

食管鳞癌患者外周血 MMP-9 mRNA 表达水平及临床意义研究

李波^{1,2}, 凌志强^{2,3}, 郑吉^{1,2}, 毛伟敏^{2,3}

(1. 浙江省中医药大学 2010 级硕士研究生, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江省肿瘤医院, 浙江省肿瘤研究所, 浙江 杭州 310022; 3. 浙江省胸部肿瘤(肺、食管)诊治技术研究重点实验室, 浙江 杭州 310022)

摘要: [目的] 探讨食管鳞癌患者外周血中基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 基因的表达及其与临床病理资料、生存情况的关系。 [方法] 应用实时定量 PCR 技术定量检测食管癌外周血标本中 MMP-9 mRNA 的表达, 分析 MMP-9 基因表达情况与患者临床病理参数及预后之间的关系。 [结果] 在 169 例食管鳞癌患者外周血标本中, 有 106 例 (62.7%) 存在外周血 MMP-9 基因的阳性表达, 与食管癌的淋巴结转移 ($P=0.039$)、远处转移 ($P=0.019$) 和 TNM 分期 ($P=0.014$) 显著相关。单因素生存分析显示 N 分期 ($P=0.000$)、M 分期 ($P=0.002$)、TNM 分期 ($P=0.003$)、MMP-9 表达 ($P=0.042$) 对患者生存的影响有统计学意义。MMP-9 基因阳性表达的食管癌患者远期生存明显低于阴性表达者。多因素分析显示 N 分期是食管鳞癌患者预后的独立影响因素 ($RR=1.671, 95\%CI: 1.212\sim 2.306$)。 [结论] 食管鳞癌患者外周血中 MMP-9 基因的高表达与食管癌转移存在关联, 并可提示食管癌患者的不良预后。

关键词: 食管肿瘤; 鳞状细胞癌; 基质金属蛋白酶-9 (MMP-9); 实时定量 PCR; 外周血
中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)05-0352-05

Expression of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) mRNA in the Peripheral Blood of Patients with Esophageal Squamous Cell Cancer and Its Clinical Significance

LI Bo^{1,2}, LING Zhi-qiang^{2,3}, ZHENG Ji^{1,2}, et al.

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Zhejiang Cancer Hospital, Zhejiang Cancer Research Institute, Hangzhou 310022, China; 3. Zhejiang Key Laboratory of Diagnosis & Treatment Technology on Thoracic Oncology (Lung and Esophagus), Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene in the peripheral blood of patients with esophageal squamous cell cancer (ESCC) and its relationships with clinicopathologic characteristics and survival. [Methods] The expression of MMP-9 mRNA from peripheral blood samples of ESCC was detected by real-time qPCR, and the relationships of MMP-9 expression with clinicopathologic characteristics and prognosis were analyzed. [Results] The positive expression rate of MMP-9 in the peripheral blood of patients with ESCC was 62.7% (106/169), which positively correlated with the lymph node metastasis ($P=0.039$), distant metastasis ($P=0.019$) and TNM stage ($P=0.014$). Univariate analysis showed that N stage ($P=0.000$), M stage ($P=0.002$), TNM stage ($P=0.003$) and MMP-9 expression ($P=0.042$) had significant impact on patients' survival. The survival of ESCC patients with positive expression of MMP-9 was lower than that of patients with negative expression of MMP-9. Multivariate analysis showed that N stage was an independent impact factor for prognosis ($RR=1.671, 95\%CI: 1.212\sim 2.306$). [Conclusion] The high expression of MMP-9 correlates with the metastasis of esophageal cancer and might indicate poor prognosis.

