x}\pm s$	$\bar{x}\pm s$	
MMP-9							
-	75	5.30±3.00		<0.01	3.76±1.24		>0.05
+	177	10.58±4.67			3.71±1.43		
MMP-14							
-	92	6.56±3.79		<0.01	3.54±1.37		>0.05
+	160	10.55±4.86			3.69±1.18		
MMP-2							
-	83	5.93±3.17		<0.01	3.82±1.16		>0.05
+	169	10.82±4.39			3.74±1.31		

**Table 3 Correlation among the expressions of MMP-2, MMP-9, MMP-14 and VEGF-C in breast cancer**

Groups	n	MMP-9				MMP-14			
		-	+	r	P	-	+	r	P
MMP-2									
+	177	39	138	0.27	<0.01	34	143	0.27	<0.01
-	75	39	36			30	45		
VEGF-C									
+	143	21	122	0.35	<0.01	19	124	0.26	<0.01
-	109	57	52			45	64		

## 3 讨论

目前有关 MMP-9、MMP-14 如何影响乳腺癌淋巴管生成尚不完全清楚,有报道 MMP-2 能诱导淋巴管生成,而 MMP-14 是 MMP-2 重要的激活因子<sup>[5]</sup>。本实验前期工作表明,肿瘤淋巴管生成数量与肿瘤淋巴结转移呈正相关,MMP-9 与 MMP-14 协同作用促进腋窝淋巴结转移,可能成为判定乳腺浸润性癌恶性程度的指标之一<sup>[6-8]</sup>,本实验癌周边区 LVD 与乳腺癌淋巴结转移、肿瘤大小、导管癌的分级有关,进一步证实了上述观点。

LVD 与肿瘤的浸润深度、临床分期及淋巴结转移关系密切,可以作为评判乳腺癌预后的重要指标之一<sup>[8,9]</sup>。本组乳腺浸润性导管癌 MMP-9、MMP-14 与 MMP-2、VEGF-C 阳性组的表达率明显高于阴性组,其阳性表达均与癌周边区 LVD 数量有关而与癌中心区 LVD 数量无关。因此我们认为 MMP-9、MMP-14 与 MMP-2、VEGF-C 的表达与乳腺癌淋巴管生成及淋巴结转移关系密切,可能通过协同作用影响乳腺癌淋巴管生成并参与乳腺癌的进展和淋巴结转移。

多数学者认为<sup>[10-13]</sup>,肿瘤微环境中的 MMPs 水平升高,可通过多种机制诱导上皮细胞间质转化来促进肿瘤的进展和转移,目前也公认 VEGF-C 与其特异性受体 VEGFR-3 是生成淋巴管内皮的信号传递系统之一,两者结合后可激活 Ras/MAPK 以及 RAFTK 信号传导通路促进肿瘤淋巴管生成<sup>[1,11,15,16]</sup>。本组 VEGF-C 阳性的乳腺癌中,MMP-9、MMP-14 和 MMP-2 的阳性率明显高于阴性组,并且 MMP-9、MMP-14 和 MMP-2 的表达与 VEGF-C 呈正相关关系,提示 VEGF-C 与 VEGFR-3 结合后,一方面可能持续激活 MAPK 诱导 MMP-9、MMP-14 和 MMP-2 的高表达,诱导肿瘤上皮细胞间质转化,参与肿瘤的发展、浸润和转移;另一方面可能通过 MAPK 激活淋巴管内皮细胞有丝分裂促进其存活与增殖,从而导致肿瘤肿瘤周边区 LVD 数量的增多参与乳腺癌的浸润及淋巴结转移。但是乳腺癌进展和转移是一个复杂的过程,MMPs 在乳腺癌细胞间质转化中促进