Subject words: esophageal neoplasms; squamous cell carcinoma; matrix metalloproteinase-9 (MMP-9); real-time qPCR; peripheral blood

食管癌是人类目前最常见的恶性肿瘤之一,我

基金项目: 浙江省重大科技专项计划项目 (2011C13039-1); 卫生部科学研究基金——浙江省医药卫生重大科技计划项目 (WKJ2011-2-015); 浙江省医药卫生平台重点资助计划 (2011ZDA004)

通讯作者: 毛伟敏, 院长, 浙江省胸部肿瘤(肺、食管)诊治技术研究重点实验室主任, 教授, 主任医师, 博士生导师, 硕士; 浙江省肿瘤医院胸外科, 浙江省杭州市半山桥广济路 38 号 (310022); E-mail: maowm1218@163.com。

收稿日期: 2013-03-27; **修回日期:** 2013-04-18

国的发病及死亡情况尤为严重, 在所有恶性肿瘤中排第 6 位和第 4 位^[1]。近年来, 随着多方面技术手段的进步, 食管癌的诊治取得了较大的发展, 但整体而言预后仍较差, 总体 5 年生存率在 20% 左右^[2], 其部分原因归结于发现太晚, 在城市居民中首次被诊断为食管癌的患者中 86% 已属中期或晚期, 在农村地区该比例更是达到 95% 以上^[3]。因此应重视做好早

诊早治方面的工作,有必要深入开展食管癌的生物分子生物学研究,寻找其诊断、治疗及评估预后的新型有效标志物和靶点,从而为患者病情判断、疗效评估及个体化治疗提供参考。

基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9)基因是基质金属蛋白酶(MMPs)家族的重要组分,可降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和基底膜成分,在肿瘤浸润转移中起关键性作用。已有大量的研究表明,食管癌细胞可自行产生和分泌 MMP-9 蛋白,从而促进肿瘤的浸润转移等发展进程^[4,5]。但之前的各项研究都以食管癌手术切除或局部组织活检的标本为实验对象,虽然已在肿瘤组织学上得出阳性结论,但因在健康体检和肿瘤筛查时一般不首先考虑创伤较大的检查,所以无法在临床实践上得到广泛应用。本研究应用实时定量 PCR 技术对 169 例食管癌外周血标本中 MMP-9 基因的表达进行定量检测,并结合临床资料探讨其意义。

1 资料与方法

1.1 资料

收集浙江省肿瘤医院 2010 年 5 月至 2012 年 4 月期间 169 例食管鳞癌患者的外周循环血标本,病例均经胃镜活检病理证实为食管鳞癌,标本采集前患者未被诊断其他恶性肿瘤,未行手术及放化疗等抗肿瘤治疗。169 例食管癌患者中男性 151 例,女性 18 例;发病年龄 43~77 岁,平均(60.03±7.38)岁;浸润深度为 T₁ 9 例、T₂ 30 例、T₃ 118 例、T₄ 4 例;淋巴结转移阴性 60 例、阳性 108 例;远处转移阴性 162 例、阳性 7 例;TNM 分期 I 期 21 例、II 期 47 例、III 期 94 例、IV 期 7 例。收集标本时取 1ml EDTA 抗凝的外周血加入等体积生理盐水稀释,再加入 2ml 淋巴细胞分离液,500r/min 离心 20min,吸取白细胞层转移至 1.5ml 离心管中,2 400r/min 离心 5min,弃上清后置-76℃冰箱备用。

1.2 方法

总 RNA 提取:按照 MiRNeasy Mini Kit 试剂盒说明书提取外周血白细胞中的总 RNA,紫外分光光度计判定所取总 RNA 的浓度和纯度,要求吸光度值 A₂₆₀/A₂₈₀>1.8。取 1μl RNA 溶液在 1.5%的变性琼脂糖凝胶中进行电泳,测定 RNA 的完整性。

逆转录:取 1μl 总 RNA 使用 PrimeScript® miRNA cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行 cDNA 的逆转录合成,具体操作参照试剂盒说明书。

PCR 扩增:Real-time qPCR 使用 ABI 7500PCR 仪(Applied Biosystems),采用 25μl 的反应体系,具体操作参照 SYBR® Premix Ex Taq™ II 的使用说明。反应过程具体为:50℃激活聚合酶 2min,94℃预变性 3min;94℃变性 30s,60℃退火和延伸 35s,扩增 40 个循环。分析实验数据,计算出标本中 MMP-9 的 DNA 浓度。

结果判定标准:设定阳性分界为 256ng/μl, MMP-9 基因最终测量值≥256ng/μl 为阳性,<256 ng/μl 为阴性。

1.3 随访

患者随访由研究组成员随访负责人专门跟踪随访,记录完整的随访资料。定义终点事件为死亡,自确诊日期开始计算总生存期(OS),手术完全切除的患者自手术日期开始计算无病生存期(DFS),其余患者自接受治疗达到缓解或稳定的日期开始计算无进展生存期(PFS)。末次随访时间为 2012 年 7 月,失访者以最近 1 次有效随访日期作为截尾值处理。

1.4 统计学处理

采用 SPSS18.0 统计软件对结果进行分析。采用 Spearman 秩相关检验进行 MMP-9 表达与各项临床病理资料之间的相关性分析。采用乘积极限法(Kaplan-Meier)进行单因素生存分析,绘制生存曲线,用对数秩检验(Log-Rank)进行生存曲线比较。采用 Cox 回归进行多因素生存分析,显著性检验采用 Wald 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 食管癌外周血 MMP-9 基因表达状态

169 例食管癌外周血标本中,106 例出现 MMP-9 基因的表达,阳性表达率为 62.7%。

2.2 MMP-9 基因表达与食管癌患者临床病理特征

利用 Spearman 秩相关检验对 MMP-9 基因在食管癌外周血中的表达程度和患者的临床病理特征进行分析,MMP-9 基因的阳性表达与食管癌患者的淋巴结转移(P=0.039)、远处转移(P=0.019)、TNM 分期(P=0.014)存在统计学上的相关性(Table 1);与患者

性别、年龄、家族史、T分期、组织分化程度、脉管瘤栓、神经侵犯等情况不存在统计学上的相关性 ($P > 0.05$)。

2.3 MMP-9 基因表达与食管癌患者预后

对本研究中 169 例患者进行电话随访, 结果随访资料完整者 162 例, 失访 7 例(失访率 4.14%), 随访日期截止到 2012 年 7 月 4 日。106 例 MMP-9 基因阳性表达的患者中有 33 例在随访期间内死亡, 而

63 例阴性表达的患者只有 9 例死亡, 两者之间差异显著 ($\chi^2=6.004, P=0.014$)。对两组患者的临床病理及预后情况进行单因素生存分析显示, N 分期 ($\chi^2=27.496, P=0.000$)、M 分期 ($\chi^2=9.878, P=0.002$)、TNM 分期 ($\chi^2=14.291, P=0.003$)、MMP-9 表达 ($\chi^2=4.138, P=0.042$) 对患者的总生存期 (OS) 影响有统计学意义, 提示 TNM 分期晚、MMP-9 阳性表达等因素致使患者总生存期缩短 (Figure 1), 而性别、年龄、T 分期、家族史、分化程度、脉管瘤栓、神经侵犯等因素对 OS 影响无统计学意义 (Table 2)。患者的无病生存期 (DFS) 或无进展生存期 (PFS) 在分析计算中均未发现临床病理特征对其影响有统计学意义 ($P > 0.05$)。OS 的 Cox 多因素回归分析结果仅剩 N 分期进入方程 ($P=0.002$), 提示 N 分期在方程拟合过程中对患者生存函数的贡献值较其他因素大, 是患者预后的独立影响因子, 其相对危险度 (RR) 为 1.671 (95% CI: 1.212~2.306)。