癌周边区淋巴管生成的具体机制还有待进一步深入研究。

## 参考文献:

- [1] Liu D, Guo H, Li Y, et al. Association between polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases (MMPs) and risk of cancer metastasis: a meta-analysis[J]. PLoS One, 2012, 7(2):e31251.
- [2] Al-Raawi D, Abu-El-Zahab H, El-Shinawi M, et al. Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlates with the expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in inflammatory breast cancer [J]. Int J Clin Exp Med, 2011, 4(4):265-275.
- [3] Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H, et al. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissues [J]. Hum Pathol, 1990, 21(6):607-612.
- [4] Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 1992, 84(24): 1875-1887.
- [5] Liang YX, Chen MH. The Expressions of MMP-9 and VEGF-C in breast cancer and their significance[J]. Chinese Community Doctors, 2010, 12(4):298-301. [梁运霞, 陈茂怀. 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子和血管内皮生长因子-C 在乳腺癌的表达及其意义[J]. 中国医师杂志, 2010, 12(4):298-301.]
- [6] Cao GM, Yang M. The impact of VEGF-C and VEGFR-3 expression on lymphangiogenesis and lymph-node metastasis of breast cancer [J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2006, 33(6): 310-313. [曹桂明, 杨梅. VEGF-C 和 VEGFR-3 对乳腺癌淋巴管生成和淋巴结转移的影响[J]. 中国肿瘤临床, 2006, 33(6): 310-313.]
- [7] Cao GM, Yang M, Hong H, et al. Impact of hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  expression with biological behavior on breast carcinoma[J]. Journal of Nanhua University(Medical Edition), 2005, 33(4):473-475. [曹桂明, 杨梅, 洪海, 等. 缺氧诱导因子 1 $\alpha$  对乳腺癌生物学行为的影响 [J]. 南华大学学报·医学版, 2005, 33(4):473-475.]
- [8] Wang Y, Li WY, Liang JH, et al. The relationship of expression of INOS and VEGF-C with lymphangiogenesis and prognosis in laryngeal cancer[J]. Journal of Chinese Oncology, 2012, 18(2):114-117. [王莹, 李文媛, 梁金花, 等. iNOS 和 VEGF-C 的表达与喉癌组织淋巴管生成及预后关系[J]. 肿瘤学杂志, 2012, 18(2):114-117.]
- [9] Chen JS, Zhang YJ, Li GQ, et al. Role of platelet-derived growth factor-BB in lymphangiogenesis and lymph node metastasis of human breast cancer [J]. Journal of Chinese Oncology, 2009, 15(7):649-651. [陈基善, 张雅洁, 李贵芹, 等. 血小板源性生长因子-BB 在人类乳腺癌淋巴管生成及淋巴结转移中作用[J]. 肿瘤学杂志, 2009, 15(7): 649-651.]
- [10] Li Q, Yang M, Cao GM. Association of MMP-9 and MMP-14 with lymphangiogenesis and lymph node metastasis in breast cancer[J]. International Medicine and Health Guidance News, 2011, 17(15):1807-1810. [黎晴, 杨梅, 曹桂明. MMP9 和 MMP14 与乳腺癌淋巴管生成及淋巴结转移关系的研究[J]. 国际医药卫生导报, 2011, 17(15):1807-1810.]
- [11] Radisky ES, Radisky DC. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 15(2):201-212.
- [12] Zuo JH, Zhu W, Li MY, et al. Activation of EGFR promotes squamous carcinoma SCC10A cell migration and invasion via inducing EMT-like phenotype change and MMP-9-mediated degradation of E-cadherin[J]. J Cell Biochem, 2011, 9(112): 2508-2517.
- [13] Jezierska A, Motyl T. Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review[J]. Med Sci Monit, 2009, 15(2):32-40.
- [14] Kang Y, Zeng GQ, Zou FY, et al. Expression and relationship of SDF-1 and MMP-7 proteins in breast carcinoma[J]. Journal of University of South China (Medical Edition), 2009, 37(1):42-44. [康颖, 曾谷清, 邹飞燕, 等. SDF-1、MMP-7 在乳腺癌中的表达及相互关系[J]. 南湖大学学报·医学版, 2009, 37(1):42-44.]
- [15] Dang QH, Zeng XX, Zhang HH, et al. Expression of CD147 and MMP9 in breast invasive ductal carcinoma and its significance[J]. Journal of Chinese Oncology, 2010, 16(9):721-724. [党秋红, 曾宪旭, 张欢欢, 等. CD147 和 MMP9 在乳腺浸润性导管癌中的表达及意义[J]. 肿瘤学杂志, 2010, 16(9):721-724.]
- [16] Lohela M, Bry M, Tammela T, et al. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis[J]. Curr Opin Cell Biol, 2009, 21(2): 154-165.