3 讨论

MMP-9 基因作为 MMPs 家族的主要成员, 参与了创伤修复、血管形成、炎症反应及结缔组织病等多种生理病理过程。在肿瘤学研究方面, 因其可破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障, 使肿瘤细胞较易于突破原发部位, 而在肿瘤侵袭转移过程中发挥重要作用^[6]。随着研究的深入, 更发现了 MMP-9 基因的多态性与食管癌的发生、发展及预后都存在关联, 认为 MMP-9 表达增加是促使食管发生癌变的早期事件^[7,8]。El-Kenawy 等^[9]还发现 MMP-9 基因高表达的患者肿瘤局部微血管密度明显大于低表达的患者 ($P=0.002$), 提供了 MMP-9 基因促进间质血管新生和肿瘤转移的直接证据。但是这一系列的成果暂未在临床上被推广使用, 因其测定需要组织活检, 不符合筛查期间尽量减少有创检查的原则, 因此未能使更多的患者受益。能否通过外周血的 MMP-9 基因表达水平来评价患者的疾病状态, 是将该项成果转化为实践应用的一条可尝试的途径。

本研究通过 Real-time qPCR 对 169 例食管癌患者的外周血中 MMP-9 基因的表达情况进行检测, 发现食管癌中 MMP-9 基因的阳性表达率为 62.7% (106/169), 与其他研究在食管癌组织中测得的阳性

Table 1 Correlation of MMP-9 expression and clinicopathologic characteristics

Variables	MMP-9		P
	-	+	
Gender			
Male	55	96	0.254
Female	8	10	
Age(years)			
<60	31	61	0.058
≥60	32	45	
T stage			
T ₁	4	5	0.239
T ₂	12	18	
T ₃	47	71	
T ₄	0	4	
N stage			
N ₀	27	33	0.039
N ₁	21	37	
N ₂	11	20	
N ₃	4	15	
M stage			
M ₀	63	99	0.019
M ₁	0	7	
TNM stage			
I	10	11	0.014
II	21	26	
III	32	62	
IV	0	7	
Family history			
No	42	82	0.065
Yes	21	24	
Histologic grade			
High	4	9	0.388
Moderate	43	60	
Low	16	12	
Vessel invasion			
No	3	11	0.273
Yes	1	8	
Nerve invasion			
No	2	11	0.392
Yes	2	8	

率大致相仿,结合其表达程度与病理分级的相关性,提示 *MMP-9* 基因在外周血中和肿瘤组织局部的表达情况可能存在正相关,但这一假设有待进一步收集相对应的该两种标本进行关联性研究来确定。将 *MMP-9* 基因在外周血的表达与患者临床资料进行分析,发现其与淋巴结转移 ($P=0.039$)、远处转移 ($P=0.019$)及 TNM 分期 ($P=0.014$)显著相关,这些都验证了 *MMP-9* 基因促进肿瘤转移的理论,同时也与之前发表过的研究结果符合^[10,11],提示 *MMP-9* 基因在患者外周血的表达情况在一定程度上可以反映食管癌的侵袭能力。而不同的是,本研究结果显示 *MMP-9*

Table 2 The patients' survival and clinicopathologic characteristics

Variables	n	1-year survival(%)	χ^2	P
Gender				
Male	151	73.8	0.050	0.823
Female	18	78.9		
Age(years)				
<60	83	83.1	1.860	0.173
≥60	86	66.2		
T stage				
T ₁	9	100.0	6.162	0.104
T ₂	30	76.5		
T ₃	118	78.7		
T ₄	4	50.0		
N stage				
N ₀	60	81.4	27.496	0.000
N ₁	58	86.1		
N ₂	31	65.7		
N ₃	19	40.9		
M stage				
M ₀	162	76.4	9.878	0.002
M ₁	7	21.4		
TNM stage				
I	21	95.0	14.291	0.003
II	47	72.9		
III	94	73.1		
IV	7	21.4		
Histologic grade				
High	13	77.8	0.244	0.885
Moderate	103	77.8		
Low	44	77.9		
Family history				
No	124	74.9	0.082	0.775
Yes	45	73.0		
MMP-9				
Positive	106	84.6	4.138	0.042
Negative	63	68.9		

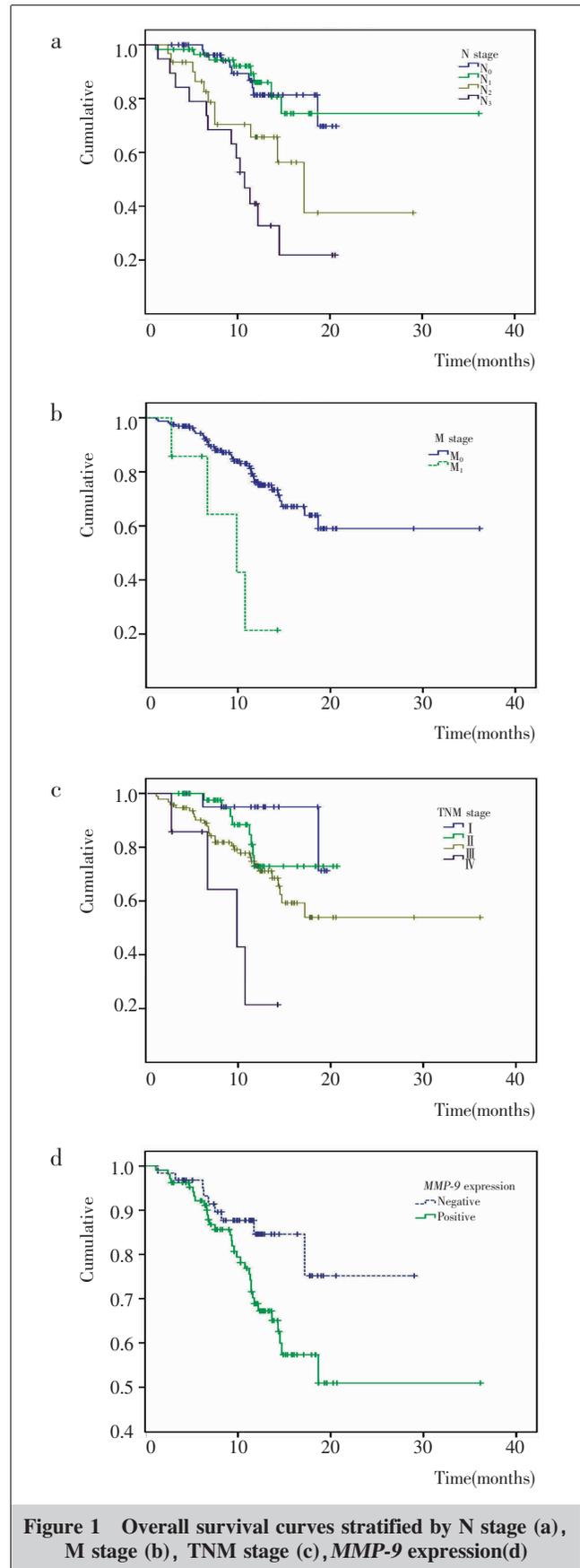


Figure 1 Overall survival curves stratified by N stage (a), M stage (b), TNM stage (c), *MMP-9* expression(d)

不存在与局部浸润、分化程度、脉管瘤栓和神经侵犯的相关性,除主要考虑可能存在取材和资料查询上的误差外,也不排除和国内外病例病理类型不同及诊断的界定差异有关。在预后方面,发现不同临床病理特征分组对患者的 DFS 或 PFS 影响无统计学意义 ($P > 0.05$),提示 *MMP-9* 基因的表达对患者复发没有影响,但这极有可能是目前样本量尚不足、随访时间不够久而致的阴性结果,因从肿瘤生物学的基础理论而言,*MMP-9* 基因的表达如能促进肿瘤转移,与病理分期正相关,则相对较晚的病理分期及局部淋巴结转移等情况将导致肿瘤容易复发,这与目前的分析结果是不一致的,需要再行进一步的研究。患者的 OS 在 *MMP-9* 基因高表达组明显低于低表达组 ($P = 0.042$),这同其他研究在组织上得到的结果是相似的^[11,12],考虑为 *MMP-9* 基因过度表达导致肿瘤发生淋巴结转移和远处转移的概率增加所致,由此我们认为食管癌外周血中 *MMP-9* 的高表达水平可以提示食管癌患者生存上的预后不良。但在 Cox 多因素回归中,仅剩 N 分期因素进入方程的结果表明,相对于病理分期而言,外周血 *MMP-9* 表达对预后的预测作用明显不如 N 分期稳健,这可能是受其灵敏度和特异性所限,同时也是可能与未定义其最优化的阳性界值有关。

综上所述,*MMP-9* 基因在外周血的表达情况能反映肿瘤局部和远处转移的状态,可以认为是判定食管癌患者分期的一个可靠指标,能为临床医生选择术后的进一步诊疗方案提供参考。*MMP-9* 基因在外周血表达和肿瘤局部的具体关系如何?能否把 *MMP-9* 基因作为一个治疗的靶点?这些都还有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [2] Esophageal Professional Committee of the Chinese Anti-Cancer Association. Clinical practice guidelines for diagnosis and treatment of esophageal cancer [M]. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2011. [中国抗癌协会食管癌专业委员会. 食管癌规范化诊治指南[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2011.]
- [3] Fan YJ, Song X, Li JL, et al. Esophageal and gastric carcinoma cancers on 4238 Chinese patients residing in municipal and rural regions: a histopathological comparison during 24-year period [J]. World J Surg, 2008, 32(9):1980-1988.
- [4] Wang YZ, Wu JN, Sun RQ, et al. Expression of MMP-9 and MMP-9 mRNA in esophageal carcinoma and its correlation with antioncogene p53 [J]. Journal of Jiangsu University (Medicine Edition), 2005, 15(2):113-116. [王永忠, 吴建农, 孙瑞清, 等. 食管癌中 MMP-9 及其 mRNA 的表达与肿瘤抑制基因 p53 表达的关系[J]. 江苏大学学报(医学版), 2005, 15(2):113-116.]
- [5] Chan SM, Ou XL, Sun WH, et al. Expression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human esophageal squamous cell carcinoma and its correlation with angiogenesis [J]. World Chinese Journal of Digestology, 2009, 17(22):2259-2265. [产松苗, 欧希龙, 孙为豪, 等. COX-2 和 MMP-9 在食管鳞癌组织中的表达及其与血管生成的关系等[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(22):2259-2265.]
- [6] Yang JM, Xu Z, Wu H, et al. Overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in multidrug resistant cancer cells [J]. Mol Cancer Res, 2003, 1(6):420-427.
- [7] Wu J, Zhang L, Luo H, et al. Association of matrix metalloproteinases-9 gene polymorphisms with genetic susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma [J]. DNA Cell Biol, 2008, 27(10):553-557.
- [8] Herszenyi L, Hritz I, Pregon I, et al. Alterations of glutathione S-transferase and matrix metalloproteinase-9 expressions are early events in esophageal carcinogenesis [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(5):676-682.
- [9] El-Kenawy AM, Lotfy M, El-Kott A, et al. Significance of matrix metalloproteinase 9 and CD34 expressions in esophageal carcinoma: correlation with DNA content [J]. J Clin Gastroenterol, 2005, 39(9):791-794.
- [10] Li Y, Ma J, Guo Q, et al. Overexpression of MMP-2 and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Dis Esophagus, 2009, 22(8):664-667.
- [11] Gu ZD, Li JY, Li M, et al. Matrix metalloproteinases expression correlates with survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma [J]. Am J Gastroenterol, 2005, 100(8):1835-1843.
- [12] Tanioka Y, Voshida T, Yagawa T, et al. Matrix metalloproteinase-7 and matrix metalloproteinase-9 are associated with unfavourable prognosis in superficial oesophageal cancer [J]. Br J Cancer, 2003, 89(11):2116-2121.